

PERBANDINGAN SENYAWA KUERSETIN DAN KAEMPFEROL PADA RESEPTOR COX-2 SEBAGAI AGEN ANTIKANKER KOLOREKTAL SECARA *IN-SILICO*

Nilasari Indah Yuniati*, Dian Islamiyati, Nur Aini Hidayah Khasanah, Fajar Husen

STIKES Bina Cipta Husada Purwokerto

*e-mail: nila@stikesbch.ac.id

ABSTRAK

Kanker kolorektal (CRC) merupakan kanker paling umum ke tiga dari seluruh kasus kanker di dunia yang menyumbang 9,4% kasus kematian akibat kanker. Salah satu penyebab CRC yang saat ini mulai banyak diketahui adalah adanya overekspresi pada protein COX-2. Kemampuan penghambatan terhadap ekspresi COX-2 baru-baru ini dijadikan dasar dalam pemilihan obat terapi. Senyawa alami seperti kuersetin (kuer) dan kaempferol (kaemp) telah diketahui memiliki potensi sebagai antikanker, namun perlu dilakukan pengujian untuk mengetahui potensinya. Prediksi kemanjuran senyawa kuer dan kaemp sebagai anti-CRC dapat dilakukan dengan menganalisis pola pengikatannya pada COX-2 melalui *docking molecular* secara *in silico*. Penelitian ini bertujuan membandingkan aktivitas penghambatan senyawa kuer dan kaemp terhadap overekspresi protein target COX-2. Pengujian dilakukan melalui tahapan preparasi protein dan ligan, validasi metode, *molecular docking* senyawa kuer dan kaemp dengan COX-2, serta visualisasi ikatan menggunakan aplikasi PyRx. Hasil menunjukkan *binding affinity* kuer pada COX-2 lebih kecil dibanding kaemp pada COX-2 masing-masing sebesar -7,9 kkal/mol dan -7,4 kkal/mol. Dapat disimpulkan bahwa kuer mampu berikatan lebih kuat dan stabil dengan COX-2 sehingga diprediksi memiliki efek anti-CRC lebih kuat dibanding kaemp.

Kata Kunci: *In Silico*, Kanker Kolorektal, Kuersetin, Kaempferol, COX-2

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer of all cancer and accounts cases in the world for 9.4% of cancer-related deaths. One of the familiar causes of CRC is the overexpression of COX-2 protein. The ability to inhibit COX-2 expression has recently been used as the basis for selecting anticancer therapy drugs. Natural compounds such as quercetin (quer) and kaempferol (kaemp) have been known to have anticancer potential. Predicting the efficacy of kuer and kaemp compounds as anti-CRC can be done by analyzing their binding pattern to COX-2 through *in silico* molecular docking. This study is aimed to compare the inhibitory activity of kuer and kaemp compounds against COX-2 overexpression. The tests were carried out through the steps of protein and ligand preparation, method validation, molecular docking of quer and kaemp compounds with COX-2, and bond visualization using the PyRx application. The results showed that the binding affinity of quer on COX-2 was lower than kaemp on COX-2, respectively -7.9 kcal/mol and -7.4 kcal/mol. It can be concluded that quer can bind more strongly and stably with COX-2, so that it is predicted to have a stronger anti-CRC effect than kaemp.

Keywords: *In Silico*, Colorectal Cancer, Quercetin, Kaempferol, COX-2

PENDAHULUAN

Kanker kolorektal (CRC) menempati urutan ke tiga dari seluruh kasus kanker di dunia dan menjadi penyebab 9,4% kematian akibat kanker pada tahun 2020 (Neamtu *et al.*, 2022). Berdasarkan data GLOBOCAN (2020), angka kejadian CRC di Indonesia tercatat sebanyak 396.914 kasus baru dengan 234.511 kasus kematian dan menduduki urutan terbanyak ke empat dari seluruh jenis kasus kanker.

Secara etiologi, CRC disebabkan oleh adanya tumor maligna pada jaringan epitel rektum atau kolon yang menyebar ke bagian tubuh lain. Faktor penyebab CRC di antaranya kebiasaan merokok, konsumsi alkohol, *western diet*, kurangnya aktivitas fisik, perubahan genetik, dan overekspresi *cyclooxygenase-2* (COX-2). Di antara faktor-faktor pemicu tersebut, tercatat bahwa sebagian besar kasus CRC berkaitan erat dengan overekspresi COX-2. Peningkatan kadar protein COX-2 ditemukan di sebagian besar adenokarsinoma kolorektal dibanding pada mukosa normal yang berdekatan secara histologis. Overekspresi COX-2

akan disertai dengan peningkatan sintesis prostaglandin E₂ (PGE₂) yang menyebabkan peningkatan proliferasi sel dan invasi sel kanker epitel yang pada akhirnya dapat mempengaruhi kemanjuran terapi antikanker (Sheng *et al.*, 2020).

Pilihan pengobatan CRC dengan pembedahan, kemoterapi, dan radioterapi selama ini banyak dilakukan untuk terapi pasien CRC karena dinilai memiliki dampak besar dalam pengobatan CRC. Akan tetapi, muncul beberapa permasalahan baru akibat terapi tersebut, seperti resistensi obat dan toksisitas yang belum dapat teratasi hingga saat ini. Oleh karena itu, agen terapi yang berasal dari produk alami saat ini dianggap sebagai alternatif paling aman untuk pengobatan CRC, yang dapat memperbaiki indikasi dan kualitas hidup pasien dengan CRC (Nejabati & Roshangar, 2022).

Beberapa senyawa alami telah terbukti memiliki potensi dalam menghambat jalur pensinyalan sel kunci pada kejadian tumorigenesis, termasuk COX-2, yang akhir-akhir ini banyak digunakan baik tunggal

maupun dengan kombinasi bersama agen kemoterapi yang ada.

Flavonoid merupakan golongan senyawa aktif dengan potensi terapeutik yang banyak terdapat di alam dan sudah terbukti aktivitasnya sebagai antikanker. Kuersetin (kuer) dan kaempferol (kaemp) adalah dua senyawa turunan flavonoid golongan flavonol yang paling banyak dipelajari bioaktivitasnya. Kuersetin dan turunannya bekerja pada banyak sel target yang terlibat dalam fase inisiasi dan progresi karsinogenesis CRC. Aktivitas anti-karsinogenik kuersetin meliputi penghambatan proliferasi dan pertumbuhan sel, penghentian siklus sel, induksi apoptosis, pengurangan ukuran tumor, penurunan jumlah nodul tumor, penekanan metastasis, penurunan inflamasi, penurunan *reactive oxygen species* (ROS), dan penurunan *multidrug resistant* (Neamtu *et al.*, 2022). Sedangkan kaempferol, telah diketahui mampu menekan perkembangan dan progresivitas kanker melalui aksinya sebagai antioksidan dan anti-inflamasi (Imran *et al.*, 2019).

Berkaitan dengan hal tersebut, penelitian ini mencoba memprediksi kemanjuran senyawa kuersetin dan kaempferol yang telah diketahui memiliki aktivitas anti-CRC, dengan menganalisis pola pengikatannya pada COX-2. Penelitian akan melakukan prediksi perbandingan aktivitas penghambatan senyawa kuersetin dan kaempferol terhadap overekspresi COX-2 dengan *molecular docking* secara *in silico*, dengan melihat nilai afinitas ikatan dari protein COX-2 dengan ligan kuersetin dan kaempferol, serta melihat ikatan yang dihasilkan.

METODE PENELITIAN

BAHAN

Bahan yang digunakan pada studi ini meliputi struktur protein COX-2 (*protein data bank/PDB* id: 6COX) yang diunduh dari PDB <http://www.rscb.org>, kemudian dipreparasi menggunakan program aplikasi *Discovery Studio*. Ligan senyawa kuersetin dan kaempferol diunduh melalui <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

ALAT

Seperangkat komputer dengan Windows 9, 64 bit. Adapun perangkat

lunak pada penelitian ini berupa *PharmMapper* yang diakses melalui <http://www.lilab-ecust.cn/PharmMapper/>, PubChem yang diakses melalui <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, RCSB PDB yang diakses pada (<https://www.rcsb.org/>), aplikasi PyRx 0.8 dan aplikasi *Discovery Studio Visualizer*.

METODE PENELITIAN

Preparasi Protein Reseptor

Preparasi protein COX-2 dilakukan sebelum simulasi *docking molecular* dengan menggunakan aplikasi *Discovery Studio*. Aplikasi ini digunakan untuk menghilangkan atau memisahkan *native ligand* dan residu berupa molekul air dengan cara mengklik residu-residu yang akan dihilangkan, lalu klik *delete*, kemudian *file* disimpan dalam bentuk PDB.

Preparasi Ligan

Preparasi ligan struktur 3D dari senyawa kuer dan kaemp dilakukan menggunakan aplikasi PyRx 0.8 dengan sistem *Open Babel* dengan cara membuka ligan yang akan digunakan, lalu klik kanan pada ligan,

pilih *minimize selected* maka ligan akan otomatis terminimalisasi energinya. Selanjutnya, klik kanan dan pilih *convert selected to AutoDock ligand* (pdbqt) maka ligan akan secara otomatis masuk.

Validasi Metode *Molecular Docking*

Validasi metode dilakukan dengan melakukan *docking* ulang *native ligand* protein yang sudah dihilangkan *native ligand*-nya menggunakan *AutoDock*. Parameter yang digunakan yaitu nilai *root mean square distances* (RMSD). Jika nilai $\text{RMSD} \leq 3 \text{ \AA}$, maka metode *molecular docking* yang digunakan valid dan penambatan ligan pada protein dapat dilakukan (Jain & Nicholls, 2008).

***Molecular Docking* Senyawa Kuer dan Kaemp dengan COX-2**

Senyawa kuer dan kaemp hasil preparasi kemudian di-*docking*-kan pada COX-2 yang telah dihilangkan *native ligand*-nya dengan aplikasi PyRx 0.8, menggunakan sistem *Vina Wizard*. Hasil akan secara otomatis tersajikan pada tabel *analyze result*. Klik *ligand out* yang memiliki *binding affinity* terendah, selanjutnya klik

molecule pada tabel navigator. Pilih *ligand out* yang telah diklik pada tabel *analyze result*, lalu klik kanan *save as* untuk menyimpan hasil dalam bentuk PDB.

Visualisasi Ikatan

Ikatan antara ligan dan protein yang memiliki nilai *binding affinity* terkecil divisualisasi menggunakan program aplikasi *Discovery Studio Visualizer* dengan cara membuka ikatan tersebut, selanjutnya interaksi ligan dilihat secara 3D dan 2D.

Analisis Data

Data hasil *molecular docking* adalah energi ikatan (*binding affinity*). Nilai *binding affinity* menunjukkan kekuatan interaksi antara ligan dan protein. Semakin kecil nilai *binding affinity*, maka ikatan yang dihasilkan semakin kuat dan stabil.

HASIL DAN PEMBAHASAN

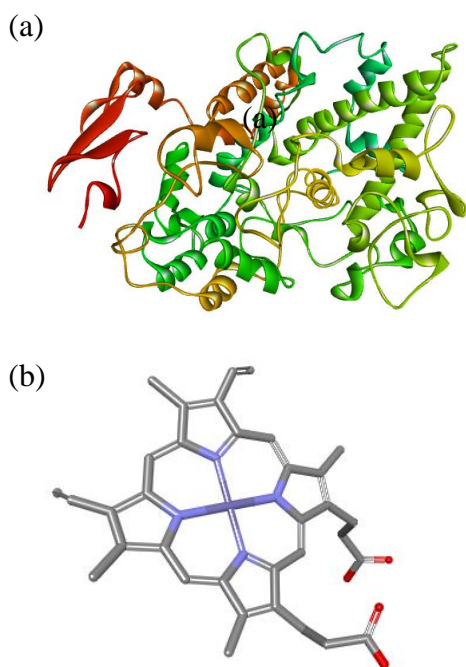
Protein COX-2 memainkan peran penting dalam perkembangan CRC melalui peningkatan proliferasi sel yang bermutasi dan mempengaruhi apoptosis sel. Reseptor COX-2 juga diketahui memainkan peran penting dalam kemanjuran terapi antikanker.

Penelitian ini berfokus pada kemanjuran senyawa kuer dan kaemp sebagai turunan flavonoid, yang dapat memodulasi regulasi *multistep* ekspresi gen COX-2 melalui analisis pola pengikatan dengan *molecular docking*.

Preparasi Protein

Proses *molecular docking* diawali dengan memisahkan *native ligand* dari struktur protein menggunakan *Discovery Studio*, sehingga diperoleh struktur COX-2 tanpa *native ligand* dan struktur *native ligand* yang terpisah seperti pada Gambar 1.

Pada proses preparasi, dilakukan penghilangan molekul air dan residu lainnya agar tidak mengganggu simulasi *docking*, sehingga dapat dipastikan bahwa yang benar-benar berinteraksi adalah ligan reseptor. Selain itu, dilakukan penambahan atom hidrogen (H) agar terkondisikan suasana *docking* dengan pH mendekati 7.



Gambar 1. (a) Struktur COX-2 tanpa *native ligand*, (b) *native ligand*

Preparasi Ligan

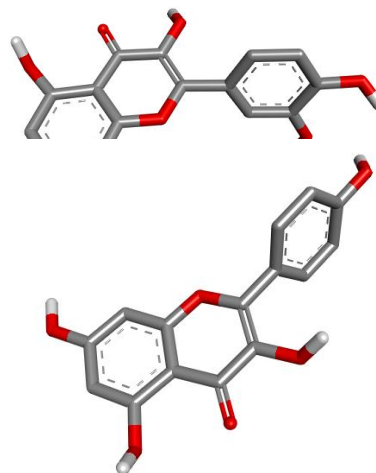
Senyawa kuer dan kaemp digunakan sebagai ligan uji dalam penelitian ini. Terlebih dahulu struktur 3D ligan diunduh dari <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Selanjutnya dilakukan optimasi geometri untuk memperoleh konformasi molekul yang stabil, dengan energi total ikatan paling kecil menggunakan *Open Babel* pada aplikasi PyRx.

Ketika diinput, secara otomatis ligan akan ditambahkan dengan muatan *gasteiger* serta diatur *merge*

nonpolar-nya. Hal ini dilakukan dengan harapan hanya atom H polar yang akan berikatan dengan residu protein.

(a)



Gambar 2. (a) Struktur 3D Kuersetin, (b) Struktur 3D Kaempferol

Validasi Metode *Molecular Docking*

Redocking native ligand protein COX-2 terhadap protein COX-2 yang sudah dipreparasi dengan PyRx dilakukan untuk validasi metode *molecular docking*. Parameter yang digunakan yaitu nilai RMSD atau jarak ikatan, menyatakan jarak penyimpangan ikatan *native ligand* dengan protein setelah di-*docking*-kan terhadap posisi ikatan *native ligand* yang sebenarnya (Rastini et al., 2019).

Nilai RMSD yang semakin rendah dapat memprediksi *pose* ligan yang semakin baik karena semakin dekat dengan konformasi *native ligand*. Sedangkan nilai RMSD yang semakin tinggi, menunjukkan perbedaan konformasi yang semakin besar antara *pose* ligan yang diprediksi dengan *native ligand* setelah *redocking*, sehingga semakin besar pula kesalahan prediksi interaksi antara ligan dengan protein reseptor (Candra & Wijaya, 2021). Nilai RMSD pada penelitian ini adalah 0 Å (≤ 3 Å), artinya metode *molecular docking* pada penelitian ini telah tervalidasi dan penambatan senyawa kuer serta kaemp pada COX-2 dapat dilakukan.

Docking Molecular Kueretin dan Kaempferol dengan COX-2

Hasil *docking molecular* senyawa kuer dengan COX-2 dan kaemp dengan COX-2 menghasilkan 9 konformasi ikatan. Selanjutnya dilakukan pemilihan satu konformasi dengan interaksi paling stabil, ditunjukkan oleh nilai *binding affinity* paling rendah.

Model *docking* terbaik dipilih berdasarkan energi terendah, dan konformasi pengikatan yang paling cocok dipilih berdasarkan interaksi ikatan hidrogen antara ligan dan protein di dekat tempat pengikatan substrat. *Pose* energi terendah menunjukkan afinitas pengikatan tertinggi karena energi tinggi menghasilkan konformasi yang tidak stabil (Dash *et al.*, 2015).

Hasil *docking* menunjukkan bahwa *binding affinity* antara kuer dengan COX-2 dan kaemp dengan COX-2 bernilai negatif. Terhadap COX-2, kuer memiliki *binding affinity* yang lebih rendah dibanding kaemp, masing-masing dengan nilai *binding affinity* -7,9 kkal/mol dan -7,4 kkal/mol (Tabel 1). Baik kuer maupun kaemp memiliki nilai *binding affinity* lebih positif pada protein COX-2 dibandingkan *native ligand*. Meskipun demikian, kuer dan kaemp tetap memiliki afinitas pada protein COX-2 karena mampu berikatan dengan COX-2 pada sisi aktifnya.

Nilai *binding affinity* kuer pada COX-2 yang lebih negatif dibandingkan kaemp pada COX-2

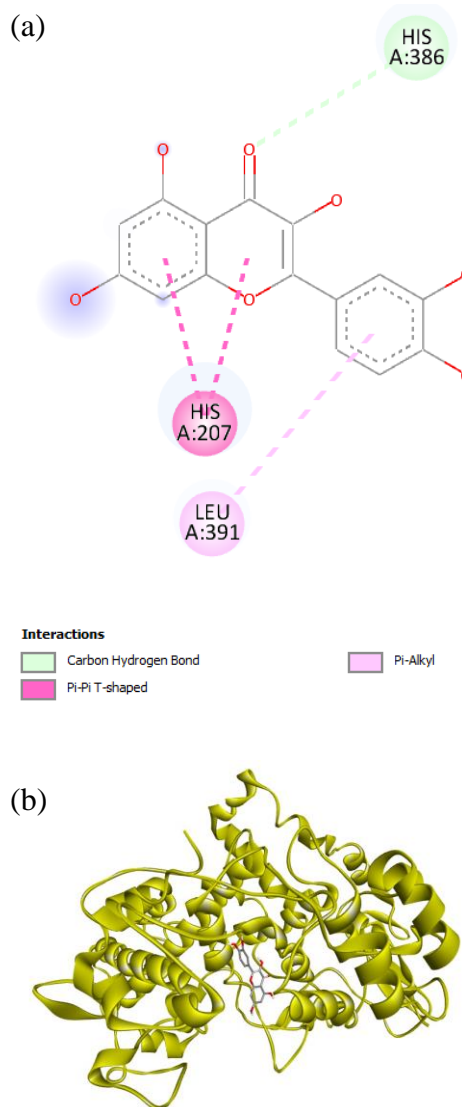
menunjukkan bahwa potensi kuer untuk berikatan dengan sisi aktif COX-2 lebih tinggi dibandingkan dengan kaemp.

Tabel 1. Hasil *Docking Molecular* Senyawa Kuersetin dan Kaempferol pada Reseptor COX-2

Protein	Ligan	Energi Ikatan (kkal/mol)
	<i>Native ligand</i>	-11,4
COX-2	Kuer	-7,9
	Kaemp	-7,4

Visualisasi Ikatan

Senyawa dengan energi ikatan yang lebih rendah, yaitu kuer selanjutnya divisualisasi menggunakan aplikasi *Discovery Studio Visualizer*. Visualisasi ikatan dan analisis hasil *docking* dilakukan untuk melihat interaksi kuer pada COX-2. Hasil visualisasi berupa interaksi residu asam amino dengan ligan. Terjadinya interaksi antar asam amino yang terlibat memungkinkan terjadinya interaksi antara kuer dengan COX-2 sehingga, menggambarkan adanya aktivitas penghambatan. *Binding site* menunjukkan residu-residu asam amino yang berperan penting dalam pembentukan interaksi antara protein dengan ligan (Sari et al., 2020).



Gambar 3. Interaksi Antara Senyawa Kuersetin dengan Reseptor COX-2, (a) Visualisasi 2D, (b) Visualisasi 3D

Berdasarkan hasil *docking* senyawa kuer dengan COX-2, diperoleh 3 residu asam amino yang berikatan, yaitu HIS207, HIS386, dan LEU391. *Binding affinity* antara senyawa kuer dengan COX-2 sebesar

-7,9 kkal/mol membentuk ikatan hidrogen pada residu asam amino HIS386 (Gambar 3).

KESIMPULAN

Dapat disimpulkan bahwa senyawa kuersetin diperkirakan lebih berpotensi sebagai agen anti-CRC dibandingkan dengan kaempferol dengan nilai *binding-affinity* terhadap COX-2 masing-masing sebesar -7,9 dan -7,4. Senyawa kuer dapat berikatan lebih kuat dan stabil dengan COX-2 sehingga diprediksi memiliki efek anti-CRC lebih kuat dibanding kaemp.

DAFTAR PUSTAKA

- Candra, G. N. H., & Wijaya, I. M. A. P. (2021). Molecular Docking Kaempferol sebagai Antiinflamasi pada Aterosklerosis secara In Silico. *Jurnal Ilmiah Medicamento*, 7(1), 13–18. <https://doi.org/10.36733/medicamento.v7i1.1497>
- Dash, R., Uddin, M. M., Hosen, S. M. Z., Rahim, Z. Bin, Dinar, A., Kabir, M., Sultan, R. A., Islam, A., & Hossain, M. K. (2015).

Molecular docking analysis of known flavonoids as dual COX-2 inhibitors in the context of cancer. *Bioinformation*, 11(12), 543–549. <https://doi.org/10.6026/97320630011543>

GLOBOCAN. (2020). World Health Organization International Agency for Research on Cancer (IARC). Indonesia Source: Globocan 2020. https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10_8_9-Colorectum-fact-sheet.pdf

Imran, M., Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Gondal, T. A., Saeed, F., Imran, A., Shahbaz, M., Fokou, P. V. T., Arshad, M. U., Khan, H., Guerreiro, S. G., Martins, N., & Estevinho, L. M. (2019). Kaempferol: A key emphasis to its anticancer potential. *Molecules*, 24(12), 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules24122277>

Jain, A. N., & Nicholls, A. (2008). Recommendations for evaluation of computational methods. *Journal of Computer-Aided*

- Molecular Design*, 22(3–4), 133–139.
<https://doi.org/10.1007/s10822-008-9196-5>
- Neamtu, A., Maghiar, T., Alaya, A., Olah, N., Turcus, V., Pelea, D., Totolici, B. D., Neamtu, C., Maghiar, A. M., & Mathe, E. (2022). A Comprehensive View on the Quercetin Impact on. *Molecules*, 27, 1873.
- Nejabati, H. R., & Roshangar, L. (2022). Kaempferol: A potential agent in the prevention of colorectal cancer. *Physiological Reports*, 10(20), 1–12.
<https://doi.org/10.14814/phy2.15488>
- Rastini, M. B. O., Giantari, N. K. M., Adnyani, K. D., & Laksmiani, N. P. L. (2019). Molecular Docking Aktivitas Antikanker Dari Kuersetin Terhadap Kanker Payudara Secara in Silico. *Jurnal Kimia*, 180.
<https://doi.org/10.24843/jchem.2019.v13.i02.p09>
- Sari, I. W., Junaidin, J., & Pratiwi, D. (2020). STUDI MOLECULAR DOCKING SENYAWA FLAVONOID HERBA KUMIS KUCING (*Orthosiphon stamineus* B.) PADA RESEPTOR α -GLUKOSIDASE SEBAGAI ANTIDIABETES TIPE 2. *Jurnal Farmagazine*, 7(2), 54.
<https://doi.org/10.47653/farm.v7i2.194>
- Sheng, J., Sun, H., Yu, F. B., Li, B., Zhang, Y., & Zhu, Y. T. (2020). The role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *International Journal of Medical Sciences*, 17(8), 1095–1101.
<https://doi.org/10.7150/ijms.44439>