



LAPORAN PENELITIAN

JUDUL PENELITIAN:

**Pendekatan Farmakoinformatika dalam Mengungkap Potensi Multi-Target Gambir
(*Uncaria gambir Roxb.*) terhadap Kanker Kolorektal**

TIM PENELITI :

apt. Fihriani Armin, S.Si., M.Si (0014117602)
apt. Purnawan Pontana Putra, M.Si (0008109102)
Maharani (BP 2111012017)

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS
ANDALAS 2025**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian

: Pendekatan Farmakoinformatika dalam Mengungkap Potensi Multi-Target Gambir (*Uncaria gambir Roxb.*) terhadap Kanker Kolorektal

Tim Peneliti

Ketua Peneliti

a. Nama Lengkap	:	apt. Fitriani Armin, S.Si., M.Si
b. NIDN	:	0014117602
c. Jabatan Fungsional	:	Lektor
d. Prodi, Fak/PPs	:	Farmasi
e. Nomor HP	:	08126620746
f. Alamat surel (e-mail)	:	fitrianiarmin@phar.unand.ac.id

Anggota Peneliti I

a. Nama Lengkap	:	apt. Purnawan Pontana Putra, M.Si
b. NIDN	:	0008109102
c. Jabatan Fungsional	:	Asisten Ahli
d. Prodi, Fak/PPs	:	Farmasi
e. Nomor HP	:	085398212403
f. Alamat surel (e-mail)	:	purnawanpp@phar.unand.ac.id

Anggota Mahasiswa

a. Nama Lengkap	:	Maharani
b. No. BP	:	2111012017
c. Prodi, Fak/PPs	:	Farmasi

Padang, 04 Agustus 2025

Mengetahui,



Ketua Peneliti

apt. Fitriani armin, S.Si., M.Si.
NIP. 197611142006042002

IDENTITAS DAN URAIAN UMUM

Pendekatan Farmakoinformatika dalam Mengungkap Potensi Multi-Target

Gambir (*Uncaria gambir* Roxb.) terhadap Kanker Kolorektal

1. Tim Peneliti : 3 (Tiga) orang

No	Nama	Jabatan	Bidan Keahlian	Fakultas	Alokasi Waktu (jam/minggu)
1.	apt. Fithriani Armin,S.Si, M.Si	Ketua	Kimia Farmasi	Farmasi	10
2.	apt. Purnawan Pontana Putra, M.Si	Anggota	Kimia Farmasi	Farmasi	10
3.	Maharani	Mahasiswa	Farmasi	Farmasi	10

2. Objek Penelitian:

Pendekatan Farmakoinformatika dalam Mengungkap Potensi multi-Target Gambir (*Uncaria gambir* Roxb.) terhadap Kanker Kolorektal

3. Lokasi Penelitian : Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Andalas

4. Temuan yang ditargetkan yaitu:

Mengidentifikasi interaksi antara senyawa bioaktif dalam *Uncaria gambir* Roxb. dan protein yang berperan dalam kanker kolorektal melalui pendekatan network pharmacology yang karakteristik, kekuatan, dan stabilitas interaksi antara senyawa gambir dan residu asam amino pada protein target dianalisis menggunakan metode molecular docking dan molecular dynamics.

5. Kontribusi mendasar pada suatu bidang ilmu

Memberikan dasar ilmiah mengenai mekanisme aksi multi-target senyawa bioaktif *Uncaria gambir* Roxb. terhadap kanker kolorektal melalui pendekatan farmakoinformatika, khususnya dalam pemetaan hubungan senyawa–target, identifikasi interaksi molekuler pada tingkat asam amino, serta evaluasi stabilitas ikatan senyawa–protein. Temuan ini memperkaya pengembangan obat berbasis bahan alam, mendukung penemuan lead compound antikanker, dan memperkuat penerapan pendekatan *in silico* sebagai tahap awal riset dan pengembangan obat dalam ilmu farmasi.

RINGKASAN PENELITIAN

Kanker kolorektal merupakan salah satu kanker paling prevalen di dunia dengan tingkat mortalitas yang masih tinggi, sementara pilihan terapi yang tersedia saat ini relatif terbatas. Kondisi tersebut mendorong eksplorasi sumber obat baru, khususnya dari bahan alam. Gambir (*Uncaria gambir* Roxb.) diketahui kaya akan senyawa bioaktif dan berpotensi dikembangkan sebagai agen antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi potensi antikanker kolorektal gambir melalui pendekatan farmakoinformatika yang terintegrasi. Identifikasi senyawa menunjukkan keberadaan 42 senyawa bioaktif gambir pada basis data CMAUP dan 58 senyawa pada PubMed, sedangkan analisis target mengungkapkan 2.813 protein yang terkait dengan kanker kolorektal. Pendekatan network pharmacology dan enrichment analysis mengidentifikasi AKT1, EGFR, GSK3B, PIK3R1, dan BCL2 sebagai target utama dari 19 senyawa bioaktif gambir yang berperan dalam jalur biologis dan proses molekuler kanker kolorektal. Studi molecular docking berbasis deep learning menunjukkan afinitas ikatan tinggi antara senyawa gambir dan protein target, khususnya gambiriin A1 terhadap AKT1 serta procyanidin B3 terhadap EGFR. Selanjutnya, simulasi molecular dynamics mengonfirmasi stabilitas kompleks AKT1–gambiriin A1 dalam lingkungan biologis. Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa bioaktif gambir memiliki mekanisme aksi multi-target dan berpotensi dikembangkan sebagai kandidat agen antikanker kolorektal.

DAFTAR ISI

IDENTITAS DAN URAIAN UMUM	3
RINGKASAN PENELITIAN.....	4
DAFTAR ISI	5
BAB I PENDAHULUAN	6
BAB II PETA JALAN PENELITIAN	7
BAB III TINJAUAN PUSTAKA	
3.1 <i>Uncaria gambir</i> (Hunter) Roxb	8
3.2 Protein-protein Interaction	10
3.3 Gene Ontology Analysis	11
BAB IV METODE PENELITIAN	
4.1 Alat dan Perangkat Lunak	12
4.2 Tahapan Penelitian	12
4.2.1 Identifikasi Senyawa dari <i>Uncaria gambir</i> Roxb. dan Target protein ..	12
4.2.2 Protein-protein Interaction (PPI)	13
4.2.3 Enrichment Analysis GO dan KEGG	13
4.2.4 Prediksi Sifat Fisikokimia dan ADMET	14
4.2.5 Molecular Docking	14
4.2.6 Molecular Dynamics	14
BAB V HASIL PENELITIAN.....	16
LAMPIRAN	107

BAB I. PENDAHULUAN

Kanker masih menjadi salah satu masalah kesehatan utama di dunia dengan angka kejadian dan kematian yang tinggi. Data WHO menunjukkan bahwa kanker merupakan penyebab utama kematian global, termasuk di Indonesia dengan jumlah kasus yang terus meningkat. Di antara berbagai jenis kanker, kanker kolorektal menempati peringkat ketiga tertinggi dari sisi insiden dan kedua sebagai penyebab kematian, dengan peningkatan kasus yang dipengaruhi oleh faktor genetik, gaya hidup, dan lingkungan.

Terapi kanker kolorektal saat ini, seperti pembedahan, kemoterapi, dan radioterapi, masih memiliki keterbatasan akibat efek samping dan toksisitas yang dapat merusak sel normal. Kondisi ini mendorong pencarian alternatif terapi yang lebih aman dan efektif, salah satunya melalui pemanfaatan bahan alam. Indonesia memiliki keanekaragaman hayati yang sangat besar dan berpotensi sebagai sumber senyawa antikanker baru.

Gambir (*Uncaria gambir* Roxb.) merupakan tanaman obat khas Indonesia yang kaya akan senyawa metabolit sekunder, terutama flavonoid dan alkaloid, dengan katekin sebagai komponen utama. Berbagai studi melaporkan bahwa katekin dan turunannya memiliki aktivitas antioksidan, sitotoksik, dan proapoptosis pada beberapa jenis sel kanker. Meskipun demikian, kajian mengenai potensi antikanker gambir pada kanker kolorektal masih sangat terbatas.

Perkembangan konsep terapi multi-target menjadi pendekatan yang menjanjikan untuk penyakit kompleks seperti kanker. Pendekatan network pharmacology memungkinkan analisis interaksi senyawa-target-jalur biologis secara sistemik, sehingga lebih mencerminkan mekanisme kerja obat herbal yang bersifat multitarget. Pendekatan ini dikombinasikan dengan enrichment analysis (GO dan KEGG) untuk mengidentifikasi fungsi biologis dan jalur sinyal yang terlibat dalam kanker kolorektal.

Selanjutnya, metode molecular docking dan molecular dynamics digunakan untuk mempelajari afinitas dan stabilitas interaksi antara senyawa bioaktif gambir dan protein target pada tingkat molekuler. Kombinasi pendekatan farmakoinformatika ini diharapkan mampu memberikan gambaran yang komprehensif mengenai mekanisme aksi dan potensi gambir sebagai kandidat agen antikanker kolorektal, serta menjadi dasar pengembangan obat berbasis bahan alam di masa depan.

BAB II. PETA JALAN PENELITIAN

Penelitian ini selaras dengan Renstra Universitas Andalas yang berfokus pada pengembangan obat berbahan alam serta mendukung misi Universitas Andalas sebagai institusi terdepan dalam pengembangan obat dan kosmetik berbasis sumber daya alam. Penelitian dilaksanakan secara bertahap dengan diawali tinjauan literatur sistematis untuk mengidentifikasi publikasi ilmiah yang relevan terkait *Uncaria gambir* Roxb., pengobatan tradisional, dan pendekatan network pharmacology sebagai dasar penentuan senyawa bioaktif dan target biologisnya.

Senyawa aktif gambir diidentifikasi melalui database dan literatur ilmiah, kemudian dikarakterisasi berdasarkan struktur molekul, sifat kimia, dan aktivitas biologisnya. Secara paralel, target biologis yang terkait dengan pemanfaatan tradisional gambir ditentukan dan dianalisis keterkaitannya dengan senyawa aktif yang teridentifikasi.

Selanjutnya, disusun database interaksi senyawa-target untuk memetakan hubungan antara senyawa bioaktif gambir dan target biologisnya, berdasarkan data literatur dan database terkait, guna mendukung pemahaman mekanisme kerja gambir sebagai kandidat obat berbahan alam.

BAB III. TINJAUAN PUSTAKA

3.1 *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb

Uncaria gambir (Hunter) Roxb., yang dikenal sebagai gambir, merupakan tanaman tropis dari famili Rubiaceae yang diperkirakan berasal dari kawasan Asia Tenggara. Tanaman ini tumbuh baik di lingkungan terbuka maupun hutan lembap, termasuk tepi hutan. Gambir mampu beradaptasi pada berbagai jenis tanah dengan pH relatif asam (4,8–5,5), tumbuh optimal pada ketinggian 200–800 mdpl, curah hujan tinggi, serta suhu berkisar 20–36 °C dengan kelembapan 70–85%.

Di Asia Tenggara, gambir banyak ditemukan di Indonesia dan Semenanjung Malaka, dengan persebaran luas di Sumatera, Kalimantan, Jawa, Bali, Maluku, dan Nusa Tenggara. Tanaman ini dikenal dengan beragam nama lokal di setiap daerah, mencerminkan luasnya pemanfaatan dan kedekatan gambir dengan budaya masyarakat setempat, seperti gambee, kacu, sontang, gambie, santun, ghambhir, hingga kampir dan gabere

Secara tradisional, gambir telah lama dimanfaatkan sebagai pelengkap dalam kebiasaan menyirih serta sebagai bahan pengobatan tradisional untuk berbagai keluhan kesehatan ringan, seperti demam, diare, batuk, pilek, sakit kepala, dan gangguan pencernaan. Dalam praktik pengobatan masyarakat, gambir juga digunakan untuk membantu penyembuhan luka, mengatasi infeksi bakteri dan jamur, gangguan saluran cerna, penyakit radang, asma, rematik, hingga berbagai penyakit kronis, termasuk kanker dan diabetes. Manfaat kesehatan tersebut terutama berkaitan dengan kandungan senyawa antioksidan yang terdapat dalam tanaman gambir.

Senyawa katekin sebagai komponen utama gambir berperan dalam menekan stres oksidatif, sehingga berpotensi menurunkan kadar glukosa darah, bersifat antihiperlipidemia, antibesitas, hepatoprotektif, serta mendukung fungsi kognitif. Selain aplikasi di bidang kesehatan, gambir juga banyak dimanfaatkan dalam industri kosmetik sebagai agen antioksidan, pelindung UV, antiaging, dan antiakne. Di bidang farmasi dan pangan, gambir digunakan dalam formulasi sediaan fungsional, nutraceutikal, serta sebagai bahan alami untuk memperpanjang masa simpan produk pangan.

Jalur biosintesis flavonoid pada *Uncaria gambir* Roxb. pertama kali dilaporkan oleh Das dan Griffiths pada tahun 1967. Mereka menjelaskan bahwa pembentukan struktur flavonoid melibatkan kontribusi jalur asetat dan fenilpropanoid, di mana cincin A terbentuk dari kondensasi unit asetil, sedangkan cincin B berasal dari gugus fenil. Studi pelabelan isotop

menunjukkan bahwa katekin pada gambir disintesis melalui jalur $^{14}\text{CO}_2$ dan [1- ^{14}C]-asetat, yang membuktikan keterlibatan kedua jalur tersebut dalam pembentukan struktur katekin. Selanjutnya, pada tahun 1974, Das mengonfirmasi bahwa (+)-catekin dan (-)-epicatekin merupakan flavonoid dominan dalam tanaman gambir.

Katekin merupakan senyawa bioaktif utama gambir dan telah banyak diteliti melalui berbagai metode ekstraksi dan analisis. Isolasi katekin dan epikatekin dilakukan menggunakan ekstraksi air panas, kemudian dianalisis dengan kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC). Penelitian lanjutan menunjukkan bahwa metode ekstraksi menggunakan hot plate pada suhu moderat mampu menghasilkan kadar katekin yang tinggi, mencapai sekitar 80–90%. Selain itu, katekin juga berhasil diperoleh dari ekstrak metanol, etanol, dan etil asetat.

Selain katekin dan epikatekin, gambir mengandung flavonoid lain seperti gallicatechin, epigallocatechin, dan epicatechin gallate. Senyawa-senyawa tersebut berhasil diidentifikasi dan diisolasi dari ekstrak etil asetat menggunakan teknik RP-HPLC, memperkuat bukti bahwa gambir merupakan sumber flavonoid dengan kandungan katekin yang tinggi dan beragam.

Alkaloid pada *Uncaria gambir* Roxb. pertama kali dilaporkan pada tahun 1934 dengan ditemukannya senyawa gambirine, yang kemudian dijelaskan oleh Pavolini dkk. sebagai hasil ekstraksi dari fraksi tanin dengan perkiraan rumus molekul $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$. Penelitian lanjutan oleh Merlini dkk. pada tahun 1967 berhasil mengidentifikasi beberapa alkaloid lain dari ekstrak air daun dan batang gambir menggunakan teknik kromatografi, di antaranya gambirtanin, dihidrogambirtanin, oksogambirtanin, neooksigambirtanin, serta isogambirdine.

Pada tahun 1970, analisis ekstrak metanol daun gambir oleh Merlini dkk. menunjukkan keberadaan alkaloid baru yang terdeteksi melalui uji KLT dengan pereaksi serum sulfat. Pemisahan menggunakan kromatografi silika gel mengungkap lima alkaloid utama, yaitu roxburghine A, B, C, D, dan E. Selain itu, pada bagian batang tanaman ditemukan alkaloid tetrahydroalstonine dan dihydrocorynantheine. Penelitian selanjutnya juga melaporkan isolasi senyawa uncariagambiriine dari daun gambir, serta penemuan dua alkaloid baru, yaitu uncariagambiriines B dan C, yang memperkaya profil alkaloid tanaman gambir.

Selain flavonoid dan alkaloid, gambir juga mengandung berbagai senyawa fenolik bebas dan poliol siklik. Senyawa fenolik yang telah diidentifikasi meliputi pirokatekol, phloroglucinol, serta sejumlah turunan fenol bermetoksi dan bermethyl, sedangkan asam kuinat dilaporkan sebagai senyawa poliol siklik utama. Keberadaan senyawa-senyawa ini memperkaya profil fitokimia gambir dan berkontribusi terhadap aktivitas biologisnya.

Beberapa penelitian telah mengonfirmasi keberadaan senyawa tersebut melalui berbagai metode analisis. Pirokatekol berhasil diisolasi dari ekstrak air dan dikarakterisasi menggunakan XRD, sementara phloroglucinol diperoleh dari ekstrak asam asetat dan dianalisis dengan GC–MS. Selain itu, analisis LC–MS/MS menunjukkan bahwa asam kuinat merupakan salah satu komponen utama dalam gambir, menegaskan kompleksitas kandungan fenolik tanaman ini.

3.2 Protein-potein Interaction

Protein merupakan biomolekul utama penyusun sel yang berperan penting dalam berbagai proses biologis, seperti katalisis enzimatik, transport, penyimpanan, dan pembentukan struktur membran. Fungsi biologis sel tidak hanya ditentukan oleh protein secara individual, tetapi juga oleh kemampuannya berinteraksi dengan biomolekul lain, khususnya antarprotein. Interaksi protein–protein (*protein–protein interaction*, PPI) menjadi dasar terbentuknya sistem biologis yang kompleks dan menentukan regulasi fungsi seluler.

PPI mencerminkan hubungan fungsional antara dua atau lebih protein yang dapat bersifat stabil maupun sementara, serta terlibat dalam berbagai proses biologis penting, seperti metabolisme, transduksi sinyal, transkripsi dan replikasi DNA, respons imun, serta regulasi siklus sel. Gangguan pada jaringan PPI dapat menyebabkan disfungsi sel dan berkontribusi terhadap terjadinya berbagai penyakit, termasuk kanker dan penyakit degeneratif. Oleh karena itu, analisis jaringan PPI sangat penting untuk memahami mekanisme molekuler suatu penyakit dan mengidentifikasi target potensial dalam pengembangan obat.

Pendekatan biologi komputasi memungkinkan visualisasi dan analisis jaringan PPI secara sistematis, termasuk kekuatan dan pola interaksi antarprotein. Meskipun berbagai metode eksperimental telah dikembangkan untuk mempelajari PPI, teknik-teknik tersebut umumnya membutuhkan biaya tinggi, waktu lama, serta berpotensi menghasilkan data positif atau negatif palsu. Selain itu, metode eksperimental hanya mampu merepresentasikan sebagian kecil dari keseluruhan jaringan PPI yang ada.

Untuk mengatasi keterbatasan tersebut, pendekatan komputasi digunakan dalam prediksi PPI dengan memanfaatkan data urutan dan struktur protein. Metode prediksi PPI secara umum meliputi pendekatan berbasis docking, struktur, dan urutan protein, yang dapat digunakan untuk memperkirakan afinitas pengikatan dan orientasi kompleks protein. Data yang digunakan diperoleh dari berbagai database, seperti UniProt,¹⁰ PDB, dan STRING.

Beberapa database PPI telah dikembangkan untuk mendukung analisis jaringan protein, di antaranya STRING, GeneMANIA, dan ConsensusPathDB. Database STRING banyak digunakan karena menyediakan informasi asosiasi fungsional protein secara komprehensif dengan tingkat kepercayaan yang terukur, serta terintegrasi dengan jalur biologis yang dikurasi, seperti KEGG. Dengan demikian, analisis PPI berbasis komputasi menjadi pendekatan yang efektif dalam memahami sistem biologis dan mendukung penemuan target obat secara rasional.

3.2 Gene Ontology Analisys

Gene Ontology (GO) merupakan proyek kolaboratif internasional yang menyediakan kerangka kerja terstandar untuk mendeskripsikan fungsi biologis komponen genom, termasuk gen, protein, RNA non-coding, dan kompleks molekuler. GO menyajikan anotasi berbasis bukti yang mengaitkan produk gen dengan istilah ontologi tertentu, sehingga memudahkan pemahaman peran biologisnya secara sistematis dan terstruktur.

Analisis GO digunakan untuk mengelompokkan gen berdasarkan fungsi molekuler, lokasi seluler, dan proses biologis yang terlibat, tanpa bergantung langsung pada kesamaan urutan atau struktur protein. Pendekatan ini memungkinkan interpretasi biologis melalui pengayaan istilah GO, serta perbandingan gen secara otomatis menggunakan ukuran semantik. Dengan demikian, analisis GO membantu menjembatani pengetahuan biologis global dengan pemahaman spesifik terhadap fungsi gen pada tingkat molekuler.

Sebagai basis pengetahuan fungsional genom yang komprehensif, GO terdiri atas tiga ontologi utama, yaitu Biological Process (BP), Cellular Component (CC), dan Molecular Function (MF). Untuk mengidentifikasi istilah GO yang diperkaya secara signifikan dalam suatu kumpulan gen, digunakan metode Gene Ontology Enrichment Analysis (GOEA), yang banyak diterapkan dalam analisis data genomik dan transkriptomik berskala besar. Berbagai perangkat dan database, seperti DAVID, gProfiler, GOrilla, GOEAST, serta BinGO, tersedia untuk mendukung pelaksanaan analisis tersebut secara efisien.

BAB IV. METODE PENELITIAN

4.1 Alat dan Perangkat Lunak

4.1.1 Alat

Laptop Asus X44IU Processor CORE i3 with Nvidia Geforce, komputer dengan spesifikasi Processor Ryzen 7 7700 X dan RTX 4060 TI

4.1.2 Perangkat Lunak

CMAUP (<https://bidd.group/CMAUP/>) , PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), Swiss Target Prediction (<http://swisstargetprediction.ch/index.php>), PharmMapper (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper>), GeneCards (<https://www.genecards.org>), DisGeNET (<https://www.disgenet.org>) (47), UniProt (<https://www.uniprot.org>), Venn diagram (<http://www.interactivenn.net/>), DAVID (<http://david.ncifcrf.gov/>), KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>), bioinformatika (<http://bioinformatics.com.cn/en?p=1>), STRINGdb (<https://string-db.org>), Algoritma ClusterOne in Cytoscape 3.10.2., Deep-PK (<https://biosig.lab.uq.edu.au/deeppk/>), PDB (<https://www.rcsb.org>). GNINA, Avogadro, VMD, Pdbfixer, BIOVIA Discovery Studio, Acpype, Gromacs 2024.1, dan xmgrace. *Molecular docking* dan *molecular dynamics* dilakukan dalam sistem Linux.

4.2 Tahapan Penelitian

4.2.1 Identifikasi Senyawa dari *Uncaria gambir* Roxb. dan Target Protein

1. Senyawa dari *U. gambir* Roxb. diidentifikasi pada database CMAUP (*Collective Molecular Activities of Useful Plants*) (<https://bidd.group/CMAUP/>) dan PubMe (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Senyawa yang dipilih yaitu senyawa yang tumpang tindih antara kedua database atau berpotensi sebagai agen antikanker berdasarkan studi literatur.
2. Struktur tiga dimensi (3D) masing-masing kandidat senyawa terpilih diunduh pada database PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).
3. Canonical SMILES (*The Simplified Molecular-Input Line-Entry System*) kandidat senyawa diidentifikasi menggunakan database Swiss Target Prediction (<http://swisstargetprediction.ch/index.php>) untuk menilai potensi interaksinya dengan target protein. Protein yang dipilih yaitu protein dengan nilai probabilitas $\geq 0,8$, dengan menerapkan filter taksonomi “*homo sapiens*”.
4. Target potensial senyawa terpilih ¹²diidentifikasi menggunakan PharmMapper (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper>) . Protein yang dipilih yaitu protein dengan

normalized fit score $\geq 0,8$ sebagai target potensial *U. gambir* Roxb.

4.2.2 Prediksi Protein Target yang Terlibat dalam Kanker Kolorektal

1. Gen target kanker kolorektal diidentifikasi menggunakan *database* GeneCards (<https://www.genecards.org>), DisGeNET (<https://www.disgenet.org>, dan *database* UniProt (<https://www.uniprot.org>).
2. Target tumpang tindih antara senyawa aktif dan protein target kanker kolorektal digambarkan dengan Venn diagram (<http://www.interactivenn.net/>). Target yang tumpang tindih dianggap sebagai target potensial *U. gambir* Roxb. terhadap kanker kolorektal.

4.2.3 Konstruksi Jaringan *Protein-protein Interaction* (PPI)

1. Jaringan PPI dan analisis pengayaan fungsional dilakukan pada target dengan menggunakan STRINGdb (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) (<https://string-db.org>).
2. Data yang diperoleh dibawa ke Cytoscape 3.10.2. Kelompokkan jaringan PPI menggunakan CytoCluster pada Cytoscape berdasarkan algoritma ClusterONE dengan *minimum size* 10, *minimum density* 0,5, dan *seeding method from every node*.
3. Klaster dengan *p-value* terendah dijadikan sebagai klaster signifikan dari target kanker kolorektal.
4. Protein dari klaster signifikan diurutkan berdasarkan kriteria *betweenness*, *degree*, dan *closeness* pada aplikasi Cytoscape.

4.2.4 Enrichment Analysis Gene Ontology (GO) dan Kyoto Encyclopaedia of Gene and Genomes (KEGG)

1. *Enrichment analysis* target potensial dari klaster signifikan dianalisis menggunakan *platform* DAVID (<http://david.ncifcrf.gov/>) untuk menyelidiki anotasi fungsional pada *U. gambir* Roxb. *Enrichment analysis* fungsi GO meliputi *Biological Process* (BP), *Cellular Component* (CC), dan *Molecular Function* (MF).
2. Analisis *pathway* dilakukan pada platform KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>).
3. Ambang batas untuk menentukan perbedaan signifikan ditetapkan pada $P < 0,05$ dengan taksonomi *homo sapiens*.
4. Hasil analisis diplot dan divisualisasikan menggunakan platform bioinformatika yang dapat diakses di SRplot (<http://bioinformatics.com.cn/en?p=1>).

4.2.5 Prediksi Sifat Fisikokimia dan Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, Ekskresi, dan Toksisitas (ADMET)

1. Analisis sifat fisikokimia dan ADMET dilakukan pada *database* Deep-PK (<https://biosig.lab.uq.edu.au/deppk/>).
2. Struktur tiga dimensi (3D) dari masing-masing kandidat senyawa diunggah pada platform Deep-PK untuk menganalisis sifat fisikokimia dan toksisitas dari senyawa.
3. Parameter yang dipilih adalah *Human Intestinal Absorption* (HIA), Caco2, *Blood-Brain Barrier* (BBB), CYP inhibitor (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, dan CYP3A4), *clearance*, mutagenesis AMES, karsinogenesis, penghambatan hERG, *liver Injury* I dan II, gangguan sistem pernapasan, dan sensitisasi kulit.

4.2.6 Molecular Docking

1. *Molecular docking* dilakukan pada setiap kandidat senyawa yang berpotensi sebagai agen antikanker kolorektal menggunakan perangkat lunak GNINA yang berbasis deep learning.
2. Struktur kandidat senyawa dioptimalkan dengan metode optimasi mekanika molekuler berdasarkan medan gaya Merck Molecular Force Field (MMFF94) menggunakan Avogadro.
3. Struktur kristal sinar-X dari target yang akan disimulasikan diunduh dari Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>).
4. Sequence gaps dari structure manipulation dianalisis dengan software Visual Molecular Dynamics (VMD) dan untuk memperbaiki missing residue dari struktur protein digunakan pdbfixer.
5. Protein rigid digunakan dalam docking dan molekul air dihilangkan pada tahap preparasi. Protokol ini menambatkan antara native ligand dengan kompleks protein molekuler dan nilai RMSD yang diketahui digunakan sebagai validasi metode docking.
6. Analisis kemiripan pengikatan antara native ligand dan senyawa uji dapat diketahui dari energi pengikatan CNN affinity, CNN pose score, dan interaksi asam amino.

4.2.7 Molecular Dynamics

1. Preparasi protein dilakukan dengan pdbgmxt pada software Gromacs dan preparasi ligand dengan software Acyppe.
2. Proses ionisasi dilakukan dengan menggunakan NaCl pada konsentrasi 0,15M. Protein dan ligand dipreparasi dengan medan gaya AMBER99SB-ILDN dan model air

yang digunakan yaitu model TIP3P.

3. *Proses equilibrasi dengan Canonical NVT ensambel (Volume Temperatur) dan simulasi produksi dengan NPT ensamble (Tekanan dan Temperatur) dilakukan dengan suhu 310 K. Simulasi molecular dynamics dilakukan dengan perangkat lunak Gromacs 2024.1 dengan total waktu 100 ns (60) (61).*

BAB V. HASIL PENELITIAN

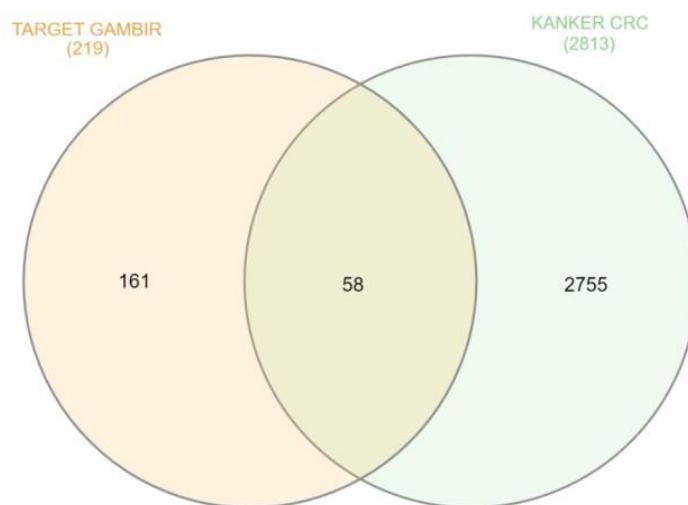
Penelitian dengan pendekatan farmakoinformatika atau *in silico* ini dilakukan untuk mengetahui interaksi dan potensi dari senyawa yang terkandung dalam tanaman gambir (*Uncaria gambir* Roxb.) dengan protein target kanker kolorektal. Pendekatan *in silico* ini merupakan metode komputasi yang dapat digunakan dalam penemuan dan pengembangan obat. Studi *in silico* yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi *network pharmacology*, *protein-protein interaction*, prediksi sifat fisikokimia dan ADMET, *molecular docking*, dan *molecular dynamics*.

1.1 Identifikasi Senyawa dan Target Protein

Senyawa atau metabolit yang terkandung dalam tanaman gambir diidentifikasi menggunakan *database* CMAUP (*Collective Molecular Activities of Useful Plants*) dan PubMed. Berdasarkan hasil identifikasi kandungan metabolit dari gambir ditemukan sebanyak 42 senyawa dari *database* CMAUP dan 58 dari *database* PubMed (**Lampiran 1, Tabel 1**, halaman 115). CMAUP merupakan *database* yang menyediakan berbagai informasi tentang target, tingkat aktivitas, gen ontologi, proses biologi, dan penyakit (43). *Database* ini memuat lebih kurang 7.865 jenis tamanan, dimana 2.954 diantaranya termasuk tanaman obat yang digunakan di 79 negara/wilayah. Sedangkan PubMed merupakan *database* yang memuat berbagai literatur dan kutipan yang berhubungan dengan data biomedis dan kesehatan, beberapa disiplin ilmu seperti ilmu hayati, perilaku, kimia, dan bioteknologi.

Kandungan metabolit dari gambir yang dilanjutkan sebagai senyawa uji dipilih berdasarkan hasil tumpang tindih dari kedua *database* dan ditemukan sebanyak 13 senyawa (**Lampiran 1, Gambar 1**, halaman 118). Selain itu, pemilihan senyawa uji juga didasarkan pada studi literatur terhadap senyawa yang berperan sebagai antikanker. Secara keseluruhan, senyawa yang dipilih sebagai senyawa uji berjumlah 19 diantaranya (-)-catechin, (-)-epicatechin, (+)-catechin,

(+)-epicatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin, gallicatechin, catechol, gambiriin A1, gambiriin A2, gambiriin B1, gambiriin B2, gambiriin C, gambirine, procyanidin B1, procyanidin B2, procyanidin B3, quercetin, dan roxburghine B.

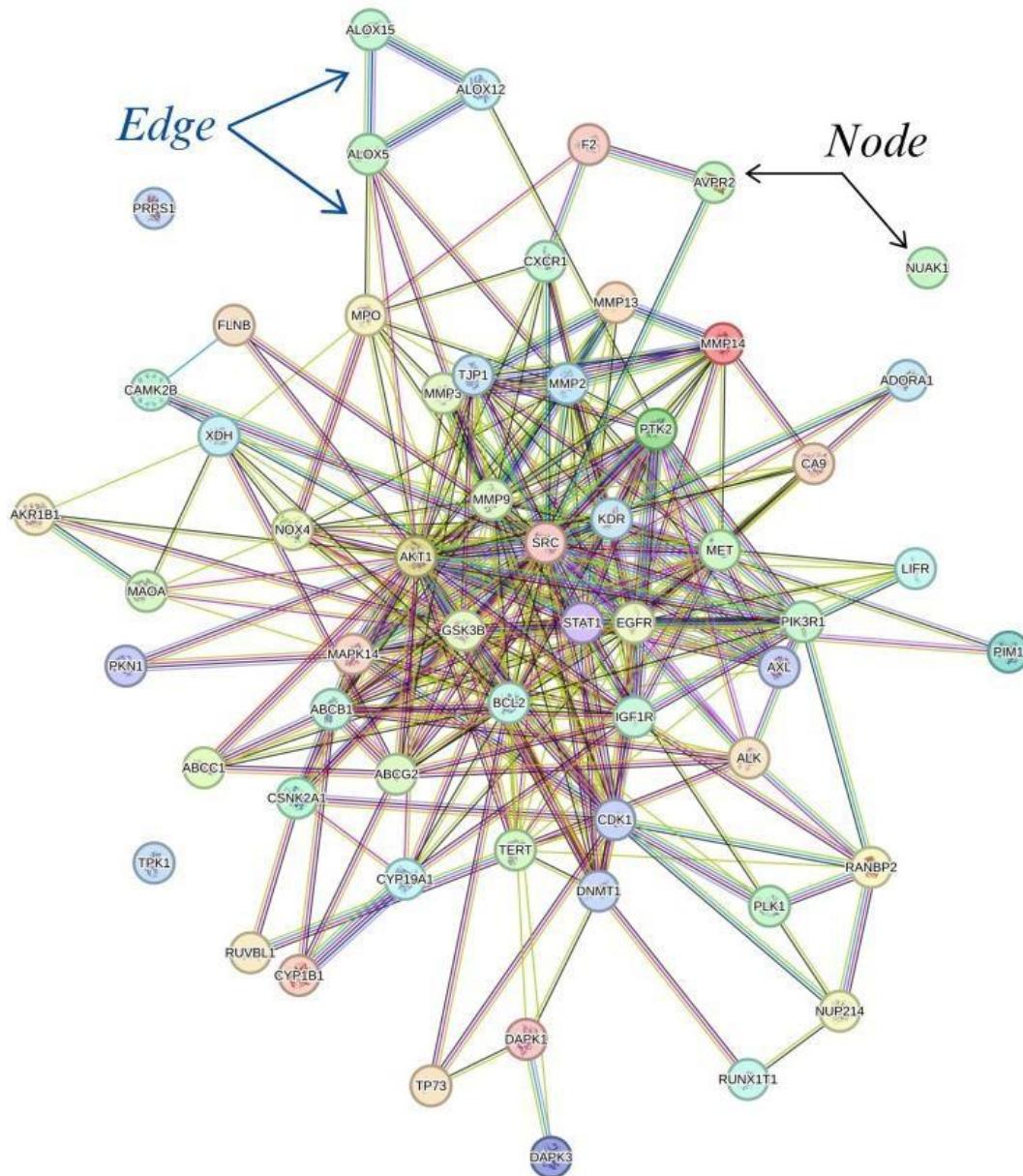


Gambar 4.1 Venn Diagram Target Potensial *U. gambir* Roxb. terhadap Kanker Kolorektal. Hasil ven diagram menunjukkan terdapat 58 protein yang tumpang tindih antara protein yang menjadi target senyawa (219 target) dengan protein yang terlibat dalam kanker kolorektal (2.813 protein).

Senyawa yang dipilih diidentifikasi menggunakan *database Swiss Target Prediction* dan *PharmMapper*. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui protein yang dapat menjadi target dari senyawa uji *U. gambir* Roxb. dan didapatkan hasil sebanyak 219 protein. Sementara itu, protein yang terlibat pada penyakit kanker kolorektal diidentifikasi menggunakan beberapa *database* diantaranya GeneCards, DisGeNET, dan UniProt. Hasil identifikasi target protein terhadap kanker kolorektal ditemukan sebanyak 2.813 target, dimana sebanyak 1.146 target diperoleh dari GeneCards, 880 dari DisGeNET, dan 1.457 dari UniProt (dapat diakses melalui platform GitHub : <https://github.com/r-rni/Lampiran/blob/main/Targets%20colorectal%20cancer.xlsx>). **Gambar 4.1** menunjukkan bahwa terdapat 58 protein target yang berpotongan atau tumpang tindih antara senyawa uji gambir dengan protein kanker kolorektal (**Lampiran 2, Tabel 4**, halaman

126). Hasil perpotongan ini merupakan target potensial dari *U. gambir* Roxb. terhadap kanker kolorektal.

1.2 Protein-protein Interaction (PPI)



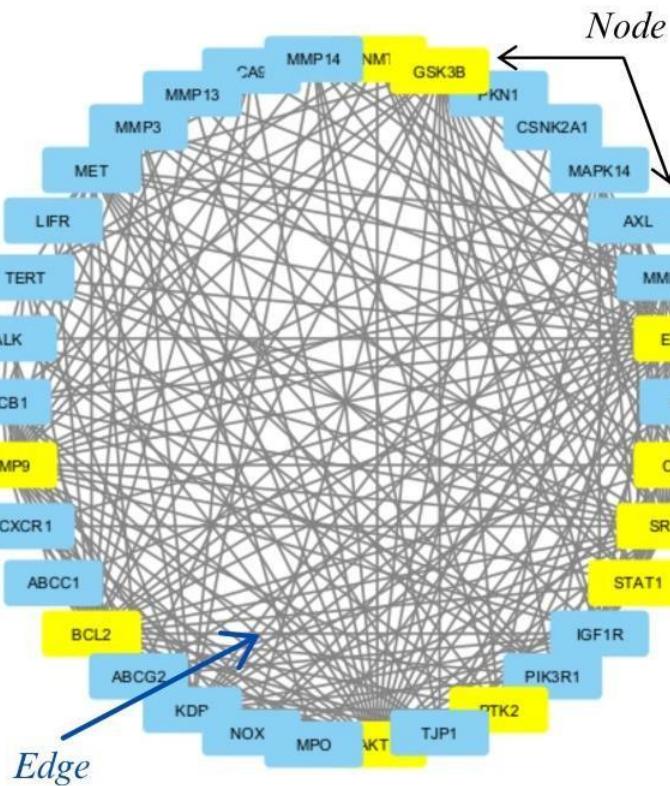
Gambar 4.2 Jaringan Protein-protein Interaction (PPI) dari Target Potensial. Jaringan PPI target potensial dari *U. gambir* Roxb. terhadap kanker kolorektal menghasilkan sebanyak 58 node dan 301 edge. Dalam jaringan PPI node merupakan protein dan edge merupakan koneksi atau interaksi yang terjadi pada suatu node (protein) terhadap node lainnya.

Protein dapat berinteraksi atau saling berhubungan satu sama lainnya, terutama pada penyakit kompleks seperti kanker. Interaksi yang terjadi antar protein pada target potensial gambir diketahui berdasarkan jaringan PPI (*Protein-protein Interaction*). Pembangunan jaringan PPI dilakukan dengan *database* STRINGdb. Jaringan PPI yang terbentuk dapat dilihat pada **Gambar 4.2** (halaman 37). Berdasarkan interaksi dan pembangunan jaringan PPI dari 58 target potensial ditemukan sebanyak 58 *node* dan 301 *edge*.

Tabel 4.1 Klaster Berdasarkan Alogoritma ClusterOne

<i>Cluster</i>	<i>Node</i>	<i>Edge</i>	<i>Density</i>	<i>p-value</i>
1	34	235	0.4189	0.0000000000000000
2	28	189	0.5000	0.00000000972774

Hasil dari STRINGdb kemudian dibawa ke Cytoscape untuk menentukan klaster signifikan dari jaringan PPI. Klaster signifikan ditentukan menggunakan algoritma ClusterONE. Algoritma ClusterONE bertujuan untuk menentukan kelompok jaringan yang mempunyai *score* interaksi pada protein-protein yang signifikan berdasarkan kesamaan fungsi dan proses biologis (62). Dalam jaringan PPI ini diperoleh 2 klaster, yaitu klaster 1 dan klaster 2. Klaster signifikan dipilih berdasarkan klaster dengan *p-value* terkecil. **Tabel 4.1** menunjukkan bahwa klaster 1 memiliki *p-value* terkecil. Oleh karena itu, klaster 1 dapat digunakan dalam analisis jaringan untuk menentukan protein yang terlibat secara signifikan dalam kanker kolorektal. Semakin kecil *p-value* klaster yang dihasilkan dalam jaringan PPI maka prediksi keberadaan protein yang berpengaruh akan semakin besar (63).



Gambar 4.3 Jaringan PPI dari Klaster Signifikan. Jaringan PPI dari 34 protein pada klaster signifikan (klaster 1) menghasilkan sebanyak 34 *node* dan 235 *edge*. *Node* berwarna kuning menunjukkan 10 protein teratas yang diurutkan berdasarkan *degree*. Protein yang terdapat pada klaster 1 diantaranya adalah AKT1, BCL2, EGFR, SRC, MMP9, GSK3B, KDR, MMP2, MET, IGF1R, STAT1, PTK2, CDK1, ABCB1, ABCG2, PIK3R1, TJP1, TERT, MAPK14, MMP14, NOX4, DNMT1, MPO, MMP3, AXL, ALK, CXCR1, MMP13, CA9, CSNK2A1, LIFR, ABCC1, PIM1, dan PKN1.

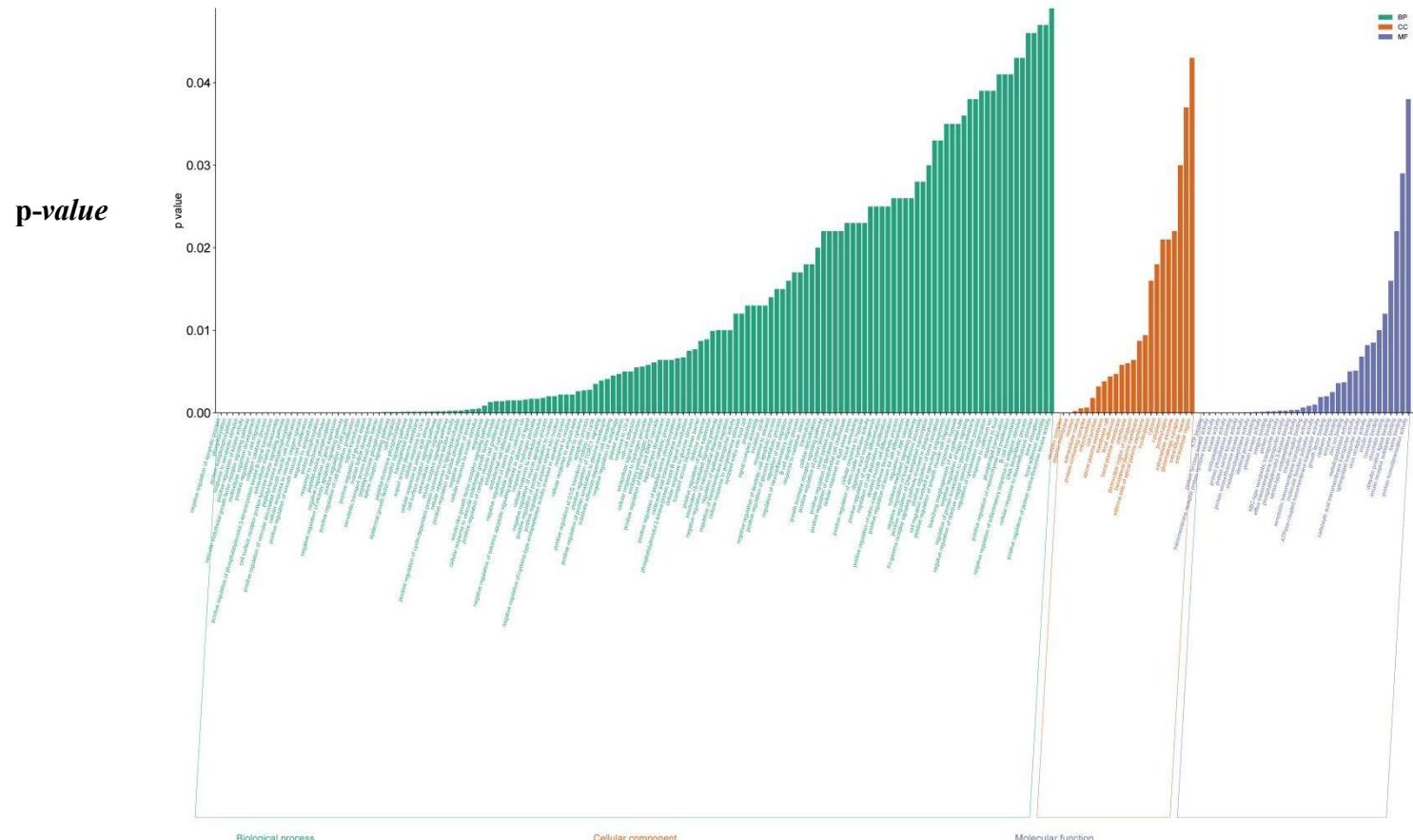
Sebanyak 34 protein ditemukan pada klaster 1 dengan total 235 interaksi. Pada aplikasi Cytoscape, 34 protein tersebut dapat diurutkan berdasarkan kriteria *degree*, *betweenness*, dan *closeness*. *Degree* merupakan besaran yang digunakan untuk mengukur jumlah koneksi (*edge*) yang dimiliki suatu protein (*node*) terhadap protein lainnya. Nilai *degree* menandakan banyaknya interaksi yang terjadi antar protein. Semakin tinggi nilai *degree* maka akan semakin banyak interaksi yang terjadi. Hal ini menunjukkan protein yang berperan sebagai pusat interaksi dan berperan penting dalam fungsi biologis. *Betweenness Centrality* (BC) menunjukkan kekuatan protein sebagai pembatas bagi protein-protein lain dalam

menjaga koneksi dan stabilitas jaringan. Protein dengan nilai BC yang tinggi berperan sebagai pusat pengatur dalam fungsi biologis. Sedangkan *Closeness Centrality* (CC) menggambarkan kedekatan antar protein (64). Kedekatan protein mengacu pada kemampuan suatu protein menjangkau protein lainnya dalam jaringan (65).

1.3 Enrichment Analysis

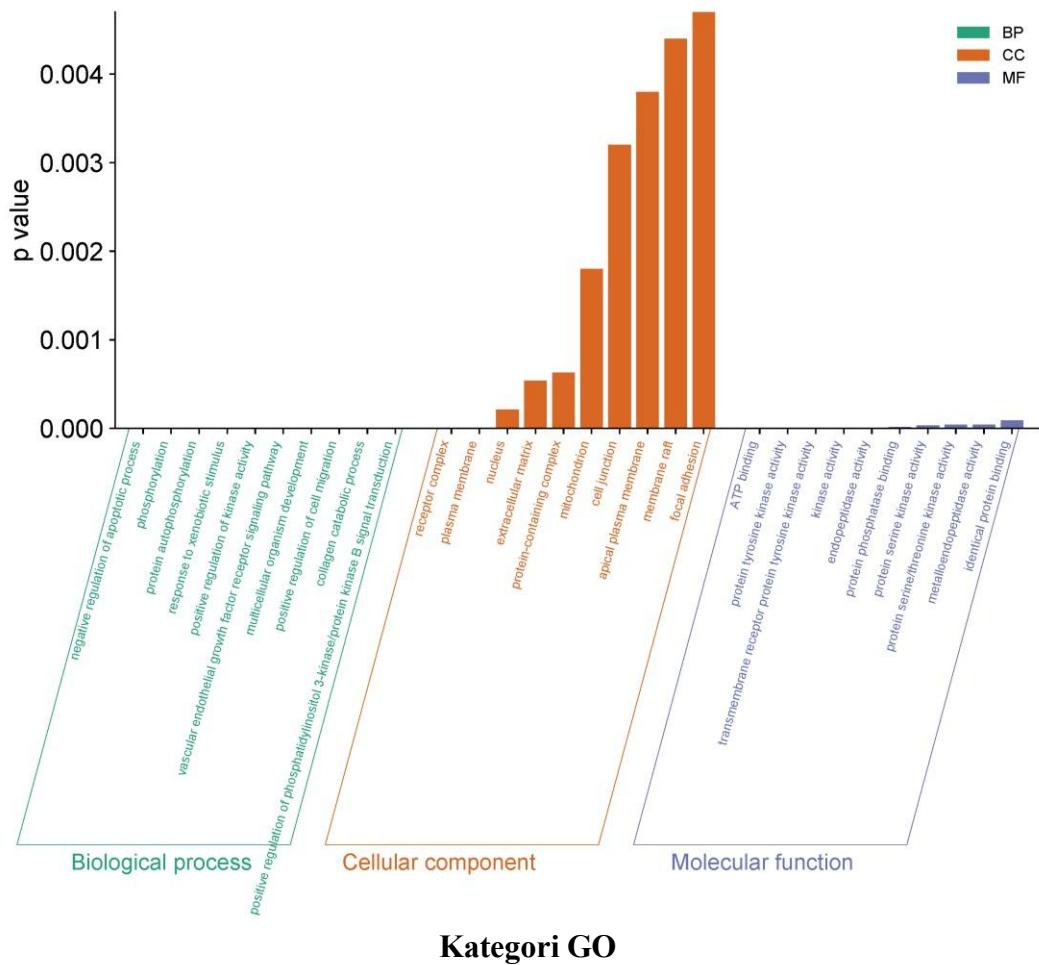
1.3.1 Enrichment Analysis GO

Enrichment analysis dilakukan melalui analisis GO dan KEGG pathway menggunakan *database* DAVID. *Enrichment analysis* bertujuan untuk mengeksplorasi lebih dalam mekanisme yang mendasari potensi gambir dalam pengobatan kanker kolorektal. Analisis GO digunakan untuk mengeksplorasi fungsi biologis dari 34 target protein kanker kolorektal dari klaster signifikan. Analisis GO terdiri dari *biological process*, *cellular component*, dan *molecular function*. Hasil analisis pengayaan GO dapat dilihat pada **Gambar 4.4** (Halaman 41 dan 42). Secara keseluruhan, hasil analisis GO menunjukkan bahwa kanker kolorektal melibatkan berbagai proses biologis dan fungsi molekular yang berperan dalam mekanisme regulasi jalur sinyal dan pengendalian metabolisme protein.



Kategori GO

(a)



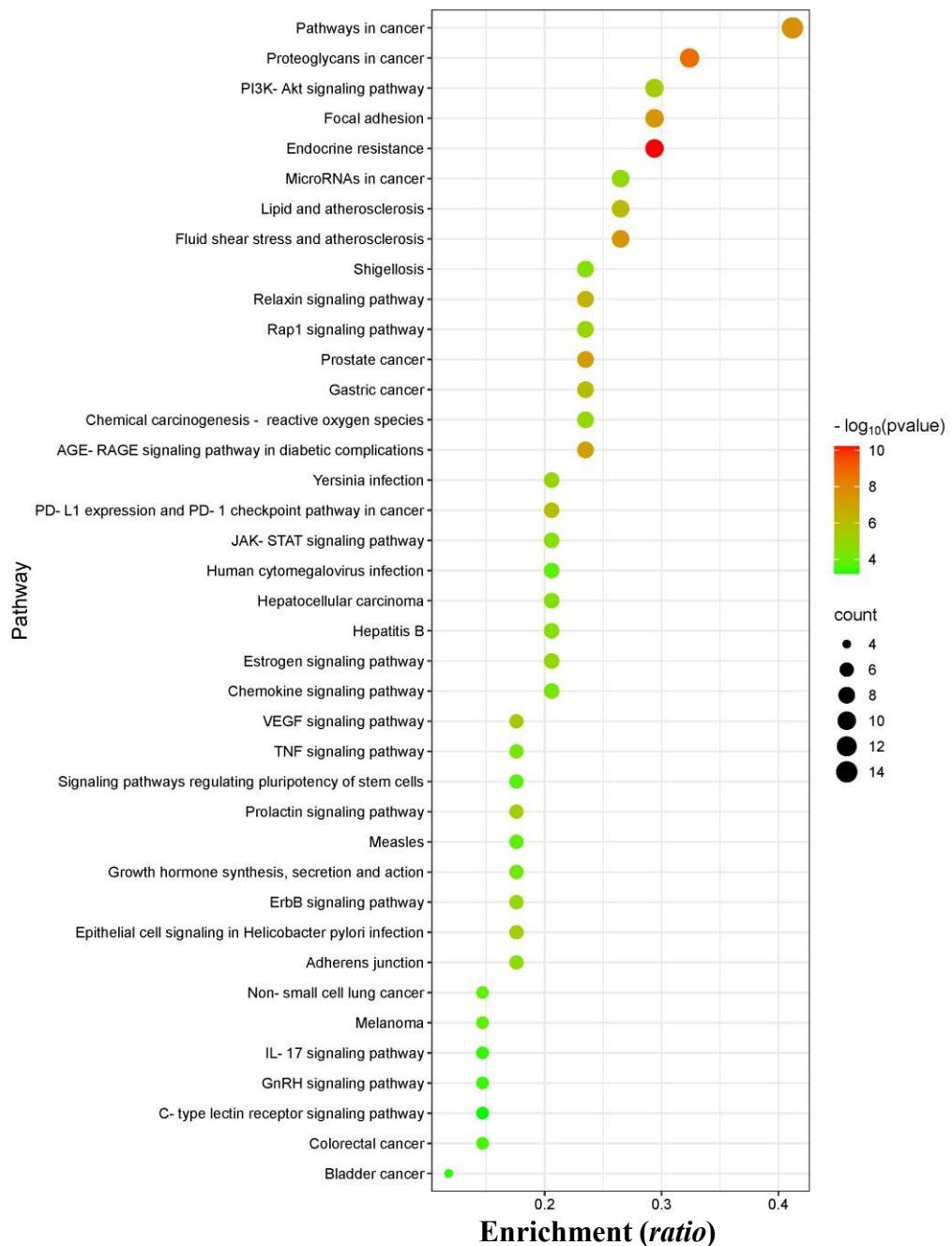
Gambar 4.4 Enrichment Analysis GO. (a) Analisis GO dari 34 protein klaster signifikan secara keseluruhan ($p\text{-value} < 0,05$) ditemukan ; (b) Analisis GO dari protein klaster signifikan dengan 10 istilah teratas ($p\text{-value}$ terkecil). Gambar ini diplot menggunakan SRplot (<http://bioinformatics.com.cn/en?p=1>) (50).

Gambar 4.4(a) menunjukkan hasil analisis GO, dimana terdapat 143 istilah pengayaan untuk kategori *biological process* (BP), 23 untuk *cellular component* (CC), dan 36 untuk *molecular function* (MF) (dapat diakses melalui platform GitHub : <https://github.com/r-rni/Lampiran/blob/main/Enrichment%20analysis.xlsx>). **Gambar 4.4(b)** menunjukkan 10 istilah teratas dalam proses biologis, komponen seluler, dan fungsi molekuler. Istilah dalam GO ini diurutkan berdasarkan *enrichment score* ($p\text{-value}$), semakin kecil $p\text{-value}$ maka akan menunjukkan kategori yang semakin signifikan. Istilah teratas yang ditemukan dalam proses biologis diantaranya adalah regulasi negatif proses apoptosis,

fosforilasi, autofosforilasi protein, respon terhadap stimulus xenobiotik, regulasi positif aktivitas kinase, jalur persinyalan reseptor faktor pertumbuhan endotel vaskular, perkembangan organisme multiseluler, regulasi positif migrasi sel, proses katabolik kolagen, dan regulasi positif tranduksi sinyal phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B. Hasil analisis GO menunjukkan protein dari klaster signifikan mempunyai keterlibatan dalam berbagai proses biologis yang mendukung perkembangan, kelangsungan hidup, dan penyebaran sel kanker. Istilah-istilah dalam proses biologis mencerminkan berbagai fungsi utama, seperti regulasi negatif proses apoptosis yang berperan dalam menghambat kematian sel terprogram, fosforilasi dan autofosforilasi protein yang berperan dalam mekanisme pengaturan aktivitas kinase protein.

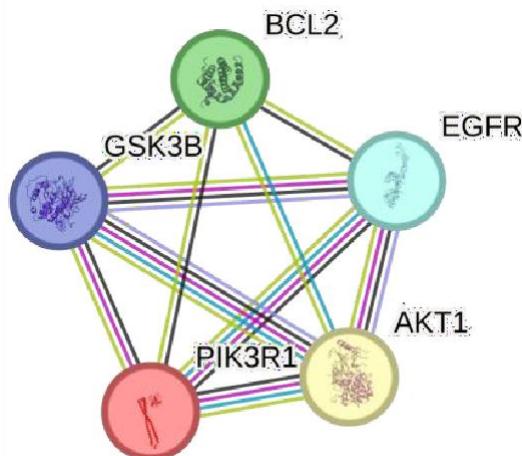
Sepuluh istilah teratas dalam komponen seluler diantaranya adalah kompleks reseptor, membrane plasma, nukleus, matriks ekstraseluler, kompleks protein, mitokondria, sambungan sel, membran plasma apikal, raft membran, dan adhesi fokal. Analisis GO pada kategori komponen seluler menunjukkan bahwa protein dari klaster signifikan terlokalisasi dalam berbagai struktur penting yang mendukung fungsi sel. Sedangkan, istilah teratas untuk fungsi molekuler diantaranya pengikatan ATP, aktivitas protein tirosin kinase, aktivitas protein reseptor transmembran tirosin kinase, aktivitas kinase, aktivitas endopeptidase, pengikatan protein fosfatase, aktivitas protein serin kinase, aktivitas protein serin/treonin kinase, aktivitas metalloendopeptidase, dan pengikatan protein identik. Analisis pengayaan GO pada kategori fungsi molekular menunjukkan bahwa protein yang dianalisis terlibat dalam berbagai aktivitas fungsional yang penting untuk regulasi sinyal pada proses biologis. Istilah-istilah ini menggambarkan berbagai fungsi molekular protein yang mendukung proses biologis sel.

1.3.2 Enrichment Analysis KEGG



Gambar 4.5 Enrichment Analysis KEGG. Analisis pengayaan KEGG ditemukan sebanyak 91 jalur sinyal ($p-value < 0,05$). Hasil plot menunjukkan 40 jalur sinyal teratas yang diurutkan dari $p-value$ terkecil. *Ratio* menunjukkan perbandingan antara *count* dengan jumlah protein yang dianalisis (34 protein dari klaster signifikan). *Count* merupakan jumlah protein yang terlibat dalam *pathway* tertentu. Gambar ini diplot menggunakan SRplot (<http://bioinformatics.com.cn/en?p=1>) (50).

Hasil *enrichment analysis* KEGG menggunakan DAVID dapat dilihat pada **Gambar 4.5** (halaman 44). Pada analisis KEGG diperoleh 91 jalur sinyal yang terlibat dalam 34 target pada klaster signifikan (dapat diakses melalui platform GitHub : <https://github.com/r-rni/Lampiran/blob/main/Enrichment%20analysis.xlsx>). Hasil analisis menunjukkan bahwa sebagian besar protein berperan dalam *pathway* kanker. Berdasarkan analisis *p-value* terkecil, terdapat 5 jalur yang paling signifikan yaitu resistensi pengambatan tirosin kinase EGFR, resistensi endokrin, proteoglikan kanker, *pathway* kanker, dan tekanan geser cairan dan aterosklerosis. Sebagian besar jalur sinyal tersebut berperan dalam berbagai aspek patogenesis yang berhubungan dengan perkembangan kanker, mulai dari resistensi terapi hingga perubahan struktural pada jaringan kanker. Secara keseluruhan dari 91 jalur sinyal yang terlibat, hasil analisis menunjukkan bahwa target memiliki jalur persinyalan pada kanker kolorektal. Oleh karena itu, analisis dengan KEGG ini dapat membuktikan bahwa target pada klaster signifikan memiliki jalur persinyalan yang berhubungan dengan kanker kolorektal.

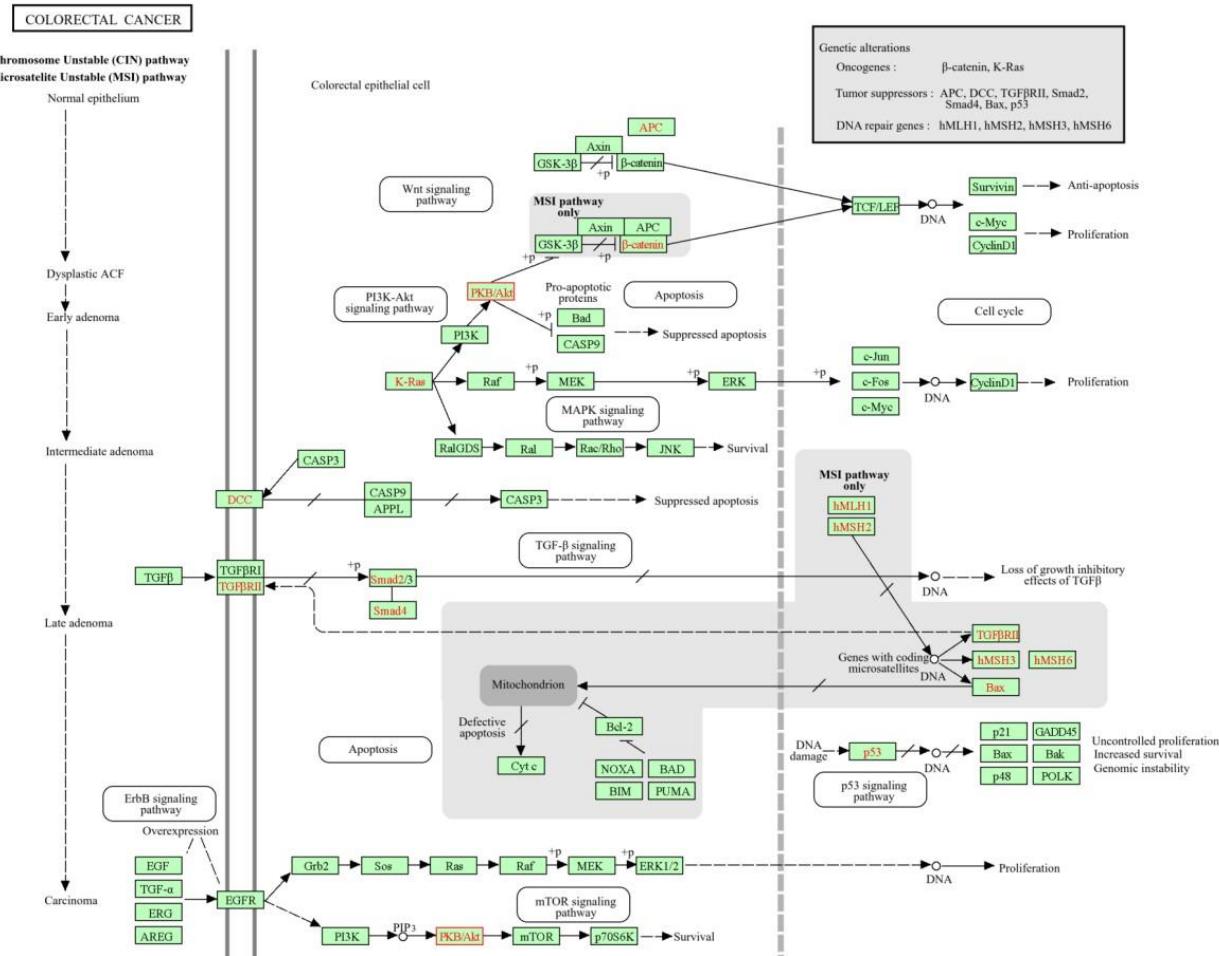


Gambar 4.6 Jaringan PPI Target pada Klaster Signifikan yang Terlibat dalam Jalur *Pathway* Kanker Kolorektal. AKT1, BCL2, EGFR, GSK3B, dan PIK3R1 merupakan protein yang secara langsung terlibat dalam jalur sinyal kanker kolorektal.

Selain itu, hasil analisis KEGG *pathway* menunjukkan bahwa terdapat 5 target protein dari klaster signifikan yang terlibat langsung pada jalur persinyalan kanker kolorektal. Protein tersebut diantaranya adalah AKT1, BCL2, EGFR, GSK3B, dan PIK3R1. Interaksi dan jaringan PPI dari kelima target dapat dilihat

pada **Gambar 4.6** (halaman 45) dan ditemukan bahwa AKT1 dan EGFR merupakan target yang memiliki banyak interaksi dengan target protein lainnya. Dengan demikian, kedua target ini dapat dijadikan sebagai target paling signifikan yang berhubungan dengan kanker kolorektal. Semakin banyak suatu protein berinteraksi dengan protein lainnya, maka protein tersebut semakin berpengaruh terhadap suatu penyakit (63).

Jalur sinyal yang terlibat dalam kanker kolorektal dianalisis menggunakan *database KEGG pathway*. Hasil analisis ini dapat dilihat pada **Gambar 4.7** (halaman 47). Kanker kolorektal dapat terjadi akibat adanya alterasi genetik. Alterasi genetik ini melibatkan onkogen seperti β -catenin dan K-Ras, supresor tumor APC, DCC, TGF β RII, Smad2, Smad4, Bax, dan p53, serta DNA repair genes seperti hMLH1, hMLH2, hMLH3, dan hMLH6.



Gambar 4.7 Sinyal Pathway Kanker Kolorektal. Gambar ini diperoleh dari *platform* KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) (29). Kanker kolorektal melibatkan berbagai jalur sinyal diantaranya jalur sinyal Wnt, PI3K-Akt, MAPK, TGF- β , p53, ErkB.

Jalur sinyal pada kanker kolorektal berhubungan dengan proliferasi, diferensiasi, apoptosis, dan kelangsungan hidup sel. Kanker jenis ini melibatkan beberapa jalur diantaranya *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) atau *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK), *Wingless-related Integration Site* (Wnt) atau β -catenin, phosphoinositide 3-kinase (PI3K), *Transforming Growth Factor- β* (TGF)- β , *Neurogenic locus notch homolog protein* (Notch), dan *Nuclear Factor* (NF)- κ B (66).

Adanya mutasi pada gen penggerak seperti APC, KRAS, BRAF, PIK3CA, SMAD4, dan TP53 dapat menyebabkan terjadinya transformasi sel epitel usus menjadi kanker. Mutasi pada APC, KRAS, dan BRAF terjadi pada tahap awal, mutasi ini merupakan transisi dari sel epitel normal menjadi polip atau adenoma. Sedangkan mutasi PIK3CA, SMAD4, dan TP53 merupakan tahap akhir dari perkembangan kanker. Pada tahap ini sel tumor menginvasi jaringan disekitarnya dan bermetastasis sehingga adenoma dapat berkembang menjadi karsinoma (67).

Mutasi pada gen *Adenomatous Polyposis Coli* (APC) dapat mempengaruhi perkembangan kanker kolorektal yang dikodekan terhadap jalur sinyal Wingless/Wnt, salah satunya β -catenin. Mutasi ini dapat meningkatkan lokalisasi β -catenin di nukleus sehingga mendukung aktivasi onkogenik. Ekspresi β -catenin yang berlebihan dapat merangsang ekspresi cyclin D1 dan mempercepat perkembangan tumor. Selain APC, KRAS juga berperan dalam terjadinya karsinogenesis. Gen ini bekerja dengan mengatifkan jalur RAF-MAPK dan P13K (67).

Jalur sinyal PI3K/AKT/mTOR merupakan salah satu jalur yang sering terlibat pada persinyalan berbagai jenis kanker, termasuk kanker kolorektal. Jalur ini berperan dalam proses proliferasi, apoptosis, pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel, serta pengaturan sitoskeleton. Penyimpangan jalur PI3K dapat mendorong terjadinya inisiasi dan perkembangan tumor. Aktivasi sinyal PI3K/AKT/mTOR melibatkan *Receptor Tyrosine Kinases* (RTKs) dan mutasi somatik yang mengkode PI3KCA, IRS1, PI3KR1, PDK1, AKT1, AKT2, PAK4, dan mTOR (68).

AKT atau PKB (Protein Kinase B) merupakan komponen utama yang diaktivasi melalui jalur persinyalan PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase). AKT

dapat mengatur mTOR yang berperan dalam translasi protein, pertumbuhan sel, metabolisme, dan angiogenesis pada kanker kolorektal (68). Jalur PI3K diaktifasi dengan melibatkan reseptor tirosin kinase atau RTKs, salah satunya EGFR. EGFR bertindak sebagai katalis dalam transfer molekul fosfat dari ATP ke situs aktif tirosin kinase dan memicu aktivitas seluler seperti anti-apoptosis, invansi sel tumor, dan mendorong angiogenesis. Ekspresi EGFR yang berlebihan pada kanker kolorektal menunjukkan prognosis yang buruk dan berisiko mengalami metastasis (67).

1.4 Prediksi Sifat Fisikokimia dan ADMET

1.4.1 *Lipinski Rule of Five*

Sifat fisikokimia dan ADMET dari 19 senyawa uji yang terkandung dalam tanaman gambir dianalisis menggunakan *database* Deep-PK. Analisis sifat fisikokimia kandidat senyawa dilakukan berdasarkan aturan *Lipinski Rule of Five*, yakni dengan memprediksi kelarutan, pemeabilitas membran, dan potensi senyawa dalam pengembangan obat secara komputasi. Aturan ini digunakan untuk menentukan apakah sifat fisikokimia senyawa dapat berpotensi serta aktif apabila digunakan secara oral. Obat yang aktif secara oral tidak boleh melanggar aturan Lipinski's lebih dari satu (69). Aturan *Lipinski Rule of Five* menunjukkan penyerapan yang buruk apabila (i) berat molekul > 500 Da, (ii) nilai koefisien partisi ($\log P$) > 5, (iii) donor ikatan-H > 5, dan (iv) akseptor ikatan-H > 10 (70).

Hasil skrining *Lipinski Rule of Five* dapat dilihat pada **Tabel 4.2** (halaman 50). Berdasarkan analisis, ditemukan sebanyak 7 senyawa uji yang memenuhi aturan Lipinski's, diantaranya adalah (-)-Catechin, (-)-Epicatechin, (+)-Catechin, Epicatechin, Catechol, Gambirine, dan Quercetin. Senyawa Epicatechin gallate, Epigallocatechin, Gallocatechin, dan Roxburghine B melanggar satu aturan Lipinski's dan 8 senyawa lainnya melanggar tiga aturan Lipinski's. Dari 19 senyawa uji, terdapat 11 senyawa yang berpotensi aktif dan dapat dijadikan sebagai kandidat obat oral, yaitu senyawa yang melanggar aturan Lipinski's kurang dari dua.

Tabel 4.2 Skrining Lipinski's Rule of Five dan Log S dari Senyawa Uji *U. gambir* Roxb.

Senyawa	BM (≤ 500) (g/mol)	Log P (≤ 5)	Akseptor Ikatan-H (≤ 10)	Donor Ikatan-H (≤ 5)	Pelanggaran Lipinski's	Log S (log mol/L)
(-) -Catechin	290,271	1,546	6	5	0	-2,06
(-) -Epicatechin	290,271	1,546	6	5	0	-2,06
(+) -Catechin	290,271	1,546	6	5	0	-2,08
(+) -Epicatechin	290,271	1,546	6	5	0	-2,08
Epicatechin gallate	442,376	2,258	10	7	1	-4,23
Epigallocatechin	306,270	1,252	7	6	1	-2,11
Gallocatechin	306,270	1,252	7	6	1	-2,13
Catechol	110,112	1,098	2	2	0	-0,06
Gambiriin A1	580,542	2,810	12	11	3	-3,63
Gambiriin A2	580,542	2,810	12	11	3	-3,63
Gambiriin B1	562,527	3,504	11	9	3	-4,70
Gambiriin B2	562,527	3,504	11	9	3	-4,69
Gambiriin C	562,527	3,289	11	9	3	-5,13
Gambirine	384,476	3,522	6	2	0	-3,77
Procyanidin B1	578,526	2,995	12	10	3	-4,35
Procyanidin B2	578,526	2,995	12	10	3	-4,33
Procyanidin B3	578,526	2,995	12	10	3	-4,36
Quercetin	302,238	1,988	7	5	0	-3,12
Roxburghine B	492,623	5,029	6	2	1	-5,18

Berat molekul berpengaruh terhadap kemampuan senyawa berdifusi, senyawa dengan berat molekul lebih besar dari 500 g/mol akan kesulitan untuk menembus membran sel karena pergerakan difusi yang lambat. Akseptor dan donor ikatan hidrogen menggambarkan jumlah ikatan hidrogen yang dibutuhkan dalam proses absorpsi. Apabila tidak memenuhi kriteria Lipinski's maka senyawa akan membutuhkan energi yang semakin tinggi (69). Senyawa dengan jumlah akseptor ikatan hidrogen lebih dari 10 dan donor lebih dari 5 cenderung memiliki banyak ikatan hidrogen dan kesulitan menembus membran *lipid bilayer* (71).

Kelarutan senyawa dapat diketahui berdasarkan nilai log P dan log S. Nilai log P menggambarkan kelarutan senyawa dalam pelarut non polar dan kemampuan menembus membran sel atau *lipid bilayer*. Semakin besar nilai log P maka senyawa akan bersifat hidrofobik. Senyawa dengan nilai log P lebih besar dari 5 akan lebih lama berada pada lapisan *lipid bilayer* dan terdistribusi luas di seluruh tubuh sehingga selektivitas ikatan terhadap protein target menurun, efek samping dan toksisitas meningkat. Senyawa akan sulit menembus lapisan lipid jika nilai log P semakin negatif (69). Sementara itu, nilai log S menunjukkan kelarutan senyawa dalam air. Sekitar 80% obat yang beredar memiliki nilai log S > -4 (72). Senyawa dengan log S < -6 menunjukkan kelarutan yang rendah (73).

1.4.2 Prediksi ADMET

Analisis ADMET (Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, Ekskresi, dan Toksisitas) perlu dilakukan dalam penemuan obat baru melalui penentuan parameter farmakokinetik dan toksisitas senyawa aktif. Parameter absorpsi yang ditentukan diantaranya adalah *Human Intestinal Absorption* (HIA) dan Caco-2, distribusi berdasarkan parameter *Blood-Brain Barrier* (BBB), profil metabolisme berupa CYP inhibitor (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, dan CYP3A4), dan ekskresi berdasarkan parameter *clearance* berupa konstanta CLTOT. Hasil analisis ADME dapat dilihat pada **Tabel 4.3** (halaman 52).

Tabel 4.3 Analisis ADME Kandungan Senyawa *U. gambir* Roxb.

Senyawa	Absorpsi		Distribusi	Metabolisme					Ekskresi
	Human Intestinal Absorption	Caco-2 (logPaap)	Blood-Brain Barrier	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4	Clearance (ml/menit/kgBB)
(-)-Catechin	0,905 (Yes)	-5,72	No	No	No	No	No	No	13,61
(-)-Epicatechin	0,900 (Yes)	-5,72	No	No	No	No	No	No	13,59
(+)-Catechin	0,903 (Yes)	-5,72	No	No	No	No	No	No	13,60
(+)-Epicatechin	0,908 (Yes)	-5,72	No	No	No	No	No	No	13,63
Epicatechin gallate	0,365 (No)	-7,07	No	No	No	No	No	No	13,32
Epigallocatechin	0,760 (Yes)	-6,75	No	No	No	No	No	No	14,42
Gallocatechin	0,766 (Yes)	-6,75	No	No	No	No	No	No	14,43
Catechol	0,979 (Yes)	-4,27	Yes	No	No	No	No	No	10,32
Gambiriin A1	0,014 (No)	-6,54	No	No	No	No	No	No	11,96
Gambiriin A2	0,014 (No)	-6,54	No	No	No	No	No	No	11,96
Gambiriin B1	0,059 (No)	-6,64	No	No	No	No	No	No	11,43
Gambiriin B2	0,060 (No)	-6,64	No	No	No	No	No	No	11,42
Gambiriin C	0,019 (No)	-6,63	No	No	No	No	No	No	11,18
Gambirine	0,984 (Yes)	-5,14	Yes	No	No	No	Yes	Yes	13,53
Procyanidin B1	0,019 (No)	-6,62	No	No	No	No	No	No	11,84
Procyanidin B2	0,019 (No)	-6,62	No	No	No	No	No	No	11,84
Procyanidin B3	0,019 (No)	-6,62	No	No	No	No	No	No	11,85
Quercetin	0,866 (Yes)	-5,80	No	Yes	No	Yes	No	No	8,910
Roxburghine B	0,932 (Yes)	-5,44	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes	11,02

Human Intestinal Absorption (HIA) atau penyerapan gastrointestinal menunjukkan kemampuan penyerapan senyawa di usus. Sebagian senyawa uji menunjukkan absorpsi yang tinggi atau dapat diserap dengan baik oleh usus, senyawa tersebut diantaranya adalah (-)-catechin, (-)-epicatechin, (+)-catechin, (+)-epicatechin, epigallocatechin, gallocatechin, catechol, gambirine, quercetin, dan roxburghine B. Sementara itu, epicatechin gallate, gambiriin A1, gambiriin A2, gambiriin B1, gambiriin B2, gambiriin C, procyanidin B1, procyanidin B2, dan procyanidin B3 menunjukkan penyerapan yang rendah. Beberapa senyawa tersebut memiliki berat molekul yang lebih besar daripada sebagian senyawa lainnya. Penyerapan senyawa di usus pada umumnya dipengaruhi oleh berat molekul. Semakin besar berat molekul maka penyerapan akan semakin menurun (74).

Sembilan belas senyawa uji menunjukkan nilai $Caco-2 < 0$ dan tidak ada satupun senyawa yang memiliki permeabilitas Caco-2 yang tinggi. Dalam Deep-PK satuan permeabilitas Caco-2 dinyatakan sebagai koefisien permeabilitas ($\log Papp$). Suatu senyawa dikatakan memiliki permeabilitas Caco-2 yang tinggi jika nilai prediksi $> 0,90$ (72). Sel Caco-2 merupakan parameter permeabilitas yang digunakan sebagai model *in vitro* untuk menentukan penyerapan atau perpindahan senyawa aktif yang diberikan secara oral. Parameter permeabilitas ini terjadi melalui sel epitel di usus manusia yang berawal dari *adenocarcinoma* usus besar (75).

Parameter *Blood-Brain Barrier* (BBB) merupakan parameter distribusi yang bertujuan untuk menentukan kemampuan berpenetrasi suatu senyawa hingga menembus sawar darah otak. Dari 19 senyawa uji, sebagian besar senyawa tidak dapat menembus sawar darah otak dan hanya 3 senyawa yang dapat menembus sawar darah otak diantaranya yaitu catechol, gambirine, dan roxburghine B. Pada parameter ini hasil yang diharapkan yaitu senyawa tidak dapat menembus sawar darah otak karena pengobatan ditargetkan pada kanker kolorektal. Kandidat obat tidak boleh berpenetrasi hingga sawar darah otak apabila target pengobatan tidak berhubungan dengan sistem saraf pusat, jika terjadi maka dapat menimbulkan efek samping pada sistem saraf pusat (SSP). Sebaliknya, apabila target

berhubungan dengan SSP senyawa uji harus memiliki kemampuan berpenetrasi pada sawar darah otak (76).

Profil metabolisme senyawa aktif ditinjau dari kemampuan inhibisi senyawa terhadap enzim sitokrom P450 (CYP). Sitokrom P450 merupakan isoenzim yang berperan penting dalam biotransformasi dan eliminasi obat. CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, dan CYP3A4 merupakan isoform utama dari sitokrom P450 yang diekspresikan dalam hati. Hasil analisis terhadap 19 senyawa uji menunjukkan sebagian besar senyawa tidak berpotensi sebagai inhibitor CYP. Namun, terdapat beberapa senyawa yang berpotensi sebagai inhibitor CYP diantaranya gambirine (CYP2D6 dan CYP3A4), quercetin (CYP1A2 dan CYP2C9), dan roxburghine B (CYP1A2, CYP2D6, dan CYP3A4). Inhibisi sitokrom P450 merupakan penyebab utama terjadinya interaksi farmakokinetik. Interaksi ini dapat menimbulkan toksisitas dan efek samping yang tidak diinginkan (77). Senyawa yang bersifat sebagai inhibitor pada isoenzim dapat mempengaruhi metabolismenya dan bertahan lama di dalam tubuh.

Prediksi ekskresi dapat diketahui dari parameter *clearance*. *Clearance* diukur berdasarkan konstanta CLTOT (*Total Clearance*) yang merupakan kombinasi dari *hepatic clearance* (metabolisme di hati dan pembersihan empedu) dan *renal clearance* (ekskresi melalui ginjal). Berdasarkan analisis terhadap 19 senyawa uji, nilai CLTOT seluruh senyawa berada pada rentang 8 hingga 15 ml/menit/kgBB. Ekskresi berperan penting dalam pengeluaran obat oleh tubuh dan bertujuan untuk mengurangi efek toksik senyawa di dalam tubuh. Parameter *clearance* berhubungan dengan parameter farmakokinetik atau bioavailabilitas yang menggambarkan waktu obat berada di dalam darah. Selain itu, parameter ini juga berperan dalam menentukan tingkat dosis untuk mencapai konsentrasi *steady-state* (78).

Senyawa yang dijadikan sebagai kandidat obat harus menunjukkan aktivitas biologis dan mempunyai nilai toksisitas yang rendah. Potensi toksisitas senyawa dianalisis berdasarkan parameter mutagenesis AMES, karsinogenesis, penghambatan hERG, *liver Injury* I dan II, gangguan sistem pernapasan, dan sensitiasi kulit. Analisis toksisitas senyawa dapat dilihat pada **Tabel 4.4** (halaman 55).

Tabel 4.4 Analisis Toksisitas Kandungan Senyawa *U. gambir* Roxb.

Senyawa	AMES Mutagenesis	Carcinogenesis	hERG Blockers	Liver Injury <i>I</i>	Liver Injury <i>II</i>	Respiratory Disease	Skin Sensitisation
(-)Catechin	No	No	No	Yes	No	Yes	Yes
(-)Epicatechin	No	No	No	Yes	No	Yes	Yes
(+)-Catechin	No	No	No	Yes	No	Yes	Yes
(+)-Epicatechin	No	No	No	Yes	No	Yes	Yes
Epicatechin gallate	No	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Epigallocatechin	No	No	No	Yes	No	Yes	Yes
Gallocatechin	No	No	No	Yes	No	Yes	Yes
Catechol	No	Yes	No	Yes	No	No	Yes
Gambiriin A1	No	No	No	Yes	Yes	Yes	No
Gambiriin A2	No	No	No	Yes	Yes	Yes	No
Gambiriin B1	No	No	No	Yes	Yes	Yes	No
Gambiriin B2	No	No	No	Yes	Yes	Yes	No
Gambiriin C	No	No	No	No	Yes	Yes	No
Gambirine	No	No	Yes	No	Yes	Yes	No
Procyanidin B1	No	No	No	Yes	Yes	Yes	No
Procyanidin B2	No	No	No	Yes	Yes	Yes	No
Procyanidin B3	No	No	No	Yes	Yes	Yes	No
Quercetin	No	No	No	Yes	Yes	No	Yes
Roxburghine B	Yes	No	Yes	No	Yes	Yes	No

Potensi toksisitas senyawa dapat diketahui dari parameter mutagenesis dan karsinogenesis. Dari 19 senyawa uji, sebagian besar senyawa tidak menunjukkan potensi sebagai mutagen maupun karsinogen. Akan tetapi, roxburghine B berpotensi sebagai mutagenen dan catechol sebagai karsinogenen. AMES *test* sering digunakan dalam menentukan potensi mutagenik senyawa. Senyawa yang bersifat mutagenik dapat bertindak sebagai karsinogen (77).

Salah satu parameter utama yang perlu diperhatikan dalam penemuan dan pengembangan obat adalah hERG *blockers*. Parameter ini sangat penting untuk mengetahui potensi toksisitas pada jantung. Hasil analisis terhadap 19 senyawa uji menunjukkan bahwa sebagian besar senyawa tidak memiliki sifat sebagai hERG *blockers* sehingga dapat diketahui bahwa senyawa tidak bersifat toksik pada jantung, tetapi catechol dan roxburghine B diketahui dapat menghambat hERG. Penghambatan hERG dapat mengakibatkan terjadinya aritmia pada jantung. Selain itu, senyawa yang berpotensi menghambat kanal hERG dapat meningkatkan risiko kehilangan kesadaran dan kematian mendadak (69).

Selain toksisitas pada jantung, toksisitas pada hati dan sistem pernapasan juga perlu diperhatikan. Senyawa uji yang memiliki kemampuan menginduksi cidera hati dapat diprediksi berdasarkan *liver injury I* dan *liver injury II*. Berdasarkan hasil analisis terhadap 19 senyawa uji, sebagian besar senyawa dapat menyebabkan gangguan fungsi hati normal dan hepatotoksik. Gambiriin C, gambirine, dan roxburghine B tidak menunjukkan potensi pada *liver injury I* tetapi berpotensi menyebabkan hepatotoksik. Terdapat 7 senyawa yang tidak berpotensi menyebabkan hepatotoksik diantaranya yaitu (-)-catechin, (-)-epicatechin, (+)-catechin, (+)-epicatechin, epigallocatechin, gallicatechin, dan catechol. *Liver injury I* merupakan parameter yang memetakan patologis atau fisiologis hati yang berhubungan dengan potensi senyawa menyebabkan gangguan fungsi hati normal. Sedangkan, *liver injury II* merupakan parameter yang berhubungan dengan potensi hepatotoksik suatu senyawa (72). Sementara itu, sebagian besar senyawa uji bersifat toksik pada sistem pernapasan. Catechol dan quercetin merupakan sebagian kecil senyawa uji yang tidak berpotensi toksik pada sistem pernafasan.

Sensitiasi atau *skin sensitization* merupakan parameter toksisitas yang berhubungan dengan kepekaan kulit terhadap senyawa atau bahan kimia yang

dapat menimbulkan reaksi alergi (69). Sebagian dari 19 senyawa uji dapat menyebabkan terjadinya respon alergi pada kulit. Senyawa tersebut diantaranya adalah (-)-catechin, (-)-epicatechin, (+)-catechin, (+)-epicatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin, gallocatechin, catechol, dan quercetin. Sementara itu, senyawa yang diduga tidak bersifat toksik pada kulit adalah gambiriin A1, gambiriin A2, gambiriin B1, gambiriin B2, gambiriin C, gambirine, procyanidin B1, procyanidin B2, procyanidin B3, dan roxburghine B.

1.5 Molecular Docking

1.5.1 Preparasi Ligand dan Target Protein

Penemuan kandidat obat dengan pendekatan *network pharmacology* perlu dilakukan validasi dengan metode komputasi lanjutan. Metode komputasi lanjutan ini terdiri dari pendekatan *molecular docking* dan simulasi *molecular dynamics*. Studi *molecular docking* dan *molecular dynamics* dilakukan terhadap senyawa uji yang terkandung dalam *U. gambir* Roxb. dengan target signifikan dari kanker kolorektal berupa protein AKT1 dan EGFR. Namun, sebelum dilanjutkan pada tahap *molecular docking* dan *molecular dynamics* struktur geometri senyawa uji perlu dioptimasi terlebih dahulu menggunakan *software* Avogadro. Optimasi ini bertujuan untuk mendapatkan konformasi senyawa yang stabil pada energi terendah (79). Optimasi dilakukan dengan menambahkan medan gaya *Merck molecular force field* (MMFF94). Sementara itu, struktur protein yang akan disimulasikan dipilih dan diperoleh dari *database* Protein Data Bank (PDB).

Struktur protein yang dipilih yaitu struktur dengan kode PDB yang mempunyai *native ligand* sebagai obat. Pemilihan struktur protein didasarkan pada organisme *homo sapiens* menggunakan metode *X-ray diffraction* dengan nilai resolusi $< 3 \text{ \AA}$. Struktur protein resolusi tinggi, yaitu sekitar 1 \AA menunjukkan susunan elektron dan atom terlihat jelas dalam peta kerapatan elektron. Sebaliknya, struktur protein dengan resolusi rendah sekitar 3 \AA atau lebih hanya menunjukkan kontur dasar rantai protein dan susunan atom tidak terlihat jelas (35).

Struktur AKT1 yang digunakan pada penelitian ini memiliki kode PDB 4GV1. Kode PDB ini menggunakan metode *X-ray diffraction* dengan resolusi

1.49 Å. Protein AKT1 dengan kode PDB 4GV1 memiliki *native ligand* obat yaitu capivasertib. Capivasertib dapat menekan proliferasi melalui penghambatan aktivitas kinase dan menurunkan fosforilasi protein. Menurut penelitian yang dilakukan Khabazian, dkk (2024), liposomal capivasertib dapat meningkatkan ekspresi gen PTEN (*tumor suppressor phosphate*) dan FOXO1. Peningkatan ekspresi PTEN secara signifikan menghambat proliferasi sel dan menginduksi apoptosis sel kanker kolorektal melalui jalur persinyalan PI3K/AKT (80)(81).

Sementara itu, kode PDB yang digunakan untuk target EGFR adalah 4WKQ dengan resolusi 1.85Å. Kode PDB 4WKQ merupakan struktur EGFR yang mempunyai *native ligand* obat berupa gefitinib. Gefitinib merupakan inhibitor tirosin kinase yang digunakan sebagai terapi kanker dengan mutasi EGFR dan diketahui bersifat sebagai agen sitotoksik. Pada sel kanker kolorektal gefitinib memiliki aktivitas antitumor baik pada terapi tunggal maupun kombinasi dengan agen sitotoksik lainnya seperti irinotecan dan oxaliplatin. Gefitinib menunjukkan penghambatan sinyal EGFR dan menurunkan proliferasi sel pada pasien dengan karsinoma kolorektal metastasis (82).

Struktur protein yang diperoleh dari *database* PDB sering ditemukan memiliki *sequence gap* atau kesenjangan *sequence* berdasarkan struktur dan urutan protein. Analisis *sequence gap* struktur protein dilakukan dengan *software Visual Molecular Dynamics* (VMD). *Sequence* protein dengan kode PDB 4GV1 memiliki urutan asam amino yang dimulai dari residu 143-477. Sedangkan protein dengan kode PDB 4WKQ dimulai dari urutan asam amino 694-1020. Struktur protein yang ditemukan memiliki *sequence gap* atau *missing residue* diidentifikasi dan diperbaiki dengan menggunakan pdbfixer.

Missing residue sering kali disebabkan oleh keterbatasan *instrument* dalam mendeteksi residu atau unsur dalam peta kerapatan elektron. *Missing residue* menunjukkan adanya struktur protein yang tidak lengkap dan sebagian posisi atom tidak terdeteksi terutama atom hidrogen dalam struktur kristalografi sinar-X (83). Selain itu, kesenjangan *sequence* dapat terjadi akibat hilangnya sebagian atom atau rantai samping pada struktur kristal protein (84). *Missing residue* yang ditemukan pada *sequence* protein dapat menyebabkan kesalahan dalam

interpretasi potensi elektrostatik permukaan protein dan memungkinkan terjadinya penyimpangan hasil *molecular docking* (83).

Missing residue juga dapat mempengaruhi keseimbangan struktur protein selama simulasi *molecular dynamics* berlangsung. Interaksi yang terjadi antara reseptor dan *ligand* tidak terdeteksi apabila *missing residue* ditemukan pada area *active site* dan *binding site* protein sehingga perhitungan energi pengikatan menjadi tidak akurat dan posisi *ligand* yang diprediksi tidak sesuai dengan kondisi lingkungan biologis. Oleh karena itu, perbaikan *sequence* dari struktur protein penting dilakukan untuk memastikan keakuratan hasil *molecular docking* dan *molecular dynamics*. Berdasarkan hasil analisis ditemukan beberapa *missing residue* pada struktur protein AKT1 dan EGFR. Analisis *missing residue* dan perbaikan *sequence* dapat dilihat pada **Tabel 4.5**.

Tabel 4.5 Missing Residue

Protein	Sequence Gap (Urutan Asam Amino)	Missing Residue
AKT1 (4GV1)	Antara 307 dan 309	THR
	Antara 451 dan 457	PRO, ASP, GLN, ASP, ASP
	Antara 720 dan 724	GLY, ALA, PHE
	Antara 746 dan 752	LEU, ARG, GLU, ALA, THR
EGFR (4WKQ)		GLU, ARG, MET, HIS, LEU, PRO, SER, PRO, THR, ASP, SER, ASN, PHE, TYR, ARG, ALA, LEU, MET, ASP, GLU, GLU, ASP
	Antara 984 dan 1007	

Protein AKT1 (PDB 4GV1) memiliki *sequence gap* atau *missing residue* pada asam amino urutan 308 dan 452-456. Residu yang hilang pada protein tersebut diantaranya adalah Thr 308, Pro 452, Asp 453, Gln 454, Asp 455, dan Asp 456. Sementara itu, *missing residue* target EGFR (PDB 4WKQ) ditemukan pada asam amino 721-723, 747-751, dan 985-1006. *Sequence* yang hilang pada struktur *X-ray diffraction* protein 4WKQ diantaranya adalah Gly 721, Ala 722, Phe 723, Leu 747, Arg 748, Glu 749, Ala 750, Thr 751, Glu 985, Arg 986, Met 987, His 988, Leu 989, Pro 990, Ser 991, Pro 992, Thr 993, Asp 994, Ser 995, Asn 996, Phe 997, Tyr 998, Arg 999, Ala 1000, Leu 1001, Met 1002, Asp 1003, Glu 1004, Glu 1005, dan Asp 1006.

1.5.2 Validasi Metode Docking

Pada penelitian ini simulasi *molecular docking* dilakukan dengan pendekatan *deep learning*. Pendekatan *deep learning* ini menggunakan *Convolutional Neural Network* (CNN). Parameter yang dihasilkan untuk menilai interaksi antara reseptor dan *ligand* yaitu CNN *affinity* dan CNN *pose score*. CNN *affinity* menunjukkan kekuatan interaksi antara reseptor dan *ligand* berdasarkan pada afinitas pengikatan. CNN *pose score* merupakan peringkat dan skor pada *pose ligand* atau orientasi *ligand* pada target, dimana skor 1 menunjukkan pose yang sempurna dan mirip dengan *native ligand*. Nilai CNN *pose score* yang tinggi cenderung memiliki nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*) yang rendah (54). Sebelum melakukan simulasi *molecular docking* perlu dilakukan validasi metode *docking*. Validasi metode *docking* dapat diketahui berdasarkan nilai RMSD.

Tabel 4.6 Hasil Validasi Docking (RMSD Native Ligand)

Protein	RMSD
AKT1 (4GV1)	0.822197
EGFR (4WKQ)	1.611710

Nilai RMSD menunjukkan perbandingan konformasi antara *native ligand* hasil *docking* dengan hasil kristalografi. Berdasarkan hasil validasi metode *docking* pada **Tabel 4.6** didapatkan nilai RMSD kurang dari 2 Å pada kedua target protein. Hasil *docking* dikatakan valid jika nilai RMSD yang diperoleh \leq 2 Å (69). Semakin kecil nilai RMSD yang dihasilkan maka pose *ligand* hasil *docking* akan semakin mendekati konformasi *native ligand* hasil kristalografi. Oleh karena itu, analisis *molecular docking* senyawa uji pada *U. gambir* Roxb. terhadap protein AKT1 (PDB 4GV1) dan EGFR (PDB 4WKQ) dapat dilanjutkan.

1.5.3 Binding Site dan Active Site Protein

Simulasi *molecular docking* dapat menggambarkan interaksi yang terjadi antara reseptor dan *ligand* pada target protein kanker kolorektal. Interaksi antara reseptor dan *ligand* terjadi pada situs aktif protein. *Binding site* merupakan area

terjadinya interaksi antara reseptor dan *ligand* melalui gaya antar molekul. Hal ini dapat mempengaruhi konformasi, aktivasi, serta menghambat fungsi protein (85). *Binding site* menunjukkan residu atau asam amino yang berperan pada pengikatan *ligand*. *Binding site* berfungsi untuk mengenali dan mengikat substrat, *ligand*, atau molekul target lainnya secara spesifik. Sementara itu, *active site* merupakan area spesifik pada enzim, tempat substrat berikatan dan reaksi kimia berlangsung. *Active site* menunjukkan residu atau asam amino yang berperan sebagai katalis yang melibatkan pemutusan ikatan kimia, pembentukan ikatan baru, atau pengubahan struktur molekul, serta memicu terbentuknya hasil reaksi dengan mengubah substrat menjadi produk. **Tabel 4.7** menunjukkan asam amino yang terlibat dalam *binding site* dan *active site* protein.

Tabel 4.7 Binding Site dan Active Site Protein

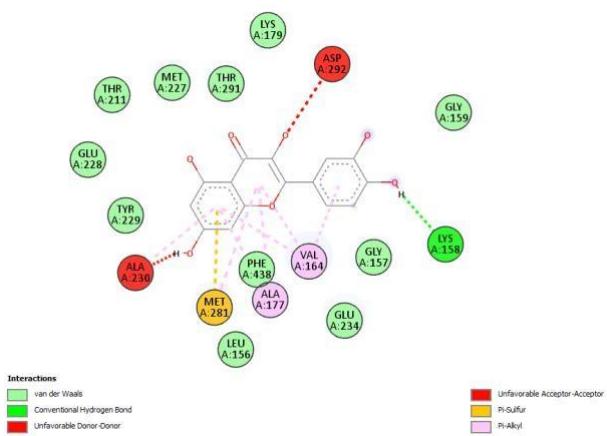
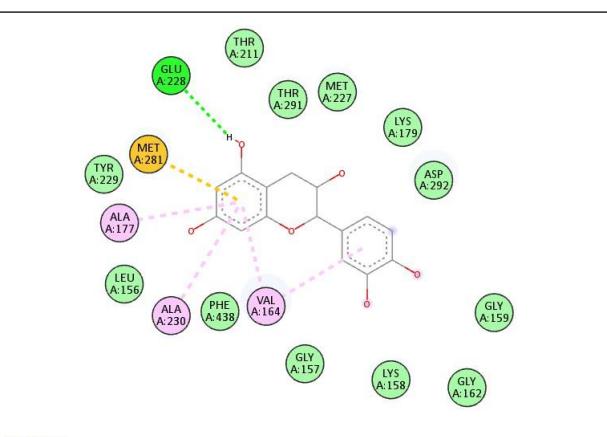
Protein	<i>Binding site</i>	<i>Active site</i>
AKT1 (4GV1)	LEU 156, GLY 157, LYS 158, GLY 159, GLY 162, LYS 163, VAL 164, ALA 177, LYS 179, ALA 230, GLU 234, LYS 276, MET 277, GLU 278, ASN 279, MET 281, ASP 292, PHE 438	ASP 274
EGFR (4WKQ)	LEU 718, VAL 726, ALA 743, LYS 745, GLU 762, MET 766, LEU 788, THR 790, GLN 791, LEU 792, MET 793, PRO 794, GLY 796, CSX 797, ASP 800, LEU 844, ASP 855	ASP 837

Binding site protein dengan kode PDB 4GV1 berada pada residu asam amino 156-159, 162-164, 177, 179, 230, 234, 276-279, 281, 292, dan 438. Sementara itu, protein dengan kode PDB 4WKQ memiliki *binding site* pada residu 718, 726, 743, 745, 762, 766, 788, 790-794, 796-797, 800, 844, dan 855. Masing-masing protein hanya memiliki satu daerah *active site*. *Active site* protein 4GV1 terdapat pada asam amino urutan 274 sedangkan 4WKQ pada asam amino 837.

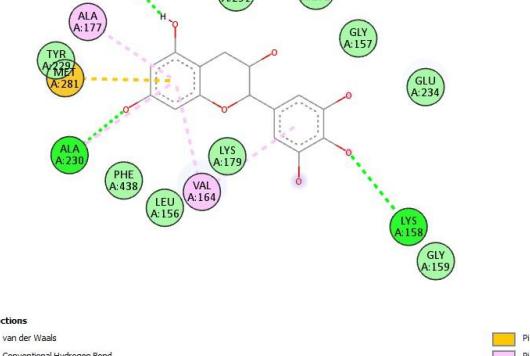
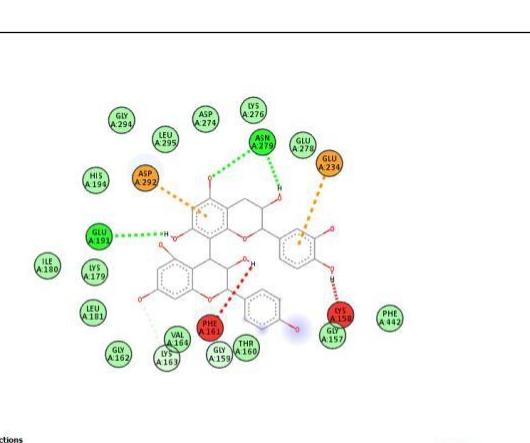
1.5.4 Hasil dan Visualisasi Interaksi pada *Molecular Docking*

Tabel 4.8 Hasil *Molecular Docking* Target AKT1 (4GV1)

No	Senyawa	Affinity (kcal/mol)	CNN Pose Score	Interaction	Hydrogen Bonds	Hydrophobic
1	Native Ligand (Capivasertib)	-9.98	0.9903	<p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond <ul style="list-style-type: none"> Pi-Sulfur Alkyl Pi-Alkyl 	<p><i>Conventional Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - GLU 228 - GLU 234 - GLU 278 - ASP 292 - ALA 230 <p><i>Carbon Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - GLY 157 - THR 291 	<p>Alkyl & Pi-alkyl :</p> <ul style="list-style-type: none"> - MET 227 - ALA 177 - LEU 156 - VAL 164 - LYS 179

4	Quercetin	-9.15	0.8031	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> green circle: van der Waals green line: Conventional Hydrogen Bond red line: Unfavorable Acceptor-Acceptor yellow line: Pi-Sulfur pink line: Pi-Alkyl 	<p><i>Conventional Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - LYS 158 	Pi-Alkyl : <ul style="list-style-type: none"> - ALA 177 - VAL 164
5	(+)-Catechin	-9.01	0.7866	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> green circle: van der Waals green line: Conventional Hydrogen Bond 	<p><i>Conventional Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - GLU 228 	Pi-Alkyl : <ul style="list-style-type: none"> - ALA 177 - ALA 230 - VAL 164

6	(+)-Epicatechin	-9.00	0.8076	<p>Conventional Hydrogen Bond :</p> <ul style="list-style-type: none"> - LYS 158 - ASP 292 - GLU 234 <p>Pi-Alkyl :</p> <ul style="list-style-type: none"> - ALA 177 - VAL 164 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals (green) Conventional Hydrogen Bond (green dashed) Unfavorable Donor-Donor (red) Pi-Sulfur (yellow) Pi-Alkyl (pink) 		
7	Gambiriin A2	-8.85	0.4074	<p>Pi-Alkyl :</p> <ul style="list-style-type: none"> - LEU 181 - VAL 164 <p>Pi-Pi T-shaped :</p> <ul style="list-style-type: none"> - PHE 161 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals (green) Unfavorable Acceptor-Acceptor (red) Pi-Anion (orange) Pi-Pi T-shaped (pink) Pi-Alkyl (light pink) 		

8	Gallocatechin	-8.79	0.7791	 <p>Conventional Hydrogen Bond :</p> <ul style="list-style-type: none"> - GLU 228 - ALA 230 - LYS 158 	
9	Gambiriin C	-8.77	0.2711	 <p>Conventional Hydrogen Bond :</p> <ul style="list-style-type: none"> - GLU 191 - ASN 279 <p>Carbon Hydrogen Bond :</p> <ul style="list-style-type: none"> - LYS 163 	

10	Epicatechin gallate	-8.74	0.2768	<p>Interactions:</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals (green) Conventional Hydrogen Bond (green dashed line) Carbon Hydrogen Bond (light green dashed line) <p>Legend:</p> <ul style="list-style-type: none"> Pi-Anion (orange) Pi-Sulfur (yellow) Pi-Alkyl (purple) <p>Conventional Hydrogen Bond:</p> <ul style="list-style-type: none"> LYS 179 PHE 161 <p>Carbon Hydrogen Bond:</p> <ul style="list-style-type: none"> THR 291 	<p>Pi-Alkyl :</p> <ul style="list-style-type: none"> ALA 177 VAL 164
11	Procyanoindin B3	-8.72	0.2832	<p>Interactions:</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals (green) Conventional Hydrogen Bond (green dashed line) Pi-Sigma (purple) <p>Legend:</p> <ul style="list-style-type: none"> Pi-Sulfur (yellow) Pi-Pi T-shaped (pink) Amide-Pi Stacked (purple) <p>Conventional Hydrogen Bond:</p> <ul style="list-style-type: none"> GLY 162 GLU 278 ASP 439 <p>Pi-Pi T-shaped :</p> <ul style="list-style-type: none"> GLY 159 LYS 158 <p>Amide-Pi Stacked :</p> <ul style="list-style-type: none"> PHE 442 <p>Pi-Sigma :</p> <ul style="list-style-type: none"> VAL 164 	<p>Pi-Pi T-shaped :</p> <ul style="list-style-type: none"> GLY 159 LYS 158 <p>Amide-Pi Stacked :</p> <ul style="list-style-type: none"> PHE 442 <p>Pi-Sigma :</p> <ul style="list-style-type: none"> VAL 164

12	(-) -Epicatechin	-8.71	0.7106	<p><i>Conventional Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - GLU 234 	Pi-Alkyl : <ul style="list-style-type: none"> - ALA 177 - VAL 164
13	Epigallocatechin	-8.67	0.7300	<p><i>Conventional Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - GLU 228 - VAL 164 - ALA 230 	Pi-Alkyl : <ul style="list-style-type: none"> - ALA 177 - VAL 164 - ALA 230

20	Catechol	-3.86	0.9215		-	Pi-Alkyl : - VAL 164 - LYS 179
----	----------	-------	--------	--	---	--------------------------------------

Keterangan:

- Font berwarna biru menunjukkan interaksi yang sama dengan *native ligand*
- Font berwarna merah menunjukkan *binding site* protein
- Font berwarna hijau menunjukkan *active site* protein

Hasil simulasi *docking* pada target protein AKT1 dengan kode PDB 4GV1 dapat dilihat pada **Tabel 4.8** (halaman 62). Hasil tersebut menunjukkan bahwa tidak ada senyawa yang memiliki afinitas yang lebih rendah dari *native ligand* capivasertib yaitu dengan nilai afinitas -9,98 kcal/mol. Hal ini menandakan bahwa interaksi antara reseptor dan *native ligand* lebih stabil daripada reseptor dan senyawa uji. Senyawa uji dari *U. gambir* Roxb. yang memiliki selisih nilai afinitas paling minimal dengan *native ligand* yaitu gambiriin A1. Gambiriin A1 memiliki afinitas sebesar -9,36 kcal/mol.

Kestabilan dari interaksi yang terjadi dapat dianalisis berdasarkan *binding affinity*. Reseptor dan *ligand* cenderung berinteraksi pada kondisi energi terendah, dimana semakin rendah *binding affinity* maka akan semakin stabil interaksi yang terjadi antara reseptor dan *ligand* (34). Meskipun demikian, hal ini tidak secara langsung mengeliminasi senyawa-senyawa tersebut sebagai kandidat obat antikanker pada kanker kolorektal. Selain nilai afinitas, interaksi dan ikatan yang terjadi pada reseptor dan *ligand* juga perlu diperhatikan. Semakin banyak ikatan hidrogen maka akan semakin stabil interaksi antara reseptor dan *ligand*. Selain itu, semakin banyak *ligand* yang terikat pada asam amino maka jarak antara reseptor dan *ligand* akan semakin dekat sehingga interaksi yang terjadi semakin stabil (78).

Interaksi yang terjadi pada residu asam amino menunjukkan tempat pengikatan *ligand* dengan protein atau reseptor. Interaksi yang terjadi antara reseptor dan *ligand* mencakup ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan interaksi elektrostatis. Hasil visualisasi *docking* menunjukkan interaksi yang terjadi antara reseptor dan *ligand* secara langsung melibatkan area *binding site* protein. Interaksi yang terjadi antara *native ligand* capivasertib dengan reseptor AKT1 (PDB 4GV1) membentuk ikatan hidrogen pada 7 asam amino dan interaksi hidrofobik pada 5 asam amino. Ikatan hidrogen melibatkan Gly 157, Ala 230 Glu 234, Glu 278, Asp 292 dan interaksi hidrofobik melibatkan Leu 156, Val 164, Ala 177, Lys 179, Met 227 yang merupakan *binding site* protein dengan kode PDB 4GV1 (**Tabel 4.8**, no.1). Sedangkan pada senyawa gambiriin A1 ditemukan 3 asam amino membentuk ikatan hidrogen dan 3 interaksi hidrofobik. Gambiriin A1 membentuk ikatan hidrogen pada asam amino Leu 156, Lys 179, dan Gly 162 dan interaksi hidrofobik pada asam amino Ala 177, Val 164 yang berperan sebagai *binding site*

protein (**Tabel 4.8**, no.2). Hasil visualisasi *molecular docking* menunjukkan adanya kesamaan interaksi pada beberapa asam amino antara *native ligand* dan senyawa. Persamaan interaksi ini terdapat pada asam amino Ala 177 dan Val 167 yang membentuk interaksi hidrofobik. *Native ligand* dan gambiriin A1 tidak menunjukkan adanya interaksi pada *active site* protein. Berdasarkan analisis, *active site* protein menunjukkan adanya interaksi ketika *molecular docking* dilakukan terhadap senyawa gambiriin B1, yaitu membentuk ikatan hidrogen pada asam amino Asp 274 yang berperan sebagai katalis dan terlibat dalam pembentukan reaksi kimia. Interaksi yang terjadi pada *binding site* dan *active site* protein dapat menyebabkan perubahan konformasi struktur protein AKT1 sehingga dapat mempengaruhi fungsi dan aktivitas protein.

Tabel 4.9 Hasil Molecular Docking Target EGFR (4WKQ)

No	Senyawa	Affinity (kcal/mol)	CNN pose score	Interaction	Hydrogen Bonds	Hydrophobic
1	<i>Native ligand</i> (Gefitinib)	-7.60	0.9669	<p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond <p>Legend:</p> <ul style="list-style-type: none"> Pi-Sigma Alkyl Pi-Alkyl 	<p><i>Conventional Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - VAL 726 - MET 793 <p><i>Carbon Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - GLN 791 <p><i>Pi-Sigma</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - LEU 718 	<p>Alkyl & Pi-Alkyl :</p> <ul style="list-style-type: none"> - VAL 726 - MET 793 - LYS 745 - LEU 844 - ALA 743

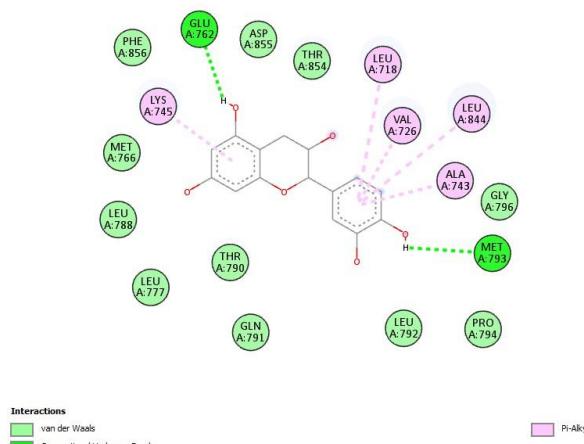
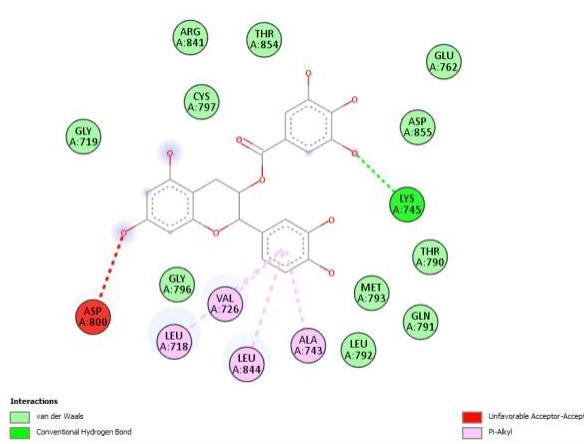
2	Procyanidin B3	-11.20	0.7688	<p><i>Conventional Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - ASP 800 - LYS 745 - ASP 855 - MET 793 - CYS 797 <p><i>Pi-Alkyl :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - VAL 726 - LYS 745 - ALA 743 - LEU 844 - CYS 797 <p><i>Pi-Sigma</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - LEU 718
3	Procyanidin B1	-10.92	0.7502	<p><i>Conventional Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - MET 793 - GLN 791 - ARG 841 - LYS 745 - LEU 718 <p><i>Pi-Alkyl :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - LEU 844 - LYS 745 - VAL 726 - LEU 718 - ALA 743 <p><i>Carbon Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - THR 854

4	Gambiriin A1	-10.90	0.8381	<p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond Pi-Cation <p>Legend:</p> <ul style="list-style-type: none"> Pi-Sigma Amide-Pi Stacked Pi-Alkyl 	<p><i>Conventional Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - GLU 762 - MET 793 - GLY 719 - LEU 788 <p><i>Pi-Sigma :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - LEU 718 - <p><i>Carbon Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - GLY 796 <p><i>Amide-Pi Stacked :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - LEU 718
5	Gambiriin B2	-10.64	0.7317	<p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond <p>Legend:</p> <ul style="list-style-type: none"> Pi-Cation Pi-Sigma Pi-Alkyl 	<p><i>Conventional Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - ASN 842 - LEU 788 - GLU 762 - THR 854 - MET 793 - LEU 718 <p><i>Pi-Alkyl :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - VAL 726 - MET 766 - LEU 844 - ALA 743 - LEU 718 <p><i>Carbon Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - GLY 796

6	Gambiriin A2	-10.37	0.7609	<p><i>Conventional Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - GLU 762 - MET 793 <p><i>Carbon Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - GLY 724 <p><i>Pi-Alkyl :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - LEU 844 - ALA 743 - VAL 726 - LYS 745 <p><i>Pi-Sigma :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - LEU 718
7	Gambiriin C	-10.30	0.7273	<p><i>Conventional Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - CYS 797 - MET 793 - GLN 791 - ASN 842 <p><i>Carbon Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - GLY 719 - GLY 796 <p><i>Pi-Alkyl :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - VAL 726 - LEU 718 - LEU 844 - ALA 743

8	Procyanidin B2	-10.15	0.6157	<p><i>Conventional Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - ASN 842 - ASP 855 - LYS 745 <p><i>Carbon Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - ARG 841 <p><i>Pi-Alkyl :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - ALA 743 - LEU 844 - VAL 726 - ARG 841 - LYS 745
9	Gambiriin B1	-10.00	0.6631	<p><i>Conventional Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - THR 725 - MET 793 <p><i>Carbon Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - GLY 724 <p><i>Pi-Alkyl :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - LEU 718 - LEU 844 - VAL 726

10	Roxburghine B	-9.69	0.1460	<p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Carbon Hydrogen Bond Pi-Sigma Pi-Alkyl 	<p><i>Carbon Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - ASP 800 - ARG 841 - MET 793 <p><i>Pi-Alkyl :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - LEU 718 - LEU 844 - ALA 743 - LYS 745 - VAL 726 <p><i>Pi-Sigma :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - VAL 726
11	Quercetin	-9.65	0.8871	<p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Unfavorable Acceptor-Acceptor Pi-Alkyl 	<p><i>Conventional Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - MET 793 <p><i>Pi-Alkyl :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - LYS 745 - VAL 726 - ALA 743 - LEU 844 - LEU 718

12	(-) -Catechin	-9.54	0.8679	 <p><i>Conventional Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - GLU 762 - MET 793 <p><i>Pi-Alkyl :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - LYS 745 - LEU 718 - VAL 726 - LEU 844 - ALA 743 	
13	Epicatechin gallate	-9.42	0.6488	 <p><i>Conventional Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - LYS 745 <p><i>Pi-Alkyl :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - LEU 718 - VAL 726 - LEU 844 - ALA 743 	

14	Epigallocatechin	-9.03	0.8537	<p>Conventional Hydrogen Bond :</p> <ul style="list-style-type: none"> - GLU 762 - ASP 855 - MET 793 - VAL 726 - LEU 844 <p>Pi-Alkyl :</p> <ul style="list-style-type: none"> - LYS 745 - LEU 718 - ALA 743 - VAL 726 - LEU 844 	
15	Gallocatechin	-9.02	0.8496	<p>Conventional Hydrogen Bond :</p> <ul style="list-style-type: none"> - GLU 762 - ASP 855 - MET 793 - LEU 788 <p>Carbon Hydrogen Bond :</p> <ul style="list-style-type: none"> - GLY 796 <p>Pi-Alkyl :</p> <ul style="list-style-type: none"> - LYS 745 - LEU 718 - LEU 844 - VAL 726 	

16	(+)-Catechin	-8.85	0.8335	<p><i>Conventional Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - ASP 855 - GLU 762 - MET 793 - LEU 844 <p><i>Pi-Alkyl :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - LYS 745 - LEU 844 - LEU 718 - VAL 726 <p><i>Carbon Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - GLY 796 	
17	(-)Epicatechin	-8.57	0.8575	<p><i>Pi-Alkyl :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - LEU 718 - LEU 844 - ALA 743 - VAL 726 - LYS 745 	

18	(+)-Epicatechin	-8.39	0.8141	<p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals (green) Conventional Hydrogen Bond (green dashed line) Pi-Alkyl (pink) Carbon Hydrogen Bond (light green) 	<p><i>Conventional Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - CYS 797 - GLU 762 - LYS 745 <p><i>Carbon Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - GLY 796 	<p>Pi-Alkyl :</p> <ul style="list-style-type: none"> - ALA 743 - LEU 844 - LEU 718
19	Gambirine	-7.79	0.3458	<p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals (green) Carbon Hydrogen Bond (green dashed line) Unfavorable Donor-Donor (red) Alkyl (purple) Pi-Alkyl (pink) 	<p><i>Carbon Hydrogen Bond :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - LEU 718 - GLY 719 	<p>Alkyl & Pi-Alkyl :</p> <ul style="list-style-type: none"> - CYS 797 - ALA 743 - VAL 726 - LEU 788

20	Catechol	-4.11	0.8721	<p><i>Conventional Hydrogen Bond :</i> - ASP 855</p>	-
----	----------	-------	--------	--	---

Keterangan:

- *Font berwarna biru menunjukkan interaksi yang sama dengan native ligand*
- *Font berwarna merah menunjukkan binding site protein*

Hasil simulasi *docking* pada target EGFR dengan kode PDB 4WKQ dapat dilihat pada **Tabel 4.9** (halaman 75). Hasil *docking* menunjukkan hampir seluruh senyawa uji memiliki nilai afinitas yang lebih rendah daripada *native ligand*. Berdasarkan analisis, catechol merupakan senyawa yang memiliki afinitas lebih besar daripada *native ligand* yaitu dengan afinitas sebesar -4,11 kcal/mol. *Native ligand* gefitinib memiliki nilai afinitas sebesar 7,60 kcal/mol. Hal ini menunjukkan bahwa mayoritas senyawa diprediksi stabil dalam menargetkan EGFR dan memiliki potensi sebagai antikanker. Procyanidin B3 merupakan senyawa yang memiliki nilai afinitas terendah daripada senyawa lainnya, yaitu sebesar -11,20 kcal/mol dan lebih minimal daripada *native ligand*. Dengan demikian, dapat diketahui bahwa procyanidin B3 memiliki interaksi yang lebih stabil pada reseptor daripada *native ligand* dan senyawa uji lainnya.

Hasil dari visualisasi *molecular docking* antara reseptor dan *ligand* pada *native ligand* gefitinib dan 19 senyawa uji menunjukkan sebagian besar interaksi terjadi pada area *binding site* protein dan tidak ditemukan interaksi yang terjadi pada *active site* protein. Hal ini menunjukkan bahwa *native ligand* dan senyawa uji memiliki interaksi pada area spesifik protein yang tidak terlibat langsung dalam pembentukan reaksi kimia. Pada target EGFR, *native ligand* berikatan pada reseptor EGFR (PDB 4WKQ) dengan 8 asam amino, diantaranya 2 asam amino membentuk ikatan hidrogen dan 6 membentuk interaksi hidrofobik. *Binding site* protein membentuk ikatan hidrogen pada asam amino Met 793 dan Gln 791 dan interaksi hidrofobik pada asam amino Leu 718, Val 726, Ala 743, Lys 745, Met 766, dan Leu 844 (**Tabel 4.9**, no.1). Sedangkan, senyawa procyanidin B3 dengan 6 asam amino membentuk ikatan hidrogen dan 6 hidrofobik. Ikatan hidrogen antara reseptor dan *ligand* procyanidin B3 terjadi pada asam amino Lys 745, Met 793, Gly 796, Cys 797, Asp 800, Asp 855 dan interaksi hidrofobik pada asam amino Leu 718, Val 726, Ala 743, Lys 745, Cys 797, Leu 844 yang merupakan *binding site* protein (**Tabel 4.9**, no.2). Berdasarkan analisis ditemukan kesamaan interaksi antara *native ligand* dan procyanidin B3. Persamaan interaksi terjadi pada ikatan hidrogen dengan asam amino Met 793 dan interaksi hidrofobik pada asam amino Val 726, Lys 745, Ala 743, Leu 844, dan Leu 718.

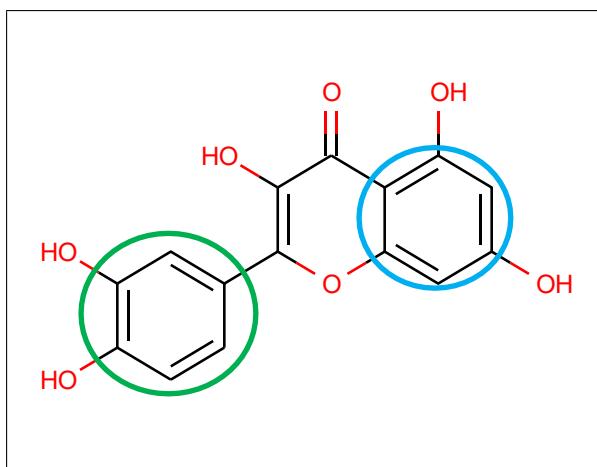
Interaksi yang dapat terjadi antara reseptor dan *ligand* pada *molecular docking* diantaranya adalah ikatan hidrogen, van der Waals, ikatan ionik, ikatan pi-pi, pi-sigma, pi-alkil, ikatan kovalen, dan ikatan hidrofobik. Penelitian ini berfokus pada ikatan hidrogen dan ikatan hidrofobik. Ikatan hidrogen merupakan ikatan yang terjadi ketika atom hidrogen terikat pada atom lain yang memiliki keelektronegatifan tinggi. Ikatan ini mempengaruhi kelarutan dan derajat disolusi dari molekul. Sementara itu, ikatan hidrofobik merupakan interaksi yang terjadi antara molekul non polar. Ikatan ini terjadi akibat adanya gaya tolak menolak antara molekul polar dan non polar (86).

Ikatan van der Waals merupakan ikatan paling lemah diantara ikatan lainnya. Ikatan ionik terjadi antara atom dengan perbedaan keelektronegatifan yang besar. Ikatan pi terjadi antara dua atom yang mempunyai orbital p yang tumpang tindih dan ikatan p-alkil terjadi ketika orbital p tumpang tindih dengan atom alkil. Sedangkan sigma adalah ikatan yang terjadi antara dua atom yang mempunyai orbital s yang tumpang tindih. Ikatan kovalen merupakan ikatan yang paling kuat dan terjadi antara dua atom yang berbagi elektron (86).

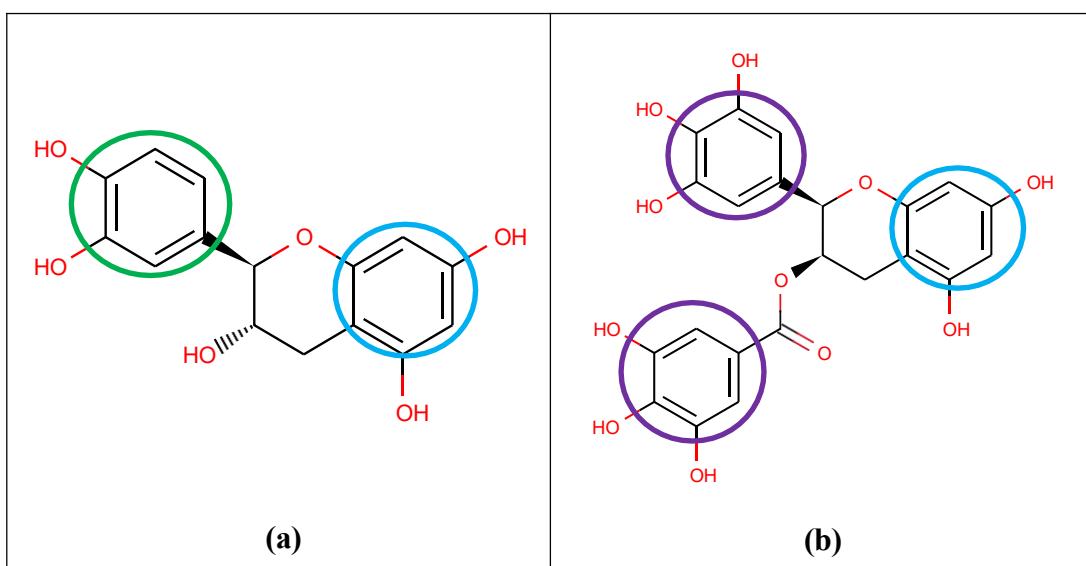
Berdasarkan penelitian sebelumnya, Putri, dkk melaporkan bahwa quercetin berpotensi sebagai agen antikanker kolorektal dengan *molecular docking*. Quercetin ditargetkan pada penghambatan COX-2 dan penginduksi Caspase-3 melalui ikatan hidrogen dengan energi pengikatan sebesar -9,54 kkal/mol (COX-2) dan -4,59 kkal/mol (Caspase-3) (87). Selain itu, Kusuma, dkk juga melaporkan quercetin memiliki aktivitas sitotoksik, dapat menekan proliferasi dan menginduksi apoptosis pada sel kanker WiDr. Hasil peneltian menunjukkan quercetin memiliki nilai IC₅₀ sebesar 1046 μM (88).

Beberapa penelitian telah menunjukkan aktivitas multi-target quercetin sebagai antikanker pada pengobatan kanker kolorektal. Quercetin berpotensi sebagai antikanker kolorektal melalui penekanan proliferasi sel, induksi apoptosis, dan penghambatan metastasis. Selain itu, quercetin berperan dalam modulasi jalur sinyal yang berhubungan dengan kanker kolorektal. Pada umumnya, jalur sinyal yang dimodulasi diantaranya adalah NF-κB, Wnt, MAPK, P13K-Akt, p53, ErbB, dan mTOR. Quercetin diketahui dapat menargetkan protein AKT1 dan EGFR

dengan menekan proliferasi, menginduksi apoptosis, dan menghambat angiogenesis (89).



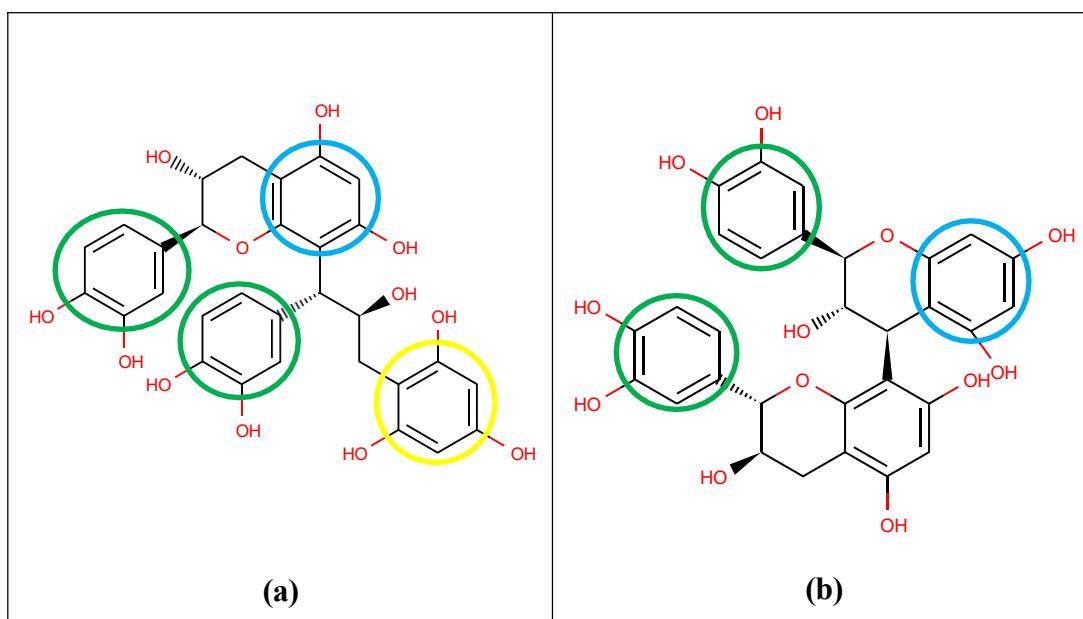
Gambar 4.8 Struktur Quercetin. Quercetin merupakan senyawa polifenol, golongan flavonoid (lingkaran menandakan gugus fenolik; hijau: catechol dan biru: resorcinol).



Gambar 4.9 Struktur Catechin, (a) (+)-Catechin; (b) Epigallocatechin gallate. (+)-Catechin dan Epigallocatechin gallate merupakan senyawa polifenol, golongan flavonoid (lingkaran menandakan gugus fenolik; hijau: catechol, biru: resorcinol, dan ungu: pyrogallol). Katekin dengan gugus katekol memiliki aktivitas antioksidan yang lebih rendah daripada dengan gugus pirogalol (90).

Selain quercetin, beberapa studi *in vitro* dan *in vivo* menunjukkan bahwa senyawa epigallocatechin gallate (EGCG) dan turunan katekin lainnya

mempunyai aktivitas penghambatan perkembangan kanker kolorektal. Senyawa turunan katekin berpotensi sebagai anti-proliferasi, menginduksi apoptosis, dan menghambat angiogenesis. EGCG menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi daripada senyawa katekin lainnya. Senyawa ini dapat menekan invasi dan transformasi sel melalui berbagai jalur sinyal yang berhubungan dan karsinogenesis. EGCG mempengaruhi pertumbuhan sel kanker kolorektal dengan menurunkan regulasi berbagai jalur sinyal yang berhubungan dengan RTKs. Selain itu, senyawa ini dapat menghambat ekspresi Cyclin D1 dan Bcl-2 dalam jalur NF-κB, mengaktifkan Bax, dan Caspase-3, dan menghentikan siklus sel dalam fase G0-G1. Pada sel Caco-2, HCT116, HT29, SW480, dan SW837, EGCG dan katekin dapat menginduksi penghentian siklus sel G1, mengurangi aktivasi Akt, EGFR, dan HER2, serta menurunkan regulasi reseptor EGF melalui fosforilasi pada Ser104/1047 oleh p38 MAPK. Selain itu, EGCG dapat menghambat proliferasi sel Caco-2 melalui induksi penghentian siklus sel G2/M (10).



Gambar 4.10 Struktur Gambiriin A1 dan Procyanolidin B3, (a) Gambiriin A1; (b) Procyanolidin B3. Gambiriin A1 dan Procyanolidin B3 termasuk senyawa polifenol yang merupakan dimer flavonoid (lingkaran menandakan gugus fenolik; hijau: catechol, biru: resorcinol, dan kuning: phloroglucinol).

Gambiriin A1 dan procyanidin B3 merupakan senyawa polifenol yang termasuk dimer flavonoid atau dimer katekin. Senyawa polifenol telah dilaporkan memiliki banyak aktivitas farmakologis, seperti sebagai antioksidan, antiinflamasi, antikarsinogenik, antivirus, dan antialergi (91). Pada gambiriin A1 dan procyanidin B3 ditemukan sejumlah gugus hidroksil yang berpotensi sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan suatu senyawa bergantung pada ikatan atau konfigurasi struktur senyawa dan jumlah gugus hidroksil (90). Senyawa yang mempunyai banyak gugus hidroksil dengan posisi orto akan menunjukkan sifat antioksidan yang kuat.

Gugus hidroksil yang ditemukan pada senyawa polifenol dapat berinteraksi dengan reseptor di dalam tubuh. Gugus ini berperan dalam mendonorkan atom hidrogen untuk menetralisir radikal bebas. Dengan demikian, senyawa polifenol dapat melindungi sel dari kerusakan oksidatif dan berperan sebagai antioksidan untuk menjaga kesehatan tubuh. Senyawa ini dapat menghambat proliferasi sel dan menginduksi apoptosis pada beberapa jenis sel kanker (91). Senyawa polifenol mampu menginduksi kematian sel kanker tanpa mempengaruhi sel sehat (90).

Beberapa pengobatan kanker kolorektal telah disetujui oleh FDA (*Food and Drug Administration*) dengan menargetkan jalur spesifik yang memicu pertumbuhan kanker, diantaranya adagrasib, bevacizumab, cetuximab, encorafenib, fruquintinib, ipilimumab, nivolumab, panitumumab, pembrolizumab, ramucirumab, regorafenib, tucatinib, dan ziv-aflibercept (92). Sebagian besar pengobatan kanker kolorektal menargetkan EGFR yang berperan penting dalam karsinoma, terutama dalam pengaturan diferensiasi sel, proliferasi, migrasi, angiogenesis, dan apoptosis. Cetuximab dan panitumumab merupakan antibodi monoklonal yang menargetkan EGFR. Kedua obat ini secara kompetitif menghambat pengikatan EGF dan aktivitas tirosin kinase (93).

1.6 *Molecular Dynamics*

Pada penelitian ini, senyawa yang memiliki nilai afinitas terendah dari masing-masing target pada simulasi *molecular docking* (berdasarkan **Tabel 4.8** dan **4.9**) dilanjutkan dengan simulasi *molecular dynamics* menggunakan *software*

Gromacs. Senyawa yang dilanjutkan pada tahapan simulasi *molecular dynamics* yaitu gambiriin A1 dengan target AKT1 dan procyanidin B3 dengan target EGFR. Simulasi *molecular dynamics* dilakukan untuk mengetahui pergerakan setiap atom dalam kompleks atau protein yang bergerak pada periode waktu tertentu. Simulasi ini dapat mengetahui berbagai proses biomolekular, termasuk perubahan konformasi, pengikatan *ligand*, pelipatan protein, dan menunjukkan posisi atom saat bergerak (94).

Selain itu, *molecular dynamics* dapat menganalisis fleksibilitas residu dan mengetahui setiap perubahan konformasi protein. *Molecular dynamics* dapat memberikan data pergerakan makromolekul dengan variasi sistem yang disesuaikan dengan keadaan sebenarnya seperti pelarut, tekanan, pH, dan suhu (35). Metode komputasi ini dilakukan untuk mengetahui kestabilan interaksi antara reseptor dan *ligand* pada sistem. Dalam hal ini, sistem dibuat semirip mungkin dan sesuai dengan kondisi fisiologis tubuh manusia pada rentang waktu tertentu.

Simulasi *molecular dynamics* diawali dengan penyiapan topologi pada reseptor dan *ligand*. Dalam penyiapan topologi reseptor dilakukan pemilihan medan gaya (*force field*) dan model air. *Force field* merupakan fungsi yang dirancang untuk mempertahankan geometri molekul dan identitas struktur molekul selama simulasi (94). Medan gaya juga menggambarkan energi potensial antar atom pada sistem. Medan gaya yang digunakan dalam penelitian ini adalah amber *force field* (AMBER99SB-ILDN). Medan gaya AMBER99SB-ILDN telah disempurnakan dan divalidasi secara luas dalam berbagai penelitian untuk meningkatkan akurasi dalam simulasi. Sementara itu, model air yang digunakan dalam penyiapan topologi ini yaitu TIP3P.

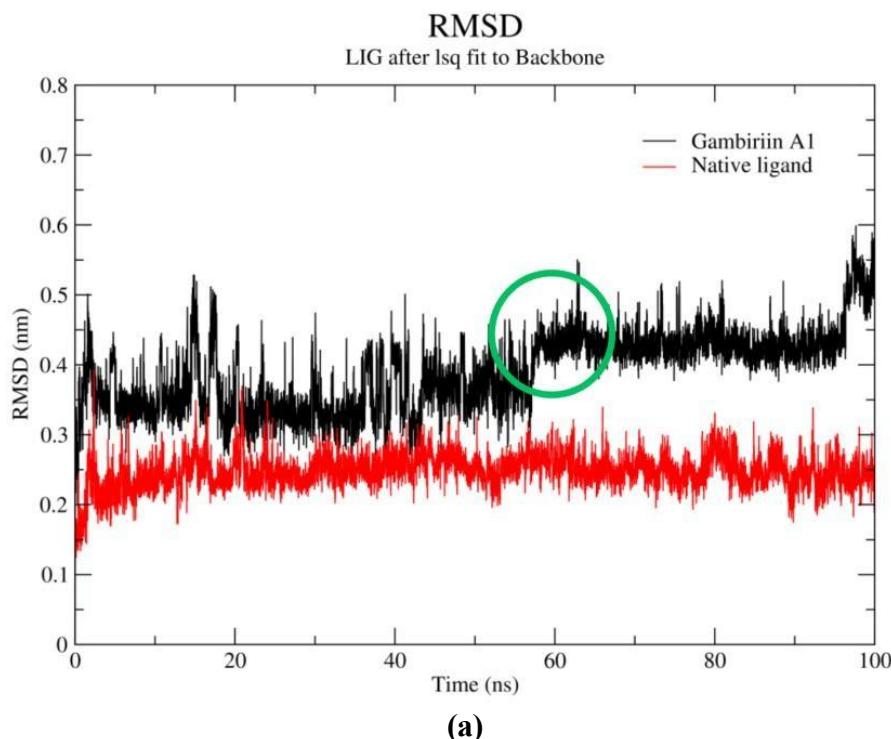
Penyiapan topologi *ligand* dilakukan dengan acpype menggunakan medan gaya *The General AMBER Force Field* (GAFF2). GAFF kompatibel terhadap medan gaya AMBER pada reseptor dan mempunyai parameter pada sebagian besar molekul organik yang terdiri dari C, N, O, H, S, P, F, Cl, Br, dan I. GAFF2 dapat menghitung energi interaksi, densitas, energi bebas, penguapan, dan hidrasi. Dalam *molecular dynamics* sistem harus dalam kondisi netral sehingga diperlukan proses solvasi dan penambahan ion NaCl. Proses solvasi dan penambahan ion

dilakukan dengan konsentrasi netral yaitu 0,15 M mengikuti kondisi biologis tubuh (94).

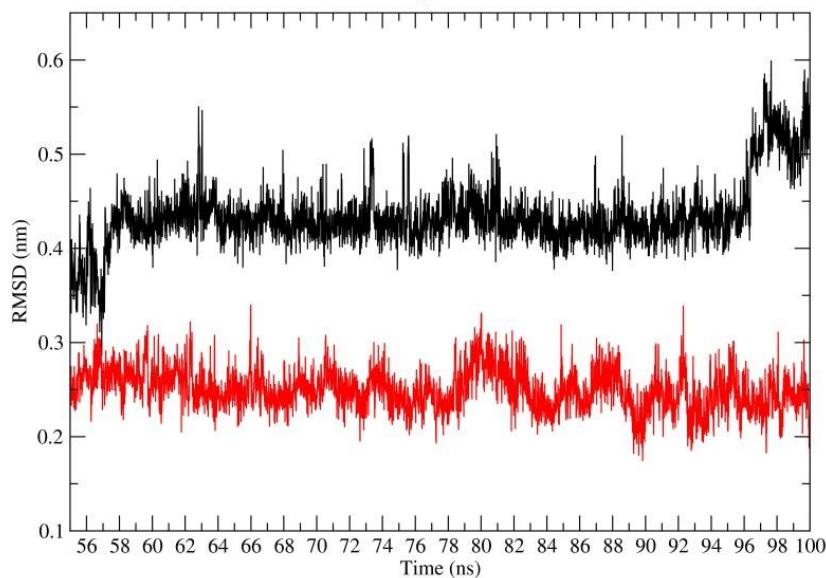
Tahap *molecular dynamics* dimulai dari minimisasi, equilibrasi, dan produksi. Minimisasi bertujuan meminimalkan jumlah bentrokan dan kontak antar atom dalam sistem (94). Proses minimisasi ini juga bertujuan untuk meminimumkan energi potensial sistem dan berperan penting dalam mempertahankan stabilitas molekul dalam sistem biologis atau kimia. Semakin rendah energi potensial maka konformasi molekul akan semakin stabil.

Equilibration atau kesetimbangan merupakan kondisi sistem yang awalnya tidak bergerak berubah menjadi mencapai suhu yang diinginkan. Proses ini juga dapat dikatakan sebagai waktu istirahat sistem. Tahapan *equilibration* pada simulasi *molecular dynamics* umumnya menggunakan *ensemble* NVT (volume dan *temperature*) dan NPT (*pressure* dan *temperature*) (94). *Equilibration* dipengaruhi oleh suhu, tekanan, dan volume dalam mencapai kesetimbangan termodinamika sehingga energi sistem stabil dan analisis menjadi semakin akurat. Tahapan terakhir dalam simulasi *molecular dynamics* dijalankan pada proses produksi. Simulasi dilakukan selama 100 ns (*nanosecond*) atau setara dengan 50.000.000 *steps*. Konformasi kompleks *ligand* dan reseptor pada sekali simulasi menghasilkan 10.000 *frame*. Proses produksi ini dilakukan pada suhu 310 K atau setara dengan 36,87 °C yang merupakan suhu tubuh manusia.

Setelah proses simulasi selesai dijalankan dilakukan analisis hasil *molecular dynamics*. Parameter yang dianalisis dalam simulasi ini diantaranya RMSD (*Root Mean Square Deviation*), RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*), Rg (*Radius of Gyration*), ikatan hidrogen, dan SASA (*Solvent Accessible Surface Area*). RMSD merupakan metode pengukuran untuk menilai kemiripan struktur antara dua konformasi molekul. Dalam simulasi *molecular dynamics* RMSD digunakan untuk mengetahui kestabilan konformasi protein dengan *ligand* dari waktu ke waktu. Nilai RMSD yang diterima untuk sistem dapat dikatakan stabil yaitu apabila berada pada rentang 0,2-0,5 nm selama simulasi berlangsung (33).



(a)

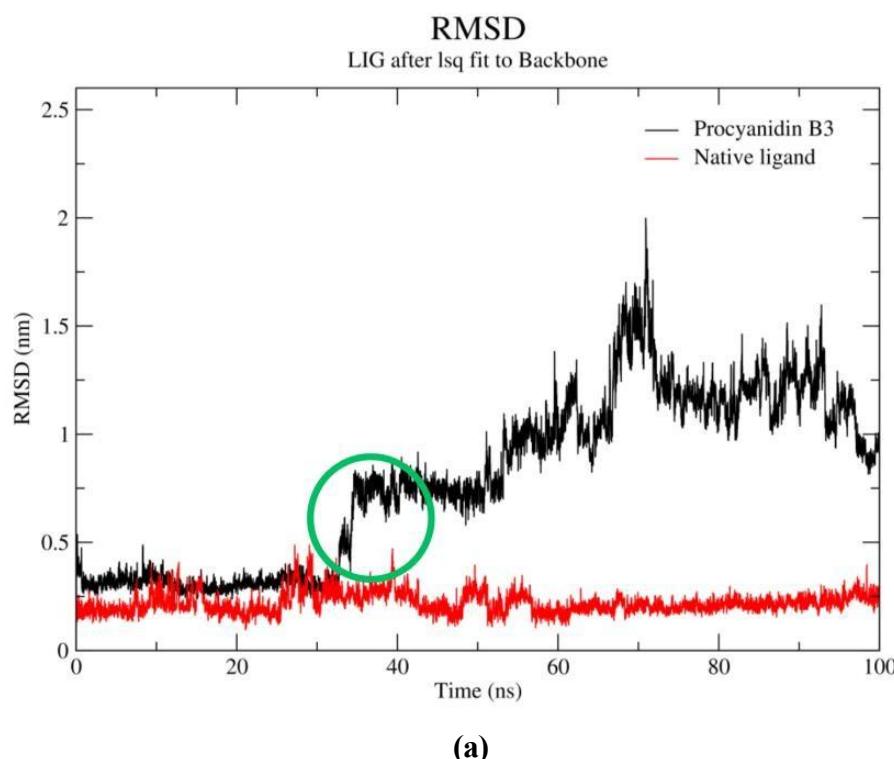


(b)

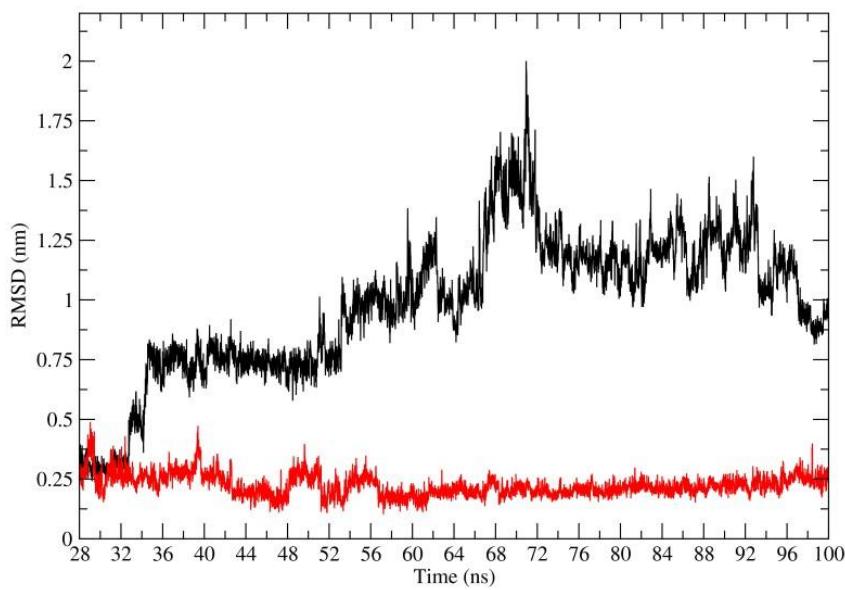
Gambar 4.11 Grafik RMSD Native Ligand 4GV1 dan Gambiriin A1,
 (a) Hasil plot selama 100 ns; (b) Hasil plot dimulai dari 55 ns.
Native ligand menunjukkan RMSD yang lebih rendah dan stabil daripada gambiriin A1. Gambiriin A1 stabil hingga simulasi 56 ns.

Pada **Gambar 4.11** dapat diketahui bahwa *native ligand* target AKT1 memiliki nilai RMSD yang lebih rendah dan stabil daripada senyawa gambiriin

A1. *Native ligand* memiliki nilai RMSD yang stabil dalam rentang 0,13-0,39 nm. Sedangkan nilai RMSD gambiriin A1 berada pada rentang 0,25-0,59. Berdasarkan hasil analisis gambiriin A1 stabil hingga simulasi 56 ns dan mulai mengalami perubahan pada simulasi ke-57 ns. Perubahan ini stabil hingga simulasi ke-95, sementara itu pada simulasi ke-96 ns senyawa kembali mengalami fluktuasi. Gambiriin A1 mengalami perubahan konformasi yang tidak terlalu signifikan dan stabil pada simulasi 100 ns. Perubahan yang stabil berada pada rentang 1-3 Å (94).



(a)



(b)

Gambar 4.12 Grafik RMSD Native Ligand 4WKQ dan Procyanidin B3,

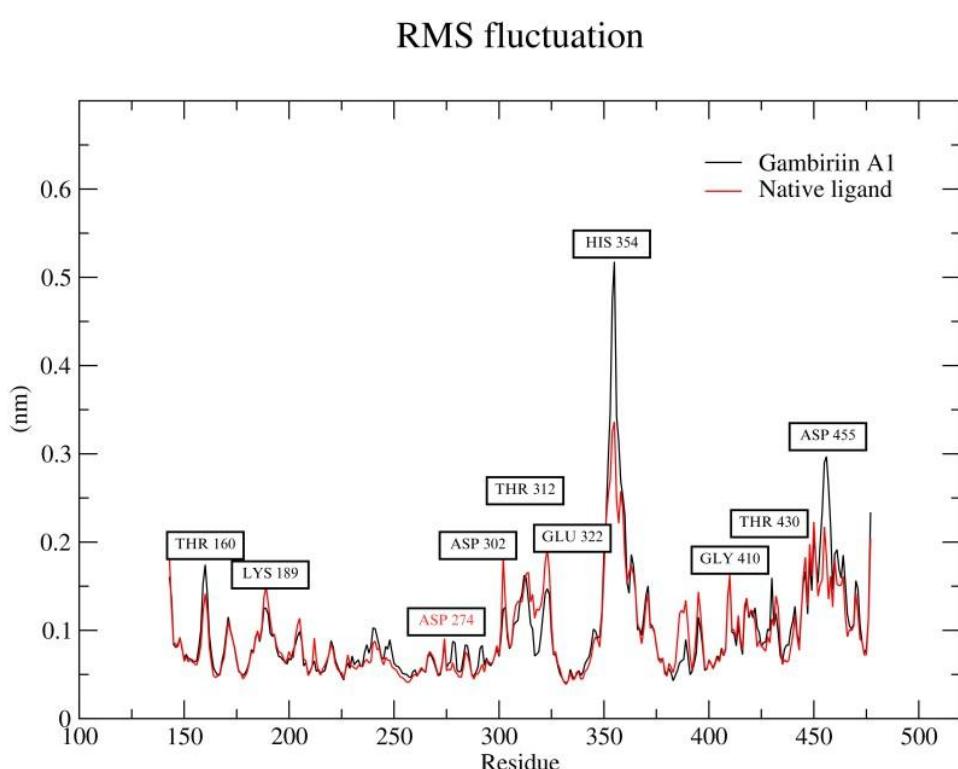
(a) Hasil plot selama 100 ns; (b) Hasil plot dimulai dari 28 ns. *Native ligand* menunjukkan RMSD yang lebih rendah dan stabil daripada procyanidin B3. Procyanidin B3 menunjukkan fluktuasi yang signifikan pada simulasi 33 ns hingga akhir simulasi.

RMSD pada target EGFR dan senyawa procyanidin B3 dapat dilihat pada

Gambar 4.12. *Native ligand* target EGFR memiliki nilai RMSD yang stabil pada simulasi dengan rentang 0,2-0,4 nm. Namun, senyawa procyanidin B3 tidak lebih stabil daripada *native ligand* dan mengalami perubahan konformasi yang cukup signifikan. Senyawa stabil pada rentang 0,25-0,5 nm hingga simulasi ke-32 ns. Sementara itu, pada waktu ke-33 ns senyawa mulai mengalami fluktuasi yang tidak beraturan. Fluktuasi yang terjadi menyebabkan senyawa tidak lagi menunjukkan nilai RMSD berada dalam rentang normal. Kenaikan nilai RMSD bermula dari 0,6 nm dan mencapai nilai RMSD yang paling tinggi yaitu 2 nm. Nilai fluktuasi tertinggi ini terjadi pada simulasi ke-71 ns. Fluktuasi RMSD yang signifikan menandakan adanya ikatan antara reseptor dan *ligand* yang terlepas sejauh jarak tertentu.

Berbeda dengan RMSD, RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*) digunakan untuk menilai fleksibilitas residu atau menghitung banyaknya residu

yang berfluktuasi selama simulasi berlangsung (94). Nilai RMSF menggambarkan fleksibilitas dari perubahan konformasi setiap residu asam amino. Residu dengan nilai RMSF yang rendah menunjukkan fleksibilitas yang rendah sehingga interaksi yang terjadi antara reseptor dan *ligand* akan semakin stabil. Sebaliknya, semakin tinggi nilai RMSF maka akan semakin tinggi fleksibilitas protein, dimana menunjukkan interaksi atau ikatan yang tidak stabil. Hal ini terjadi akibat adanya perubahan konformasi selama simulasi berlangsung (95). Grafik RMSF gambiriin A1 terhadap AKT1 ditunjukkan pada **Gambar 4.13**.

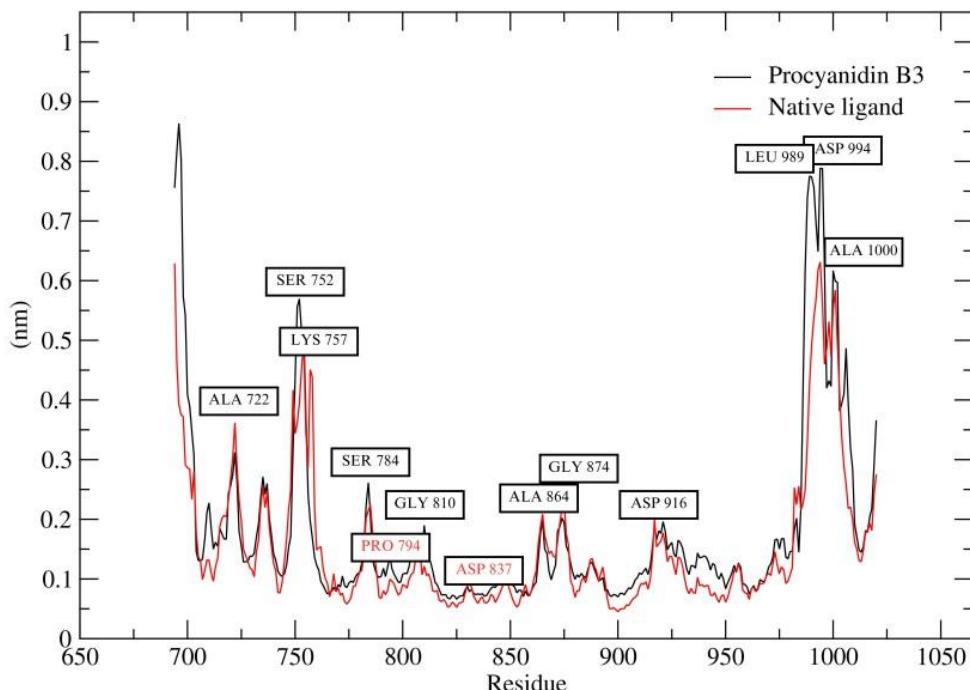


Gambar 4.13 Grafik RMSF *Native Ligand* 4GV1 dan Gambiriin A1, Asp 274 merupakan *active site* dari protein AKT1. Residu Asp 274 pada *native ligand* menunjukkan fluktuasi yang rendah. Area *binding site* pada *native ligand* dan gambiriin A1 menunjukkan fleksibilitas yang rendah.

Berdasarkan **Gambar 4.13**, *native ligand* 4GV1 dan gambiriin A1 menunjukkan fluktuasi residu asam amino yang relatif sama. Fluktuasi tertinggi baik pada *native ligand* maupun gambiriin A1 terjadi pada residu His 354. Selain asam amino His 354 juga terdapat beberapa residu yang berfluktuasi diantaranya

yaitu Thr 160, Lys, 189, Asp 302, Thr 312, Glu 332, Gly 410, Thr 430, dan Asp 455. Asam amino tersebut tidak terlibat langsung pada area *active site* ataupun *binding site* yang berperan penting dalam situs pengikatan. Residu yang terlibat langsung dalam *active site* yaitu Asp 274 memiliki nilai RMSF yang kecil sekitar 0,08 nm. Fluktuasi RMSD pada residu ini hanya terjadi pada *native ligand*, sedangkan pada senyawa gambiriin A1 asam amino Asp 274 tidak mengalami fluktuasi. Sementara itu, area pengikatan (*binding site*) protein memiliki fleksibilitas yang rendah atau tidak menunjukkan terjadinya fluktuasi selama simulasi berlangsung. Dengan demikian, *native ligand* dan senyawa gambiriin A1 diketahui memiliki interaksi yang stabil pada *active site* dan *binding site* protein AKT1.

RMS fluctuation



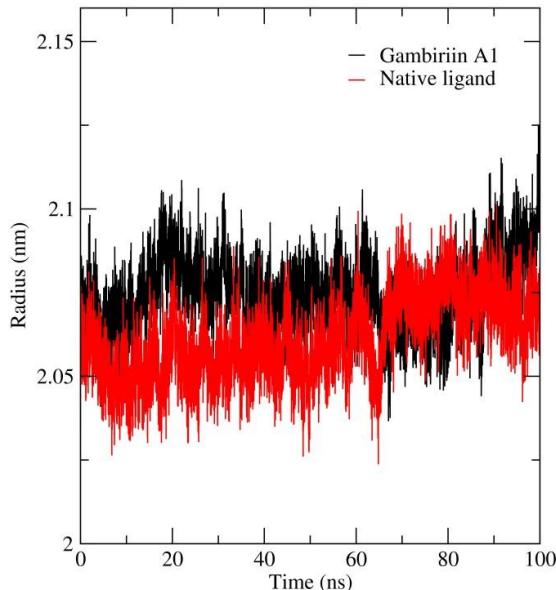
Gambar 4.14 Grafik RMSF Native Ligand 4WKQ dan Procyanidin B3,
Asp 837 merupakan *active site* dan Pro 794 merupakan *binding site* dari protein EGFR. *Active site* dan *binding site* protein menunjukkan fluktuasi yang relatif rendah.

Gambar 4.14 menunjukkan grafik RMSF *native ligand* target EGFR dan senyawa procyanidin B3. Procyanidin B3 menunjukkan fluktuasi yang relatif

lebih tinggi daripada dengan *native ligand* 4WKQ. Pada procyanidin B3 fluktuasi yang paling tinggi terjadi pada residu asam amino Asp 994, Leu 989, Ser 752, dan Ala 1000. Sementara itu, fluktuasi tertinggi dari *native ligand* terjadi pada asam amino Asp 994, Ala 1000, dan Lys 757. Fluktuasi yang terjadi menunjukkan fleksibilitas yang tinggi pada asam amino yang bukan merupakan area *active site* dan *binding site* protein. Beberapa residu yang juga mengalami fluktuasi baik pada *native ligand* maupun procyanidin B3 diantaranya adalah Ala 722, Ser 784, Pro 794, Gly 810, Ala 864, Gly 874, dan Asp 916. *Active site* protein terdapat pada asam amino Asp 837. Residu ini menunjukkan fleksibilitas yang rendah dan fluktuasi sangat kecil. Sedangkan, residu asam amino Pro 794 yang berperan terhadap *binding site* protein mengalami fluktuasi dengan nilai yang relatif kecil pada *native ligand* sekitar 0,1 nm. Secara keseluruhan residu pada *binding site* menunjukkan fleksibilitas yang rendah. Kedua *ligand* ini tidak memberikan fluktuasi yang signifikan pada *active site* dan *binding site* protein sehingga fluktuasi tersebut tidak secara langsung mempengaruhi stabilitas ikatan selama simulasi berlangsung.

Radius of Gyration (R_g) atau jari-jari girasi merupakan parameter untuk mengukur *compactness* atau kekompakan struktur protein di dalam lingkungan biologis. R_g digunakan untuk menentukan jumlah variasi dari struktur protein selama simulasi *molecular dynamics* (96). Jari-jari girasi mengacu pada ukuran penyebaran atom-atom dalam protein di sekitar pusat massanya. Parameter ini mampu mengukur jarak rata-rata antara pusat rotasi dan titik terjadinya transfer energi paling efektif (97).

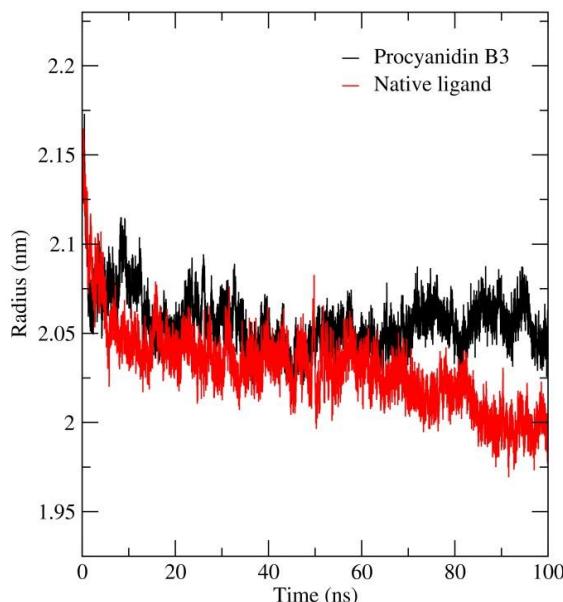
Radius of gyration (total and around axes)



Gambar 4.15 Grafik Rg Native Ligand 4GV1 dan Gambiriin A1. Native ligand protein AKT1 memiliki nilai Rg yang lebih rendah daripada gambiriin A1 (native ligand 2,05-2,08 nm dan gambiriin A1 2,07-2,1 nm).

Hasil analisis Rg menunjukkan penambatan *ligand* pada kompleks protein dalam sistem. Grafik Rg terhadap protein AKT1 (PDB 4GV1) dapat dilihat pada **Gambar 4.15**. Grafik ini menunjukkan bahwa *native ligand* dan gambiriin A1 memiliki nilai Rg yang relatif konstan hingga akhir simulasi. Nilai Rg dari *native ligand* berada di sekitar 2,05-2,08 nm. Sementara itu, nilai Rg gambiriin A1 berkisar pada rentang 2,07-2,1 nm. Berdasarkan analisis grafik Rg, *native ligand* dan gambiriin A1 memiliki stabilitas terhadap *compactness* dalam kompleks protein dan *ligand* pada lingkungan biologis. Hal ini menunjukkan bahwa gambiriin A1 tidak mempengaruhi konformasi protein secara signifikan. Namun, gambiriin A1 memiliki struktur yang lebih fleksibel daripada *native ligand* 4GV1.

Radius of gyration (total and around axes)



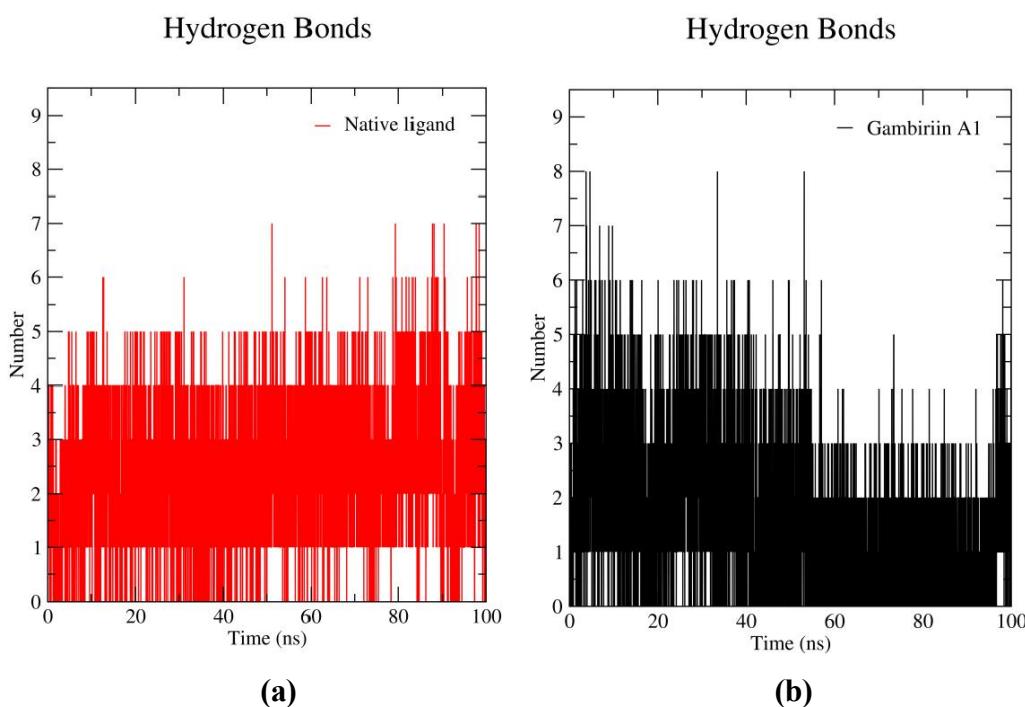
Gambar 4.16 Grafik Rg Native Ligand 4WKQ dan Procyanidin B3. Native ligand protein EGFR memiliki nilai Rg yang lebih rendah daripada procyanidin B3 (*native ligand* 2,-2,1 nm dan gambiriin A1 2,05-2,14 nm).

Analisis nilai Rg dari penambatan *ligand* terhadap protein EGFR (4WKQ) dapat dilihat pada **Gambar 4.16**. Grafik Rg menunjukkan terjadinya fluktuasi selama simulasi. Berdasarkan analisis grafik Rg, *native ligand* memiliki struktur yang lebih stabil dan kompak daripada dengan procyanidin B3. Nilai jari-jari girasi *native ligand* 4WKQ pada awal simulasi sekitar 2,1 nm dan mengalami penurunan beberapa nanosecond, yaitu pada waktu simulasi 2 ns. Nilai Rg *native ligand* stabil pada nilai 2 nm setelah mengalami penurunan. Sementara itu, nilai Rg procyanidin B3 pada awal simulasi sekitar 2,14 nm. Nilai Rg procyanidin B3 kemudian mengalami penurunan dan berfluktuasi. Penurunan yang terjadi mengalami penyesuaian konformasi hingga mencapai nilai yang mendekati 2,05 nm dan lebih stabil daripada nilai sebelumnya. Setelah 70 ns, nilai Rg dari procyanidin B3 kembali meningkat dan berfluktuasi.

Nilai Rg yang lebih tinggi menggambarkan struktur protein yang lebih longgar. Kondisi ini menyebabkan konformasi protein lebih fleksibel. Semakin tinggi nilai Rg maka konformasi protein semakin fleksibel (98). Oleh karena itu,

kekompakkan protein dapat diketahui dari nilai R_g , dimana semakin kompak protein maka semakin rendah nilai R_g yang dihasilkan.

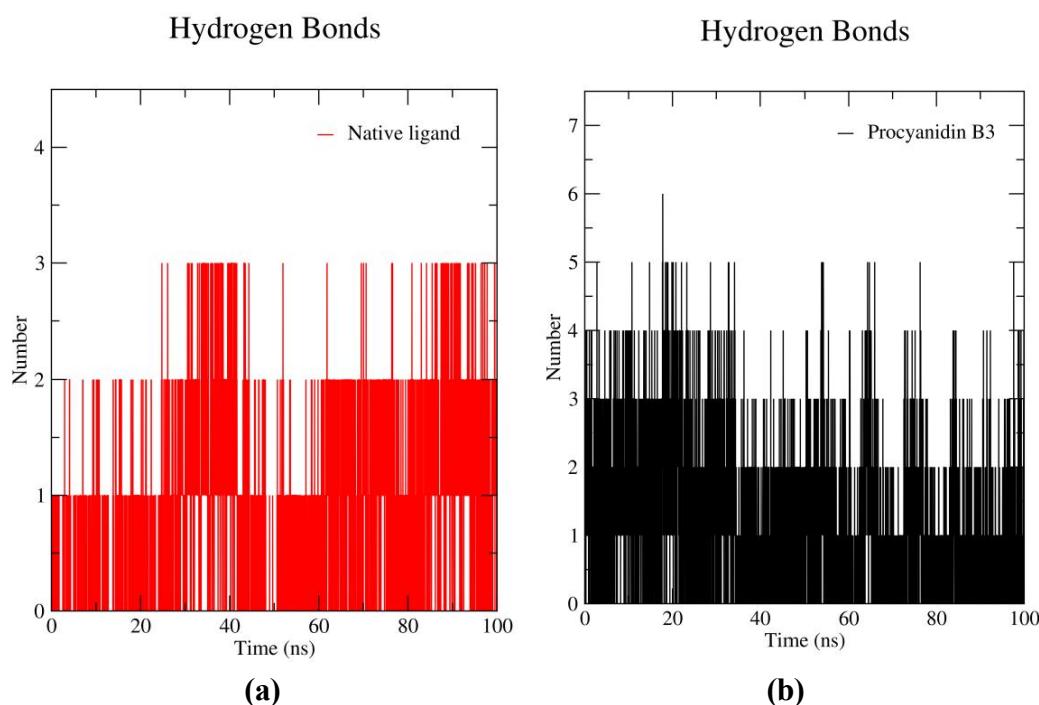
Ikatan hidrogen merupakan ikatan yang mempengaruhi struktur protein, pelipatan protein, dan identitas molekul. Interaksi yang terjadi antara ikatan hidrogen reseptor dan *ligand* merupakan aspek dasar dari biomolekul (94). Selain itu, ikatan hidrogen juga berhubungan dengan kekakuan struktur protein. Ikatan hidrogen berperan penting dalam menjaga stabilitas protein (96).



Gambar 4.17 Grafik Ikatan Hidrogen Native Ligand 4GV1 dan Gambiriin A1. (a) *Native ligand* 4GV1 memiliki 0-7 ikatan hidrogen; (b) Gambiriin A1 memiliki 0-8 ikatan hidrogen.

Analisis ikatan hidrogen dari reseptor protein AKT1 (PDB 4GV1) dapat dilihat pada **Gambar 4.17**. Hasil simulasi menunjukkan adanya perbedaan interaksi ikatan hidrogen pada kompleks protein dengan *native ligand* 4GV1 dan *ligand* gambiriin A1. *Native ligand* lebih stabil per satuan waktu daripada senyawa gambiriin A1. Ikatan hidrogen yang terbentuk pada *native ligand* berada pada rentang 0 hingga 7. Sebagian besar jumlah ikatan hidrogen *native ligand* berada pada kisaran 1 hingga 4. Ikatan hidrogen yang menunjukkan nilai maksimum terjadi pada waktu simulasi 51 ns, 79 ns, 87 ns, 88 ns, 90 ns, 97, dan 98 ns. Sementara itu, gambiriin A1 menunjukkan distribusi jumlah ikatan

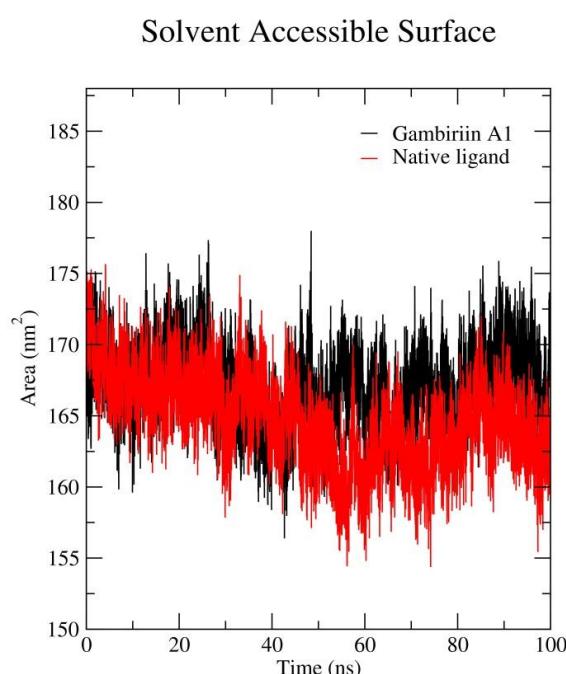
hidrogen yang lebih banyak daripada *native ligand*, dimana jumlah maksimum ikatan hidrogen gambiriin A1 adalah 8. Jumlah maksimum ini ditemukan pada waktu 3 ns, 4 ns, 33 ns, dan 53 ns. Hal ini menunjukkan bahwa gambiriin A1 memiliki ikatan hidrogen yang kuat terhadap target. Setelah 40 ns, jumlah ikatan hidrogen senyawa mulai menurun dan tidak stabil.



Gambar 4.18 Grafik Ikatan Hidrogen *Native Ligand* 4WKQ dan Procyanidin B3. (a) *Native ligand* 4GV1 memiliki 0-3 ikatan hidrogen; (b) Gambiriin A1 memiliki 0-6 ikatan hidrogen.

Gambar 4.18 menunjukkan grafik ikatan hidrogen pada *native ligand* EGFR (PDB 4WKQ) dan procyanidin B3. *Native ligand* 4WKQ memiliki jumlah ikatan hidrogen yang lebih sedikit dan lebih stabil daripada dengan senyawa uji. Sebagian besar *native ligand* menunjukkan adanya 1 hingga 2 ikatan hidrogen selama simulasi berlangsung. Pada simulasi 24 ns mulai menunjukkan adanya 3 ikatan hidrogen yang hilang timbul hingga simulasi 100 ns. Sementara itu, procyanidin B3 menunjukkan adanya jumlah ikatan hidrogen yang lebih banyak daripada *native ligand*. Ikatan hidrogen procyanidin berada pada rentang 0 hingga 6 ikatan, dimana pada awal simulasi ikatan hidrogen procyanidin B3 berada pada rentang 1 hingga 4. Procyanidin B3 membentuk 5 ikatan hidrogen pada waktu tertentu dan mencapai ikatan maksimum pada simulasi ke-17 ns.

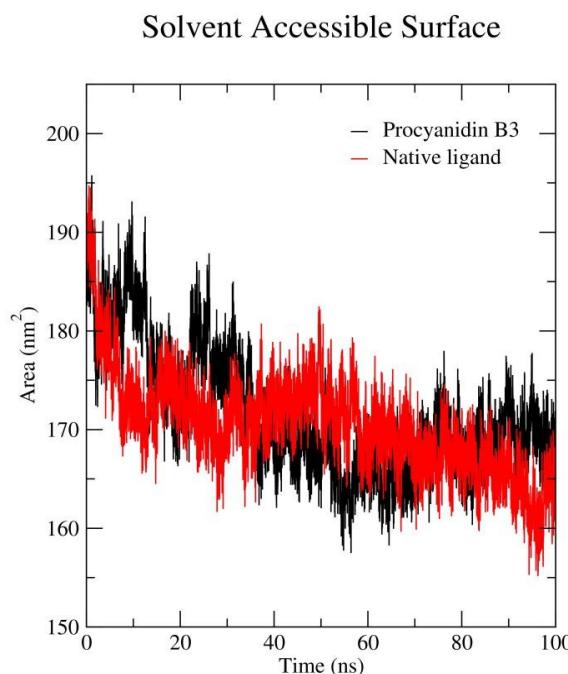
Solvent Accessible Surface Area (SASA) merupakan area permukaan biomolekul yang dapat diekspos pelarut. Permukaan diidentifikasi di sekitar protein oleh permukaan kontak van der Waals dari molekul dan pusat hipotesis bola pelarut (94). Parameter ini menggambarkan luas permukaan protein yang dapat diekspos oleh molekul pelarut selama simulasi *molecular dynamics*. Semakin tinggi nilai SASA maka semakin besar paparan pelarut. Sementara itu, nilai SASA yang lebih rendah menunjukkan daerah atau struktur protein yang lebih padat (99). Oleh karena itu, kekompakkan dan stabilitas struktur protein juga dapat dianalisis dengan SASA.



Gambar 4.19 Grafik SASA Native Ligand 4GV1 dan Gambiriin A1. Native ligand memiliki nilai SASA yang lebih kecil daripada gambiriin A1 (native ligand 155-175 nm² dan gambiriin A1 160-178 nm²).

Parameter SASA dari simulasi *molecular dynamics* native ligand AKT1 (PDB 4GV1) dan gambiriin A1 dapat dilihat pada **Gambar 4.19**. Nilai SASA baik dari *native ligand* maupun gambiriin A1 mengalami fluktuasi yang cenderung stabil selama simulasi. *Native ligand* 4GV1 memiliki nilai SASA yang lebih kecil dan fluktuasi yang lebih stabil daripada gambiriin A1. Luas permukaan *native ligand* 4GV1 berada dalam rentang 155-175 nm² dan gambiriin A1 dalam rentang 160-178 nm². Oleh karena itu, *native ligand* diketahui memiliki struktur

protein yang lebih rapat dan kompak daripada gambiriin A1. Nilai SASA dari *native ligand* mengalami penurunan pada simulasi 46 ns hingga 80 ns dengan fluktuasi kecil, hal ini menunjukkan terjadinya pemanjangan struktur protein. Senyawa gambiriin A1 juga mengalami fluktuasi yang tidak jauh berbeda dengan *native ligand*. Senyawa ini mengalami penurunan SASA pada simulasi 25 hingga 80 ns.



Gambar 4.20 Grafik SASA *Native Ligand* 4WKQ dan Procyanolidin B3.

Native ligand memiliki nilai SASA yang lebih kecil daripada procyanolidin B3 (*native ligand* stabil pada rentang 160-170 nm² dan procyanolidin B3 pada rentang 60-175 nm²).

Nilai SASA untuk kompleks protein EGFR terhadap procyanolidin B3 dapat dilihat pada **Gambar 4.20**. Pada awal simulasi *native ligand* 4WKQ dan senyawa procyanolidin B3 mempunyai nilai SASA yang relatif tinggi yaitu sekitar 190 nm². Hal ini menunjukkan bahwa luas permukaan *native ligand* dan procyanolidin B3 yang terekspos oleh pelarut relatif besar pada awal simulasi. Nilai SASA *native ligand* dan procyanolidin B3 menunjukkan fluktuasi yang signifikan pada awal simulasi. *Native ligand* 4WKQ mengalami penurunan nilai SASA pada waktu simulasi 0,8-28 ns. Setelah simulasi 40 ns, penurunan dan fluktuasi nilai SASA mulai menunjukkan kestabilan dengan fluktuasi kecil. *Native ligand* stabil ketika nilai SASA berada pada rentang 160-170 nm².

Sementara itu, procyanidin B3 mengalami perubahan dan fluktuasi yang lebih signifikan daripada *native ligand*. Fluktuasi ini terlihat jelas pada waktu simulasi 1 ns hingga 35 ns. Procyanidin B3 mulai mencapai kestabilan setelah 35 ns, yaitu dengan nilai SASA 160-175 nm². *Native ligand* 4WKQ memiliki nilai SASA yang lebih rendah daripada procyanidin B3. Nilai SASA yang lebih rendah menunjukkan struktur molekul atau protein yang lebih kompak sehingga area yang dapat diakses pelarut lebih kecil. Sebaliknya, SASA yang lebih tinggi menunjukkan bahwa molekul memiliki struktur yang lebih terbuka sehingga lebih besar luas permukaan yang dapat diakses oleh pelarut.

Berdasarkan studi farmakoinformatika, tanaman gambir diperkirakan memiliki aktivitas antikanker dalam pengobatan kanker kolorektal. Hasil *network pharmacology* menunjukkan bahwa senyawa yang terkandung dalam tanaman gambir dapat menargetkan beberapa protein yang berhubungan dengan kanker kolorektal. Pendekatan *in silico* dengan *molecular docking* menunjukkan hasil yang lebih stabil dan potensial ketika senyawa ditargetkan pada target EGFR daripada AKT1. Namun, berdasarkan analisis *molecular dynamics* target protein AKT1 menunjukkan hasil yang lebih baik daripada target EGFR. Hasil simulasi *molecular dynamics* antara kompleks protein AKT1 dengan gambiriin A1 relatif stabil dalam sistem. Gambiriin A1 diprediksi memiliki karakteristik yang hampir sama dengan *native ligandnya*.

Hasil penelitian ini dapat memberikan pandangan baru dalam pengembangan obat antikanker kolorektal dengan memanfaatkan bahan alam, khususnya tanaman gambir. Senyawa gambiriin A1 diprediksi dapat berpotensi sebagai agen antikanker kolorektal, terutama karena interaksinya yang stabil dengan protein AKT1 berdasarkan hasil simulasi *molecular dynamics*. Temuan ini memiliki implikasi penting bagi berbagai pihak yang relevan dan dapat menjadi dasar untuk penelitian lanjutan yang bertujuan untuk menguji aktivitas biologis senyawa yang terkandung dalam gambir secara *in vitro* dan *in vivo* dalam memastikan keamanan dan efektivitas pengobatan. Penelitian ini memberikan peluang bagi industri farmasi untuk mengembangkan gambiriin A1 atau senyawa bioaktif lainnya yang terkandung dalam tanaman gambir sebagai senyawa utama dalam penemuan dan pengembangan formulasi kandidat obat antikanker yang

potensial. Selain itu, eksplorasi terapi kombinasi dengan senyawa atau obat antikanker lainnya perlu dilakukan untuk mengetahui potensi sinergis obat- obatan.

LAMPIRAN . Susunan organisasi tim peneliti dan pembagian tugas

Susunan organisasi tim peneliti dan pembagian tugas

No.	Nama / NIDN	Instansi Asal	Bidang Ilmu	Alokasi Waktu (jam/minggu)	Uraian Tugas
1.	apt. Fithriani Armin, S.Si., M.Si. (0014117602)	Farmasi UNAND	Kimia Farmasi	10	Molecular Docking dan Analisis Molekul
2	apt. Purnawan Pontana Putra, M.Si, /(0008109102)	Farmasi UNAND	Kimia Farmasi	10	Analisis Jaringan Analisis Network Pharmacology
3	Maharani (2111012017)	Farmasi UNAND	Farmasi	10	Molecular Docking dan Analisis Molekul