

In Silico Study of Moringa leaves Compound (*Moringa oleifera* L.) as Protein Kinase C Alpha Inhibitor in Breast Cancer

Annisa S. Salsabila*, Rayhan Z. Safira, Wuri A. Sari, Arif R. Nugraha, Dinda Wulandari, Ridhatul Qaivani

Departemen Analisis Farmasi dan Kimia Medisinal, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Jawa Barat, Indonesia

Submitted 04 April 2023; Revised 14 November 2023; Accepted 15 November 2023 ; Published 31 December 2023

*Corresponding author: annisa19006@mail.unpad.ac.id

Abstract

Migration of breast cancer cells can be initiated by increasing the expression of protein kinase C alpha, thus inducing the invasive potential and causing metastasis. Compounds in *Moringa oleifera* have the potential to induce apoptosis by inhibiting the signaling pathway initiated by protein kinase C alpha. This study aimed to determine the inhibition mechanism of alpha protein kinase by compounds that contained in *M. oleifera* in silico. The stages consisted of preparation and optimization of protein kinase C alpha and test compounds, method validation and molecular docking simulation, pharmacophore modeling, and prediction of pharmacokinetic profiles and ADMET based on Lipinski's Rule of Five parameters. The results are then visualized through the BIOVIA Discovery Studio 2020 Client program. It was found that 3 compounds had the lowest binding energy values and the lowest inhibition constants, namely myricetin ($\Delta G = -8.49$ kcal/mol; $K_i = 600.42$ nM), quercetin ($\Delta G = -7.94$ kcal/mol; $K_i = 1.52$ uM), and kaempferol ($\Delta G = -7.75$ kcal/mol; $K_i = 2.08$ uM). However, only kaempferol has absorption properties in the intestine and better permeability compared to others. Therefore, it is concluded that kaempferol has the potential to be a lead compound in the inhibition mechanism of protein kinase C alpha.

Keywords: Breast cancer, *Moringa oleifera*, Molecular docking, Protein kinase C alpha

Studi In Silico Senyawa dalam Daun Kelor (*Moringa oleifera* L.) sebagai Inhibitor Protein Kinase C Alpha pada Kanker Payudara

Abstrak

Migrasi sel kanker payudara dapat diinisiasi oleh meningkatnya ekspresi protein kinase C alpha sehingga menginduksi terjadinya potensi invasif dan menyebabkan metastasis. Senyawa dalam daun kelor (*Moringa oleifera*) berpotensi untuk menginduksi apoptosis dengan menghambat jalur pensinyalan dari protein kinase C alpha. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui mekanisme inhibisi pada protein kinase alpha dari senyawa yang terkandung di dalam daun kelor (*M. oleifera*) secara *in silico*. Tahapan penelitian terdiri atas preparasi dan optimasi protein kinase C alpha serta senyawa uji, validasi metode dan simulasi penambatan molekuler, pemodelan farmakofor, serta prediksi profil farmakokinetika dan ADMET berdasarkan parameter *Lipinski's Rule of Five*. Hasil yang didapat divisualisasikan menggunakan *BIOVIA Discovery Studio 2020 Client*. Diperoleh 3 senyawa dengan *binding energy* terendah dan konstanta inhibisi terkecil yaitu myricetin ($\Delta G = -8,49$ kcal/mol; $K_i = 600,42$ nM), kuersetin ($\Delta G = -7,94$ kcal/mol; $K_i = 1,52$ uM), dan kaempferol ($\Delta G = -7,75$ kcal/mol; $K_i = 2,08$ uM). Namun, hanya kaempferol yang memiliki sifat absorpsi pada usus serta permeabilitas lebih baik dibandingkan senyawa lainnya. Oleh karena itu, pada penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa kaempferol berpotensi untuk dijadikan senyawa kandidat sebagai inhibitor protein kinase C alpha.

Kata Kunci: Kanker payudara, *Moringa oleifera*, Penambatan Molekuler, Protein kinase C alpha

1. Pendahuluan

Kanker payudara adalah kanker yang paling sering ditemukan pada wanita di seluruh dunia (22% dari semua kasus kanker pada wanita) dan merupakan penyebab kematian akibat kanker kedua setelah kanker paru-paru.¹ Di Indonesia, kejadian kanker payudara menempati urutan pertama diikuti dengan kanker serviks dan kanker paru-paru dengan angka kejadian mencapai sekitar 400.000 kasus pada tahun 2020.²

Kanker payudara (*Carcinoma mammae*) adalah salah satu jenis tumor ganas yang terjadi akibat peningkatan pertumbuhan sel abnormal pada epitel duktus maupun lobulus di jaringan payudara. Kanker ini dapat menyebabkan sel dan jaringan payudara tumbuh di luar kendali serta dapat menyebar ke bagian tubuh lainnya atau disebut dengan metastasis.^{3,4,5} Pemicu dari mekanisme karsinogenesis yaitu adanya gangguan pada apoptosis yang menjaga keseimbangan antara kehidupan dan kematian sel. Apoptosis sangat terkait dengan kegagalan eliminasi sel yang berpotensi ganas, terjadinya hiperplasia, dan perkembangan tumor.^{6,7} Salah satu jalur yang memicu apoptosis adalah jalur intrinsik atau jalur mediasi mitokondria, yang diatur oleh kelompok protein kinase C (PKC). PKC bertindak sebagai enzim yang terlibat dalam pertumbuhan, regulasi migrasi, dan metastasis dalam sel tumor.⁸ Berbagai jenis enzim PKC yang berbeda diketahui diekspresikan secara berlebihan dalam berbagai kanker, salah satunya pada kanker payudara.⁹

Protein Kinase C (PKC) merupakan protein yang mengkatalisis fosforilasi berbagai jenis protein seluler dan terlibat dalam proses aktivasinya. Protein tersebut diperlukan untuk perannya dalam proses transduksi sinyal melalui *second messenger*. Selama transduksi sinyal, pesan yang berupa rangsangan dari luar diteruskan ke inti sel untuk mempengaruhi ekspresi gen dan merespon sesuai dengan kebutuhan lingkungan.¹⁰ Adanya penghambatan pada PKC akan menyebabkan jalur transduksi sinyal terhambat sehingga ekspresi gen yang diinginkan tidak terjadi dan sel mati. Pada kanker payudara, PKC bertindak sebagai

modulator transkripsi dari *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). VEGF menstimulasi proses angiogenesis yang penting bagi pertumbuhan sel kanker.¹¹ Penghambatan angiogenesis lebih efektif dalam pengobatan kanker daripada membunuh sel kanker secara langsung. Jika angiogenesis terhambat, sel akan kekurangan nutrisi dan oksigen sehingga dapat menyebabkan kematian.¹² Penghambatan terhadap PKC berarti menghambat satu proses perkembangbiakan sel sehingga senyawa yang menghambat aktivitas PKC tersebut berpotensi sebagai antikanker. Oleh karena itu, PKC dapat menjadi target potensial untuk pengobatan kanker payudara.

PKC terdiri dari beberapa isoform protein, yang menempati peran sentral dalam proses seluler, termasuk proliferasi, diferensiasi, mitosis, dan peradangan.¹³ Isoform PKC ini dibagi menjadi tiga subkelompok berdasarkan struktur domain dari regulasinya yaitu *classical* (PKC α , β I, β II, dan γ), *novel* (PKC Δ , *epsilon*, dan *theta*), dan *atypical* (PKC ζ dan η/λ).¹⁴ PKC α berfungsi sebagai pengatur dari proses perkembangan tumor, termasuk proliferasi, kelangsungan hidup, diferensiasi, dan motilitas. Dalam beberapa penelitian, PKC α diketahui berkaitan dengan peningkatan proliferasi dan sinyal anti-apoptosis. Migrasi sel kanker payudara dapat diawali dengan peningkatan ekspresi protein kinase C *alpha*, sehingga menciptakan potensi sel kanker payudara untuk menginvasi dan menginduksi metastasis.¹⁵⁻¹⁸

Berbagai pengobatan kanker telah banyak digunakan, termasuk kemoterapi. Pengobatan kanker dengan senyawa kemoterapi bersifat *targeted therapy*. Senyawa kemoterapi dapat menghambat pertumbuhan kanker dengan cara menghambat proliferasi atau membunuh sel kanker. Kelemahan metode ini adalah sulitnya merancang senyawa kemoterapi dengan aktivitas antikanker yang tinggi dan efek samping minimal terhadap sel normal.¹⁹ Selain itu, biaya terapi sangat tinggi.²⁰ Oleh karena itu, diperlukan pengobatan alternatif, salah satunya adalah pemanfaatan senyawa potensial dari tumbuhan. *Moringa oleifera* L. atau daun kelor

merupakan tanaman yang daun, biji, kulit batang, akar, getah, dan bunganya banyak digunakan dalam pengobatan tradisional. Daun kelor mengandung beberapa senyawa kimia berupa senyawa bioaktif yaitu vitamin, karotenoid, polifenol, asam fenolat, flavonoid, alkaloid, glukosinolat, tanin, saponin dan oksalat.¹⁹

Ekstrak daun kelor menunjukkan adanya aktivitas sitotoksik dan belum ada yang dilaporkan mengenai efek samping pada manusia.¹⁹ Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa ekstrak air^{21,22} hidroalkohol dan alkohol²³ dari daun kelor menunjukkan aktivitas antisitotoksik, analgesik, antiinflamasi, antihipertensi, radioprotektif dan imunomodulator. Daun kelor mengandung flavonoid yang memberikan aktivitas antisitotoksik.^{19,21} Zat-zat aktif anti kanker pada daun kelor seperti kuersetin, kaempferol dan myricetin, dapat menginduksi apoptosis melalui jalur intrinsik dengan menghambat *mitogen-activated protein kinase (MAPK)*, *extracellular-signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2)*, *c-Jun N-terminal protein kinase 1 (JNK)*, dan *protein kinase C (PKC)*.²⁴

Untuk mengetahui potensi dari senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun kelor sebagai kandidat obat kanker payudara, dilakukan studi *In Silico* dengan menggunakan metode penambatan molekuler atau *molecular docking*. *Molecular docking* sangat efektif untuk penelitian dan pengembangan obat berbasis komputasi. Metode ini dapat meniru peristiwa interaksi dari suatu molekul ligan terhadap protein target melalui simulasi model menggunakan komputer.²⁵ Senyawa dalam daun kelor yang diuji meliputi asam kafeat, asam galat, kaempferol, myricetin, asam p-kumarat, kuersetin, rutin, asam sinapat, asam siringat, dan asam vanilat.

2. Metode

2.1. Alat

Perangkat keras yang digunakan pada penelitian ini yaitu laptop pribadi dengan spesifikasi processor *Intel® Core™ i3-7020 CPU @2.30GHz RAM 4.00 GB* dengan sistem operasi *Windows 10 64-bit*. Adapun

perangkat lunak yang digunakan pada pengujian *in silico* ini yaitu:

1. Situs Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) untuk mengunduh struktur dari protein reseptor
2. Situs Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) untuk mengunduh struktur dari senyawa uji dan senyawa pembanding
3. Program ChemDraw Ultra 12.0 (<https://www.cambridgesoft.com/>) untuk menggambar struktur dari senyawa uji dan senyawa pembanding
4. Program Chem3D Pro 12.0 (<https://www.cambridgesoft.com/>) untuk meminimalisasi energi ligan uji
5. Program BIOVIA Discovery Studio 2020 (<http://www.accelrys.com/>) Client untuk melakukan preparasi ligan dengan cara memisahkan ligan dari reseptornya, menentukan koordinat kantung aktif, dan memvisualisasikan hasil dari penambatan molekuler berupa interaksi antara ligan dengan reseptornya
6. Program AutoDockTools 1.5.6 (<https://autodock.scripps.edu/>) untuk melakukan persiapan parameter penambatan molekuler dan mensimulasikan proses penambatan molekuler
7. Program Ligand scout® 4.4 (<https://ligandscout.software.informer.com/>) untuk pemodelan farmakofor senyawa uji dan senyawa pembanding
8. Situs PreADMET (<https://preadmet.bmdrc.kr/>) untuk memprediksi absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, dan toksisitas serta prediksi *Lipinski's Rule of Five* dari senyawa uji

2.2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu struktur dari PKC α yang diunduh melalui situs Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) dengan ID PDB: 4RA4, struktur dari sepuluh senyawa tumbuhan daun kelor yaitu asam kafeat, asam galat, kaempferol, myricetin, asam p-kumarat, kuersetin, rutin, asam sinapat, asam siringat, dan asam vanilat, serta senyawa pembanding

yaitu staurosporine yang diunduh melalui situs Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Struktur tersebut digambar menjadi 2D melalui program *ChemDraw Ultra 12.0* dan kemudian dioptimasi melalui program *Chem3D Pro 12.0* menjadi struktur 3D.

2.3. Prosedur Rinci

2.3.1. Preparasi Ligan dan Reseptor

Preparasi reseptor dilakukan dengan mengunduh struktur PKCa (ID PDB: 4RA4) terlebih dahulu dalam format PDB melalui situs *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>). Ligan alami dan reseptor dari struktur tersebut dipisahkan dan dihilangkan molekul airnya melalui program *BIOVIA Discovery Studio 2020 Client* yang kemudian disimpan dalam format PDB. Preparasi ligan dilakukan melalui program *AutoDockTools 1.5.6* dengan menambahkan atom hidrogen, menggabungkan senyawa menjadi non-polar, menambahkan muatan compute gasteiger, serta menambahkan torsi ke dalamnya. Pada preparasi reseptor dilakukan dengan menambahkan atom hidrogen dan muatan kollman. Ligan dan reseptor yang telah dipreparasi kemudian disimpan dalam format.pdbqt.

2.3.2. Validasi Metode Penambatan Molekuler

Validasi metode dilakukan terlebih dahulu dengan cara menambatkan kembali ligan alami pada reseptor melalui program *AutoDock* untuk menentukan ukuran dan posisi dari *grid box* yang akan digunakan pada simulasi penambatan molekuler. *Grid box* yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu *grid box* dimensi 40x40x40 Å dengan *grid coordinate* (*x* = 31.625; *y* = -6.762; *z* = 12.627) dan jarak 0.375 Å yang disimpan dalam format.gpf. Parameter *docking* dibuat dengan menggunakan parameter *genetic algorithm* dan jumlah *GA Runs* 100. *Output* yang digunakan yaitu *Lamarckian GA* yang kemudian filenya disimpan dalam format.dpf. Selanjutnya dilakukan proses *re-docking* atau penambatan kembali menggunakan *command prompt*.

2.3.3. Simulasi Penambatan Molekuler

Struktur senyawa uji dan senyawa pembanding digambar dalam bentuk 2D melalui program *ChemDraw* dan disimpan dengan format .cdx. Program *Chem3D* digunakan untuk mengubah bentuk 2D menjadi 3D kemudian dilakukan minimalisasi energi, dan disimpan dalam format .pdb. Semua ligan uji dipreparasi dengan cara yang sama seperti preparasi pada ligan alami dari PKCa. Poses simulasi penambatan molekuler dilakukan antara senyawa uji sebagai ligan dengan reseptor PKCa sebagai protein atau makromolekul melalui *command prompt* dengan menggunakan pengaturan yang sama seperti pada validasi metode penambatan molekuler. Visualisasi interaksi senyawa uji dengan reseptor secara 2D ataupun 3D dari hasil simulasi penambatan molekuler tersebut dapat dilihat melalui program *BIOVIA Discovery Studio*.

2.3.4. Pemodelan farmakofor

Pemodelan farmakofor senyawa uji dilakukan dengan menggunakan *fitur create pharmacophore* melalui program *LigandScout*. Hasil yang didapatkan yaitu berupa struktur dalam bentuk 2D dan 3D disertai dengan ikatan-ikatan yang ada pada senyawa uji tersebut.

2.3.5. Prediksi Lipinski's Rule of Five

Prediksi *Lipinski's Rule of Five* dilakukan melalui situs PreADMET (<http://preadmet.bmdrc.kr/>) dengan cara mengunggah struktur senyawa uji dalam bentuk 2D. Tahap ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui profil *druglikeness* dari senyawa uji dan senyawa pembanding. Parameter dalam *Lipinski's Rule of Five* yaitu meliputi bobot molekul, nilai log P, ikatan hidrogen donor dan ikatan hidrogen akseptor.

2.3.6. Penentuan ADMET

Penentuan Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, Ekskresi, dan Toksisitas dapat dilakukan melalui situs PreADMET (<http://preadmet.bmdrc.kr/>) dengan cara mengunggah struktur senyawa uji dalam bentuk 2D. Dengan melalui situs tersebut dapat

secara otomatis memprediksi parameter ADMET yang meliputi nilai *Human Intestinal Absorption* (%HIA), *Cancer coli-2* (Caco-2), *Blood Brain Barrier Penetration* (BBB), *Plasma Protein Binding* (PPB), serta *Ames Test* dan *Rodent Carcinogenicity* untuk menentukan toksitas. Hasil analisisnya kemudian diunduh dalam format .pdf.

3. Hasil

3.1. Hasil Validasi Metode Penambatan Molekuler

Tujuan dari validasi metode penambatan molekuler yaitu untuk memastikan bahwa simulasi penambatan molekuler yang akan dilakukan sudah memenuhi persyaratan. Validasi dilakukan dengan metode *re-docking* atau menambatkan ulang ligan alami dari *co-crystal* yang terdapat pada reseptor dengan kode PDB 4RA4 melalui program *Autodock Tools*. Pada proses validasi metode, parameter yang dilihat adalah nilai dari *Root Mean Square Deviation* (RMSD) dan energi ikatan yang negatif. Metode penambatan molekuler dikatakan valid apabila nilai RMSD $\leq 2 \text{ \AA}$.²⁶ Dari hasil validasi metode penambatan molekuler diperoleh nilai RMSD sebesar 1,15 \AA dengan energi ikatan sebesar

-9,70 kkal/mol. Visualisasi dari interaksi senyawa ligan alami dengan reseptor PKCa dapat dilihat pada Gambar 3.

3.2. Simulasi Penambatan Molekuler

Simulasi penambatan molekuler dilakukan pada 10 senyawa uji yang terkandung dalam daun kelor (*Moringa oleifera*) dan juga senyawa pembanding (*staurosporine*) dengan reseptor PKCa. Tujuan simulasi penambatan molekuler yaitu untuk mengetahui nilai dari energi bebas ikatan (ΔG), konstanta inhibisi (Ki), residu asam amino, dan interaksi ikatan yang terjadi antara ligan dengan reseptor.²⁷ Simulasi penambatan molekuler antara 10 senyawa uji dengan reseptor PKCa menunjukkan hasil yang baik karena semua senyawa uji memiliki energi ikatan bebas yang lebih kecil dibandingkan dengan senyawa pembanding. Semakin kecil energi bebas Gibbs menandakan bahwa semakin tinggi kemampuan ligan dan reseptor untuk berikatan.²⁸ Nilai konstanta inhibisi berbanding lurus dengan energi bebas Gibbs, semakin kecil nilai konstanta inhibisi semakin stabil interaksi yang terjadi. Hasil simulasi penambatan molekuler dapat dilihat pada Tabel 1. Senyawa pembanding doxorubicin

Tabel 1. Hasil Penambatan Molekuler

No	Senyawa	Cluster	Energi Ikatan (kkal/mol)	Ki	Interaksi dengan Asam Amino		
					Ikatan Hidrogen	Ikatan Van der Waals	Ikatan Lainnya
1.	Ligan alami	100	-9,70	77,6nM	GLU418; ASP467; ASN468	LEU345; MET470; TYR419; THR401; MET417; ALA480; ASP481; LYS347	GLY346; VAL353; VAL420; ALA366; LYS368; PHE350
2.	Doxorubicin (obat pembanding)	33	-5,97	42,42uM	ILE449; GLU418; ARG457; ILE459; GLY450	ASP395; LEU394; LEU393; PHE482; LEU400; LEU451; HIS455; CYS485; PHE482; TYR461; VAL390; GLY458;	PRO397; LYS396; PHE452; HIS455

Tabel 1. Hasil Penambatan Molekuler

No	Senyawa	Cluster	Energi Ikatan (kkal/ mol)	Ki	Interaksi dengan Asam Amino		
					Ikatan Hidrogen	Ikatan Van der Waals	Ikatan Lainnya
3.	Asam galat	96	-4,18	869,63uM	ASP481; LYS368; ALA366; GLU418	LYS456; GLU387; VAL353; ILE367; TYR419; THR401; MET470; VAL420	ALA480; MET417
4.	Asam kafeat	82	-5,66	70,47uM	GLU387; VAL420	LEU391; PHE482; ASP481; ALA480; THR401; MET470; VAL353; LYS368; GLU418; TYR419; LEU345	ALA366; MET417
5.	Asam p-kumarat	67	-5,17	162,84uM	GLU418; GLU387	-	VAL420; MET417; ALA366
6.	Asam sinapat	99	-5,58	80,79uM	ASP481; VAL420; GLU418; TYR419	GLU387; LEU391; LYS368; ALA480; MET417	
7.	Asam siringat	87	-3,61	2,28mM	GLU418; LYS368; ASP481	TYR419; ALA366; VAL420; VAL353; THR401; GLU387	ALA480; MET417; PHE482; LEU391; MET470
8.	Asam vanilat	90	-4,13	945,16uM	GLU418; ASP481	-	PHE482; MET417; LEU391; LYS368; ALA480
9.	Kaempferol	100	-7,75	2,08uM	LEU345; VAL420; GLU418; GLU387	VAL353; TYR419; ASN421; THR401; PHE482; LEU391	ALA366; MET417; ALA480; MET470; ALA480; ASP481; LYS368
10.	Kuersetin	93	-7,94	1,52uM	LYS368; GLU387; GLU418; VAL420	-	ALA366; MET470; VAL353; LEU345; MET417; ALA480

Tabel 1. Hasil Penambatan Molekuler

No	Senyawa	Cluster	Energi Ikatan (kcal/mol)	Ki	Interaksi dengan Asam Amino		
					Ikatan Hidrogen	Ikatan Van der Waals	Ikatan Lainnya
11.	Myricetin	91	-8,49	600,42 nM	THR401; GLU418; VAL420; LEU345; ASP481; LYS368; GLU387	PHE482; LEU391; ASN421; TYR419	ALA480; MET470; ALA366; MET417; VAL353
12.	Rutin	1	-3,45	2,94mM	ASR544; ILE510	-	RHE547

memiliki energi ikatan sebesar -5,97 kcal/mol. Adapun senyawa uji yang memiliki nilai energi ikatan paling rendah dibandingkan senyawa uji lainnya dan senyawa pembanding yaitu kaempferol ($\Delta G = -7,75$ kcal/mol), kuersetin ($\Delta G = -7,94$ kcal/mol), dan myricetin ($\Delta G = -8,49$ kcal/mol). Ke-3 senyawa tersebut juga mempunyai nilai konstanta inhibisi yang paling rendah yaitu myricetin ($K_i = 600,42$ nM), kuersetin $K_i = 1,52$ μ M), dan kaempferol ($K_i = 2,08$ μ M).

3.3. Pemodelan Farmakofor

Farmakofor pada ligan alami, senyawa

uji, dan obat pembanding divisualisasikan dengan menggunakan program *ligandscout* yang dapat dilihat pada Tabel 2. Pemodelan farmakofor dilakukan untuk membandingkan kemiripan ikatan dari senyawa uji dengan ligan alami pada reseptor PKCa. Hasil pemodelan farmakofor dari obat pembanding dan reseptor PKCa menunjukkan adanya interaksi hidrofobik dan interaksi hidrogen. Terdapat 3 interaksi hidrofobik terhadap asam amino VAL353A, PHE350A, dan ASP481A serta 1 ikatan hidrogen donor terhadap asam amino GLU4118A.

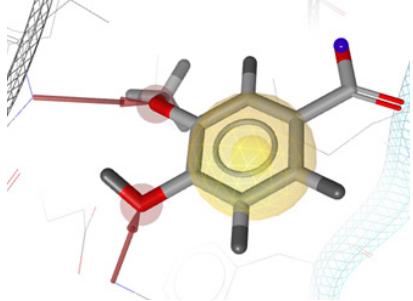
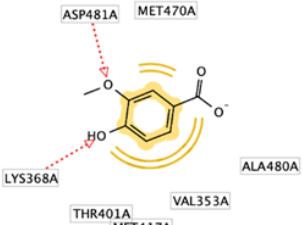
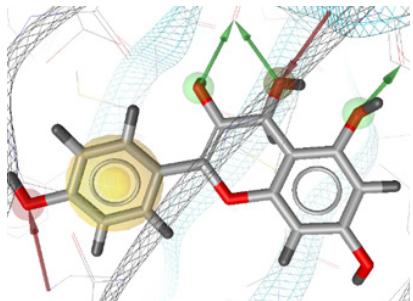
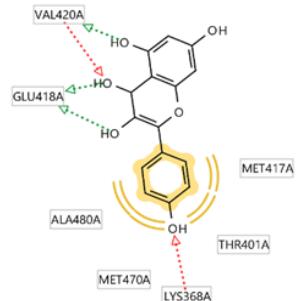
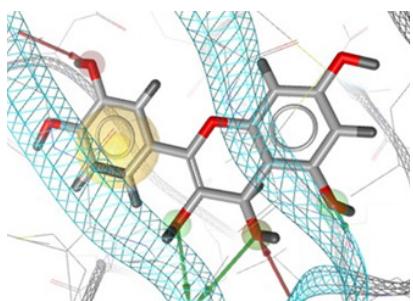
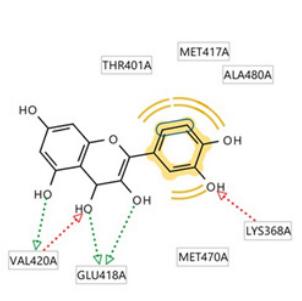
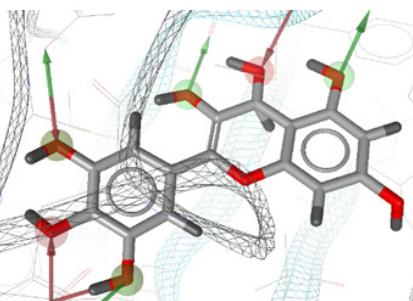
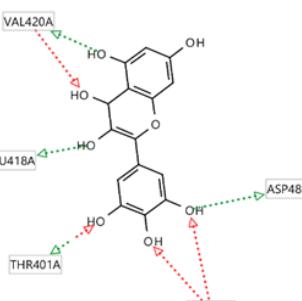
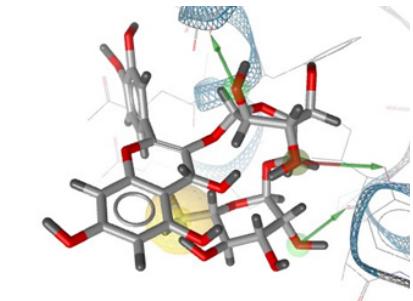
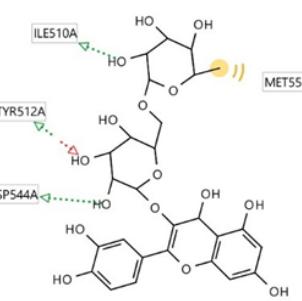
Tabel 2. Visualisasi Pemodelan Farmakofor

No	Senyawa	Hasil Visualisasi	
		3D	2D
1.	Ligan alami		
2.	Doxorubicin (obat pembanding)		

Tabel 2. Visualisasi Pemodelan Farmakofor

No	Senyawa	Hasil Visualisasi	
		3D	2D
3.	Asam galat		
4.	Asam kafeat		
5.	Asam p-kumarat		
6.	Asam sinapat		
7.	Asam siringat		

Tabel 2. Visualisasi Pemodelan Farmakofor

No	Senyawa	Hasil Visualisasi	
		3D	2D
8.	Asam vanilat		
9.	Kaempferol		
10.	Kuersetin		
11.	Myricetin		
12.	Rutin		

Tabel 3. Hasil Prediksi Lipinski's Rule of Five

No	Senyawa	Berat molekul (g/mol)	ClogP	Ikatan hidrogen donor	Ikatan hidrogen akseptor	Pelanggaran RO5	Keterangan
1.	Doxorubicin (obat pembanding)	546,549	-0,346	8	11	3	Tidak Memenuhi
2.	Asam galat	169,112	-2,135	3	5	0	Memenuhi
3.	Asam kafeat	181,167	-1,290	2	4	0	Memenuhi
4.	Asam p-kumarat	165,168	-0,996	1	3	0	Memenuhi
5.	Asam sinapat	224,220	-0,978	1	5	0	Memenuhi
6.	Asam siringat	197,166	-1,529	1	5	0	Memenuhi
7.	Asam vanilat	167,140	-1,538	1	4	0	Memenuhi
8.	Kaempferol	288,255	3,157	5	5	0	Memenuhi
9.	Kuersetin	304,254	2,863	6	6	0	Memenuhi
10.	Myricetin	320,253	2,568	7	7	1	Memenuhi
11.	Rutin	612,537	-1,385	11	15	3	Tidak memenuhi

3.4. Prediksi Lipinski's Rule of Five

Parameter fisikokimia ditentukan melalui bobot molekul, nilai Log P, ikatan hidrogen donor serta ikatan hidrogen akseptor berdasarkan Lipinski's Rule of Five. Hasil prediksi Lipinski's Rule of Five dapat dilihat pada Tabel 3. Hampir semua senyawa uji memenuhi syarat aturan Lipinski kecuali senyawa rutin.

3.5. Prediksi ADMET

Hasil dari prediksi ADMET menunjukkan bahwa hampir semua senyawa memiliki sifat absorpsi yang cukup baik berdasarkan

parameter nilai %HIA serta Caco-2, kecuali pada senyawa rutin, kuersetin, dan myricetin yang memiliki absorpsi dalam kategori buruk. Sedangkan pada parameter distribusi berdasarkan nilai %PPB, senyawa uji kuersetin dan myricetin memiliki nilai lebih dari 90%. Pada parameter BBB, senyawa rutin tergolong ke dalam kategori buruk. Pengujian toksisitas menunjukkan bahwa sebagian besar senyawa uji bersifat mutagenik tetapi non-karsinogenik berdasarkan Ames test dan Rodent Carcinogenicity. Hasil prediksi Pre-ADMET senyawa uji terdapat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Prediksi ADMET

No.	Senyawa	Absorpsi		Distribusi		Toksisitas	
		HIA (%)	Caco-2 (nm/sec-1)	PPB (%)	BBB (%)	Mutagen	Karsinogen
1.	Doxorubicin (obat pembanding)	31,952944	17,7265	32,789519	0,0328818	-	Mouse: - Rats: -
2.	Asam galat	53,696852	13,8492	65,384676	0,348084	+	Mouse: - Rats: +
3.	Asam kafeat	82,3013	21,1076	40,290652	0,4976	+	Mouse: - Rats: +
4.	Asam p-kumarat	92,095876	21,1093	63,055072	0,694635	+	Mouse: - Rats: +
5.	Asam sinapat	88,553867	19,854	47,507982	0,721907	+	Mouse: - Rats: +

Tabel 4. Hasil Prediksi ADMET

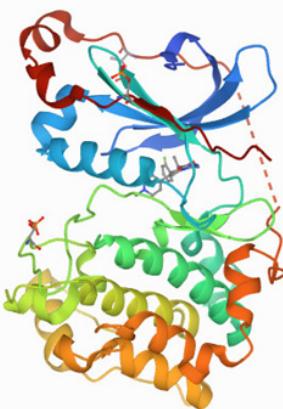
No.	Senyawa	Absorbsi		Distribusi		Toksisitas	
		HIA (%)	Caco-2 (nm/sec-1)	PPB (%)	BBB (%)	Mutagen	Karsinogen
6.	Asam siringat	82,027960	18,8327	69,775772	0,539779	+	Mouse: - Rats : +
7.	Asam vanilat	85,369464	19,9363	52,106917	0,626787	+	Mouse: - Rats : +
8.	Kaempferol	79,4392	9,5774	86,6082	0,286076	+	Mouse: - Rats : +
9.	Kuersetin	63,485215	3,4129	93,236103	0,172765	+	Mouse: - Rats : -
10.	Myricetin	40,964049	0,991395	96,784810	0,110308	+	Mouse: - Rats : +
11.	Rutin	2,861176	7,91267	43,897909	0,0285642	-	Mouse: - Rats : -

4. Pembahasan

Molecular docking atau penambatan molekuler merupakan metode komputasi yang bertujuan untuk memprediksi konformasi serta afinitas ikatan yang terbentuk antara suatu molekul (ligan) dengan *binding site* pada protein target (reseptor).²⁹ Simulasi penambatan molekuler berperan penting dalam *virtual screening* untuk mengetahui potensi dari suatu senyawa sehingga dapat dikembangkan menjadi obat baru. Melalui metode simulasi penambatan molekuler dapat diketahui interaksi dari senyawa metabolit yang berperan sebagai ligan dengan reseptor yang ada dalam tubuh manusia.³⁰

Proses penambatan molekuler diawali dengan menyiapkan reseptor. Reseptor obat merupakan suatu makromolekul (lipoprotein, asam nukleat) yang jelas dan spesifik dimana dapat berikatan dengan ligan (obat, hormon, neurotransmitter) untuk memicu tanda atau sinyal kimia dalam sel sehingga menimbulkan efek.³¹ Struktur makromolekul diunduh pada situs *Protein Data Bank* (PDB) <http://www.rcsb.org>. *Protein Data Bank* (PDB) adalah sebuah dokumen atau kumpulan data eksperimental struktur tiga dimensi dari makromolekul. Data-data tersebut berisi koordinat atom, struktur kristalografi, dan data eksperimen mengenai NMR. Setiap data memiliki nama molekul, informasi mengenai struktur utama dan tambahan, keterangan sekuens database, serta informasi mengenai ligan.

Reseptor yang digunakan pada penelitian ini yaitu reseptor protein kinase C alpha dengan PDB ID 4RA4 karena reseptor ini tidak bersifat mutagen dan di dalam struktur ko-kristal tersebut terdapat ligan alami (1R) - 9 - [(3S,4S) - 1,3 - Dimethylpiperidin - 4 - Yl] - 8 - (2 - Fluorophenyl) - 1 - Methyl - 3,5 - Dihydro[1,2,4]Triazino[3,4 - C][1,4]Benzoxazin - 2(1H) - One yang akan membantu dalam menentukan letak *binding site* antara ligan dengan reseptor. Adanya sisi aktif reseptor yang berikatan pada ligan alaminya menyebabkan reseptor ini dapat digunakan untuk mengetahui interaksi antara ligan dan reseptor pada proses simulasi penambatan molekuler. PKCa telah memenuhi persyaratan sebagai reseptor yang baik yaitu memiliki resolusi 2.63 Å; nilai R-kerja 0,186; nilai R-bebas 0,264; dan nilai R-observasi 0,190. Semakin kecil nilai resolusi menandakan semakin baik resolusi yang dimiliki oleh kristal reseptor tersebut sehingga penggambaran strukturnya akan semakin mirip dengan struktur aslinya.³² Selain itu, reseptor tersebut diperoleh dari organisme *Homo sapiens* atau manusia. Struktur 3 dimensi dari PKCa (PDB ID: 4RA4) dapat dilihat pada Gambar 1. Struktur kristal tersebut digunakan untuk membuat file makromolekul dan ligan alami yang terpisah agar terdapat ruang atau *pocket* yang akan digunakan pada saat simulasi penambatan molekuler. Selain diperoleh struktur protein dengan *pocket* sebagai tempat protein yang



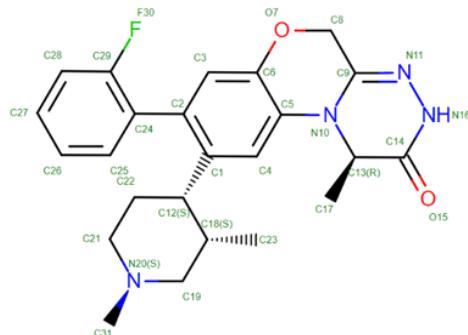
Gambar 1. Struktur 3D dari Protein Kinase C (PDB ID : 4RA4)

akan berikatan dengan ligan uji, diperoleh juga struktur ligan alami tanpa proteinnya.

Protein dengan ligan alami dari reseptor PKCa perlu dipisahkan dengan menggunakan program BIOVIA Discovery Studio 2020. Pada tahap ini, struktur makromolekul yang diunduh dari PDB memerlukan proses optimasi terlebih dahulu agar proses penambatan molekul dapat berlangsung semirip mungkin dengan proses fisiologis yang ada dalam tubuh manusia. Umumnya struktur protein pada PDB mengandung molekul pelarut berupa air dan residu lainnya sehingga diperlukan penghilangan molekul air (desolviasi) agar tidak mengganggu interaksi hidrofobik yang terjadi pada saat simulasi docking dilakukan. Secara teoritis, air yang bersifat polar akan menghalangi ikatan ligan dengan reseptornya karena air dapat membentuk ikatan hidrogen dengan reseptor. Selain itu, dilakukan penambahan atom hidrogen untuk

menyesuaikan suasana docking mendekati pH 7. Pada preparasi ligan dilakukan dengan menambahkan muatan gasteiger menggunakan Autodock Tools 1.5.6. Secara otomatis dilakukan pengaturan merge non-polar pada ligan sehingga hanya atom H polar yang akan berinteraksi dengan residu protein.

Sebelum melakukan simulasi penambatan molekuler, dilakukan validasi metode terlebih dahulu untuk memastikan bahwa metode serta perangkat lunak yang digunakan telah memenuhi standar validitas dan dapat diimplementasikan dalam prosedur pengujian simulasi molekuler. Validasi penambatan molekuler dilakukan dengan cara menambatkan ulang reseptor 4RA4 dan ligan alaminya. Struktur ligan alami dari reseptor PKCa dapat dilihat pada gambar 2. Parameter yang digunakan pada simulasi penambatan molekuler adalah nilai RMSD



Gambar 2. Struktur Ligan Alami Protein Kinase C *alpha*

(Root Mean Square Deviation). Nilai RMSD merupakan suatu parameter yang digunakan untuk menggambarkan kemiripan antara konformasi penambatan molekul dengan hasil eksperimen dari dua struktur.³³⁻³⁵ Besarnya nilai RMSD menunjukkan keakuratan perhitungan. Apabila RMSD $< 2\text{\AA}$ menandakan bahwa kesalahannya lebih kecil sehingga lebih akurat, sedangkan RMSD $> 2\text{\AA}$ menandakan penyimpangan yang lebih besar dari hasil perhitungan.³⁶ Hasil dari validasi metode diperoleh nilai RMSD sebesar $1,15 \text{ \AA}$ dengan energi ikatan sebesar $-9,70 \text{ kkal/mol}$, yang menunjukkan bahwa posisi atom-atom pada ligan dari hasil validasi penambatan molekuler tidak berbeda terlalu jauh dengan posisi pada ligan hasil kristalografi (ligan asli). Metode yang digunakan dikatakan valid jika nilai RMSD yang diperoleh $< 2\text{\AA}$. Semakin kecil nilai RMSD menunjukkan bahwa posisi ligan yang diperkirakan semakin baik karena semakin mendekati konformasi asal.³⁷ Selain nilai rmsd, validasi dikatakan berhasil jika pada proses penambatan kembali (*re-docking*), senyawa *native* tertambat pada asam amino penting. Hasil dari validasi penambatan molekuler menunjukkan bahwa metode serta parameter penambatan molekuler yang diatur pada pengujian dinyatakan valid dan dapat diaplikasikan pada proses simulasi penambatan molekuler senyawa uji dan senyawa pembanding dengan PKCa. Dengan menggunakan program Autodock Tools 1.5.6 dilakukan penentuan *grid box* pada daerah yang diketahui sebagai *binding site* antara ligan dengan protein. Penentuan *grid box* ini meliputi pengaturan letak parameter box dan penentuan besarnya *grid box* menggunakan *spacing* (angstrom). Koordinat yang digunakan adalah sumbu x sebesar $31,625 \text{ \AA}$, sumbu y sebesar $-6,762 \text{ \AA}$, dan sumbu z sebesar $12,627 \text{ \AA}$. Koordinat *binding site* merupakan hal penting dalam simulasi penambatan molekuler karena pada *binding site* tersebut senyawa bioaktif ligan akan berinteraksi dengan reseptor 4RA4.

Ligan uji yang digunakan pada uji *in silico* ini yaitu senyawa dari tanaman daun kelor (*Moringa oleifera*) yang terdiri

dari asam kafeat, asam galat, kaempferol, myricetin, asam p-kumarat, kuersetin, rutin, asam sinapat, asam siringat, dan asam vanilat. Kuersetin, rutin, kaempferol, dan myricetin merupakan golongan flavonoid yang memiliki aktivitas sebagai antisitotoksik. Asam kafeat, asam p-kumarat, asam galat, asam sinapat, asam siringat, dan asam vanilat merupakan metabolit sekunder golongan asam fenolik yang banyak terlibat dalam aktivitas biologis salah satunya yaitu sebagai antikanker.¹⁹ Dilakukan simulasi penambatan molekuler pada ke-10 senyawa tersebut untuk mengetahui interaksinya terhadap reseptor PKCa. Dilakukan juga simulasi penambatan molekuler pada senyawa pembanding yaitu doxorubicin. Doxorubicin dipilih sebagai senyawa pembanding karena merupakan obat kemoterapi yang digunakan untuk mengobati kanker payudara.³⁸

Struktur senyawa uji digambar dengan menggunakan program ChemDraw Ultra 12.0 kemudian dilakukan minimalisasi energi dengan menggunakan Chem3D Pro 12.0 untuk membentuk suatu konformasi 3D yang stabil sebelum berikatan dengan reseptor target. Simulasi penambatan molekuler dilakukan terhadap seluruh senyawa uji melalui program Autodock 1.5.6. dengan menggunakan *binding site* serta ukuran dan posisi *grid box* yang sama seperti pada proses validasi metode. Koordinat *binding site* digunakan sebagai tempat interaksi antara semua senyawa bioaktif potensial dan senyawa pembanding dengan reseptor 4RA4. Tujuan dari simulasi penambatan molekuler yaitu untuk mencari kandidat ligan terbaik dengan menentukan afinitas antara konformasi reseptor dan ligan tersebut. Parameter yang dipertimbangkan dalam menentukan afinitas yaitu energi bebas ikatan (ΔG), konstanta inhibisi (K_I), residu asam amino, dan interaksi ikatan yang terjadi antara ligan dengan reseptor.²⁷ Parameter tersebut kemudian dibandingkan antara senyawa uji dengan obat pembanding.

Penelitian ini dilakukan pengulangan atau *running* sebanyak 100 kali dalam sekali *docking*, sehingga diperoleh 100 pose ligan dengan energi bebas ikatan yang berbeda-beda. Proses *running* yang berulang

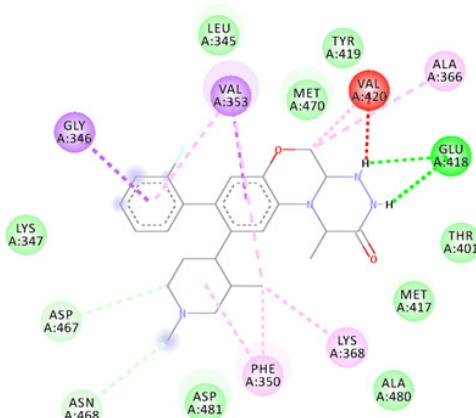
memberikan pengaruh pada nilai energi bebas ikatan. Berdasarkan hasil docking menunjukkan bahwa semua senyawa uji dapat berinteraksi dengan reseptor PKCa. Interaksi tersebut dapat dilihat dari nilai energi ikatan bebas yang nilainya rendah. Nilai energi ikatan yang rendah menunjukkan proses pembentukan kompleks ligan-reseptor dapat berlangsung secara spontan.²⁸ Senyawa pembanding doxorubicin memiliki energi ikatan sebesar -5,97 kcal/mol. Berdasarkan hasil pada Tabel 1, senyawa uji yang memiliki nilai energi ikatan paling rendah dibandingkan senyawa uji lainnya dan senyawa pembanding yaitu myricetin ($\Delta G = -8,49$ kcal/mol), kuersetin ($\Delta G = -7,94$ kcal/mol), dan kaempferol ($\Delta G = -7,75$ kcal/mol). Hal ini menandakan bahwa interaksi antara senyawa tersebut dengan reseptor PKCa lebih baik dibandingkan senyawa lain ataupun senyawa pembanding.

ΔG adalah energi bebas ikatan yang menunjukkan afinitas ikatan suatu ligan terhadap targetnya dan akan menentukan kestabilan dari proses docking. Ligan-reseptor yang saling berinteraksi cenderung akan berada pada kondisi energi yang paling rendah, kondisi tersebut menyebabkan molekul akan berada pada keadaan yang stabil sehingga semakin kecil nilai ΔG maka interaksi ligan dengan reseptor akan semakin stabil. Interaksi molekul pada Ligan-reseptor mencakup interaksi elektrostatik, interaksi hidrofobik, dan ikatan hidrogen yang berkontribusi pada energi ikatan (ΔG) dari ligan-reseptor. Namun, nilai energi bebas ikatan yang rendah tidak selalu menjamin interaksi antara ligan dengan reseptor berlangsung dengan baik. Kemampuan suatu ligan untuk berinteraksi dengan asam amino katalitik juga sangat dibutuhkan untuk mengaktifasi protein fungsional tersebut. Interaksi antara reseptor PKCa dengan ligan alami hasil dari penambatan molekuler (Gambar 3) menunjukkan bahwa ligan alami (1R) - 9 - [(3S,4S) - 1,3 - Dimethylpiperidin - 4 - Yl] - 8 - (2 - Fluorophenyl) - 1 - Methyl - 3,5 - Dihydro[1,2,4]Triazino[3,4 - C][1,4]Benzoxazin - 2(1H) - One memiliki interaksi dengan residu protein melalui 3 ikatan hidrogen yang

melibatkan asam amino GLU418, ASP467, dan ASN468. Asam amino tersebut merupakan asam amino yang berperan penting dalam interaksi penghambatan PKC- α 39. Selain itu, melibatkan asam amino lainnya yaitu LEU345, TYR419, MET470, THR401, MET417, ALA480, ASP481, LYS347, GLY436, VAL353, PHE350, LYS368, VAL420, dan ALA366. Semua senyawa uji dan senyawa pembanding memiliki interaksi terhadap reseptor PKCa yang melibatkan beberapa asam amino yang sama seperti interaksi reseptor dengan ligan alami. Hal tersebut menandakan bahwa senyawa uji maupun senyawa pembanding terikat pada situs katalitik dari protein PKCa. Senyawa uji dengan residu asam amino dan ikatan hidrogen yang mendekati ligan alami menunjukkan kemiripan jenis interaksi yang menggambarkan kemiripan aktivitas.⁴⁰

Parameter konstanta inhibisi (Ki) juga perlu dipertimbangkan dalam simulasi penambatan molekuler. Ki adalah konstanta inhibisi yang menunjukkan afinitas antara ligan dengan reseptornya. Semakin rendah nilai konstanta inhibisi dari suatu senyawa maka semakin baik afinitasnya.⁴¹ Nilai konstanta inhibisi berbanding lurus dengan energi bebas Gibbs, semakin kecil nilai konstanta inhibisi semakin stabil interaksi yang terjadi. Berdasarkan hasil pada Tabel 1, myricetin ($Ki = 600,42$ nM), kuersetin ($Ki = 1,52$ μ M), dan kaempferol ($Ki = 2,08$ μ M) memiliki nilai konstanta inhibisi paling rendah dibandingkan dengan senyawa uji lainnya dan senyawa pembanding Doxorubicin ($Ki = 42,42$ μ M).

Berdasarkan pengujian simulasi docking yang telah dilakukan, senyawa dalam tanaman daun kelor (*Moringa oleifera*) yang paling memiliki potensi sebagai antikanker terhadap reseptor kinase C α adalah senyawa myricetin. Hal tersebut dapat dilihat berdasarkan nilai energi bebas Gibbs, konstanta inhibisi, dan kemampuan senyawa uji untuk berinteraksi dengan *Ligan Binding Domain* (LBD) dari protein target. Senyawa myricetin memiliki kemiripan ikatan asam amino dengan ikatan hidrogen pada residu GLU418. Adanya ikatan hidrogen akan mempengaruhi kestabilan interaksi. Oleh karena itu, ada kemungkinan senyawa



Gambar 3. Interaksi ligan alami dengan Reseptor Protein Kinase C *alpha* secara 2D. Interaksi berupa ikatan hidrogen ditandai dengan lingkaran berwarna hijau.

myricetin memiliki aktivitas biologi yang sama dengan ligan alami.

Pemodelan farmakofor merupakan metode yang penting dalam proses penemuan dan perkembangan obat melalui pendekatan berdasarkan ligan. Farmakofor merupakan gugus penting yang berinteraksi dengan target dan bertanggung jawab dalam aktivitas biologis homolog senyawa tertentu. Visualisasi farmakofor berperan dalam pengikatan senyawa uji terhadap target protein dan bertujuan untuk memastikan terjadinya interaksi molekuler optimal dengan struktur target biologis spesifik sebagai penginduksi atau penghambat respon biologis.⁴² Farmakofor dari ligan alami, senyawa uji, dan senyawa pembanding divisualisasikan secara 2D dan 3D dengan menggunakan program *LigandScout*. Hasil pemodelan farmakofor dari senyawa pembanding ataupun senyawa uji dengan reseptor PKC α menunjukkan adanya interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen (Tabel 2). Melalui pemodelan farmakofor secara *virtual*, dapat dilakukan skrining dan identifikasi molekul atau senyawa yang memberikan efek biologis sesuai dengan yang diharapkan.

Parameter kelarutan dan permeabilitas merupakan hal yang perlu dipertimbangkan dalam mengembangkan obat baru karena akan mempengaruhi kemampuan absorpsi obat di dalam tubuh. Parameter fisikokimia tersebut ditentukan berdasarkan *Lipinski's Rule of Five*. Dalam proses mengembangkan

dan menemukan obat baru yang digunakan secara oral, suatu kandidat senyawa obat harus memenuhi lima syarat yang disebut dengan "*Rule of Five*" yang meliputi berat molekul senyawa tidak lebih dari 500 dalton, memiliki lipofisitas yang tinggi yang ditunjukkan dengan nilai log P tidak lebih dari 5, memiliki donor ikatan hidrogen tidak lebih dari 5, dan akseptor ikatan hidrogen tidak lebih dari 10.⁴³ *Lipinski's Rule of Five* dapat menentukan apakah senyawa yang ingin dikembangkan menjadi obat memiliki syarat yang baik untuk dibuat dalam bentuk sediaan oral atau non-oral.⁴³ Apabila suatu senyawa obat memiliki bobot molekul yang melebihi 500 dalton maka hal tersebut dapat berpengaruh terhadap proses penetrasi senyawa dalam melewati membran sel. Supaya dapat digunakan secara oral, obat sebaiknya memiliki nilai log P lebih dari 1 dan kurang dari 5. Apabila nilai log P semakin kecil maka ligan cenderung larut dalam air, namun nilai Log P ligan tidak boleh negatif karena nilai log P negatif menunjukkan ligan tidak dapat melewati membran *lipid bilayer*. Selain itu, apabila nilai log P bernilai lebih dari 5 maka akan berpotensi memberikan efek toksisitas yang tinggi yang diakibatkan karena kelarutan yang rendah dalam air sehingga akan terakumulasi dalam tubuh karena sulit untuk dimetabolisme dan diekskresikan.⁴⁴ Berdasarkan Tabel 3 dapat dilihat hampir semua ligan uji memenuhi syarat batas berat molekul, kecuali senyawa rutin

yang bobot molekulnya melebihi 500 dalton yaitu sebesar 612,537 g/mol. *Drug-likeness* dapat ditentukan melalui jumlah parameter *Lipinski's Rule of Five* yang tidak terpenuhi oleh masing-masing senyawa. Apabila ada satu parameter yang tidak terpenuhi maka masih dapat ditoleransi dan memenuhi *drug-likeness*. Namun, apabila pelanggaran parameter *Lipinski's Rule of Five* yang dimiliki oleh suatu senyawa lebih dari satu maka senyawa tersebut dianggap tidak memenuhi syarat untuk dijadikan kandidat obat dalam bentuk sediaan oral. Diantara semua senyawa, rutin tidak memenuhi syarat sebagai kandidat obat dalam bentuk oral karena terdapat tiga pelanggaran pada parameter *Lipinski's Rule of Five*. Saat ini obat kanker dalam bentuk oral masih memiliki banyak keterbatasan, salah satunya yaitu masalah bioavailabilitas sehingga masih banyak yang diadministrasikan secara intravena.

Farmakokinetik merupakan faktor yang menjadi pertimbangan dalam pengembangan obat baru untuk menghindari adanya masalah dalam parameter absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, dan toksitas (ADMET). Oleh karena itu, dilakukan pengujian PreADMET pada kesepuluh senyawa uji melalui situs yang dapat diakses secara *online* pada <https://preadmet.bmdrc.kr/>. PreADMET mempunyai peran penting karena dapat memperhitungkan kegagalan 60% molekul obat selama proses pengembangan obat. Prediksi awal dari sifat-sifat ini dapat mengurangi biaya yang signifikan dalam bidang penelitian obat. Permeabilitas membran adalah penentu utama dalam efektivitas penyerapan obat dan keefektifan sediaan oral. Molekul obat harus mempunyai kemampuan untuk melintasi lapisan ganda lipid, yang biasanya membentuk membran pencernaan, daerah sawar darah-otak serta semua membran sel, juga penting untuk distribusi dan eliminasi obat. Oleh karena itu, permeabilitas membran saat ini merupakan salah satu sifat fisikokimia yang paling penting dan dipelajari dengan baik dalam fase praklinis.⁴⁵

Parameter prediksi absorpsi obat dilihat berdasarkan nilai HIA (*Human*

Intestinal Absorption) dan sel Caco-2. HIA merupakan penjumlahan dari bioavailabilitas dan absorpsi yang dievaluasi dari ekskresi kumulatif pada urin, empedu, dan feses. HIA menunjukkan kemampuan obat terabsorpsi pada usus. Apabila senyawa memiliki nilai HIA yang berada pada rentang 70-100% maka senyawa tersebut memiliki sifat absorpsi pada usus yang baik sehingga mudah diabsorpsi ketika diberikan secara oral.⁴⁶ Senyawa uji yang memiliki persentase HIA yang berada pada rentang 70-100% yaitu kaempferol, asam vanilat, asam kafeat, asam siringat, asam sinapat, dan p-asam kumarat. Sedangkan, persentase HIA dengan rentang 30-70% dinyatakan cukup baik, senyawa uji dengan rentang persentase HIA 30-70% adalah querctein, myricetin, dan asam galat. Senyawa uji dengan rentang nilai persentase HIA kurang dari 30% dinyatakan memiliki sifat absorpsi pada usus yang buruk, yaitu senyawa rutin. Sel Caco-2 (*Human colon adenocarcinoma*) adalah suatu model uji *in vitro* dari mukosa usus yang berasal dari adenocarcinoma kolon manusia yang memiliki kesamaan secara morfologi maupun fungsional dengan enterosit manusia.⁴⁷ Sel tersebut berperan untuk memprediksi penyerapan obat apabila diberikan secara oral. Senyawa dinyatakan memiliki permeabilitas Caco-2 yang tinggi apabila nilainya lebih dari 70, dinyatakan memiliki permeabilitas sel Caco-2 kategori sedang apabila bernilai 4-70, dan permeabilitas Caco-2 yang buruk apabila kurang dari 4. Berdasarkan pengujian, senyawa kaempferol, asam galat, asam vanilat, asam kafeat, asam sinapat, asam siringat, rutin, dan asam p-kumarat termasuk ke dalam kategori permeabilitas Caco-2 sedang. Sedangkan senyawa kuersetin dan myricetin dinyatakan memiliki permeabilitas Caco-2 yang buruk. Berdasarkan data pengujian, diketahui bahwa permeabilitas senyawa uji untuk dapat melewati epitel testinal tidak tergolong tinggi sehingga dapat mempengaruhi bioavailabilitasnya dalam darah. Oleh karena itu, diperlukan modifikasi baik secara farmasetika ataupun modifikasi struktur untuk meningkatkan sifat permeabilitas dari senyawa uji.

Pada aspek parameter distribusi, dilakukan pengujian terhadap nilai *Plasma Protein Binding* (PPB) dan *Blood Brain Barrier Penetration* (BBB). Nilai PPB merupakan nilai yang menyatakan persen ikatan obat dalam protein plasma, yang erat kaitannya dengan kemampuan disposisi obat untuk memberikan efek terapi. Pengikatan protein plasma dinyatakan dalam persentase (0-100%) yang mewakili kekuatan ikatan. Ikatan protein plasma berperan penting dalam efek terapeutik obat karena pada umumnya obat yang mampu berdifusi atau melintasi membran sel dan berinteraksi dengan target farmakologi merupakan obat dalam bentuk bebas. Umumnya obat berinteraksi secara reversible melalui ikatan kimia yang lemah seperti ikatan hidrogen dan Van der Waals. Terikatnya senyawa obat dengan protein plasma akan membantu dalam proses distribusi obat melalui aliran darah untuk mencapai area dari target kerja obat.⁴⁸ Apabila obat terikat secara kuat pada protein plasma akan menyebabkan sulit untuk berdifusi ke dalam jaringan. Kriteria nilai PPB yang melebihi 90% menunjukkan bahwa senyawa tersebut dapat terikat kuat dengan protein plasma. Berdasarkan hasil pada Tabel 4, senyawa uji kuersetin dan myricetin merupakan senyawa uji dengan nilai PPB lebih dari 90%, dan senyawa uji lainnya memiliki nilai PPB kurang dari 90%.

Nilai BBB merupakan nilai yang menyatakan kemampuan suatu obat untuk dapat menembus ke daerah sawar otak. Nilai BBB adalah salah satu parameter yang perlu diperhatikan, karena apabila senyawa memiliki aktivitas pada sistem saraf pusat (SSP) harus bisa berpenetrasi ke daerah sawar otak sedangkan untuk senyawa yang tidak memiliki aktivitas pada SSP tidak boleh berpenetrasi sampai ke daerah sawar otak karena dapat menimbulkan efek samping pada SSP. Nilai penetrasi BBB dinyatakan sebagai rasio konsentrasi dari senyawa uji pada otak dan darah. Kriteria nilai BBB (*Brain Blood Barrier*) yaitu apabila bernilai lebih dari 2,0 menunjukkan senyawa dapat terabsorpsi dengan baik ke sistem saraf pusat. Apabila menunjukkan nilai 2,0-0,1 maka cukup baik

untuk diabsorpsi ke sistem saraf pusat, namun jika nilai kurang dari 0,1 maka senyawa terabsorpsi buruk ke sistem saraf pusat.⁴⁹ Berdasarkan data pengujian, diketahui bahwa terdapat satu senyawa uji yaitu rutin yang tergolong ke dalam kategori buruk, sedangkan 9 senyawa lainnya menunjukkan nilai yang cukup baik.

Pengujian toksisitas dilakukan dengan pengujian *Ames Toxicity* dan *Rodent Carcinogenicity* menggunakan situs *online* Pre-ADMET untuk mengetahui sifat mutagenik dan karsinogenik senyawa. Berdasarkan hasil pengujian, diprediksikan bahwa semua senyawa uji dan obat pembanding memiliki sifat mutagenik, kecuali senyawa uji rutin. Sedangkan, untuk aspek sifat karsinogen senyawa uji, semua senyawa uji negatif pada pengujian *carcino mouse*, sedangkan pada pengujian *carcino rat* hanya senyawa uji rutin yang negatif. Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk memodifikasi lanjutan struktur kimia senyawa uji yang bersifat karsinogenik atau mutagenik agar dapat dikembangkan menjadi kandidat obat baru.

5. Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengujian terhadap 10 senyawa dalam daun kelor (*Moringa oleifera*), senyawa dengan nilai *binding energy* paling rendah dan konstanta inhibisi paling kecil adalah myricetin ($\Delta G = -8,49$ kcal/mol; $K_i = 600,42$ nM), kuersetin ($\Delta G = -7,94$ kcal/mol; $K_i = 1,52$ uM), dan kaempferol ($\Delta G = -7,75$ kcal/mol; $K_i = 2,08$ uM). Ke-3 senyawa tersebut mempunyai nilai *binding energy* dan konstanta inhibisi yang lebih rendah dibandingkan dengan senyawa pembanding sehingga menandakan bahwa interaksi antara senyawa tersebut dengan reseptor PKCa lebih baik dibandingkan senyawa pembanding doxorubicin. Myricetin, kuersetin, dan kaempferol sudah memenuhi parameter *Lipinski's Rule of Five*. Namun, hanya kaempferol yang memiliki sifat absorpsi pada usus serta permeabilitas yang lebih baik dibandingkan dengan myricetin dan kuersetin. Kaempferol juga memiliki interaksi dengan salah satu asam amino penting yaitu

GLU418. Selain itu, senyawa uji kuersetin dan myricetin merupakan senyawa uji dengan nilai PPB lebih dari 90% yang menandakan bahwa senyawa tersebut dapat terikat kuat dengan protein plasma sehingga akan menghambat proses distribusi di dalam tubuh. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa senyawa kaempferol yang terkandung dalam daun kelor (*Moringa oleifera*) paling berpotensi untuk dijadikan sebagai obat antikanker payudara melalui mekanisme inhibisi protein kinase C alpha. Namun, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menghilangkan sifat mutagenik dengan mengoptimasi struktur senyawa tersebut. Selain itu, perlu dilakukan modifikasi baik secara farmasetika ataupun modifikasi struktur untuk meningkatkan sifat permeabilitas dari senyawa kaempferol karena memiliki permeabilitas yang tergolong sedang.

Daftar Pustaka

1. Hero SK. Faktor Risiko Kanker Payudara. *J Med Hutama*. 2021 Oct 4;3(1):1533–7.
2. International Agency for Research on Cancer (IARC). Indonesia - Global Cancer Observatory. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/360-indonesia-fact-sheets.pdf>. 2020.
3. American Cancer Society. Breast Cancer Treatment Guideline. Atlanta: American Cancer Society; 2017.
4. Iqmy LO, Setiawati S, Yanti DE. Faktor Risiko yang Berhubungan dengan Kanker Payudara. *J Kebidanan Malahayati*. 2021 Jan 31;7(1):32–6.
5. Nurrohmah A, Aprianti A, Hartutik S. Risk Factors of Breast Cancer. *Gaster*. 2022 Feb 8;20(1):1.
6. Tor YS, Yazan LS, Foo JB, Wibowo A, Ismail N, Cheah YK, et al. Induction of Apoptosis in MCF-7 Cells via Oxidative Stress Generation, Mitochondria-Dependent and Caspase-Independent Pathway by Ethyl Acetate Extract of *Dillenia suffruticosa* and Its Chemical Profile. *PLoS One*. 2015 Jun 5;10(6):e0127441.
7. Jan R, Chaudhry G e S. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull*. 2019 Jun 1;9(2):205–18.
8. Nurmaulawati R, Purwidyaningrum I, Indrayati A. Kajian Literatur Uji Aktivitas Antikanker Payudara Tanaman Ranti (*Solanum nigrum* Linn.) Secara in vitro dan in vivo. *Pharm Med J*. 2021;4(2):44–53.
9. Gross S, Rahal R, Stransky N, Lengauer C, Hoeflich KP. Targeting cancer with kinase inhibitors. *J Clin Invest*. 2015 May 1;125(5):1780–9.
10. Meiyanto E. Biologi Molekuler. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada; 2002.
11. Yance D. A Novel Approach to Cancer Treatment. New York: McGraw-Hill Education; 2005. 15 p.
12. Hamid IS, Aksono EB, Sukmanadi M, Purnama MTE. Antiangiogenesis activity test of tin leaf (*Ficus carica* L.) on the number of blood vessels and VEGF expression of chorioallantoic membrane of embryonated chicken eggs. *Eur J Oncol Pharm*. 2018 Oct;1(4):e00007.
13. Azwanida NN. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants* [Internet]. 2015;4(3):1–6. Available from: <http://www.omicsgroup.org/journals/a-review-on-the-extraction-methods-use-in-medicinal-plants-principle-strength-and-limitation-2167-0412-1000196.php?aid=58448>
14. Lønne GK, Cornmark L, Zahirovic IO, Landberg G, Jirström K, Larsson C. PKCa expression is a marker for breast cancer aggressiveness. *Mol Cancer*. 2010 Dec 14;9(1):76.
15. Cameron AJ, Procyk KJ, Leitges M, Parker PJ. PKC alpha protein but not kinase activity is critical for glioma cell proliferation and survival. *Int J Cancer*. 2008 Aug 15;123(4):769–79.
16. Haughian JM, Reno EM, Thorne AM, Bradford AP. Protein kinase C alpha-dependent signaling mediates endometrial cancer cell growth and tumorigenesis. *Int J Cancer*. 2009 Dec 1;125(11):2556–64.
17. Nakagawa S, Fujii T, Yokoyama G, Kazanietz MG, Yamana H, Shirouzu K. Cell growth inhibition by all-trans retinoic acid in SKBR-3 breast cancer cells: Involvement

- of protein kinase C? and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase. *Mol Carcinog.* 2003 Nov;38(3):106–16.
18. Stewart JR, O'Brian CA. Resveratrol Antagonizes EGFR-Dependent Erk1/2 Activation in Human Androgen-Independent Prostate Cancer Cells with Associated Isozyme-Selective PKCa Inhibition. *Invest New Drugs.* 2004 Apr;22(2):107–17.
19. Leone A, Spada A, Battezzati A, Schiraldi A, Aristil J, Bertoli S. Cultivation, Genetic, Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of *Moringa oleifera* Leaves: An Overview. *Int J Mol Sci.* 2015 Jun 5;16(12):12791–835.
20. Tewari KS, Sill MW, Long HJ, Penson RT, Huang H, Ramondetta LM, et al. Improved Survival with Bevacizumab in Advanced Cervical Cancer. *N Engl J Med.* 2014 Feb 20;370(8):734–43.
21. Sreelatha S, Jeyachitra A, Padma PR. Antiproliferation and induction of apoptosis by *Moringa oleifera* leaf extract on human cancer cells. *Food Chem Toxicol.* 2011 Jun;49(6):1270–5.
22. Chumark P, Khunawat P, Sanvarinda Y, Phornchirasilp S, Morales NP, Phivthong-ngam L, et al. The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. *J Ethnopharmacol.* 2008 Mar;116(3):439–46.
23. Banji OJF, Banji D, Kavitha R. Immunomodulatory effects of alcbbolic and hydroalcoholic extracts of *Moringa olifera* Lam leaves. *Indian J Exp Biol.* 2012 Apr;50(4):270–6.
24. Chen AY, Chen YC. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chem.* 2013 Jun;138(4):2099–107.
25. Pinzi L, Rastelli G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *Int J Mol Sci.* 2019 Sep 4;20(18):4331.
26. Zhao J, Cao Y, Zhang L. Exploring the computational methods for protein-ligand binding site prediction. *Comput Struct Biotechnol J* [Internet]. 2020;18:417–26. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2001037019304465>
27. Muttaqin FZ. MOLECULAR DOCKING AND MOLECULAR DYNAMIC STUDIES OF STILBENE DERIVATIVE COMPOUNDS AS SIRTUIN-3 (SIRT3) HISTONE DEACETYLASE INHIBITOR ON MELANOMA SKIN CANCER AND THEIR TOXICITIES PREDICTION. *J Pharmacopoulum* [Internet]. 2019 Aug 31;2(2). Available from: https://ejurnal.stikes-bth.ac.id/index.php/P3M_JoP/article/view/489
28. Du X, Li Y, Xia YL, Ai SM, Liang J, Sang P, et al. Insights into Protein–Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2016 Jan 26;17(2):144. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/2/144>
29. Torres PHM, Sodero ACR, Jofily P, Silva-Jr FP. Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Sep 15;20(18):4574. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/18/4574>
30. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* [Internet]. 2009;NA-NA. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.21334>
31. Cartika H. Modul Cetak Bahan Ajar Farmasi Kimia Farmasi. Jakarta: Pusdik SDM Kesehatan; 2016.
32. Kreutzer AG, Hamza IL, Spencer RK, Nowick JS. X-ray Crystallographic Structures of a Trimer, Dodecamer, and Annular Pore Formed by an A β 17–36 β -Hairpin. *J Am Chem Soc* [Internet]. 2016 Apr 6;138(13):4634–42. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jacs.6b01332>
33. Prasetyawati R, Suherman M, Permana B, Rahmawati R. Molecular Docking Study of Anthocyanidin Compounds Against Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) as Anti-Lung Cancer. *Indones J Pharm Sci Technol.* 2021 Feb;8(1):8.
34. Ravindranath PA, Forli S, Goodsell

- DS, Olson AJ, Sanner MF. AutoDockFR: Advances in Protein-Ligand Docking with Explicitly Specified Binding Site Flexibility. Fetrow JS, editor. *PLOS Comput Biol*. 2015 Dec;11(12):e1004586.
35. Musoev A, Numonov S, You Z, Gao H. Discovery of Novel DPP-IV Inhibitors as Potential Candidates for the Treatment of Type 2 Diabetes mellitus Predicted by 3D QSAR Pharmacophore Models, Molecular Docking and de novo Evolution. *Molecules*. 2019 Aug;24(16).
36. Ferwadi S, Gunawan R, Astuti W. Studi Docking Molekular Senyawa Asam Sinamat Dan Derivatnya Sebagai Inhibitor Protein 1j4x Pada Sel Kanker Serviks. *J Kim Mulawarman*. 2017;14(2):84–90.
37. Agistia DD, Purnomo H, Tegar M, Nugroho AE. Interaction Between Active Compounds from *Aegle marmelos* correa as Anti inflammation Agent with COX-1 and COX-2 Receptor. *Maj Obat Tradis*. 2013;18(2):80–7.
38. Sun Z, Zhou D, Yang J, Zhang D. Doxorubicin promotes breast cancer cell migration and invasion via DCAF13. *FEBS Open Bio* [Internet]. 2022 Jan 5;12(1):221–30. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/2211-5463.13330>
39. Nakano S, Megro S ichi, Hase T, Suzuki T, Isemura M, Nakamura Y, et al. Computational Molecular Docking and X-ray Crystallographic Studies of Catechins in New Drug Design Strategies. *Molecules* [Internet]. 2018 Aug 13;23(8):2020. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/8/2020>
40. Pratama M. Studi Docking Molekular Senyawa Turunan Kuinolin terhadap Reseptor Estrogen-A. *J Surya Med*. 2016;2(1):1–7.
41. Vargas JAR, Lopez AG, Piñol MC, Froeyen M. Molecular docking study on the interaction between 2-substituted-4,5-difuryl Imidazoles with different Protein Target for antileishmanial activity. *J Appl Pharm Sci* [Internet]. 2018;8(3):14–22. Available from: http://www.japsonline.com/abstract.php?article_id=2571
42. Dermawan D, Sumirtanurdin R, Dewantisari D. Molecular Dynamics Simulation of Estrogen Receptor Alpha Against Andrografolid as Anti Breast Cancer. *Indones J Pharm Sci Technol*. 2019;6(2):65–76.
43. Lipinski CA. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov Today Technol*. 2004 Dec;1(4):337–41.
44. Gao Y, Gesenberg C, Zheng W. Oral Formulations for Preclinical Studies. In: *Developing Solid Oral Dosage Forms* [Internet]. Elsevier; 2017. p. 455–95. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128024478000170>
45. Djajanti AD, Asfi D. UJI AKTIVITAS SEDIAAN KRIM EKSTRAK ETANOL HERBA SELEDRI (*Apium graveolens* L.) TERHADAP LUKA SAYAT PADA KELINCI (*Oryctolagus cuniculus* L.). *Media Kesehat Politek Kesehat Makassar*. 2018 Dec 31;13(2):40.
46. Shargel L, Yu A. *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*. 7th ed. New York: McGraw Hill; 2016.
47. Wang NN, Dong J, Deng YH, Zhu MF, Wen M, Yao ZJ, et al. ADME Properties Evaluation in Drug Discovery: Prediction of Caco-2 Cell Permeability Using a Combination of NSGA-II and Boosting. *J Chem Inf Model* [Internet]. 2016 Apr 25;56(4):763–73. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jcim.5b00642>
48. Lindup WE, Orme MC. Clinical pharmacology: plasma protein binding of drugs. *BMJ* [Internet]. 1981 Jan 17;282(6259):212–4. Available from: <https://www.bmjjournals.org/lookup/doi/10.1136/bmj.282.6259.212>
49. MA X lei, CHEN C, YANG J. Predictive model of blood-brain barrier penetration of organic compounds1. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. 2005 Apr;26(4):500–12. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1111/j.1745-7254.2005.00068.x>