

**VIRTUAL SCREENING SENYAWA INHIBITOR SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE
B-RAF SEBAGAI ANTI-KANKER KOLON BERBASIS *PHARMACOPHORE MODELING*
DAN *MOLECULAR DOCKING***

Laporan Tugas Akhir

**M. Fatan Antafani
11161146**



**Universitas Bhakti Kencana
Fakultas Farmasi
Program Strata I Farmasi
Bandung
2020**

LEMBAR PENGESAHAN

VIRTUAL SCREENING SENYAWA INHIBITOR SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE B-RAF SEBAGAI ANTI-KANKER KOLON BERBASIS PHARMACOPHORE MODELING DAN MOLECULAR DOCKING

Laporan Tugas Akhir

Diajukan untuk memenuhi syarat kelulusan Program Strata I Farmasi

M. Fatan Antafani
11161146

Bandung, Agustus 2020

Menyetujui,
Pembimbing Utama,



(apt. Purwaniati, M.Si)

ABSTRAK

VIRTUAL SCREENING SENYAWA INHIBITOR SERINE/THREONINE- PROTEIN KINASE B-RAF SEBAGAI ANTI-KANKER KOLON BERBASIS PHARMACOPHORE MODELING DAN MOLECULAR DOCKING

Oleh:

M. Fatan Antafani

11161146

Kanker kolon merupakan kanker yang tumbuh di sistem pencernaan, disebabkan karena pertumbuhan sel yang tidak terkendali. Kanker kolon adalah kanker ketiga terbanyak di Indonesia dan merupakan kanker penyebab kematian kedua terbanyak di Amerika Serikat. Pada pencarian senyawa obat baru yang dilakukan secara *in silico*, Serine/Threonine-Protein Kinase B-Raf adalah kinase yang penting untuk pengobatan kanker kolon. Penelitian ini bertujuan untuk mencari kandidat senyawa obat baru berdasarkan metode *virtual screening* berbasis *pharmacophore modeling* dan *molecular docking* menggunakan database *ZINC Natural Product*. Validasi berbasis farmakofor menunjukkan ada 4 jenis fitur farmakofor yaitu 3 ikatan hidrofobik, dan 1 ikatan donor hidrogen dengan nilai AUC 0,51 dan EF 3,2 menghasilkan 343 dari 151.837 senyawa. Untuk validasi berbasis *molecular docking* dengan *vina wizard* didapatkan nilai AUC 0,781 dan EF 51,00 menghasilkan 178 senyawa dari nilai *binding affinity* ligan alami yaitu -8,9 kkal/mol. Sedangkan validasi *autodock wizard* didapatkan nilai AUC 0,637 dan EF 51,00 menghasilkan 29 senyawa dari nilai *binding energy* ligan alami yaitu -9,05 kkal/mol. Didapatkan 3 hits terbaik yang diduga berpotensi sebagai anti kanker kolon yaitu senyawa ZINC05343819, ZINC09572633 dan ZINC96115220 yang memiliki ikatan hidrogen pada residu asam amino Cys532, Lys483 dan Phe595.

Kata Kunci: Kanker kolon, *molecular docking*, *pharmacophore modeling*, Serine/Threonine-Protein Kinase B-Raf, *virtual screening*.

ABSTRACT

VIRTUAL SCREENING OF SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE B-RAF INHIBITOR BASED ON PHARMACOPHORE MODELING AND MOLECULAR DOCKING

By:

M. Fatan Antafani

11161146

Colon cancer is cancer that grows in the digestive system, caused by uncontrolled cell growth. Colon cancer is the third most cancer in Indonesia and is the second leading cause of death in the United States. In the search for new drug compounds conducted in silico, Serine / Threonine-Protein Kinase B-Raf is an important kinase for the treatment of colon cancer. This study aims to find candidates for new drug compounds based on virtual screening methods based on pharmacophore modeling and molecular docking using the ZINC Natural Product database. Pharmacophore based validation shows that there are 4 types of pharmacophore features, namely 3 hydrophobic bonds, and 1 hydrogen donor bond with AUC values of 0.51 and EF 3.2 resulting in 343 out of 151,837 compounds. For molecular docking-based validation with vina wizard, AUC value of 0.781 and EF 51.00 resulted in 178 compounds of natural ligand binding affinity value of -8.9 kcal / mol. While the autodock wizard validation obtained AUC value of 0.637 and EF 51.00 produced 29 compounds of natural ligand binding energy values of -9.05 kcal / mol. Obtained the 3 best hits which are thought to be potential as anti-colon cancer are ZINC05343819, ZINC09572633 and ZINC96115220 compounds that have hydrogen bonds in the amino acid residues Cys532, Lys483 and Phe595.

Keywords: *Colon cancer, molecular docking, pharmacophore modeling, Serine/Threonine-Protein Kinase B-Raf, virtual screening.*

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum warrohmatullohi wabarokatuh

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, karena berkat rahmat, hidayah dan karunia-NYA maka penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan tepat waktu. Shalawat serta salam semoga tercurahkan kepada Rasulullah SAW, keluarga dan sahabatnya.

Penulisan tugas akhir ini merupakan suatu persyaratan untuk menyelesaikan Program Studi Sarjana Strata Satu pada Program Studi Farmasi di Universitas Bhakti Kencana Bandung. Laporan tugas akhir yang berjudul : “*Virtual Screening* Senyawa Inhibitor Serine/Threonine-Protein Kinase B-Raf Sebagai Anti-Kanker Kolon Berbasis *Pharmacophore Modeling* Dan *Molecular Docking*”. Dalam penyusunan dan penulisan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan, bimbingan serta dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu dalam kesempatan ini penulis dengan senang hati menyampaikan terimakasih kepada :

1. Bapak H. Mulyana selaku ketua Yayasan Adhiguna Kencana
2. Bapak Dr. apt. Entris Sutrisno, S.Farm., MH, Kes., selaku rektor di Universitas Bhakti Kencana Bandung
3. apt. Purwaniati, M.Si, selaku pembimbing utama yang telah menyempatkan waktu, pikiran dan arahan mulai dari awal penulisan sampai akhir.
4. Dr. Aiyi Asnawi, M.Si, selaku pembimbing serta yang telah menyempatkan waktu, pikiran dan arahan mulai dari awal penulisan sampai akhir.
5. Orangtua, nenek, kakek dan keluarga yang selalu memberikan dukungan moril, materil serta motivasi dan doanya.
6. Syifa Ayu Wiguna rekan seperjuangan *virtual screening* yang selalu memberikan masukan serta dukungannya.
7. Keluarga besar organisasi MAFARPA terkhusus angkatan 13 yang selalu memberi dukungan moril.
8. Dosen-dosen Fakultas Farmasi Universitas Bhakti Kencana Bandung yang telah memberikan ilmunya dengan penuh sabar kepada kami.
9. Rekan-rekan satu angkatan 2016 yang telah memberikan semangat serta dukungan selama penyusunan Tugas Akhir ini.

10. Rekan–rekan seperjuangan Kimia Medisinal yang bersama–sama berjuang dalam segala hal dan semua pihak yang telah membantu yang tidak bisa disebutkan satu persatu.

Atas segala kekurangan dan ketidaksempurnaan skripsi ini, penulis sangat mengharapkan masukan, kritik dan saran yang bersifat membangun kearah perbaikan dan penyempurnaan skripsi ini. Alhamdulillah dapat penulis atasi dan selesaikan dengan baik. Akhir kata penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak dan semoga amal baik yang telah diberikan kepada penulis mendapat balasan dari Allah SWT.

Bandung, Agustus 2020

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	x
BAB I. PENDAHULUAN	1
I.1. Latar belakang	1
I.2. Rumusan masalah	3
I.3. Tujuan dan manfaat penelitian	3
I.4. Hipotesis penelitian	3
I.5. Tempat dan waktu Penelitian	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
II.1. Kanker Kolorektal	4
II.1.1 Epidemiologi dan Etiologi	5
II.1.2 Faktor risiko dan pencegahan kanker kolon	5
II.1.3 Patofisiologi	6
II.1.4 Obat Penyakit Kanker Kolon	6
II.2. Peran Protein Kinase B / AKT dalam pertumbuhan kanker kolon	7
II.3. Inhibitor protein kinase B-Raf	7
II.4 <i>Virtual screening</i>	9
II.4.1 <i>Active set compound</i>	10
II.4.2 <i>Decoy Set Compound</i>	11
II.4.3 <i>Docking</i>	11
II.4.4 <i>Validasi Virtual Screening</i>	11
II.4.5 Database	14
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	15
BAB IV. PROSEDUR PENELITIAN	16
IV.1. Preparasi struktur protein target	16
IV.1.1 Pencarian dan pengunduhan struktur protein	16
IV.2. Preparasi dataset	16
IV.2.1 Pemilihan dataset senyawa aktif	16

IV.2.2 Konversi hasil active set compound	16
IV.2.3 Pencarian dataset senyawa tidak aktif	16
IV.3. Penapisan virtual berbasis farmakofor	17
IV.3.1 Konversi dataset senyawa aktif dan senyawa tidak aktif	17
IV.3.2 Optimasi ligan alami.....	17
IV.3.3 Pemodelan farmakofor	17
IV.3.4 Validasi model farmakofor	17
IV.3.5 Penapisan virtual database dengan model farmakofor	18
IV.3.6 Analisis hasil virtual screening	18
IV.4. Penapisan virtual berbasis <i>molecular docking</i> menggunakan <i>PyRx Screening Tool 0.8</i>	18
IV.4.1 Pemisahan struktur protein dengan ligan	18
IV.4.2 Lokasi target penambatan menggunakan <i>autodock wizard</i>	18
IV.4.3 Lokasi target penambatan menggunakan <i>vina wizard</i>	19
IV.4.4 Validasi penapisan virtual menggunakan <i>vina wizard</i>	19
IV.4.5 Validasi penapisan virtual menggunakan <i>autodock wizard</i>	20
IV.5. Penapisan virtual database berbasis <i>docking</i>	21
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	22
V.1. Struktur protein serine/threonine protein kinase b-raf	22
V.2. Database, dataset senyawa aktif dan dataset senyawa pengecoh.....	22
V.2.1 Database	22
V.2.2 Dataset senyawa aktif dan senyawa pengecoh.....	23
V.3. Penapisan virtual berbasis farmakofor	24
V.3.1 Model farmakofor	24
V.3.2 Validasi model farmakofor.....	25
V.3.3 Penapisan virtual database dengan model farmakofor	26
V.4. Penapisan virtual berbasis <i>molecular docking</i> menggunakan <i>PyRx Screening Tool 0.8</i>	27
V.4.1 Lokasi target penambatan.....	27
V.4.2 Validasi penapisan virtual menggunakan <i>vina wizard</i> dan <i>autodock wizard</i>	29
V.4.3 Penapisan virtual database berbasis <i>docking</i>	30
V.5. Interaksi senyawa uji terbaik	31
BAB VI. SIMPULAN DAN SARAN.....	36
VI.1. Kesimpulan	36
VI.2. Saran.....	36
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN	39

DAFTAR TABEL

Tabel II.1. Fitur-fitur farmakofor dalam <i>LigandScout</i> 4.3	15
Tabel V.1. Database ZINC <i>Natural Products</i>	24
Tabel V.2. Parameter validasi model farmokofor	26
Tabel V.3. Hasil penapisan virtual terhadap database ZINC <i>Natural Product</i> berdasarkan pemodelan farmakofor.....	28
Tabel V.4. Ukuran <i>gridbox</i> dan <i>grid center</i> untuk validasi <i>re-docking</i> menggunakan <i>autodock wizard</i>	29
Tabel V.5. Ukuran <i>gridbox</i> dan <i>grid center</i> untuk validasi <i>re-docking</i> menggunakan <i>vina wizard</i>	29
Tabel V.6. Hasil penapisan virtual database berbasis <i>docking</i> menggunakan <i>vina wizard</i> dan <i>autodock wizard</i>	32
Tabel V.7. Interaksi senyawa uji terbaik dengan residu asam amino	32
Tabel V.8. Visualisasi interaksi senyawa uji terbaik.....	35

DAFTAR GAMBAR

Gambar II.1 Struktur Protein Serine/Threonine-Protein Kinase B-Raf	9
Gambar V.1 Protein Serine/Threonine Protein Kinase B-Raf (5ITA) (a) dan ligan 6DC801 (b).....	23
Gambar V.2 Fitur awal farmakofor ligan alami 6DC801.....	25
Gambar V.3 Fitur farmakofor model 2 (a) dan ROC (b)	27
Gambar V.4 Visualisasi overlay ligan alami hasil <i>re-docking</i> menggunakan <i>autodock wizard</i>	29
Gambar V.5 Visualisasi overlay ligan alami hasil <i>re-docking</i> menggunakan <i>vina wizard</i>	30
Gambar V.6 Kurva ROC hasil validasi penapisan virtual menggunakan <i>Vina Wizard</i> (a) dan <i>Autodock Wizard</i> (b)	31

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Dataset senyawa aktif.....	41
Lampiran 2	Kandidat hits terbaik	45
Lampiran 3	Rincian prosedur penelitian.....	46

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

SINGKATAN	MAKNA
2D	Dua Dimensi
3D	Tiga Dimensi
ACC	<i>Accuracy</i>
AKT	Protein Kinase B
AUC	<i>Area Under Curve</i>
EF	<i>Enrichment Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
GH	<i>Goodness of Hit-list</i>
KEMENKES	Kementrian Kesehatan
Kkal	<i>Kilo Kalori per Mol</i>
KKR	Kanker Kolorektal
nM	<i>Nano Molar</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PKB	Protein Kinase B
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
ROC	<i>Receiving Operating Curve</i>
SE	<i>Sensitivitas</i>
SP	<i>Spesifitas</i>
Ya	<i>Yield of actives</i>

BAB I. PENDAHULUAN

I.1. Latar belakang

Kanker adalah penyakit yang mengancam serius pada kehidupan yang menyebabkan kerugian yang signifikan bagi kesehatan manusia. Kanker merupakan salah satu penyebab paling umum kematian di seluruh dunia. Ahli kimia obat telah menemukan dan mensintesis banyak obat-obat kemoterapi untuk pengobatan berbagai jenis kanker, obat ini juga sangat mempengaruhi jaringan non-kanker yang mencakup sistem haematopoietic, sumsum tulang, sel-sel epitel gastrointestinal dan folikel rambut *multidrug-resistant* (MDR) adalah rintangan penting lain dalam terapi kanker (Kaur, 2015).

Kanker Kolorektal (KKR) masih menjadi masalah besar di dunia pada umumnya dan di Indonesia pada khususnya. Dengan menggunakan kolonoskopi, dapat melihat lesi di kolon dengan biaya yang mahal jika dilakukan pada semua pasien asimtomatik. Komponen non-*Asia Pacific Colorectal Screening* (APCS) memprediksi KKR pada pasien simtomatik jadi kolonoskopi hanya merupakan modalitas untuk menstratifikasi KKR. Dan dilakukan dengan melihat kemungkinan kanker kolorektal menggunakan APCS pada penderita simtomatik (Lubis, 2015).

Menurut *American Cancer Society*, kanker kolorektal (KKR) merupakan kanker ketiga terbanyak di Indonesia dan kanker penyebab kematian kedua terbanyak pada pria dan wanita di Amerika Serikat. Pada tahun 2014 telah diprediksi bahwa ada 96.830 kasus baru kanker kolon dan 40.000 kasus baru kanker rektum. Secara keseluruhan risiko untuk mendapatkan kanker kolorektal adalah 1 dari 20 orang (5%).

Risiko penyakit KKR cenderung lebih sedikit pada wanita dibandingkan pada pria. Beberapa faktor lain dapat meningkatkan risiko individu untuk terkena kanker kolorektal. Angka kematian telah berkurang sejak 2 dasawarsa terakhir yang berhubungan dengan meningkatnya deteksi dini serta kemajuan pada penanganan kanker kolorektal (KEMENKES, 2018).

Di Indonesia sudah mulai banyak data mengenai angka kejadian kanker kolorektal. Menurut Profil Kesehatan Indonesia tahun 2008, di Indonesia kanker kolorektal berada

pada peringkat 9 dari 10 peringkat utama penyakit kanker pasien rawat inap di seluruh rumah sakit di Indonesia dengan jumlah kasus sebanyak 1.810 dengan persentase sebesar 4,92%. Data Rumah Sakit Kanker Dharmas tahun 2010, kanker kolorektal masuk dalam 10 besar kanker yang banyak dialami individu di mana kanker rektum menempati urutan keenam dan kanker kolon menempati urutan kedelapan (Tatuhey dkk., 2014). Dari beberapa laporan terjadi kenaikan jumlah kasus tetapi belum ada angka yang pasti berapa banyak penderita kanker kolorektal. Beberapa masalah dalam penanganan adalah karena pasien sering datang pada saat sudah stadium lanjut, refrakter terhadap regimen sitostatika, dan efek samping sitostatika, sehingga dikembangkan pilihan terapi yang ditujukan pada sasaran spesifik pada Protein Kinase B (PKB).

Protein kinase B (PKB), juga dikenal sebagai AKT, adalah protein kinase spesifik serine/threonine yang memainkan peran kunci dalam berbagai proses seluler seperti metabolisme glukosa, apoptosis, proliferasi sel, transkripsi, dan migrasi sel.

AKT adalah Serine-Threonine Kinase yang terlibat dalam beberapa pensinyalan hilir yang mengatur berbagai proses yang terkait dengan metabolisme sel, pertumbuhan, diferensiasi, pembelahan, apoptosis dan proliferasi (Testa & Tschlis, 2005; Manning & Cantley, 2007). Ada tiga sub tipe protein kinase B: AKT-1 / PKB α , AKT-2 / PKB β dan AKT-3 / PKB γ (Hennesy dkk., 2005). Masing-masing dikaitkan dengan berbagai jenis kanker, seperti kanker usus besar, kanker payudara, kanker ovarium (Testa & Tschlis, 2005; Zhu dkk., 2014; Ma dkk., 2018; Liu & Dong, 2014; Liby dkk., 2012; Liu dkk., 2016). Jalur PI3K / AKT adalah jalur yang paling sering terganggu di kanker pada manusia (Kurzrock dkk., 2016).

Pada penentuan dan pengembangan obat anti kanker metode yang digunakan salah satunya berdasarkan pendekatan komputasi (*in silico*). Metode kimia komputasi menghasilkan pengujian yang jauh lebih memadai dari prediksi teoritis, mudah untuk digunakan, tidak mahal dan aman (Rode dkk., 2007). Metode *in silico* yang digunakan adalah *Virtual Screening*.

Virtual Screening adalah metode *in silico* yang digunakan untuk mencari beberapa senyawa secara virtual di antara ribuan atau bahkan jutaan senyawa lainnya yang

memiliki potensi paling besar untuk dijadikan sebagai kandidat obat terhadap target makromolekul tertentu (Ichsan, 2014).

Operasi bedah adalah metode terbaik untuk menangani penyakit kanker kolon. Namun biaya yang dibutuhkan untuk penanganan tersebut tidak murah dan di Indonesia fasilitas tersebut masih tergolong sedikit, hal ini yang mendorong saya tertarik untuk mencari calon senyawa obat baru yang bekerja secara spesifik terhadap sel kanker kolon.

I.2. Rumusan masalah

1. Apakah terdapat senyawa herbal dari database yang dapat menginhibisi penyakit kanker kolon sebagai Inhibitor Serine/Threonine-Protein Kinase B-Raf?
2. Bagaimana interaksi yang terjadi antara Inhibitor Serine/Threonine-Protein Kinase B-Raf dengan senyawa herbal yang berperan dalam pengobatan kanker kolon?

I.3. Tujuan dan manfaat penelitian

1. Untuk mendapatkan kandidat senyawa aktif dengan cara menyeleksi dari database senyawa herbal sebagai Inhibitor Serine/Threonine-Protein Kinase B-Raf untuk terapi kanker kolon.
2. Untuk mengetahui interaksi yang terjadi antara senyawa yang terpilih dan Inhibitor Serine/Threonine Protein Kinase B-Raf.

I.4. Hipotesis penelitian

Diduga Inhibitor Serine/Threonine-Protein Kinase B-Raf berpotensi sebagai kandidat senyawa obat terbaik sebagai terapi kanker kolon.

I.5. Tempat dan waktu Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Desember 2019 – Mei 2020. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Komputasi Universitas Bhakti Kencana Jl. Soekarno Hatta No. 754 Bandung, Jawa Barat.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

II.1. Kanker Kolorektal

Menurut *American Cancer Society* 2019, kanker adalah sekelompok penyakit yang ditandai oleh pertumbuhan yang tidak terkendali dan penyebaran sel-sel abnormal. Jika penyebaran tidak terkontrol, dapat mengakibatkan kematian. Meskipun penyebab kanker tidak sepenuhnya dipahami, banyak faktor diketahui dapat meningkatkan kejadian penyakit ini (misalnya, penggunaan tembakau dan kelebihan berat badan) dan yang tidak (misalnya, mutasi genetik yang diwariskan dan kondisi kekebalan tubuh). Faktor-faktor risiko ini dapat bertindak secara bersamaan atau berurutan untuk memulai dan mendorong pertumbuhan kanker.

Penyakit kanker merupakan salah satu penyebab kematian utama di seluruh dunia. Pada tahun 2012, kanker menjadi penyebab kematian pada sekitar 8,2 juta orang. Menurut *Data Global Cancer Statistic*, pada tahun 2012 terdapat 14.067.894 kasus baru kanker dan 8.201.575 kematian akibat kanker di seluruh dunia. Penyebab terbesar kematian akibat kanker setiap tahunnya disebabkan oleh kanker paru, hati, perut, kolorektal, dan kanker payudara.

Menurut *American Cancer Society*, kanker kolorektal adalah keganasan yang berasal dari jaringan usus besar, yang terdiri dari kolon (bagian terpanjang dari usus besar) dan atau rektum (bagian kecil terakhir dari usus besar sebelum anus).

Kanker Kolorektal menjadi masalah besar di dunia pada umumnya dan di Indonesia pada khususnya. Dengan menggunakan kolonoskopi, dapat melihat lesi di kolon dengan biaya yang mahal jika dilakukan pada semua pasien asimtomatik. Memakai komponen non-*Asia Pacific Colorectal Screening* (APCS) dapat memprediksi KKR pada pasien simtomatik jadi kolonoskopi hanya merupakan modalitas untuk menstratifikasi KKR (Lubis, 2015). Kanker kolorektal memiliki insiden, morbiditas dan mortalitas yang tinggi. Pembedahan sebagai terapi kuratif terbaik dalam penanganan namun belum memberikan hasil klinis yang memuaskan karena tingginya kejadian rekurensi pasca pembedahan akibat adanya residu mikroskopis sel kanker. Kemoterapi adjuvan dikembangkan untuk menangani hal tersebut namun pemberiannya memberikan masalah

efek samping dan risiko toksisitas. Penentuan stadium, kondisi pasien, indikasi kemoterapi dan pemilihan regimen yang tepat perlu dilakukan (Sari, 2014).

II.1.1 Epidemiologi dan Etiologi

Faktor lingkungan dan pola makan mempengaruhi perkembangan kanker kolorektal. Selain faktor lingkungan, kanker kolorektal berkembang lebih sering pada keluarga tertentu, dan kecenderungan genetik untuk kanker ini sudah diketahui. Insiden kanker kolorektal pada pria sekitar 1,5 kali lebih besar daripada yang diamati pada wanita. Secara keseluruhan, kanker usus besar dan dubur membentuk sekitar 12% dari semua diagnosis kanker pada pria dan wanita di Amerika Serikat. Usia rata-rata saat diagnosis adalah 68 tahun dengan sangat sedikit kasus yang terjadi pada individu yang berusia kurang dari 45 tahun. Usia tampaknya menjadi faktor risiko terbesar untuk pengembangan kanker kolorektal dengan 70% kasus didiagnosis pada orang dewasa yang berusia lebih dari 65 tahun. Meskipun masih menjadi penyebab utama kedua kematian akibat kanker, angka kematian untuk kanker kolorektal telah menurun selama 30 tahun terakhir sebagai akibat dari modalitas skrining yang lebih baik, dan semakin banyak digunakan, dan perawatan yang lebih efektif (Siegel R. dkk., 2014).

Di Indonesia sudah banyak data mengenai angka kejadian kanker kolorektal. Menurut Profil Kesehatan Indonesia tahun 2008, di Indonesia kanker kolorektal berada pada peringkat 9 dari 10 peringkat utama penyakit kanker pasien rawat inap di seluruh rumah sakit di Indonesia dengan jumlah kasus sebanyak 1.810 dengan proporsi sebesar 4,92%. Data Rumah Sakit Kanker Dharmais tahun 2010, kanker kolorektal masuk dalam 10 besar kanker yang banyak dialami di mana kanker rektum menempati urutan keenam dan kanker kolon menempati urutan kedelapan (Tatuhey dkk., 2014).

II.1.2 Faktor risiko dan pencegahan kanker kolon

Perkembangan KKR merupakan interaksi antara faktor lingkungan dan faktor genetik. Faktor yang tidak dapat dimodifikasi adalah riwayat KKR atau polip adenoma individual dan keluarga, dan riwayat individual penyakit kronis inflamatori pada usus. Faktor risiko yang dapat dimodifikasi yaitu inaktivitas, obesitas, konsumsi tinggi daging merah, merokok dan konsumsi alkohol moderat-sering. Sementara aktivitas fisik diet berserat dan asupan vitamin D termasuk dalam faktor protektif.

Pencegahan kanker kolorektal dapat dimulai dari fasilitas kesehatan layanan primer melalui program KIE di populasi atau masyarakat dengan menghindari faktor-faktor risiko kanker kolorektal yang dapat di modifikasi dan dengan melakukan skrining atau deteksi dini pada populasi, terutama pada kelompok risiko tinggi.

II.1.3 Patofisiologi

Kanker kolon dan rektum (95%) adenokarsinoma (muncul dari lapisan epitel usus). Dimulai sebagai polip jinak yang dapat menjadi ganas dan menyusup serta merusak jaringan normal dan meluas kedalam struktur sekitarnya. Sel kanker dapat terlepas dari tumor primer dan menyebar kebagian tubuh yang lain yaitu yang paling sering ke hati (Japaries, 2013). Pertumbuhan kanker menghasilkan efek sekunder, meliputi penyumbatan lumen usus dengan obstruksi dan ulserasi pada dinding usus serta perdarahan. Penetrasi kanker dapat menyebabkan perforasi dan abses, serta timbulnya metastase pada jaringan lain. Prognosis relatif baik jika lesi terbatas pada mukosa dan submukosa pada saat reseksi dilakukan, dan jauh lebih jelek ketika telah terjadi metastase ke kelenjar limfe (Japaries, 2013).

II.1.4 Obat Penyakit Kanker Kolon

Panitumumab, regorafenib, BIBF 1120, cediranib panitumumab, regorafenib, BIBF 1120, dan cediranib merupakan obat penyakit kanker kolon yang belum tersedia di Indonesia. Panitumumab yaitu antibodi monoklonal murni dari manusia. Mekanisme kerjanya sama dengan cetuximab. Kedua antibodi monoklonal ini diindikasi pada pasien metastasis kanker kolorektal dengan KRAS dan NRAS *wild type*. Bila kedua RAS tersebut jenisnya *wild type*, perlu dipertimbangkan pemeriksaan BRAF (MENKES, 2018).

Regorafenib adalah obat dengan target ganda terhadap VEGFR2-TIE2 tyrosine kinase inhibitor, yang meliputi reseptor VEGF, reseptor *fibroblast growth factor* (FGF), reseptor *platelet derived growth factor* (PDGF), BRAF, KIT dan RET yang melibatkan berbagai proses termasuk pertumbuhan tumor dan angiogenesis. Uji klinik regorafenib menunjukkan perbaikan terhadap ketahanan hidup bebas gejala buruk dan keseluruhan sebagai terapi lini ketiga atau terakhir pada pasien yang mengalami gejala buruk dengan terapi standar. BIBF 1120 adalah suatu tyrosine kinase inhibitor pada VEGFR, PDGF dan FGF, yang menunjukkan komperatif antara keberhasilan dan toksisitas dalam

kombinasi dengan FOLFOX dibandingkan FOLFOX+bevacizumab pada lini pertama (MENKES, 2018). Cediranib adalah tyrosine kinase inhibitor VEGFR, yang terbukti lebih baik dalam percobaan fase ketiga dengan FOLFOX di lini pertama dibandingkan hasilnya dengan FOLFOX/bevacizumab, kualitas hidup lebih baik dengan bevacizumab (MENKES, 2018).

II.2. Peran Protein Kinase B / AKT dalam pertumbuhan kanker kolon

Protein kinase B atau AKT terbagi kedalam tiga bagian diantaranya AKT1 memiliki distribusi jaringan yang luas dan terlibat dalam pertumbuhan sel dan kelangsungan hidup (Cho dkk., 2001). Sedangkan AKT2 sangat diekspresikan dalam otot dan adiposit dan berkontribusi terhadap regulasi homeostasis glukosa yang dimediasi insulin (Garofalo dkk., 2003). Distribusi AKT3 lebih terbatas dengan ekspresi terutama ditemukan di testis dan otak (Yang dkk., 2003).

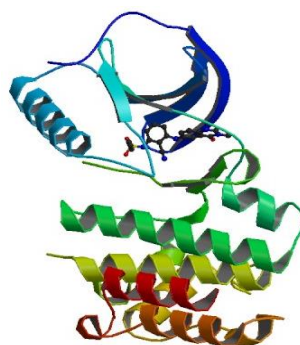
Aktivasi AKT berlebih dapat mempengaruhi banyak efektor hilir dan memediasi beberapa jalur yang mendukung tumorigenesis (seperti kelangsungan hidup sel, pertumbuhan sel dan proliferasi sel) dan dengan demikian merupakan salah satu protein kinase yang paling sering terhambat dalam kanker manusia (Altomare & Testa, 2005). Hampir semua faktor pertumbuhan onkogenik diketahui, faktor angiogenik dan sitokin mengaktifkan AKT karena semua elemen utama dari jalur telah ditemukan bermutasi atau diperkuat dalam berbagai kanker (Yuan & Cantley, 2008).

II.3. Inhibitor protein kinase B-Raf

B-RAF onkogenik, yang mendorong transformasi dan proliferasi sel, telah terdeteksi pada sekitar 50% melanoma ganas manusia dan 5-15% kanker kolorektal (KKR). Meskipun aktivitas klinis luar biasa yang dicapai oleh vemurafenib dan dabrafenib dalam mengobati melanoma metastasis B-RAFV600E, kemanjuran klinis mereka dalam B-RAFV600E CRC jauh lebih berhasil. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa aktivasi umpan balik dari pensinyalan EGFR dan MAPK pada penghambatan B-RAF mungkin berkontribusi pada relatif tidak responsifnya CRC pada inhibitor B-RAF generasi pertama. Karakterisasi inhibitor RAF kinase / EGFR ganda, BGB-283, yang saat ini sedang diselidiki secara klinis. Secara *in vitro*, BGB-283 berpotensi menghambat fosforilasi ERK yang diaktifkan B-RAFV600E dan proliferasi sel. Itu menunjukkan sitotoksitas selektif dan secara istimewa menghambat proliferasi sel kanker yang

mengandung B-RAFV600E dan mutasi / amplifikasi EGFR. Dalam garis sel B-RAFV600E CRC, BGB-283 secara efektif menghambat reaktivasi proliferasi sel yang dimediasi EGFR dan EGFR. Secara *in vivo*, pengobatan BGB-283 mengarah pada penghambatan pertumbuhan tumor yang bergantung pada dosis disertai dengan regresi tumor parsial dan lengkap baik dalam *xenograft* tumor turunan sel maupun primer kolorektal manusia yang mengandung mutasi B-RAFV600E. Temuan ini mendukung BGB-283 sebagai kandidat obat antitumor yang kuat dengan potensi klinis untuk mengobati KKR yang mengandung mutasi B-RAFV600E.

Protein Data Bank (PDB) merupakan basis data untuk data struktur tiga dimensi dari molekul biologis berukuran besar, seperti protein dan asam nukleat. Data tersebut, biasanya diperoleh dari kristalografi sinar-X, spektroskopi NMR, atau, yang terbaru melalui mikroskopi elektron kriogenik, kemudian diunggah oleh para ahli biologi dan biokimiawan dari seluruh dunia, dapat diakses secara bebas di internet melalui situs web organisasi anggotanya (PDBe, PDBj, dan RCSB). PDB diawasi oleh suatu organisasi yang disebut dengan Worldwide Protein Data Bank, wwPDB. PDB merupakan basis data yang sangat penting dalam bidang biologi struktur, seperti genomika struktur. Beberapa jurnal ilmiah utama, dan beberapa agensi pendanaan mengharuskan ilmuwan untuk menyerahkan data struktur hasil penelitian mereka pada PDB. Banyak basis data lainnya yang menggunakan struktur protein yang tersimpan di PDB. Misalnya, SCOP dan CATH dengan mengelompokkan struktur protein, sementara PDBsum menyediakan ikhtisar grafis dari entri PDB menggunakan informasi dari sumber lain, seperti ontologi gen (Berman, 2008).



Gambar II.1 Struktur Protein Serine/Threonine-Protein Kinase B-Raf (5ITA)

(Karoulia dkk., 2016)

- **Method** : X-RAY DIFFRACTION
- **Resolution** : 1,95 Å

- **R-Value Free** : 0,244
- **R-Value Work** : 0,195
- **Ligan Alami** : 6DC (C₁₉H₁₉N₅O₃S)
- **Released** : 2016-08-10

II.4 Virtual screening

Virtual screening adalah metode komputasi yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa obat baru menggunakan pustaka senyawa kimia yang luas dan beragam sebagai referensi. Metode komputasi ini adalah alat penting untuk menemukan senyawa obat baru karena lebih cepat, lebih hemat biaya, dan kurang sumber daya intensif dibandingkan dengan metode eksperimental seperti penyaringan *throughput* tinggi (Walters dkk., 1998; Shoichet, 2004; Kitchen dkk., 2004; Schneider dan Bohm, 2002). Proses *virtual screening* terdiri dari dua langkah: *docking* dan *scoring*. *AutoDock* (Morris dkk., 1998; Huey dkk., 2007) melakukan pencarian konformasi ligan untuk mengidentifikasi konformasi ikatan potensial, dan *X-Score* (Wang dkk., 2002) digunakan dalam mengevaluasi kembali afinitas pengikatan prediksi struktur. Senyawa timbal baru dalam banyak penyelidikan telah berhasil diidentifikasi menggunakan *Autodock* dan skor-X yang tersedia secara bebas.

Virtual screening bagian dari kimia komputasi (*in silico*). Kimia komputasi merupakan cabang kimia dengan menggunakan hasil kimia teori yang diterjemahkan ke dalam program komputer untuk menghitung sifat-sifat molekul dan perubahannya maupun melakukan simulasi terhadap sistem-sistem besar (makromolekul seperti protein atau sistem banyak molekul seperti gas, cairan, padatan, dan kristal cair), dan program tersebut diterapkan pada sistem kimia nyata (Intan, 2011). Kimia komputasi dikatakan sebagai ilmu yang menjembatani antara kimia teori dengan kimia eksperimen karena kimia komputasi ini memiliki kelebihan tersendiri dibandingkan dengan kimia eksperimen. Kelebihan kimia komputasi dibandingkan kimia eksperimen yaitu untuk menghemat bahan kimia yang digunakan. Kimia komputasi dapat menghasilkan informasi yang tidak dapat diterangkan secara eksperimen. Salah satu contohnya adalah penentuan keadaan transisi (keadaan antara) suatu reaksi (Rep, 2013). Dalam perkembangannya, kimia komputasi dapat memecahkan masalah-masalah yang tidak bisa diselesaikan dengan eksperimen. Kimia komputasi digunakan untuk menjelaskan beragam sistem kimia dengan kompleksitas yang sangat luas (Pranowo, 2002).

Virtual screening digunakan untuk menggambarkan proses analisis komputasi dari kumpulan senyawa besar untuk memprioritaskan senyawa yang disintesis atau untuk pengujian (Vyas dkk., 2008). Pada basis *virtual screening* adapun jenis-jenis dari *virtual screening* yaitu basis *structure based virtual screening* dan *ligand based virtual screening*.

1. *Ligand-based virtual screening*

Ligand based merupakan suatu metode komputasi yang menggambarkan interaksi antara suatu molekul sebagai ligan dengan suatu reseptor atau protein. Reseptor atau target pada proses *docking* dapat diperoleh dari hasil eksperimen seperti NMR dan kristalografi sinar X ataupun homologi modeling. Tujuan dari studi *docking* adalah membuat pemodelan struktur yang akurat dan prediksi aktivitas yang tepat (Reddy dkk., 2007).

2. *Structure-based virtual screening*

Structure based merupakan prediksi ikatan pada protein target dengan menggunakan metode komputasi, struktur tiga dimensi target yang telah diketahui. Metode *virtual screening* ini digunakan untuk mengevaluasi secara otomatis jutaan senyawa oleh program komputer. Ada berbagai aplikasi yang bisa diterapkan untuk mendapatkan struktur baru dari database komersial dalam penemuan obat awal, untuk mencari basis data kombinatorial virtual untuk struktur yang dapat disintesis dalam fase optimalisasi pengembangan obat, atau untuk memprediksi aktivitas biologis baru atau efek samping untuk obat-obatan. Menggunakan *virtual screening* sebelum skrining laboratorium basah telah terbukti memberikan pengayaan molekul aktif lebih tinggi dari pada melakukan *screening high-throughput (HTS)* (Reddy dkk., 2007).

II.4.1 Active set compound

Pada pembuatan Dataset untuk senyawa aktif diambil dari ChEMBL, dimana database dengan data bioaktivitas terbesar di dunia, sebagian besar diekstraksi secara manual dari literatur kimia kedokteran (Papadatos, 2014). Kode senyawa ChEMBL yang digunakan dari senyawa aktif set adalah CHEMBL5145. Dari kode senyawa CHEMBL5145 yang dipilih, menunjukkan senyawa yang memiliki aktivitas yang sudah terbukti aktif dapat menghambat protein kinase B-Raf dan dipilih 50 senyawa aktif yang dilihat dari nilai IC_{50} dan memiliki aktivitas yang baik dengan rentang 0 – 100.000 nM. Keterangan aktifitas dapat dilihat dari dokumen CHEMBL5145 yang diunduh dalam format *.xlsx agar dapat dibaca melalui Microsoft Office Excel pada kolom *Activity_Comment*.

II.4.2 Decoy Set Compound

Dataset senyawa decoy dibuat dengan *software* DecoyFinder dan dibuat perbandingan senyawa yang tidak aktif dari ZINC *Subset Clean Drug-Like* terhadap 50 senyawa aktif yang telah dibuat.

II.4.3 Docking

Docking merupakan suatu proses yang menyatukan dan mengikat kedua struktur molekul. *Docking* telah diakui dengan perhatian yang signifikan di antara semua metode penapisan virtual. *Docking* telah menjadi pilihan yang mampu untuk pemodelan struktur 3 dimensi dari kompleks reseptor-ligan dan mengevaluasi stabilitas kompleks yang menentukan pengakuan biologis spesifik. Masalah *docking* dapat dibagi menjadi dua langkah pertama, menjelajahi ruang konformasi ligan yang berikatan dengan molekul target dan mencetak set, yaitu mengklasifikasikannya sesuai dengan afinitas pengikatan yang diperkirakan. Itu adalah konformasi ligan yang biasanya dihasilkan, dan dengan bantuan fungsi penilaian dibandingkan dengan konformasi sebelumnya. Konformasi saat ini kemudian diterima atau ditolak berdasarkan skor untuk konfigurasi masing-masing. Kemudian lagi konformasi baru dihasilkan, dan proses pencarian beralih ke titik akhir. Dengan demikian, pencarian dan penilaian dapat digabungkan secara erat dalam *docking*. Dan penting untuk memiliki fungsi penilaian yang lebih baik sehingga konformasi urutan tertinggi akan memiliki afinitas pengikatan eksperimental yang lebih tinggi dengan reseptor. Istilah "perpustakaan" dan "kemiripan obat", untuk senyawa juga terkait, sehingga dapat melakukan perbandingan dengan subset senyawa kimia dengan menghilangkan senyawa aktif dan toksik yang lebih rendah berdasarkan pada serangkaian karakter yang tidak diinginkan (Kitchen dkk., 2011).

Pada metode *docking* berdimensi tinggi secara efektif dan menggunakan fungsi skrining yang tepat untuk menyusun kandidat senyawa. *Docking* dapat digunakan untuk melakukan *virtual screening* pada pustaka besar senyawa, memberi peringkat hasil, dan mengusulkan hipotesis struktural tentang yang ligan menghambat target (Yanuar, 2012).

II.4.4 Validasi Virtual Screening

Validasi yang dilakukan pada *virtual screening* berbasis farmakofor dapat dilihat dari parameter *Enrichment Factor* (EF), Sensitivitas (Se), Spesifitas (Sp), Akurasi (ACC), Hasil akhir (Ya), dan *Goodness of Hit-list* (GH) (Braga dkk., 2013).

Pada tahap ini, beragam senyawa dengan struktur berbeda-beda yang memiliki aktivitas biologi dinilai/ditentukan oleh struktur yang dapat dipelajari dengan optimasi kimia medisinal dengan mengikuti tahap desain obat. Digunakan untuk pengembangan senyawa pemandu, gugus farmakofor yang baik harus dapat menggambarkan banyak aktivitas biologi dari hasil perbandingan dengan database macam-macam molekul yang memungkinkan dan dipilih juga senyawa yang terbukti tidak aktif. Berbagai referensi telah menyebutkan bahwa validasi *pharmacophore modeling* ditentukan dengan kuantifikasi rasio perbandingan dari senyawa aktif terhadap senyawa inaktif dari database yang telah dibuat (Langer, 2016).

Parameter-parameter yang berlaku pada tahap validasi:

1. Faktor Pengayaan (EF)

Faktor Pengayaan (EF), cara yang paling sering digunakan dan paling sederhana untuk menghitung adalah pengayaan pada persentase tertentu dari database yang disaring. Kerugian dari EF adalah ketergantungannya yang tinggi pada rasio senyawa aktif dari database yang disaring. Penghalang ini membuat metrik tersebut tidak cocok untuk menjadi perbandingan langsung untuk uji dan menjalankannya didasarkan pada set rasio yang berbeda antara senyawa aktif dan senyawa tidak aktif. Untuk menghindari ini, perbandingannya harus memperhitungkan persentase yang sama dari database yang disaring. Pada *LigandScout* 4.0 nilai EF secara otomatis yang dapat langsung dilihat pada kurva ROC. Nilai EF yang dikatakan valid dan memenuhi syarat ialah $EF > 1.0$ (Braga, 2013).

$$EFx\% = \frac{\text{Hits}\% \text{selected} / \text{N}\% \text{selected}}{\text{Hits total} / \text{N total}}$$

2. Akurasi (ACC)

Akurasi adalah menggambarkan persentase molekul yang diklasifikasikan dengan benar. Hal ini didefinisikan sebagai rasio dari senyawa yang diambil benar positif atau *true positive* (TP) untuk semua senyawa aktif dalam database, yang merupakan jumlah dari TP dan jumlah senyawa negatif palsu atau *false negative* (FN). Nilai sensitivitas dapat berkisar dari 0 ke 1, di mana $Se = 0$ berarti bahwa pencarian tidak menemukan salah satu aktif dalam database dan $Se = 1$ berarti bahwa pencarian kembali semua senyawa aktif.

$$ACC = \frac{TP + TN}{P + N}$$

3. Spesifitas (Sp)

Spesifitas adalah ukuran untuk fraksi dari senyawa yang benar-benar tidak aktif ditolak dengan benar pada saat *virtual screening*. Maka, didefinisikan sebagai jumlah yang ditolak senyawa negatif (TN) dibagi dengan jumlah TN dan jumlah senyawa positif palsu yang didapat (FP), diringkas sebagai proporsi yang diklasifikasikan dengan benar pengamatan negatif. Kekhususan berkisar dari 0 hingga 1 dan menunjukkan persentase senyawa yang benar-benar tidak aktif. Oleh karena itu, $Sp = 0$ menentukan skenario terburuk di mana semua *inactives* dipilih oleh kesalahan sebagai aktif, sedangkan $Sp = 1$ berarti semua senyawa tidak aktif telah ditolak dengan benar selama proses penyaringan.

$$Sp = \frac{TN}{TN + FP}$$

4. Hasil Aktif (Ya)

Hasil aktif (Ya) adalah salah satu dari deskriptor paling populer untuk mengevaluasi metode *virtual screening*. Ukuran deskriptor tersebut yang menunjukkan jumlah senyawa aktif yang benar-benar diambil (TP) dalam kaitannya ke ukuran daftar hit- n.

$$Ya = \frac{Tp}{n}$$

5. Sensitifitas (Se)

Sensitivitas adalah suatu ukuran untuk persentase dari senyawa yang benar-benar aktif yang dipilih selama penyaringan. Maka ini didefinisikan sebagai rasio dari senyawa positif sejati yang diambil (TP) untuk semua senyawa aktif dalam database, yang merupakan jumlah TP dan jumlah senyawa negatif palsu (FN), dan dirangkum sebagai proporsi dengan benar klasifikasi pengamatan positif. Kepekaan nilai dapat berkisar dari 0 hingga 1, di mana $Se = 0$ berarti bahwa pencarian tidak menemukan salah satu aktif dalam database dan $Se = 1$ berarti bahwa pencarian kembali semua senyawa aktif.

$$Se = \frac{TP}{TP + FN}$$











6. Goodness of Hit-list (GH)

GH menggabungkan *sensitivitas*, *spesifitas*, dan hasil aktif karena itu merupakan tolak ukur yang dapat digunakan untuk evaluasi dari model farmakofor, karena menganggap kedua rasio aktif yang benar dan rasio *inactives* benar. Jumlah senyawa aktif biasanya berbobot lebih tinggi dari aktif di *hit-list*. Misalnya, Ya

dengan $3/4$ dan Se dengan hanya $1/4$. Dengan demikian, nilai yang tinggi dari GH hanya dapat dicapai dengan nilai tinggi aktif dan rendah rasio negatif palsu pada saat yang sama.

$$GH = \left(\frac{3}{4}Ya + \frac{1}{4}Se \right) \times Sp$$

Tabel II.1 Fitur-fitur farmakofor dalam *LigandScout 4.3*

No.	Ikon Fitur	Fitur Farmakofor
1.		<i>Hydrogen Bond Donor</i> (Ikatan Donor Hidrogen)
2.		<i>Hydrogen Bond Acceptor</i> (Ikatan Akseptor Hidrogen)
3.		<i>Positive Ionizable Area</i> (Area Ionisasi Positif)
4.		<i>Negative Ionizable Area</i> (Area Ionisasi Negatif)
5.		<i>Hydrophobic Interactions</i> (Interaksi Hidrofobik)
6.		<i>Aromatic Ring</i> (Cincin Aromatik)
7.		<i>Iron Binding Location</i> (Lokasi Ikatan Besi)
8.		<i>Zinc Binding Location</i> (Lokasi Ikatan Seng)
9.		<i>Magnesium Binding Location</i> (Lokasi Ikatan Magnesium)
10.		<i>Excluded Volume</i>

II.4.5 Database

Database uji merupakan kumpulan data yang telah diatur sedemikian rupa sehingga dapat digunakan untuk memudahkan penggunaannya untuk keperluan analisis. Database bisa diperoleh dari *ZINC Natural Product* yang dapat diakses pada zinc.docking.org (Irwin, dkk., 2012).