

**UJI IKATAN L YSEENIN DARI CAIRAN COELOMIC CACING TANAH
(*Lumbricus rubellus*) DENGAN K-RAS MUTAN SEBAGAI AGEN**

KOKEMOTERAPI 5-FU PADA KANKER KOLOREKTAL SECARA *IN SILICO*

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran



Oleh:

Aulia Fahira

NIM: 165070100111055

PROGRAM STUDI S1 KEDOKTERAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019

DAFTAR ISI

	Halaman
Judul.....	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan.....	iii
Kata Pengantar.....	iv
Abstrak.....	vii
<i>Abstract</i>	viii
Daftar Isi.....	ix
Daftar Tabel.....	xii
Daftar Gambar.....	xiii
Daftar Lampiran.....	xv
Daftar Singkatan.....	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.2.1 Rumusan Masalah Umum.....	4
1.2.2 Rumusan Masalah Khusus.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1 Tujuan Umum.....	5
1.3.2 Tujuan Khusus.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Manfaat Akademik.....	5



2.1.4 Manfaat Praktis.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Kanker Kolorektal.....	6
2.1.1 Definisi.....	6
2.1.2 Epidemiologi.....	6
2.1.3 Etiologi dan Patogenesis.....	7
2.1.4 Manifestasi Klinis.....	10
2.1.5 Klasifikasi Stadium.....	11
2.1.6 Terapi.....	12
2.1.6.1 Modalitas Terapi.....	12
2.1.6.2 5-Fluorourasil.....	15
2.2 Protein K-ras.....	17
2.2.1 Fungsi dan Struktur Protein K-ras.....	17
2.2.2 Mutasi pada Protein K-ras.....	20
2.3 <i>Lumbricus rubellus</i>	22
2.3.1 Cairan <i>Coelomic</i>	24
2.3.2 <i>Lysenin</i>	25
2.4 Studi <i>In silico</i>	26
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	30
3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....	30
3.2 Hipotesis Penelitian.....	32
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	33
4.1 Rancangan Penelitian.....	33
4.2 Populasi dan Sampel.....	33
4.3 Tempat dan Waktu Penelitian.....	33

4.4 Variabel Penelitian	34
4.4.1 Variabel Bebas.....	34
4.4.2 Variabel Tergantung	34
4.5 Definisi Operasional.....	34
4.6 Alat dan Bahan.....	35
4.6.1 Alat.....	35
4.6.2 Bahan <i>Docking Lysenin</i> – K-ras dan B-raf – K-ras.....	36
4.6.3 Bahan <i>Docking FdUMP</i> – <i>Thymidylate Synthase</i>	36
4.7 Prosedur Penelitian.....	36
4.7.1 <i>Docking Lysenin</i> – K-ras dan B-raf – K-ras	36
4.7.2 <i>Docking FdUMP</i> – <i>Thymidylate Synthase</i>	40
4.8 Analisis Data	42
4.9 Alur Penelitian	43
BAB 5 HASIL PENELITIAN	44
5.1 Hasil <i>Docking Lysenin</i> dengan K-ras Mutan.....	44
5.3 Hasil <i>Docking FdUMP</i> dengan <i>Thymidylate Synthase</i>	61
BAB 6 PEMBAHASAN	66
6.1 Ikatan <i>Lysenin</i> dengan K-ras Mutan.....	66
6.2 Ikatan FdUMP dengan <i>Thymidylate Synthase</i>	71
6.3 Implikasi Terhadap Bidang Kedokteran.....	73
6.4 Keterbatasan Penelitian.....	74
BAB 7 PENUTUP	75
7.1 Kesimpulan.....	75
7.2 Saran.....	75
DAFTAR PUSTAKA	76
LAMPIRAN	81

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

UJI IKATAN LYSENIN DARI CAIRAN COELOMIC CACING TANAH (*Lumbricus rubellus*)
DENGAN K-RAS MUTAN SEBAGAI AGEN KOKEMOTERAPI 5-FU
PADA KANKER KOLOREKTAL SECARA *IN SILICO*

Oleh:

Aulla Fahira

NIM: 165070100111055

Telah diuji pada

Hari : Senin

Tanggal: 25 November 2019

dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I

Wibi Riawan, S.Si, M.Biomed
NIP. 197701312005011001

Pembimbing-I/Penguji-II

Agustina Tri Enharti, S.Si, Ph.D
NIP. 196908191998022001

Pembimbing-II/Penguji-III

dr. Eviana Norahmawati, Sp.PA(K)
NIP. 196910281997022001



Mengetahui,
Ketua Program Studi Sarjana Kedokteran

dr. Tri Wahyu Astuti, M.Kes, Sp.P (K)
NIP. 196310221996012001

ABSTRAK

Fahira, Aulia. 2019. *Uji Ikatan Lyseinin dari Cairan Coelomic Cacing Tanah (Lumbricus rubellus) dengan K-ras Mutan Sebagai Agen Kokemoterapi 5-FU Pada Kanker Kolorektal Secara In Silico*. Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Agustina Tri Endharti, S.Si, Ph.D. (2) dr. Eviana Norahmawati, Sp. PA (K).

Kanker kolorektal di dunia menempati urutan ke-3 kanker paling sering pada pria dan paling sering ke-2 pada wanita. Mutasi pada protein K-ras merupakan peristiwa yang paling sering terjadi. Adanya mutasi menyebabkan protein ini tetap dalam keadaan aktif, sehingga transduksi sinyal proliferasi dapat terus terjadi. Obat kemoterapi utama untuk kanker kolorektal adalah 5-FU (5-fluorourasil) dengan metabolit aktif FdUMP (fluorodeoksiuridilat) yang menghambat kerja *thymidylate synthase*. 5-FU memiliki efek samping yang cukup berat, sehingga perlu dipertimbangkan terapi kombinasi dengan suatu agen kokemoterapi untuk membantu efektivitas pengobatan tanpa perlu meningkatkan dosis 5-FU, salah satunya adalah *lyseinin* yang merupakan protein bioaktif dalam cairan *coelomic* dari *Lumbricus rubellus*. Peran *lyseinin* sebagai anti-proliferasi perlu diketahui lebih lanjut secara molekuler. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui adanya interaksi antara K-ras sebagai target dengan *lyseinin* sebagai ligan, serta mengetahui interaksi molekuler FdUMP dengan targetnya yaitu *thymidylate synthase*. Penelitian ini merupakan studi eksperimental *in silico* melalui metode *docking* menggunakan program PatchDock, FireDock, dan PyRx, serta PyMOL dan LigPlot untuk visualisasi molekul, dengan mendapat struktur molekul dari PubChem dan PDB. Hasil *docking* menunjukkan bahwa terdapat ikatan antara *lyseinin* dan K-ras pada sisi pengikatan yang sama dengan ligan kontrol B-raf disertai nilai afinitas ikatan yang lebih stabil yaitu -25,06 kkal/mol dibandingkan dengan -11,80 kkal/mol, sehingga *lyseinin* memiliki potensi menghambat ikatan K-ras dengan B-raf yang penting untuk transduksi sinyal proliferasi. Selain itu, juga terbukti bahwa FdUMP dapat menghambat *thymidylate synthase*, kompleks ini memiliki afinitas ikatan -8,0 kkal/mol. Kesimpulannya, *lyseinin* mampu menjadi agen kokemoterapi 5-FU pada kanker kolorektal melalui ikatan dengan K-ras secara *in silico*. Mekanisme *lyseinin* yang berbeda dari 5-FU ini memiliki efek sinergisme kombinasi untuk terapi kanker kolorektal.

Kata Kunci: 5-FU, *in silico*, kanker kolorektal, K-ras, *Lumbricus rubellus*, *lyseinin*

ABSTRACT

Fahira, Aulia. 2019. ***In Silico Approach to Evaluate Interaction Between Lyсенin from Coelomic Fluid of Lumbricus rubellus and Mutant K-ras as Co-Chemotherapy Agent of 5-FU in Colorectal Cancer.*** Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, University of Brawijaya. Supervisors: (1) Agustina Tri Endharti, S.Si, Ph.D. (2) dr. Eviana Norahmawati, Sp. PA (K).

Colorectal cancer in the world ranks the third most common cancer in men and the second most frequent in women. Mutations in the K-ras protein are the most common events. Mutations cause these proteins to remain active, thus maintaining the signal transduction of cell proliferation. The main chemotherapy drug for colorectal cancer is 5-fluorouracil (5-FU) with its active metabolite FdUMP (fluorodeoxyuridylate) which inhibits thymidylate synthase. 5-FU has many side effects, therefore it is necessary to consider a combination therapy with natural co-chemotherapy agents, one of which is *lyсенin*, found in coelomic fluid from *Lumbricus rubellus*. The role of *lyсенin* as anti-proliferation needs to be further known. This research was conducted to determine the interaction between K-ras as a target and *lyсенin* as a ligand, this study was also to determine molecular interactions of FdUMP with its target, thymidylate synthase. This research is an *in silico* experimental study, molecular docking was done using PatchDock, FireDock, and PyRx programs, results were visualized and analyzed using PyMOL and LigPlot, while the molecular structures were obtained from PubChem and PDB databases. Results from molecular docking showed that there was a bond between *lyсенin* and K-ras on the same binding site as the B-raf control ligand with a more stable bond affinity value of -25.06 kcal/mol compared to -11.80 kcal/mol, which means *lyсенin* has the potential to inhibit K-ras to bind B-raf that is important for signal proliferation transduction. In addition, it has also been proven that FdUMP can inhibit thymidylate synthase which has a bond affinity of -8.0 kcal/mol. In conclusion, *lyсенin* was potential to be a co-chemotherapy agent through its binding with K-ras. The mechanism of *lyсенin* which is different from 5-FU was expected to have synergistic effect as a combination therapy of colorectal cancer.

Keywords: 5-FU, colorectal cancer, *in silico*, K-ras, *Lumbricus rubellus*, *lyсенin*

BAB 1**PENDAHULUAN****1.1 Latar Belakang**

Kanker kolorektal merupakan kondisi dimana terjadi pertumbuhan yang tidak terkontrol dari sel-sel penyusun usus besar. Kanker kolorektal di dunia menempati urutan ke-3 kanker paling sering pada pria dan paling sering ke-2 pada wanita, dengan 1,65 juta kasus baru dan hampir 835.000 kematian pada tahun 2015 (Fitzmaurice *et al*, 2017). Berdasarkan data GLOBOCAN, pada tahun 2018 diperkirakan terdapat 1.096.601 (6,1% kejadian dari seluruh kanker) kasus baru kanker kolon di dunia dengan jumlah kematian 551.269, serta kasus baru kanker rektum di dunia sebanyak 704.376 (3,9% kejadian dari seluruh kanker) dengan jumlah kematian 310.394 (Bray *et al*, 2018). Di Indonesia, tingkat kejadian kanker kolorektal adalah 19,1% untuk pria dan 15,6% untuk wanita (Ferlay *et al*, 2015). Telah dilaporkan bahwa angka kematian dan insiden kanker kolorektal meningkat pesat di Asia, yaitu pada sejumlah negara berkembang termasuk Indonesia (Favoriti *et al*, 2016).

Pada kanker terdapat gangguan kontrol normal pertumbuhan sel akibat perubahan genetik. Mutasi gen K-ras merupakan peristiwa yang paling sering terjadi, dapat ditemukan pada sekitar satu juta kasus kanker setiap tahun (Kumar *et al*, 2013; McCormick, 2016). Peristiwa mutasi ini banyak ditemukan pada kanker kolorektal, diketahui sekitar 50% dari kasus kanker kolorektal terdapat mutasi gen K-ras. Gen ini mengkode protein K-ras yang

bertindak sebagai penentu sinyal proliferasi sel (Liu *et al*, 2011). Protein K-ras berada dalam bentuk aktif saat berikatan dengan GTP (*guanosine triphosphate*) dan dalam bentuk tidak aktif saat mengikat GDP (*guanosine diphosphate*). K-ras yang aktif kemudian berikatan dengan protein efektor B-raf untuk dapat melanjutkan transduksi sinyal proliferasi (McCormick, 2016). Adanya mutasi pada protein K-ras menyebabkan terganggunya mekanisme inaktivasi protein tersebut. Akibatnya, protein ini tetap dalam keadaan aktif tanpa adanya rangsangan ekstraseluler, sehingga transduksi sinyal proliferasi dapat terus terjadi (Jancik *et al*, 2010).

Tatalaksana kanker kolorektal salah satunya dengan kemoterapi. Obat kemoterapi utama kanker kolorektal adalah 5-Fluorourasil (5-FU). Obat ini memiliki metabolit aktif yaitu fluorodeoksiuridilat (FdUMP) yang menghambat kerja enzim *thymidylate synthase*, membuat defisiensi timin yang diperlukan untuk sintesis DNA, akibatnya timbul ketidakseimbangan pertumbuhan dan menyebabkan kematian sel. Pengobatan kanker dengan kemoterapi tunggal seperti 5-FU memiliki efek samping yang berat dan sukar dihindari, seperti stomatitis, esofagofaringitis, leukopenia, trombositopenia, diare, anoreksia, hingga perdarahan gastrointestinal (Wolpin dan Mayer, 2009). Suatu pendekatan untuk mengatasi masalah ini adalah melalui terapi kombinasi dengan agen kokemoterapi. Agen kokemoterapi atau penunjang terapi kanker memungkinkan peningkatan efektivitas kemoterapi utama tanpa perlu meningkatkan dosis, sehingga mencegah terjadinya peningkatan efek samping dari obat kemoterapi. Terapi kombinasi juga memiliki keuntungan melalui penargetan jalur yang berbeda namun dapat bekerja sinergis,

melibatkan lebih dari satu jalur dalam pengobatan kanker sehingga terapi lebih efektif (Meiyanto *et al*, 2012).

Bahan alami diketahui mengandung molekul-molekul bioaktif yang berpotensi menjadi agen kokemoterapi. Telah dibuktikan bahwa perlakuan kombinasi 5-FU dengan bahan alami dapat meningkatkan apoptosis dan menghambat proliferasi pada sel kanker kolorektal (Redondo-Blanco *et al*, 2017). Salah satu bahan alami yang dilaporkan memiliki efek anti-kanker adalah cairan *coelomic* dari cacing tanah (*Lumbricus rubellus*). Cairan *coelomic* disekresikan sebagai bagian dari sistem kekebalan tubuh cacing tanah. Cairan ini terbukti dapat menghambat proliferasi pada sel kanker secara signifikan dan dilaporkan mengandung protein bioaktif yang memiliki efek anti-proliferasi (Augustine *et al*, 2018).

Penelitian terkini menunjukkan bahwa perlakuan kombinasi 5-FU dengan cairan *coelomic* dari *Lumbricus rubellus* dapat meningkatkan efek anti-proliferasi pada kanker kolorektal. Protein bioaktif dalam cairan *coelomic* cacing tanah yang dapat menghambat proliferasi sel kanker adalah *lysenin* (Permana *et al*, 2019). *Lysenin* disekresikan dalam bentuk tidak aktif, dan memiliki kemampuan untuk berikatan dengan *sphingomyelin* sebelum masuk ke dalam membran sel eukariotik (Bokori-Brown *et al*, 2016). Peran *lysenin* sebagai anti-proliferasi perlu diketahui lebih lanjut secara molekuler. Oleh karena penentu sinyal proliferasi adalah protein K-ras yang sering mengalami mutasi dan berperan penting dalam patogenesis kanker kolorektal, pada penelitian ini diprediksi adanya interaksi antara K-ras sebagai target, dengan *lysenin* sebagai ligan secara *in silico*. Selain itu, obat kemoterapi 5-FU juga akan dibuktikan interaksi molekuler antara metabolit aktifnya yaitu FdUMP,

dengan targetnya yaitu *thymidylate synthase* secara *in silico*. Hal ini untuk membuktikan adanya mekanisme dan penargetan jalur yang berbeda dalam terapi kombinasi pada kanker namun dapat bekerja sinergis.

Penelitian *in silico* memiliki arti “dilakukan di dalam komputer”, yaitu penelitian molekuler untuk mempelajari interaksi yang terjadi pada kompleks molekul menggunakan program di komputer (Dudley *et al*, 2010). Interaksi pada kompleks molekul dapat diketahui dengan metode *molecular docking* atau pertambahan molekul, yaitu suatu teknik dalam studi *in silico* yang berguna sebagai langkah awal dalam penemuan obat. *Docking* dilakukan dengan mengikatkan ligan pada sisi aktif dari molekul target yang diketahui merupakan tempat berikatan dengan suatu ligan kontrol. Harapannya, ligan yang digunakan dapat berikatan pada sisi yang sama dengan ligan kontrol sehingga dapat dilakukan perbandingan nilai *binding affinity* untuk mengetahui potensi ikatan ligan pada target (Chaudhary dan Mishra, 2016).

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Rumusan Masalah Umum

Apakah *lysenin* dari cairan *coelomic* cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) mampu menjadi agen kokemoterapi 5-FU pada kanker kolorektal melalui ikatan dengan K-ras mutan secara *in silico*?

1.2.2 Rumusan Masalah Khusus

1. Apakah terdapat ikatan antara *lysenin* dari cairan *coelomic* cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dengan K-ras mutan secara *in silico*?
2. Apakah terdapat ikatan antara FdUMP sebagai metabolit aktif dari 5-FU dengan *thymidylate synthase* secara *in silico*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui kemampuan *lysenin* dari cairan *coelomic* cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) untuk menjadi agen kokemoterapi 5-FU pada kanker kolorektal melalui ikatan dengan K-ras mutan secara *in silico*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui adanya ikatan *lysenin* dari cairan *coelomic* cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dengan K-ras mutan secara *in silico*.
2. Mengetahui adanya ikatan FdUMP sebagai metabolit aktif dari 5-FU dengan *thymidylate synthase* secara *in silico*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

1. Meningkatkan pengetahuan mengenai *lysenin* dari cairan *coelomic* cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) yang memiliki efek anti-proliferasi.
2. Sebagai dasar penelitian selanjutnya mengenai kokemoterapi kanker kolorektal.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Memberikan informasi pada masyarakat mengenai *lysenin* dari cairan *coelomic* cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) yang berpotensi sebagai agen kokemoterapi kanker.
2. Sebagai referensi masyarakat untuk melakukan budidaya cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) yang memiliki potensi sebagai agen kokemoterapi kanker.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker Kolorektal

2.1.1 Definisi

Kanker adalah suatu penyakit akibat kelainan genetik yang menyebabkan sel-sel dapat tumbuh secara tidak normal dan bersifat merusak jaringan sekitarnya. Kanker dapat menyebabkan kematian terutama bila sudah memasuki stadium lanjut. Kanker kolorektal yaitu kanker yang dimulai dari kolon maupun rektum atau sering disebut sebagai usus besar (Kumar *et al*, 2013).

2.1.2 Epidemiologi

Kanker kolorektal di dunia menempati urutan ke-3 kanker paling sering pada pria dan paling sering ke-2 pada wanita, dengan 1,65 juta kasus baru dan hampir 835.000 kematian pada tahun 2015 (Fitzmaurice *et al*, 2017). Berdasarkan data GLOBOCAN, pada tahun 2018 diperkirakan terdapat 1.096.601 (6,1% kejadian dari seluruh kanker) kasus baru kanker kolon di dunia dengan jumlah kematian 551.269, serta kasus baru kanker rektum di dunia sebanyak 704.376 (3,9% kejadian dari seluruh kanker) dengan jumlah kematian 310.394 (Bray *et al*, 2018). Di Indonesia, tingkat kejadian kanker kolorektal adalah 19,1% untuk pria dan 15,6% untuk wanita (Ferlay *et al*, 2015). Insidensi kanker kolorektal memuncak pada usia 60 hingga 70 tahun, dan kurang dari 20% kasus terjadi sebelum usia 50 tahun. Kanker kolorektal terjadi sedikit lebih sering pada pria daripada wanita (Kumar *et al*, 2013).

Telah dilaporkan bahwa angka kematian dan insiden kanker kolorektal meningkat pesat di Asia, yaitu pada sejumlah negara berkembang termasuk Indonesia (Pourhoseingholi, 2012; Favoriti *et al*, 2016). Status sosioekonomi rendah yang banyak terdapat pada wilayah ini dikaitkan dengan peningkatan risiko kejadian kanker kolorektal. Faktor risiko yang dapat dimodifikasi seperti ketidakaktifan fisik, diet tidak sehat, merokok, dan obesitas dianggap bertanggung jawab untuk proporsi substansial (perkiraan sepertiga hingga setengah) dari status sosioekonomi rendah terhadap risiko kanker kolorektal (Doubeni *et al*, 2013).

2.1.3 Etiologi dan Patogenesis

Kanker kolorektal pada umumnya terjadi akibat kombinasi faktor predisposisi genetik dan faktor lingkungan. Risiko keturunan berkontribusi sekitar 20% dari kasus, sementara faktor lingkungan bertanggung jawab atas 80% kasus. Faktor-faktor tersebut termasuk diet rendah serat, diet tinggi lemak, konsumsi daging merah, konsumsi alkohol berat, dan merokok (Narayan *et al*, 2003; Campos *et al*, 2005). Faktor makanan yang paling erat kaitannya dengan peningkatan angka kejadian kanker kolorektal adalah rendahnya asupan serat nabati dan asupan tinggi karbohidrat dan lemak olahan. Baik faktor keturunan maupun faktor lingkungan dapat menyebabkan kelainan genetik sehingga terjadi kanker (Kumar *et al*, 2013).

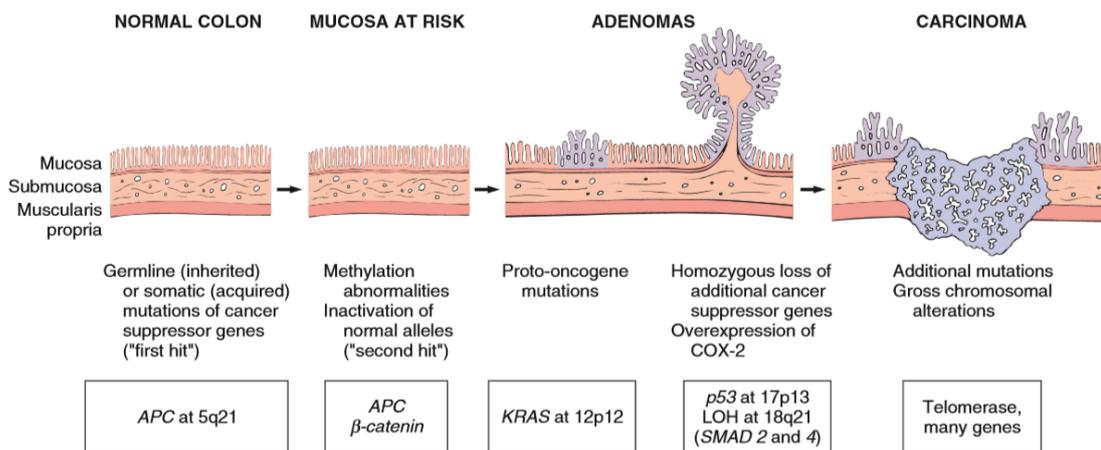
Terdapat berbagai jalur yang memicu berubahnya sel epitel normal hingga menjadi karsinoma kolorektal. Dalam proses ini sejumlah

perubahan genetik diamati, termasuk inaktivasi gen penekan tumor dan aktivasi onkogen spesifik, seperti adanya mutasi p53, *adenomatous polyposis coli* (APC), K-ras (Gonciarz, *et al* 2004). Pada intinya, kanker kolorektal merupakan hasil dari perubahan genetik yang menyebabkan hilangnya kontrol normal pertumbuhan sel maupun apoptosis (De Leon *et al*, 2000).

Kanker kolorektal terjadi akibat dari perubahan epitel kolon atau rektum yang normal menjadi abnormal. Tahap perubahan ini melalui dua proses yaitu pembentukan tumor yang belum mendesak jaringan sekitarnya atau dikenal dengan istilah adenoma dan tahap tumor yang mulai mendesak jaringan sekitarnya atau dikenal dengan istilah karsinoma. Perubahan genetika berperan penting dalam perubahan sel epitel ini, yang mana terjadi akibat salah satu dari dua jalur utama yaitu *Chromosomal Instability* (CIN) dan *Microsatellite Instability* (MIN) (Kumar *et al*, 2013).

Chromosomal instability yang dikaitkan dengan mutasi gen-gen tertentu yang berperan dalam proliferasi maupun apoptosis sel seperti APC, K-ras, dan p53, terjadi pada 80% kasus kanker kolorektal (Gambar 2.1). Jalur ini biasanya melibatkan mutasi gen penekan tumor APC di awal proses neoplastik. Gen APC harus dinonaktifkan secara fungsional agar adenoma berkembang. Kemudian diikuti oleh mutasi tambahan, termasuk mengaktifkan mutasi pada gen K-ras, yang memicu proliferasi sel. Mutasi K-ras terdapat pada kurang dari 10% dari adenoma dengan diameter kurang dari 1 cm, 50% dari adenoma dengan diameter lebih besar dari 1 cm, dan 50% dari kasus karsinoma

kolorektal. Perkembangan neoplastik juga dikaitkan dengan mutasi pada gen penekan tumor lainnya seperti SMAD2, SMAD4, dan p53. Hilangnya gen-gen ini memungkinkan pertumbuhan sel yang tidak terkendali (Kumar *et al*, 2013).



Gambar 2.1 Perubahan morfologis dan molekuler dalam karsinoma. Diawali dengan adanya mutasi APC hingga hilangnya seluruh alel normal APC, kemudian muncul mutasi lain yang melibatkan K-ras, SMAD2, dan SMAD4, dan p53, menyebabkan munculnya karsinoma.

Sementara *microsatellite instability* terjadi karena mutasi inaktivasi pada gen yang bertanggung jawab untuk memperbaiki kesalahan replikasi DNA seperti hMSH2, hMSH6, hMSH3 (Zhang *et al*, 2005). Terdapat juga gen lain yang terlibat dalam regulasi pertumbuhan sel, seperti reseptor TGF- β tipe II dan protein pro-apoptosis BAX. Karena TGF- β menghambat proliferasi sel epitel kolon, reseptor TGF- β tipe II mutan dapat berkontribusi pada pertumbuhan sel yang tidak terkontrol, sementara hilangnya BAX dapat meningkatkan kelangsungan hidup kelompok sel yang abnormal secara genetik (Kumar *et al*, 2013).



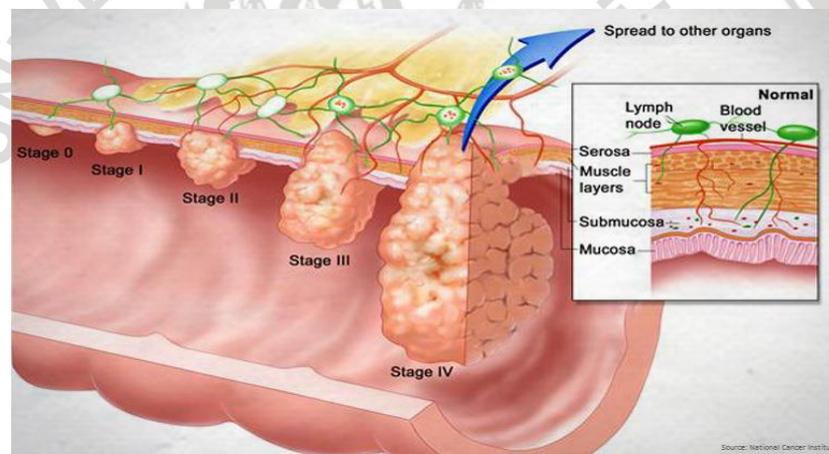
2.1.4 Manifestasi Klinis

Kanker kolorektal berkembang tanpa menimbulkan gejala yang berat sehingga dapat tidak terdeteksi untuk waktu yang lama. Pasien dengan kanker kolon sisi kanan paling sering terdapat keluhan merasa lelah dan lemah akibat anemia defisiensi besi. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa penyebab anemia defisiensi besi pada pria lansia atau pada wanita pasca-menopause adalah kanker gastrointestinal sampai terbukti sebaliknya. Sementara kanker kolorektal sisi kiri dapat menyebabkan perdarahan tersamar, perubahan kebiasaan buang air besar, atau kram pada kuadran kiri bawah (Kumar *et al*, 2013).

Terlihat diferensiasi yang buruk pada gambaran histologis dikaitkan dengan prognosis yang buruk, namun terdapat dua faktor prognostik yang paling penting yaitu kedalaman invasi dan ada atau tidak adanya metastasis kelenjar getah bening. Invasi ke dalam muscularis propria adalah tanda berkurangnya ketahanan hidup pasien secara signifikan, yang semakin berkurang apabila terdapat metastasis kelenjar getah bening. Terlepas dari stadium, beberapa pasien dengan sejumlah kecil metastasis, dapat bertahan hidup selama bertahun-tahun setelah reseksi nodul tumor metastasis tersebut. Namun hal ini sekali lagi bergantung pada heterogenitas klinis dan molekuler kanker kolorektal. Metastasis mungkin melibatkan kelenjar getah bening regional, paru-paru, dan tulang, tetapi karena adanya drainase portal, hati adalah organ yang paling umum untuk lesi metastasis kanker kolorektal (Kumar *et al*, 2013).

2.1.5 Klasifikasi Stadium Kanker Kolorektal

Begitu kanker terbentuk di lapisan dalam dari kolon, dapat tumbuh hingga ke dinding kolon atau rektum. Kanker yang telah tumbuh di dinding juga bisa menembus pembuluh darah atau pembuluh limfe. Sel-sel kanker biasanya menyebar pertama ke kelenjar limfe terdekat. Sel kanker juga dapat dibawa dalam pembuluh darah ke hati atau paru-paru, atau dapat menyebar ke rongga perut dan pelvis untuk tumbuh di organ atau jaringan lain. Penyebaran sel kanker ke bagian tubuh yang jauh disebut metastasis (De Leon *et al*, 2000).



Gambar 2.2 Stadium kanker kolorektal. Klasifikasi dapat dibagi menjadi 4 tahap yang mana penting dalam menentukan pilihan untuk pengobatan dan dalam menilai prognosis.

Penentuan stadium diperlukan untuk menentukan tindakan pengobatan. Pengobatan sangatlah tergantung dari lokasi, ukuran, stadium kanker, dan kesehatan umum pasien. Berikut adalah tingkat stadium kanker menurut National Cancer Institute, 2006:

1. Stadium 0 (Karsinoma in situ): kanker hanya pada lapisan terdalam dari kolon atau rektum.

2. Stadium I: sel kanker telah tumbuh pada dinding dalam kolon atau rektum, tapi belum menembus ke luar dinding.

3. Stadium II: sel kanker telah menyebar ke dalam lapisan otot dari kolon atau rektum. Tetapi sel kanker di sekitarnya belum menyebar ke kelenjar getah bening.

4. Stadium III: kanker telah menyebar ke satu atau lebih kelenjar getah bening di daerah tersebut, tetapi tidak ke bagian tubuh yang lain.

5. Stadium IV: kanker telah menyebar di bagian lain dari tubuh, seperti hati, paru-paru, atau tulang.

2.1.6 Terapi Kanker Kolorektal

2.1.6.1 Modalitas Terapi

Pengobatan kanker kolorektal dapat ditujukan sebagai kuratif atau paliatif. Keputusan rencana terapi tergantung pada berbagai faktor, termasuk kesehatan dan preferensi pasien, serta stadium tumor (Stein *et al*, 2011). Ketika kanker kolorektal diketahui lebih awal, operasi dapat bersifat kuratif. Namun, ketika terdeteksi pada tahap selanjutnya ketika sudah terdapat metastasis biasanya pengobatan diarahkan sebagai paliatif, untuk meredakan gejala yang disebabkan oleh tumor dan menjaga kualitas hidup pasien (Cunningham *et al*, 2010).

a. Intervensi bedah

Jika kanker ditemukan pada tahap yang sangat awal, tumor primer dapat dihilangkan melalui kolonoskopi, laparotomi, maupun laparoskopi. Jika terdapat sedikit tumor metastasis di hati atau paru-paru dapat dihilangkan juga melalui pembedahan. Terkadang kemoterapi digunakan sebelum operasi untuk mengecilkan ukuran tumor sebelum mencoba membedahnya.

b. Kemoterapi

Pada kanker kolon stadium I, tidak ada kemoterapi yang ditawarkan, dan pembedahan adalah pengobatan definitif. Peran kemoterapi pada kanker kolon stadium II masih diperdebatkan, sementara untuk stadium III dan stadium IV kemoterapi adalah pilihan utama. Jika kanker telah menyebar ke kelenjar getah bening atau organ jauh, seperti yang terjadi pada stadium III dan stadium IV, agen kemoterapi 5-Fluorourasil, capecitabine atau oxaliplatin dapat meningkatkan harapan hidup. Jika kanker metastasis luas atau tidak dapat dioperasi, maka pilihan pengobatan bersifat paliatif. Biasanya dalam kondisi ini, sejumlah obat kemoterapi yang berbeda dapat digunakan, seperti capecitabine, 5-Fluorourasil, irinotecan, dan oxaliplatin.

c. Terapi tertarget

Terapi tertarget dapat mengintervensi sinyal spesifik yang meregulasi sel tumor. Terapi ini bekerja dengan target berupa hormon, inhibitor sinyal transduksi, modulator ekspresi gen, maupun

pemicu apoptosis. Contoh dari terapi tertarget diantaranya

Bevacizumab, Cetuximab, Panitumumab, Regorafenib.

d. Terapi radiasi

Modalitas radioterapi hanya berlaku untuk kanker rektum,

sementara pada kanker kolon kurang efektif karena ketidakpekaan

kolon terhadap radiasi. Tujuan terapi radiasi yaitu mengurangi risiko

kekambuhan lokal, meningkatkan tingkat resektabilitas pada tumor

yang lokal jauh atau tidak resektabel, mengurangi jumlah sel tumor

yang viable sehingga mengurangi kemungkinan terjadinya

kontaminasi sel tumor dan penyebaran melalui aliran darah pada

saat operasi.

e. Terapi paliatif dan tindak lanjut

Keterlibatan terapi paliatif mungkin bermanfaat untuk

meningkatkan kualitas hidup baik pasien maupun keluarganya,

dengan mengurangi gejala, kecemasan dan mencegah masuk

rumah sakit (Higginson *et al*, 2010). Pasien kanker kolorektal yang

tidak dapat disembuhkan, perawatan paliatif dapat terdiri dari

prosedur yang meringankan gejala atau komplikasi dari kanker

tetapi tidak berusaha untuk menyembuhkan kanker yang mendasari

sehingga meningkatkan kualitas hidup. Pilihan operasi mungkin

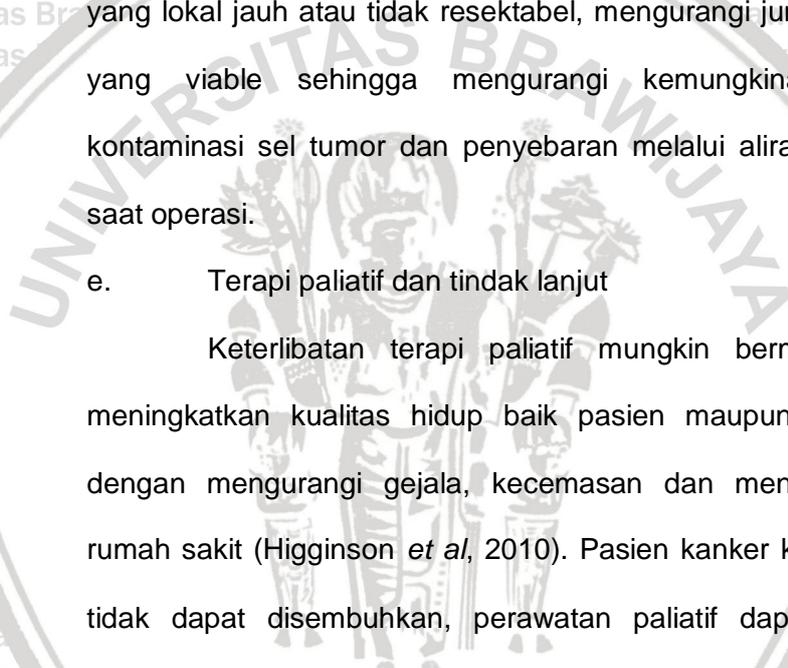
termasuk operasi pengangkatan non-kuratif dari beberapa jaringan

kanker. Prosedur-prosedur ini dapat dipertimbangkan untuk

memperbaiki gejala dan mengurangi komplikasi seperti perdarahan

dari tumor, nyeri perut dan obstruksi usus (Wasserberg *et al*, 2007).

Metode non-operasi pengobatan gejala termasuk terapi radiasi

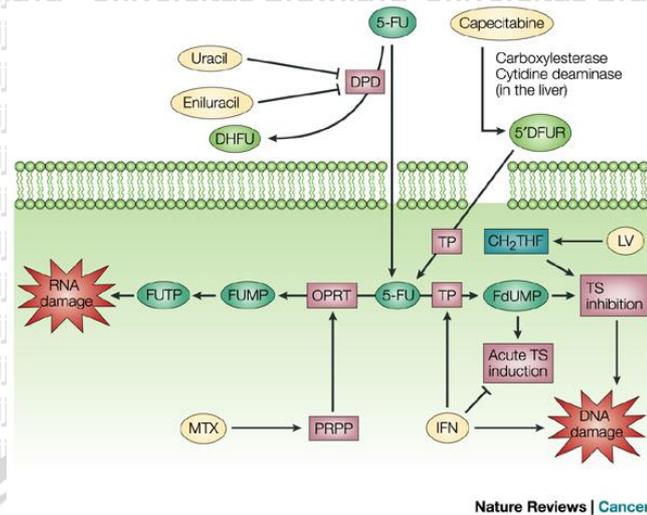


untuk mengurangi ukuran tumor serta obat anti-nyeri. Kemudian dilakukan tindak lanjut dengan tujuan dapat mendiagnosis setiap metastasis atau tumor yang berkembang di organ lain pada tahap sedini mungkin (Amersi *et al*, 2004).

2.1.6.2 5-Fluorourasil

5-Fluorourasil (5-FU) adalah agen kemoterapi utama yang digunakan untuk terapi kanker kolorektal. Metabolisme 5-FU menghasilkan fluoridin-5'-trifosfat (FUTP) yang bergabung ke dalam RNA dan mempengaruhi fungsinya, serta fluorodeoksiuridilat (FdUMP) yang menghambat replikasi DNA. FdUMP menghambat replikasi DNA melalui berikatan dengan *thymidylate synthase*.

Thymidylate synthase adalah enzim yang mengkatalisis konversi *deoxyuridine monophosphate* (dUMP) menjadi *deoxythymidine monophosphate* (dTMP) yang diperlukan untuk replikasi dan perbaikan DNA. FdUMP mampu berikatan dengan *thymidylate synthase* sehingga menghalangi tempat berikatan dari dUMP dan menghambat sintesis dTMP (Longley *et al*, 2007). Penurunan dTMP mengakibatkan penurunan *deoxythymidine triphosphate* (dTTP) yang memicu perubahan level berbagai deoksinukleotida (dATP, dGTP, dan dCTP). Adanya ketidakseimbangan dari deoksinukleotida menghasilkan gangguan berat pada penyembuhan dan sintesis DNA yang menyebabkan kerusakan DNA dan mengarah pada kematian sel (Chua *et al*, 2011).



Gambar 2.3 Metabolisme obat 5-FU. Metabolit aktif 5-FU yaitu FdUMP dapat merusak DNA sel dengan menghambat *thymidylate synthase*.

Pada kaitannya dengan daur sel, 5-FU tidak dapat bekerja pada sel yang berada di luar daur sel (G0). 5-FU hanya bekerja pada sel yang aktif menjalankan daur sel di mana diperlukan aktivitas *thymidylate synthase* untuk sintesis basa penyusun DNA. *Thymidylate synthase* diekspresikan tinggi pada fase G1. Perlakuan dengan 5-FU pada sel kanker dapat menyebabkan akumulasi sel pada fase G1 dan awal fase sintesis (*G1/S arrest*) (Liu *et al*, 2006).

Seperti obat kemoterapi yang lain, 5-FU tidak hanya menyerang sel kanker, tetapi juga sel normal, sehingga dapat terjadi efek samping yang berat dan sukar dihindari seperti stomatitis, esofagofaringitis, leukopenia, trombositopenia, diare, anoreksia, hingga perdarahan gastrointestinal (Wolpin dan Mayer, 2009). Peningkatan efektivitas 5-FU tanpa perlu meningkatkan dosis melalui terapi kombinasi dengan bahan alami merupakan jalan

penting untuk mengeksplorasi pengobatan kanker kolorektal. Terapi kombinasi memungkinkan penargetan jalur yang berbeda dalam kanker namun dapat bekerja simultan. Telah dilaporkan bahwa perlakuan kombinasi 5-FU dan bahan alami dapat meningkatkan sensitivitas sel kanker terhadap terapi melalui menghambat proliferasi dan meningkatkan kematian sel (Redondo-Blanco *et al*, 2017).

2.2 Protein K-ras

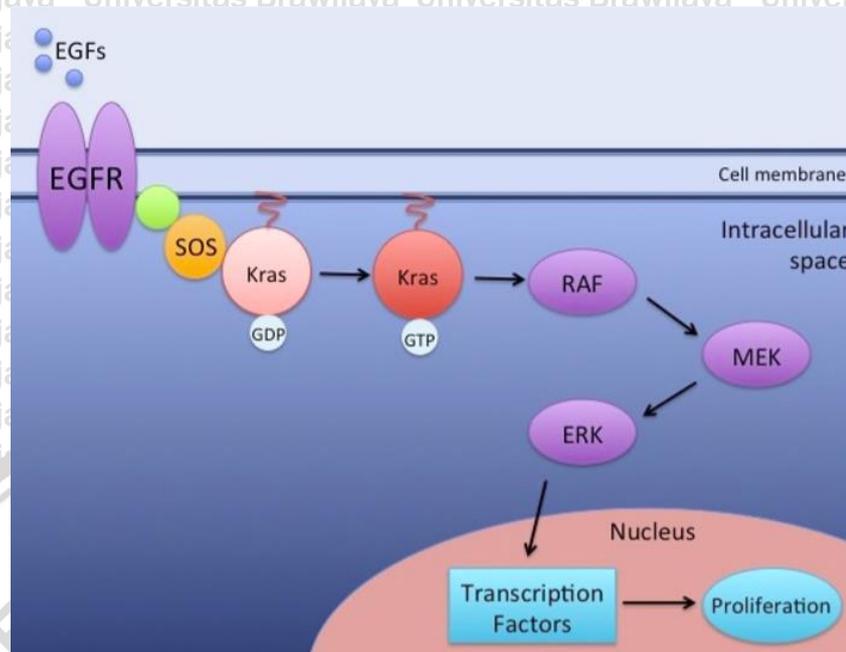
2.2.1 Fungsi dan Struktur Protein K-ras

Protein K-ras merupakan produk dari proto-onkogen K-ras, termasuk kelompok protein pengikat GTP yang dikenal sebagai RAS GTPase. Ekspresi K-ras sangat tinggi dalam sel manusia dan menjadi salah satu protein yang paling penting untuk dipelajari. K-ras berperan sebagai sakelar dari jalur transduksi sinyal, yang berarti dimulai atau diakhirinya transduksi sinyal bergantung pada protein ini dalam keadaan aktif atau tidak aktif (Kranenburg, 2005).

K-ras mengaktifkan beberapa efektor hilir untuk mengirimkan sinyal proliferasi sel dan kelangsungan hidup sel. Langkah pertama pengaktifan jalur ini terjadi ketika ligan *epidermal growth factor* (EGF) berikatan dengan reseptornya yaitu EGFR. Setelah mengikat ligan, reseptor mengalami dimerisasi dan terfosforilasi. Selanjutnya, kompleks protein dibentuk di dalam sel, dengan *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) menjadi melekat pada reseptor sementara terikat oleh RASGEF (RAS *guanine nucleotide exchange factor*). Kemudian protein ini, dengan masih melekat pada Grb2, mengikat K-ras juga untuk

aktivasi. RASGEF mampu menggantikan molekul *guanosine diphosphate* (GDP) dari K-ras dan dengan demikian memungkinkan molekul *guanosine triphosphate* (GTP) untuk mengikat dan mengaktifkannya. K-ras yang aktif kemudian mampu berinteraksi dengan RAF untuk aktivasi. Protein RAF yang telah teraktivasi kemudian berinteraksi dan mengaktifkan MEK, yang selanjutnya akan berinteraksi dan mengaktifkan ERK. ERK merupakan efektor hilir terakhir untuk mengirimkan sinyal proliferasi pada nukleus sel (Nandan *et al*, 2011).

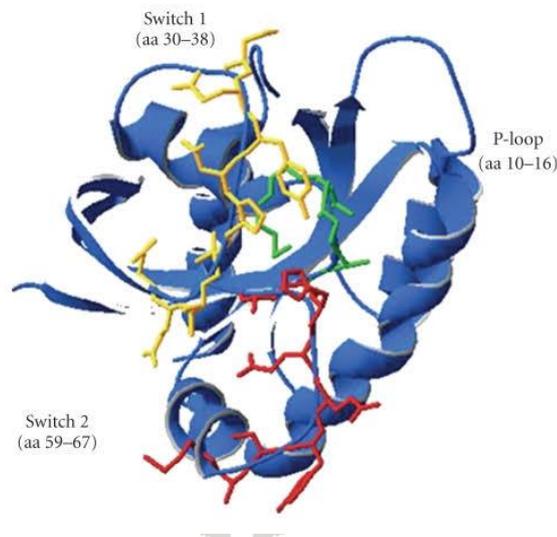
Bentuk aktif atau tidak aktif dari protein K-ras bergantung pada ikatannya dengan GTP dan GDP. Jika berikatan dengan GTP, K-ras menjadi dalam bentuk aktif dan pensinyalan K-ras dinyalakan yang membuat K-ras dapat berinteraksi dengan efektor pada jalur transduksi sinyal, yaitu RAF yang pada akhirnya menghasilkan produksi faktor transkripsi mengarah pada proliferasi sel (Gambar 2.4). K-ras memiliki kemampuan GTPase intrinsik untuk perlahan-lahan menghidrolisis GTP yang terikat menjadi GDP. Setelah pemecahan GTP dimana suatu fosfat dilepaskan, K-ras mengalami perubahan konformasi menjadi bentuk tidak aktif sehingga menghentikan interaksi dengan protein efektor, dan mematikan transduksi sinyal. Untuk menyalakan transduksi sinyal, GDP dilepaskan dari K-ras, dan GTP yang lebih berlimpah di sel akan terikat, membuat protein K-ras aktif kemudian berulang seperti sebuah siklus (Jancik *et al*, 2010).



Gambar 2.4 Transduksi Sinyal Proliferasi. Jalur ini merupakan kaskade transduksi sinyal untuk mengendalikan proliferasi sel yang aktivatornya adalah protein K-ras.

Terikatnya K-ras dengan GDP atau GTP ini dikendalikan oleh RAS *guanine nucleotide exchange factors* (RASGEF) yang bertugas mengaktivasi dan RAS *GTPase-activating protein* (RASGAP) yang menginaktivasi. RASGEF yang kemudian diberi nama Sos, berikatan dengan K-ras tidak aktif dan membuat pelepasan GDP yang saat ini terikat. Hasil dari lepasnya GDP ini adalah terikatnya GTP karena GTP berjumlah sepuluh kali lipat lebih tinggi dalam sitosol. K-ras memiliki aktivitas pemecahan GTP intrinsik sehingga menonaktifkan protein, namun aktivitas intrinsik saja tidak cukup untuk kontrol biologis. Kemudian ditemukan protein RASGAP, yang ternyata dapat berinteraksi dengan K-ras dan mempercepat laju pemecahan GTP hingga 300 kali lipat (Ihle, 2012).

K-ras terletak pada bagian permukaan sitosol dari membran plasma. Protein ini memiliki 188 asam amino dengan daerah asam amino yang penting untuk berikatan dengan efektor terletak pada P-loop (asam amino 10–16), Switch I (asam amino 30–38) dan Switch II (asam amino 59-67) (Gambar 2.5). Menghambat pada daerah tersebut dapat mengganggu interaksi protein K-ras dengan efekturnya yang merupakan suatu pendekatan untuk menghentikan sinyal proliferasi (Jancik *et al*, 2010).



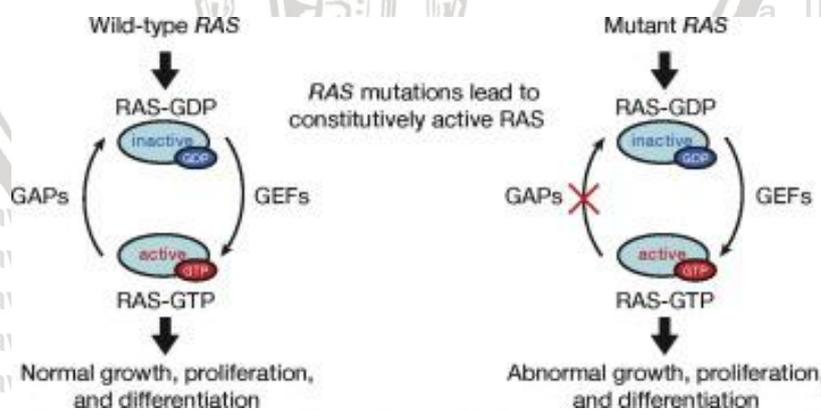
Gambar 2.5 Daerah asam amino pada protein K-ras. Daerah P-loop, Switch I, dan Switch II merupakan daerah yang berinteraksi dengan protein efektor untuk melanjutkan sinyal proliferasi.

2.2.2 Mutasi pada Protein K-ras

Mutasi gen K-ras merupakan peristiwa yang paling sering terjadi, dapat ditemukan pada sekitar satu juta kasus kanker setiap tahun. Peristiwa mutasi ini banyak ditemukan pada kanker kolorektal,

diketahui sekitar 50% dari kasus kanker kolorektal terdapat mutasi gen K-ras (Kumar *et al*, 2013; McCormick, 2016). Gen ini mengkode protein K-ras yang mengendalikan proliferasi sel. Adanya mutasi dapat merusak mekanisme inaktivasi protein K-ras menyebabkan protein ini terus-menerus dalam keadaan aktif tanpa adanya rangsangan ekstraseluler, sehingga mempertahankan transduksi sinyal proliferasi sel (Gambar 2.6) (Morcaldi *et al*, 2015).

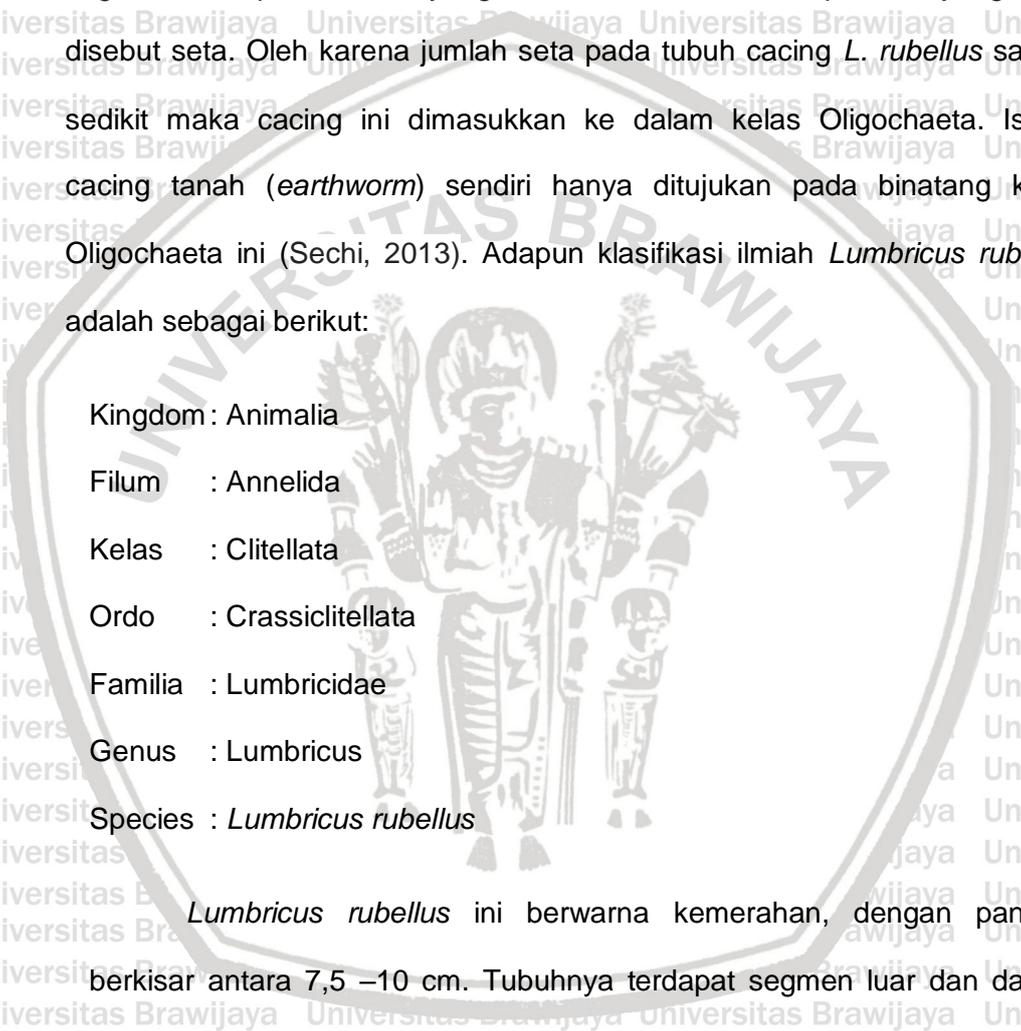
Sinyal proliferasi oleh K-ras dilanjutkan melalui B-raf, B-raf dalam keadaan tidak aktif dapat berikatan dengan protein K-ras untuk berubah menjadi bentuk aktif sehingga mampu mengaktifasi protein selanjutnya yaitu MEK. Protein B-raf memiliki daerah asam amino yang berikatan dengan K-ras, yaitu Ras Binding Domain (RBD) terletak pada asam amino 155-227. Ikatan RBD dengan daerah efektor K-ras aktif memberikan sinyal pada protein B-raf untuk aktivasi (Aramini *et al*, 2015).



Gambar 2.6 Perbedaan K-ras wild-type (normal) dan mutasi. Adanya mutasi pada K-ras dapat merusak mekanisme inaktivasi protein, sehingga mempertahankan protein K-ras dalam keadaan aktif secara terus-menerus.

2.3 *Lumbricus rubellus*

Cacing tanah *Lumbricus rubellus* tergolong dalam kelompok binatang avertebrata. Seluruh tubuhnya tersusun atas segmen-segmen yang berbentuk cincin sehingga digolongkan dalam filum Annelida. Di setiap segmen terdapat rambut yang keras dan berukuran pendek yang juga disebut seta. Oleh karena jumlah seta pada tubuh cacing *L. rubellus* sangat sedikit maka cacing ini dimasukkan ke dalam kelas Oligochaeta. Istilah cacing tanah (*earthworm*) sendiri hanya ditujukan pada binatang kelas Oligochaeta ini (Sechi, 2013). Adapun klasifikasi ilmiah *Lumbricus rubellus* adalah sebagai berikut:



Kingdom : Animalia
Filum : Annelida
Kelas : Clitellata
Ordo : Crassicitellata
Familia : Lumbricidae
Genus : Lumbricus
Species : *Lumbricus rubellus*

Lumbricus rubellus ini berwarna kemerahan, dengan panjang berkisar antara 7,5 –10 cm. Tubuhnya terdapat segmen luar dan dalam, berambut, tidak mempunyai kerangka luar, tubuhnya dilindungi oleh kutikula (kulit bagian luar). Jumlah segmen yang dimiliki sekitar 90-195 dan klitelum yang terletak pada segmen 27-32. Klitelum merupakan alat yang membantu perkembangan dan baru muncul saat cacing mencapai dewasa.

Lendir pada tubuhnya yang dihasilkan pada epidermis mempermudah pergerakannya. Pada setiap segmennya terdapat organ seta yang berupa

rambut yang relatif keras, berukuran pendek, dan memiliki daya lekat yang sangat kuat. Selain itu, terdapat pula prostomium yang merupakan organ saraf perasa dan berbentuk seperti bibir. Bagian akhir tubuhnya terdapat anus untuk mengeluarkan sisa-sisa makanan dan tanah yang dimakannya.

Tubuh cacing tanah dibagi dari sisi eksternal menjadi serangkaian segmen yang dipisahkan oleh alur. Dinding tubular tubuh terdiri dari lapisan eksternal otot melingkar dan lapisan internal otot longitudinal. Alur pada sisi internal dengan dinding melintang, atau septa, diisi dengan cairan *coelomic*, yang membagi ruang internal menjadi beberapa segmen. Pori-pori pada septa memungkinkan lewatnya cairan *coelomic* di dalam segmen-segmen. Kanal pencernaan, pembuluh darah, dan saraf berjalan di sepanjang rongga *coelomic* (Sechi, 2013).

Pengobatan dengan cacing (*worm therapy*) baru-baru ini telah dikembangkan. Terapi ini banyak digunakan di Cina, Rusia, dan Jepang terutama karena dapat membangun kembali keseimbangan sistem kekebalan tubuh (Endharti *et al*, 2017). Pada jaringan cacing tanah telah dilaporkan adanya glikolipoprotein yang terdiri dari berbagai makromolekul yang terbukti dapat menjadi sumber alternatif fibrinolitik, antikoagulatif, antimikroba, dan molekul antikanker (Cooper *et al*, 2004). Terlebih lagi, dikatakan bahwa cacing tanah dapat digunakan untuk mengobati bronkitis kronis, ulkus saluran pencernaan, parotitis, herpes zoster, urtikaria, luka bakar, batu kandung kemih, dll (Liu *et al*, 2004).

2.3.1 Cairan *Coelomic*

Cairan *coelomic* dihasilkan dari proses pertahanan cacing tanah, diproduksi oleh *coelomocytes* dalam cairan tubuh yang merupakan bagian dari sistem kekebalan tubuh cacing tanah.

Penelitian terdahulu telah menunjukkan bahwa cairan ini mengandung banyak protein bioaktif termasuk lektin, protease, peptida antibakteri, metalloenzyme, enzim fibrinolitik. Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa cairan *coelomic* memiliki peran penting berkaitan dengan mencegah pertumbuhan sel kanker yang merupakan konsep penelitian yang menarik. Penelitian terkini perlu dirancang untuk mengidentifikasi biomolekul yang dapat menghambat proliferasi sel kanker. Mengetahui efek anti-proliferatif ekstrak cacing tanah pada sel kanker dapat menjadi langkah awal menuju pengembangan obat dan terapi anti-kanker yang menjanjikan di masa depan. Penelitian terkini menunjukkan bahwa protein bioaktif pada cairan *coelomic* yaitu *lysenin* dapat menghambat pertumbuhan sel kanker (Augustine *et al*, 2018; Permana *et al*, 2019).

Cairan *coelomic* secara signifikan mampu menghambat proliferasi sel kanker serviks dan adenokarsinoma paru (Hua *et al*, 2011). Pemberian cairan *coelomic* dari *Eudrilus eugeniae* juga menunjukkan peningkatan kematian sel pada sel kanker paru dan sel kanker kolorektal (Jaabir *et al*, 2011). Telah dibuktikan juga bahwa pemberian cairan *coelomic* dengan atau tanpa kombinasi obat kemoterapi memiliki efek anti-proliferasi pada sel kanker kolon (Permana *et al*, 2018). Cairan *coelomic* dapat menjadi salah satu

strategi untuk meminimalkan dosis 5-FU sebagai terapi kombinasi.

Telah dibuktikan bahwa terapi kombinasi cairan *coelomic* dan 5-FU mampu meningkatkan efek anti-proliferasi pada kanker kolon (Permana *et al*, 2019).

2.3.2 *Lysein*

Lysein adalah suatu protein bioaktif dalam cairan *coelomic* yang merupakan bagian dari sistem kekebalan cacing tanah (*Lumbricus rubellus*). *Lysein* disekresikan sebagai monomer yang tidak aktif dan larut air, namun memiliki kemampuan untuk berikatan dengan *sphingomyelin* sebelum masuk ke dalam membran sel eukariotik (Bokori-Brown *et al*, 2016). Struktur molekul *lysein* yang terikat pada *sphingomyelin* menunjukkan bahwa pengikatan protein ini membutuhkan bagian lipid hidrofilik (kepala fosfokolin) dan hidrofobik (ekor rantai asil). *Lysein* berinteraksi dengan membran melalui dua tahap. Pertama, daerah asam amino yang bermuatan positif menarik protein ke permukaan membran dan memungkinkan pengikatan awal melalui ikatan hidrogen dan interaksi jembatan garam. Kedua, dua residu tirosin (Y24 dan Y26) mengikat rantai asil *sphingomyelin*. Pengikatan *sphingomyelin* memfasilitasi *lysein* untuk membuat struktur oligomer yang mengarah pada penyisipan ke dalam membran (Kulma *et al*, 2019).

Lysein terdiri dari 297 asam amino dengan daerah penting untuk pengikatan dengan membran sel eukariotik yaitu pada asam amino Glu10 – Ser33 dan Pro108 – Ile156. *Lysein* mampu berikatan spesifik dengan *sphingomyelin*, merupakan *sphingolipid* terbesar

pada membran sel eukariotik. Setelah pengikatan *sphingomyelin* di permukaan membran, *lysenin* mengalami perubahan signifikan pada strukturnya yang membuat protein ini dapat masuk melalui membran sel (Bokori-Brown *et al.*, 2016). *Lysenin* merupakan molekul bioaktif dalam cairan *coelomic* yang telah banyak dibuktikan memiliki efek anti-kanker. *Lysenin* pada cairan tersebut diketahui dapat menghambat pertumbuhan sel kanker, dan peran protein ini sebagai anti-proliferasi perlu diketahui secara molekuler (Permana *et al.*, 2019).

2.4 Studi *In silico*

In silico memiliki arti "dilakukan di komputer atau melalui simulasi komputer" yang mengacu pada eksperimen biologi dengan menggunakan program di komputer. Alat utama pada studi ini adalah program *software* komputer dan internet, dengan aktivitas dasar berupa analisis sekuens protein dan struktur molekul dari *database* maupun *software* (Dudley, 2010). Simulasi ini mampu memberikan gambaran tentang apa yang mungkin terjadi pada tingkat atom, sehingga penting untuk memprediksi dan memahami struktur, fungsi, dinamika, dan interaksi biomolekul (Mobley dan Gilson, 2017). Adanya studi ini mempercepat akses informasi, menganalisis data molekul, hingga menemukan potensi obat baru lebih cepat dan efisien. Studi ini tidak dapat berdiri sendiri dan tidak dapat sepenuhnya menggantikan eksperimen di laboratorium karena adanya prosedur akhir untuk sintesis agen farmasetikal yang perlu dilakukan uji pra klinis dan klinis (Ventura, 2006).

Metode yang dijadikan alat komputasi standar pada proses desain suatu obat yaitu *molecular docking*. *Molecular docking* atau pertambatan molekul merupakan metode komputasi yang dilakukan untuk mempelajari interaksi yang terjadi pada kompleks molekul dengan tujuan menemukan obat baru yang rasional. Metode ini sangat berguna dalam proses penemuan obat, seperti untuk memprediksi afinitas pengikatan dari molekul terhadap enzim atau protein tertentu yang ingin dihambat aktivitasnya.

Molecular docking dilakukan dengan menempatkan molekul ligan ke situs pengikatan protein target pada posisi yang paling optimal untuk membentuk kompleks stabil (Dar dan Mir, 2017). Ligan ditempatkan pada sisi aktif dari molekul target yang diketahui merupakan tempat berikatan dengan suatu ligan kontrol. Harapannya, ligan yang digunakan dapat berikatan pada sisi yang sama dengan ligan kontrol sehingga dapat dilakukan perbandingan nilai afinitas ikatan untuk mengetahui potensi ikatan ligan pada target (Chaudhary dan Mishra, 2016). Berdasarkan jenis ligannya, *molecular docking* dibedakan menjadi dua, yaitu:

1. *Docking* protein-protein

Docking protein-protein adalah salah satu cabang dari metode *molecular docking* yang melibatkan dua protein berbeda, satu protein sebagai target dan satu protein lainnya sebagai ligan. Pada umumnya, permukaan bagian protein target yang berfungsi sebagai lokasi ikatan dengan protein ligan cenderung lebih datar jika dibandingkan dengan permukaan bagian protein target yang berikatan dengan ligan berukuran kecil (*small molecule*). Metode ini dapat dilakukan

menggunakan program berupa server PatchDock dan FireDock (Schneidman-Duhovny *et al*, 2005; Andrusier *et al*, 2007).

2. Docking protein-ligan

Docking protein-ligan adalah salah satu cabang dari metode *molecular docking* yang melibatkan sebuah makromolekul atau molekul berukuran besar (protein target) dengan sebuah molekul berukuran kecil (ligan). Metode ini dapat dilakukan menggunakan program berupa *software* PyRx. Selama proses *docking* berlangsung, ligan diposisikan di dalam sebuah rongga yang terdapat di permukaan protein target (Dallakyan dan Olson, 2014).

Program *molecular docking* melakukan dua hal, yakni pencarian ruang (*search space*) dan fungsi penilaian (*scoring*). Pencarian ruang terdiri dari semua kemungkinan orientasi dari molekul target dan ligan untuk membentuk konformasi kompleks yang stabil (*favourable docking pose*). Konformasi tersebut merupakan input untuk melakukan fungsi penilaian yang menunjukkan nilai *binding affinity* atau afinitas ikatan dari kompleks molekul (Meng *et al*, 2011; Mukesh dan Rakesh, 2011). Afinitas ikatan adalah kekuatan energi interaksi antara molekul ligan dengan molekul target. Energi rendah (negatif) menunjukkan ikatan yang stabil dan lebih mudah terbentuk, sementara nilai energi yang lebih besar menunjukkan bahwa kompleks yang terbentuk kurang stabil (Yunta, 2016; Mukesh dan Rakesh, 2011). Afinitas ikatan kompleks pada fungsi penilaian merupakan hasil dari penilaian empiris dan penilaian berbasis medan gaya. Penilaian empiris menggambarkan jenis peristiwa fisik yang terlibat dalam kompleks, seperti ikatan hidrogen dan kontak hidrofobik. Sedangkan penilaian berbasis

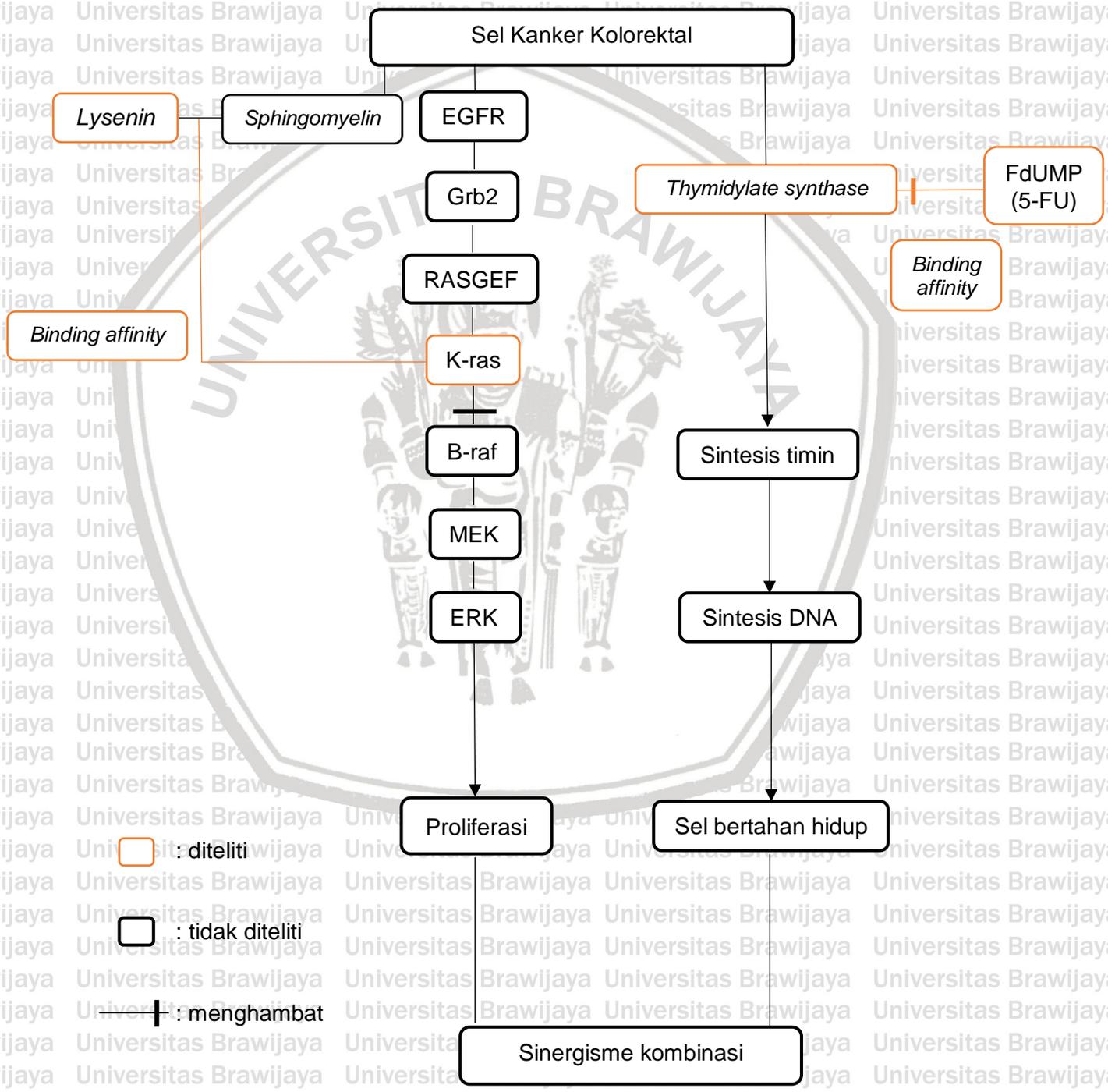
medan gaya menjumlahkan kontribusi dari ikatan seperti *bond stretching*, *angle bending*, elektrostatik, dan Van der Waals (Ferreira *et al*, 2015).

Pada prinsip penemuan obat berbasis komputasi melalui metode *molecular docking*, hal pertama yang dilakukan adalah menentukan protein target, kemudian mencari struktur tiga dimensi molekul tersebut pada *database* Protein Data Bank (PDB) ataupun Uniprot, lalu menentukan sisi pengikatan dari protein target. Setelah mengetahui struktur dan fungsi molekul protein target, dapat ditentukan ligan yang ingin diketahui interaksinya dengan protein tersebut. Struktur tiga dimensi ligan dapat dicari pada PDB, Uniprot, maupun Pubchem. Langkah selanjutnya yaitu preparasi molekul protein target dan ligan, dapat dilakukan menggunakan *software* PyMOL. Kemudian, *docking* dilakukan menggunakan program sesuai dengan jenis ligan. Program *docking* tersebut akan memberikan hasil berupa kompleks ligan dan target beserta nilai *binding affinity*. Analisis interaksi hasil *docking* kemudian dilakukan menggunakan *software* PyMOL untuk visualisasi molekul secara tiga dimensi dan *software* LigPlot untuk mengetahui asam amino yang terlibat pada dua interaksi utama pada kestabilan ikatan, yaitu interaksi hidrofobik dan hidrogen (Chaudhary dan Mishra, 2016; Laskowski dan Swindells, 2011).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Uraian Kerangka Konsep

Pada kanker dapat ditemukan perubahan genetik yang mampu memicu sifat-sifat onkogenik. Perubahan genetik yang paling sering terjadi pada kanker kolorektal adalah mutasi K-ras yang menyebabkan berlebihnya proliferasi sel. Sinyal proliferasi dimulai dengan teraktivasinya *epidermal growth factor receptor* (EGFR), kemudian reseptor membuat kompleks dengan Grb2, yang mengaktifkan RAS *guanine nucleotide exchange factors* (RASGEF) untuk kemudian berikatan dengan K-ras sehingga protein ini dapat menjadi bentuk aktif. Mutasi pada K-ras menyebabkan terganggunya mekanisme inaktivasi protein K-ras, sehingga protein ini terus-menerus dalam bentuk aktif tanpa adanya rangsangan melalui EGFR. Sinyal proliferasi dilanjutkan melalui B-raf, B-raf dalam keadaan tidak aktif dapat berikatan dengan protein K-ras untuk berubah menjadi bentuk aktif sehingga mampu mengaktifasi protein selanjutnya. Mengganggu sisi pengikatan K-ras dengan B-raf dapat menjadi suatu pendekatan untuk menurunkan aktivitas proliferasi kanker kolorektal.

Molekul yang memiliki efek anti-proliferasi pada kanker adalah *lysenin*. *Lysenin* secara spesifik berikatan dengan *sphingomyelin* untuk dapat masuk ke dalam membran sel. Peran *lysenin* sebagai anti-proliferasi perlu diketahui lebih lanjut. Oleh karena itu, protein *lysenin* pada penelitian ini diprediksi adanya interaksi dengan K-ras yang akan diketahui melalui pengikatan molekul *lysenin* dengan K-ras secara *in silico* sehingga didapatkan nilai *binding affinity*. Kemudian, dilakukan perbandingan antara kompleks ini dengan kompleks ikatan K-ras dan ligan kontrol B-raf. Apabila nilai *binding affinity* menunjukkan K-ras dapat berikatan stabil dan lebih mudah dengan

lysenin disertai asam amino pada daerah yang sama dengan B-raf, harapannya *lysenin* berpotensi menghambat ikatan K-ras dengan B-raf sehingga tidak terjadi aktivasi B-raf dan sinyal proliferasi dapat berhenti.

Obat kemoterapi 5-FU yang digunakan pada terapi kombinasi dengan cairan *coelomic* juga akan dibuktikan interaksi molekuler antara metabolit aktifnya yaitu FdUMP, dengan targetnya yaitu *thymidylate synthase* secara *in silico*. *In silico* merupakan penelitian molekuler untuk mengetahui interaksi yang terjadi pada kompleks molekul ditinjau dari *binding affinity* atau afinitas ikatannya. Adanya mekanisme dan penargetan jalur yang berbeda dalam terapi kombinasi *lysenin* dan 5-FU secara sinergis dapat meningkatkan efek anti-kanker, sehingga diharapkan mampu menjadi pilihan terapi kombinasi untuk pengobatan kanker kolorektal yang lebih efektif.

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Terdapat ikatan antara *lysenin* dari cairan *coelomic* cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dengan K-ras mutan secara *in silico*.
2. Terdapat ikatan antara FdUMP sebagai metabolit aktif dari 5-FU dengan *thymidylate synthase* secara *in silico*.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental sekunder dengan mengambil sampel dari *database* PDB (Protein Data Bank) dan PubChem, yang bertujuan untuk mengetahui afinitas ikatan *lysenin* dari cairan *coelomic* cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dengan K-ras secara *in silico* yang diharapkan dapat menjadi agen kokemoterapi 5-FU pada kanker kolorektal.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi

Populasi penelitian ini adalah struktur molekul K-ras dan *thymidylate synthase* yang datanya didapatkan dari *database* PDB.

4.2.2 Sampel

Sampel penelitian ini adalah struktur molekul *lysenin* serta B-raf sebagai ligan kontrol, yang datanya didapatkan dari *database* PDB, dan FdUMP yang merupakan metabolit aktif dari 5-FU yang datanya didapatkan dari *database* PubChem.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

4.3.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini berlangsung di Laboratorium Bioinformatika, Institut Bioinformatika Indonesia, Malang.

4.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2018 hingga September 2019.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah jenis ligan dan target yang digunakan, yaitu *lysenin*, B-raf, dan FdUMP sebagai ligan, serta K-ras dan *thymidylate synthase* sebagai target.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah afinitas ikatan *lysenin* dengan K-ras, B-raf dengan K-ras, dan FdUMP dengan *thymidylate synthase*.

4.5 Definisi Operasional

- *Lyseinin* adalah protein bioaktif dari cairan *coelomic* cacing tanah, dapat berikatan secara spesifik dengan *sphingomyelin* sebelum masuk ke dalam membran sel eukariotik, dan memiliki efek anti-proliferasi (Bokori-Brown *et al*, 2016; Permana *et al*, 2019).
- K-ras adalah protein yang bertindak sebagai penentu sinyal proliferasi sel, adanya mutasi menyebabkan protein K-ras tetap dalam

keadaan aktif dan transduksi sinyal proliferasi dapat terus terjadi

(Morcaldi *et al*, 2015).

- B-raf adalah protein yang berikatan dengan K-ras aktif, pada RBD (Ras Binding Domain) untuk dapat berubah menjadi bentuk aktif

sehingga dapat melanjutkan sinyal proliferasi (Aramini *et al*, 2015).

- Fluorodeoksiuridilat (FdUMP) merupakan metabolit aktif dari obat 5-Fluorourasil (5-FU), yang menghambat kerja enzim *thymidylate synthase* (Chua *et al*, 2011).

- *Thymidylate synthase* merupakan enzim yang mengkatalisis konversi *deoxyuridine monophosphate* (dUMP) menjadi *deoxythymidine monophosphate* (dTMP) untuk replikasi dan perbaikan DNA (Longley *et al*, 2007).

- *Molecular docking* adalah metode komputasi yang dilakukan untuk mengetahui interaksi pada kompleks molekul dan mendapatkan nilai *binding affinity* atau afinitas ikatan (Mukesh dan Rakesh, 2011).

- Afinitas ikatan adalah kekuatan energi interaksi antara molekul ligan dengan molekul target. Energi yang lebih rendah (negatif) menunjukkan ikatan yang stabil dan lebih mudah terbentuk (Yunta, 2016).

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat

a. Perangkat keras berupa satu set laptop dengan spesifikasi:

Processor tipe Intel® inside™ CORE i5, RAM 4GB, kapasitas

hard drive 128 GB.

- b. Perangkat lunak PyMOL v.2.2.0 untuk visualisasi struktur tiga dimensi, PatchDock dan FireDock untuk melakukan *docking lysenin* maupun B-raf dengan K-ras, serta PyRx untuk melakukan *docking* FdUMP dengan *thymidylate synthase* sehingga didapatkan afinitas ikatan dan kompleks molekuler, dan LigPlot v.1.4.5 untuk menganalisis letak ikatan pada kompleks.

4.6.2 Bahan Docking Lysenin – K-ras dan B-raf – K-ras

- a. Struktur tiga dimensi K-ras mutan (didapat dari <http://www.rcsb.org/structure/5VPI>)
- b. Struktur tiga dimensi K-ras *wild-type* (didapat dari <http://www.rcsb.org/structure/5VQ6>)
- c. Struktur tiga dimensi *lysenin* (didapat dari <https://www.rcsb.org/structure/3ZXG>)
- d. Struktur tiga dimensi RBD B-raf (didapat dari <http://www.rcsb.org/structure/5J17>)

4.6.3 Bahan Docking FdUMP dengan Thymidylate Synthase

- a. Struktur tiga dimensi FdUMP (didapat dari <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)
- b. Struktur tiga dimensi *thymidylate synthase* (didapat dari <http://www.rcsb.org/structure/5X5D>)

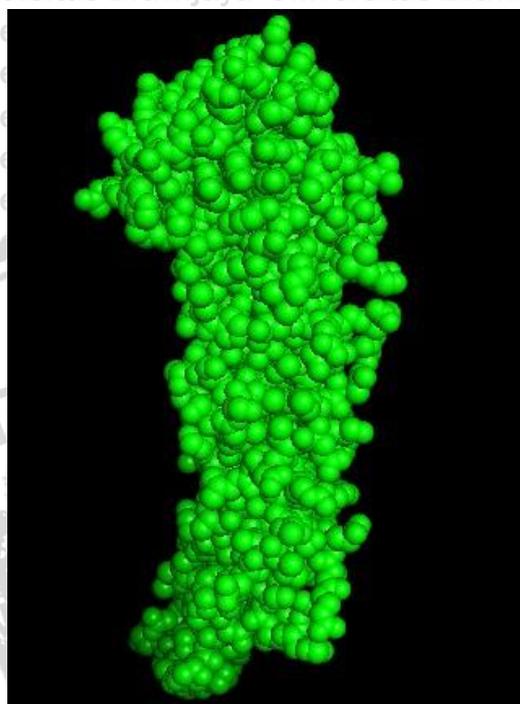
4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Docking Lysenin – K-ras dan B-raf – K-ras

1. Preparasi Lysenin

Struktur tiga dimensi lysenin diunduh dalam format .pdb dari <https://www.rcsb.org/structure/3ZXG>, kemudian divisualisasikan

pada aplikasi PyMOL, dan dihapus molekul air maupun molekul lain yang dapat mengganggu proses *docking*.



Gambar 4.1 Struktur tiga dimensi lysozin. Struktur tiga dimensi ini merupakan visualisasi protein *lysozin* sebelum dilakukan *docking*.

2. Preparasi K-ras

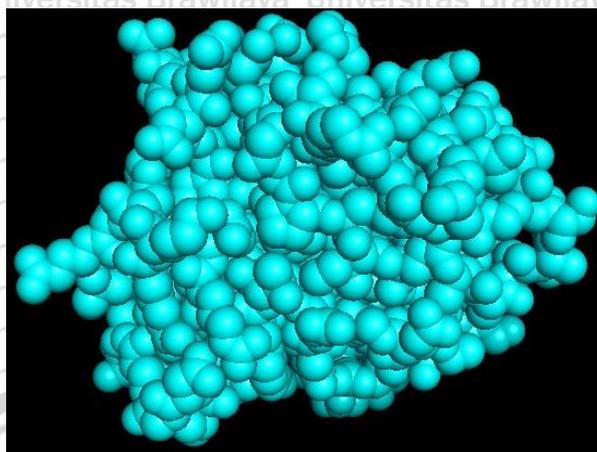
Struktur tiga dimensi K-ras mutan diunduh dalam format .pdb dari

<http://www.rcsb.org/structure/5VPI> dan K-ras *wild-type* pada

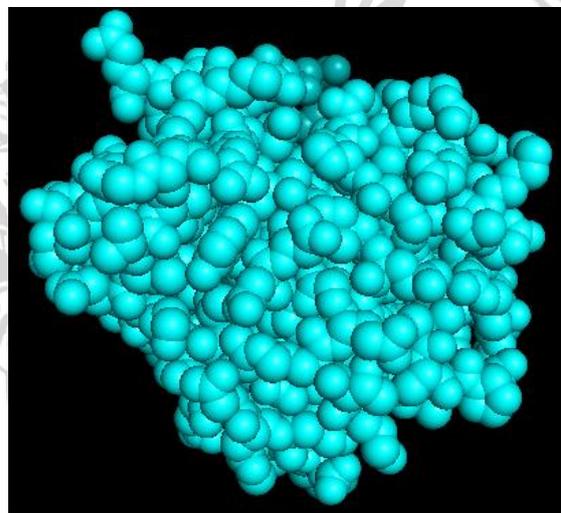
<http://www.rcsb.org/structure/5VQ6>, kemudian divisualisasikan

pada aplikasi PyMOL, dan dihapus molekul air maupun molekul

lain yang dapat mengganggu proses *docking*.



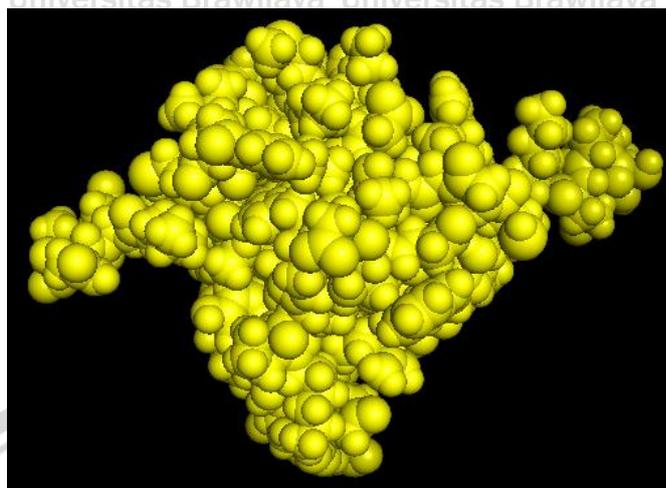
Gambar 4.2 Struktur tiga dimensi K-ras mutan. Struktur tiga dimensi ini merupakan visualisasi protein K-ras mutan sebelum dilakukan *docking*.



Gambar 4.3 Struktur tiga dimensi K-ras *wild-type*. Struktur tiga dimensi ini merupakan visualisasi protein K-ras *wild-type* (normal) sebelum dilakukan *docking*.

3. Preparasi B-raf

Struktur tiga dimensi B-raf diunduh dalam format .pdb dari <http://www.rcsb.org/structure/5J17>, kemudian divisualisasikan pada aplikasi PyMOL, dan dihapus molekul air maupun molekul lain yang dapat mengganggu proses *docking*.



Gambar 4.4 Struktur tiga dimensi B-raf. Struktur tiga dimensi ini merupakan visualisasi protein B-raf sebelum dilakukan *docking*.

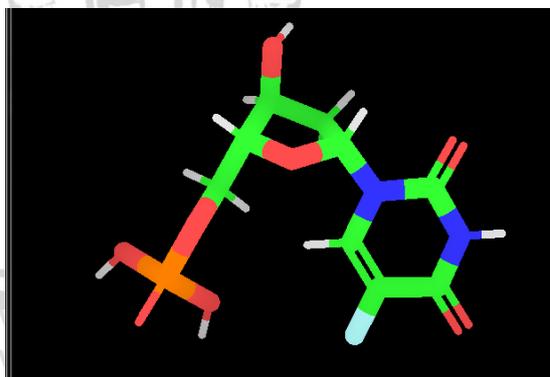
4. Struktur tiga dimensi *lysenin*, K-ras, dan B-raf yang telah divisualisasikan pada aplikasi PyMOL disimpan dalam format .pdb
5. Mengetik asam amino K-ras yang merupakan daerah penting untuk ikatannya dengan B-raf berdasarkan jurnal dan disimpan dalam format .txt
6. Membuka server PatchDock.
7. Memasukkan *file* *lysenin.pdb* pada bagian Ligand Molecule dan *file* K-ras.pdb pada bagian Receptor Molecule.
8. Memasukkan *file* data asam amino K-ras .txt pada bagian Receptor Binding Site.
9. Pada kolom *e-mail address*, ketik alamat *e-mail* yang akan dituju untuk melaporkan hasil *docking*.
10. Klik *submit form* untuk proses *docking*.
11. Setelah mendapat pesan *e-mail* dari server Patchdock, klik situs yang tercantum di pesan untuk mendapat hasil *docking*.

12. Hasil *docking* dilanjutkan dengan server FireDock untuk mendapat nilai afinitas ikatan dari kompleks.
13. Mendata nilai afinitas ikatan pada server FireDock dan mengunduh kompleks ikatan hasil *docking* dalam format .pdb
14. Memasukkan *file* hasil *docking* pada aplikasi PyMOL untuk melihat struktur tiga dimensi kompleks.
15. Memasukkan *file* hasil *docking* pada aplikasi LigPlot untuk menganalisis *binding site* dari ikatan kompleks tersebut.
16. Mengulangi langkah 6-15 untuk *docking* B-raf dengan K-ras.

4.7.2 Docking FdUMP dengan Thymidylate Synthase

1. Preparasi FdUMP

Struktur tiga dimensi FdUMP diunduh dari <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, kemudian divisualisasikan pada aplikasi PyMOL.

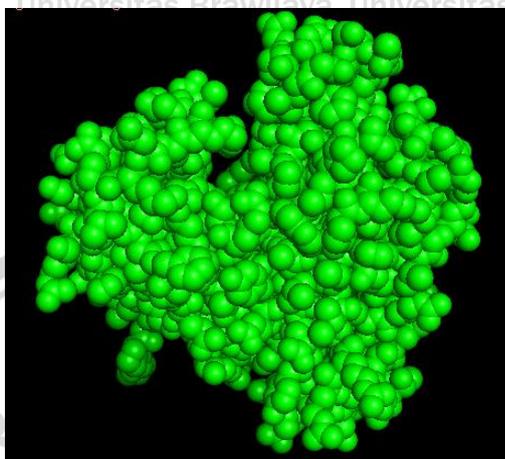


Gambar 4.5 Struktur tiga dimensi FdUMP. Struktur tiga dimensi ini merupakan visualisasi molekul FdUMP sebelum dilakukan *docking*.

2. Preparasi Thymidylate Synthase

Struktur tiga dimensi *thymidylate synthase* diunduh dalam format .pdb dari <http://www.rcsb.org/structure/5X5D>, kemudian

divisualisasikan pada aplikasi PyMOL, dan dihapus molekul air maupun molekul lain yang dapat mengganggu proses *docking*.



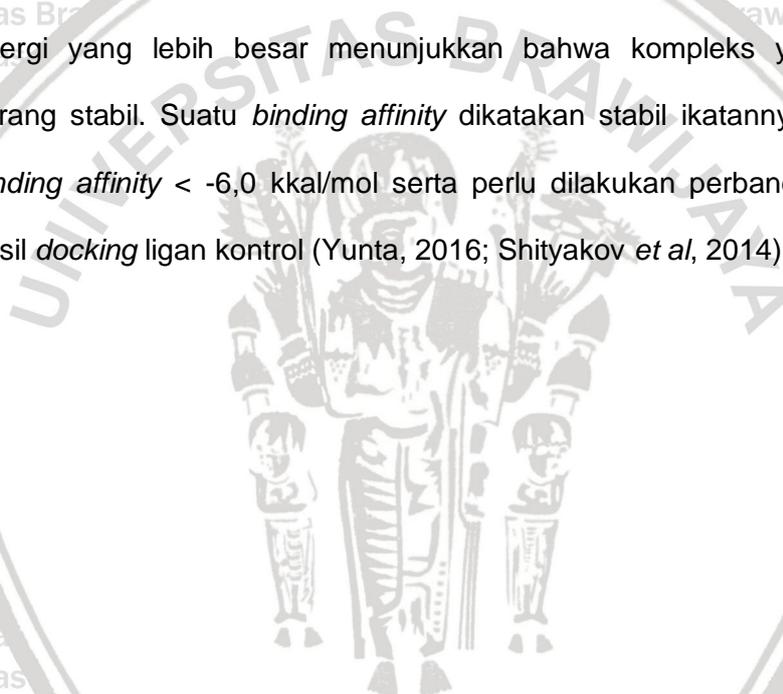
Gambar 4.6 Struktur tiga dimensi *thymidylate synthase*. Struktur tiga dimensi ini merupakan visualisasi *thymidylate synthase* sebelum dilakukan *docking*.

3. Struktur tiga dimensi FdUMP dan *thymidylate synthase* yang telah divisualisasikan pada aplikasi PyMOL disimpan dalam format .pdb
4. Membuka aplikasi PyRx dan klik add macromolecules pada bagian vina wizard untuk memasukkan struktur *thymidylate synthase*.
5. Klik add ligand untuk memasukkan struktur tiga dimensi FdUMP.
6. Pada bagian autodock, klik kanan pada setiap struktur, setelah itu klik display sehingga semua struktur terlihat pada ruang 3D scene.
7. Pada bagian molecules, klik display, dan pilih ball and sticks dan molecular surface untuk melihat letak ligan pada 3D scene.
8. Klik forward pada bagian kanan bawah Vina wizard, setelah itu atur ruang reaksi dalam fitur Run AutoGrid pada 3D scene sehingga ligan terletak pada area reaksi yang tepat dalam kubus.
9. Klik forward untuk proses *docking* dan didapatkan kompleks ikatan FdUMP dengan *thymidylate synthase* beserta *binding affinity*.

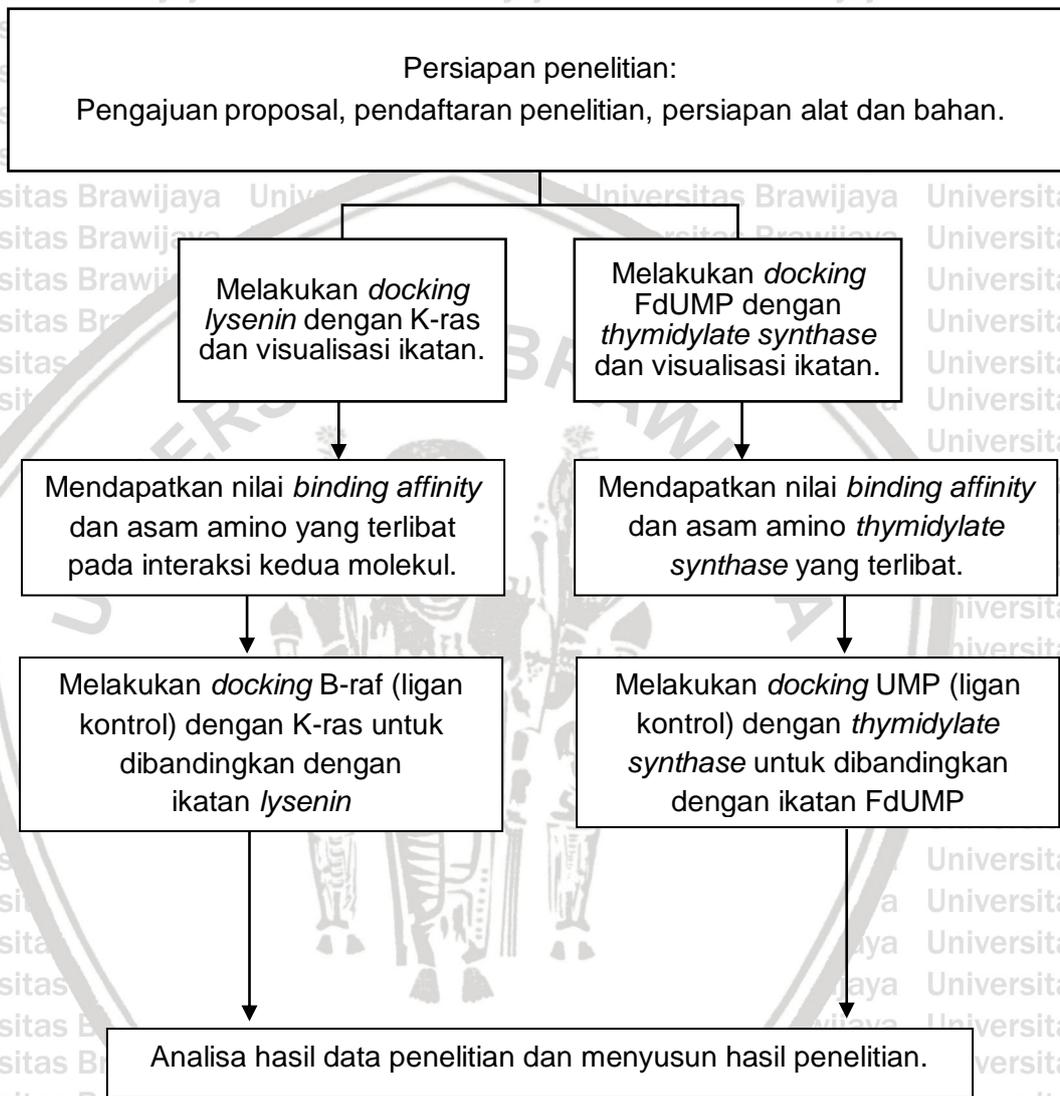
10. Memasukkan file hasil *docking* FdUMP dengan *thymidylate synthase* pada aplikasi LigPlot untuk menganalisis *binding site*.

4.8 Analisis Data

Hasil akhir yang didapat dari *docking* adalah afinitas ikatan (*binding affinity*) dari kompleks molekul. Energi yang lebih rendah (negatif) menunjukkan ikatan yang stabil dan lebih mudah terbentuk, sementara nilai energi yang lebih besar menunjukkan bahwa kompleks yang terbentuk kurang stabil. Suatu *binding affinity* dikatakan stabil ikatannya apabila nilai *binding affinity* $< -6,0$ kkal/mol serta perlu dilakukan perbandingan dengan hasil *docking* ligan kontrol (Yunta, 2016; Shityakov *et al*, 2014).



4.9 Alur Penelitian



BAB 5

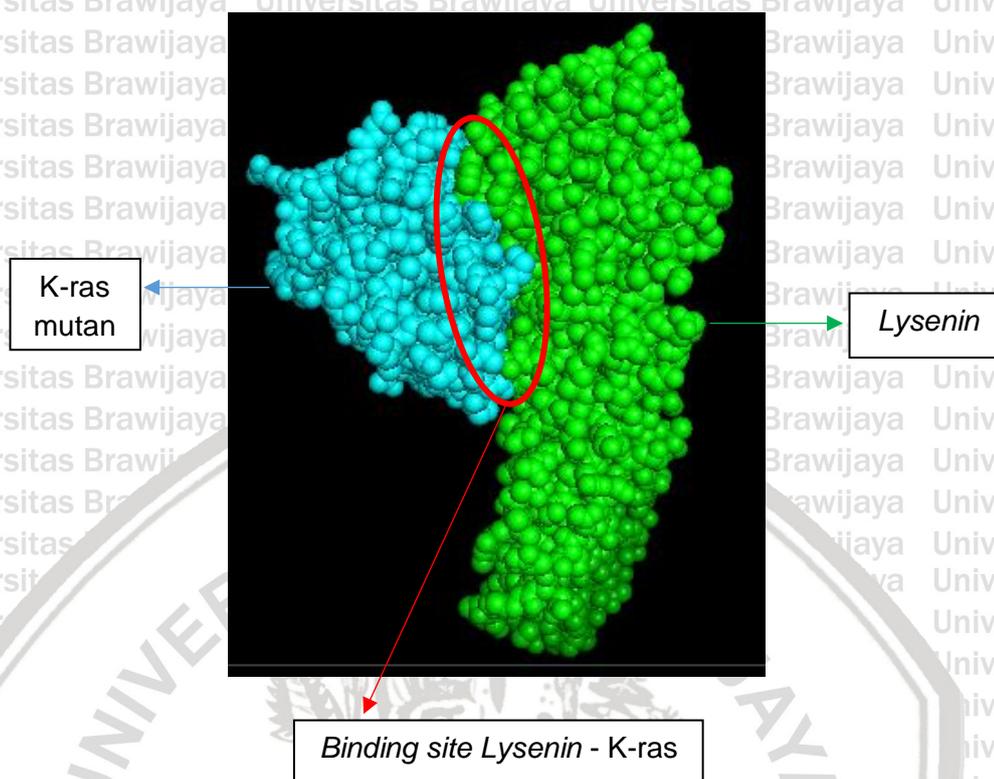
HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil *Docking* Lyсенin dengan K-ras Mutan

Molecular docking atau pertambatan molekul merupakan suatu teknik yang dilakukan untuk mempelajari interaksi yang terjadi pada suatu kompleks molekul (Chaudhary dan Mishra, 2016). Tujuan dilakukannya *docking* molekul lyсенin dengan molekul K-ras mutan adalah untuk mengetahui adanya ikatan antara lyсенin dengan onkoprotein K-ras, mendapatkan nilai *binding affinity* yang menggambarkan kekuatan energi interaksi antar molekul, dan mengetahui asam amino beserta jenis ikatan yang terlibat dalam kompleks lyсенin dengan K-ras. *Docking* dilakukan dengan server Patchdock dan Firedock, kemudian untuk visualisasi molekul menggunakan aplikasi PyMOL, serta menggunakan aplikasi LigPlot untuk mengetahui asam amino dan jenis ikatan yang terlibat.

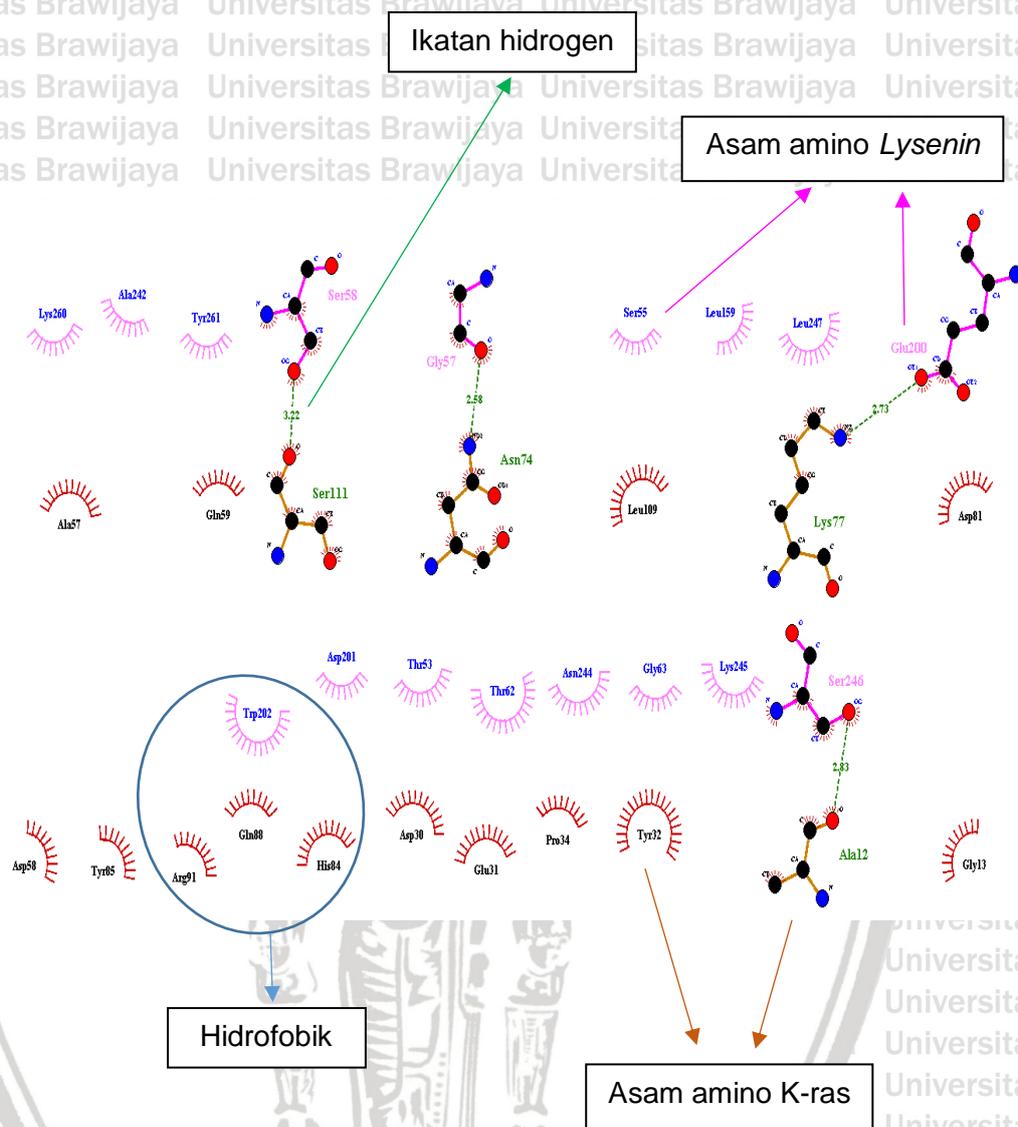
Berdasarkan *docking* yang telah dilakukan pada molekul lyсенin dengan K-ras mutan, diperoleh hasil bahwa terdapat ikatan antara keduanya dengan nilai *binding affinity* sebesar -25,06 kkal/mol. Kompleks ini kemudian divisualisasi menggunakan aplikasi PyMOL, sehingga dapat dilihat ikatan pada kedua molekul dengan bentuk tiga dimensi (Gambar 5.1). Selanjutnya, untuk mendapatkan data asam amino dan jenis ikatan yang terlibat pada kompleks tersebut, menggunakan aplikasi LigPlot dapat dilihat ikatan antar asam amino pada kedua molekul (Gambar 5.2) dengan rincian seperti pada

Tabel 5.1.



Gambar 5.1 Visualisasi kompleks ikatan Lysoenin dengan K-ras mutan. Gambaran tiga dimensi kompleks lysoenin (hijau) dengan K-ras (biru) pada aplikasi PyMOL setelah melalui proses *docking* menunjukkan nilai *binding affinity* sebesar $-25,06$ kkal/mol dengan *binding site* seperti yang ditunjuk pada lingkaran merah.

Nilai *binding affinity* didapatkan setelah melalui proses *docking* oleh server Patchdock dan Firedock. Nilai ini menggambarkan kekuatan energi ikatan antar molekul yang dipengaruhi oleh berbagai interaksi molekuler yang memberikan kontribusi pada nilai *binding affinity*. Energi yang lebih rendah (negatif) menunjukkan ikatan yang stabil dan lebih mudah terbentuk, sementara nilai energi yang lebih besar menunjukkan bahwa kompleks yang terbentuk kurang stabil (Yunta, 2016). Suatu *binding affinity* dikatakan stabil ikatannya apabila nilai *binding affinity* $< -6,0$ kcal/mol (Shityakov *et al*, 2014).



Gambar 5.2 Hasil identifikasi asam amino yang berikatan pada kompleks *Lysenin* dengan K-ras mutan. Identifikasi ini merupakan gambaran dua dimensi asam amino yang terlibat beserta jenis ikatan pada kompleks *lysenin* dengan K-ras menggunakan aplikasi LigPlot, dimana ikatan hidrogen ditandai dengan garis putus-putus berwarna hijau dan hidrofobik yang berbentuk seperti kipas. Asam amino berwarna merah muda adalah milik *lysenin*, sedangkan asam amino berwarna cokelat adalah milik K-ras.



Tabel 5.1 Analisis Kompleks Ikatan *Lysenin* dengan K-ras Mutan

Asam Amino <i>Lysenin</i>	Asam Amino K-ras	Tipe Interaksi	Asam Amino <i>Lysenin</i>	Asam Amino K-ras	Tipe Interaksi
Lys 260	Ala 57	Hidrofobik	Trp 202	His 84	Hidrofobik
Ala 242	Ala 57	Hidrofobik	Asp 201	His 84	Hidrofobik
Tyr 261	Gln 59	Hidrofobik	Asp 201	Gln 88	Hidrofobik
Ser 58	Ser 111	Hidrogen	Thr 53	Asp 30	Hidrofobik
Gly 57	Asn 74	Hidrogen	Thr 53	Glu 31	Hidrofobik
Ser 58	Asn 74	Hidrofobik	Thr 62	Glu 31	Hidrofobik
Ser 55	Leu 109	Hidrofobik	Thr 62	Tyr 32	Hidrofobik
Leu 159	Lys 77	Hidrofobik	Thr 62	Asp 30	Hidrofobik
Leu 247	Lys 77	Hidrofobik	Gly 63	Tyr 32	Hidrofobik
Leu 247	Asp 81	Hidrofobik	Asn 244	Pro 34	Hidrofobik
Glu 200	Asp 81	Hidrofobik	Lys 245	Tyr 32	Hidrofobik
Glu 200	Lys 77	Hidrogen	Ser 246	Tyr 32	Hidrofobik
Trp 202	Asp 58	Hidrofobik	Asn 244	Tyr 32	Hidrofobik
Trp 202	Tyr 85	Hidrofobik	Lys 245	Ala 12	Hidrofobik
Trp 202	Arg 91	Hidrofobik	Ser 246	Ala 12	Hidrogen
Trp 202	Gln 88	Hidrofobik	Ser 246	Gly 13	Hidrofobik

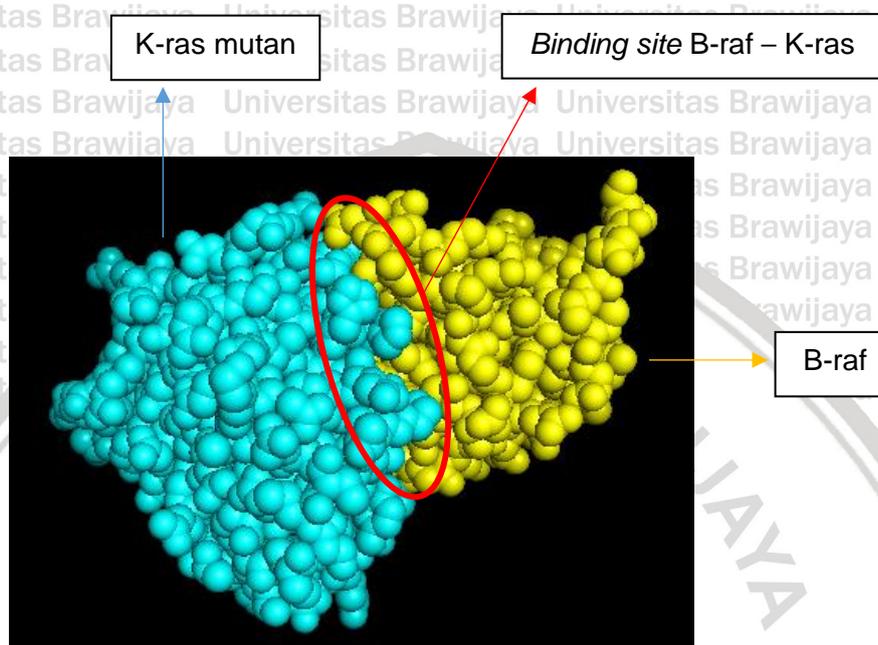
Pada kompleks *lysenin* dengan K-ras mutan diketahui terbentuk sebanyak 32 ikatan yang terdiri dari 4 ikatan hidrogen dan 28 hidrofobik. Ikatan ini menunjukkan interaksi antar asam amino yang terjadi pada sisi molekul yang berikatan. Keduanya adalah interaksi molekul yang mempengaruhi afinitas ikatan dimana hidrofobik merupakan ikatan yang lebih stabil daripada ikatan hidrogen (Garrett dan Grisham, 2013).

Setelah mengetahui ikatan *lysenin* dengan K-ras mutan, pada *molecular docking* diperlukan adanya perbandingan dengan ligan kontrol, yaitu molekul yang telah diketahui berikatan dengan protein target. Harapannya, ligan yang digunakan dapat menempati sisi pengikatan ligan kontrol sehingga dapat dilakukan perbandingan nilai *binding affinity* untuk mengetahui potensi ikatan dari ligan terhadap target (Chaudhary dan Mishra, 2016). Ligan kontrol ini diperankan oleh B-raf, yaitu protein yang berikatan dengan K-ras. Ikatan dengan daerah efektor dari asam amino K-ras dapat membuat protein ini berubah dari bentuk tidak aktif menjadi bentuk aktif sehingga dapat melanjutkan sinyal proliferasi (Aramini *et al*, 2015). Oleh karena itu, dilakukan *docking* antara molekul B-raf dengan K-ras untuk mengetahui nilai *binding affinity* yang menggambarkan kekuatan energi interaksi antar molekul, serta menganalisis kompleks ikatan tersebut, sehingga dapat dibandingkan dengan kompleks ikatan *lysenin* dengan K-ras. *Docking* dilakukan dengan server Patchdock dan Firedock, kemudian untuk visualisasi molekul menggunakan aplikasi PyMOL, serta menggunakan aplikasi LigPlot untuk mengetahui asam amino dan jenis ikatan yang terlibat.

Berdasarkan *docking* yang telah dilakukan pada molekul B-raf dengan K-ras, diperoleh nilai *binding affinity* sebesar -11,80 kkal/mol. Kompleks ini kemudian divisualisasi menggunakan aplikasi PyMOL, sehingga dapat dilihat ikatan pada kedua molekul dengan bentuk tiga dimensi (Gambar 5.3).

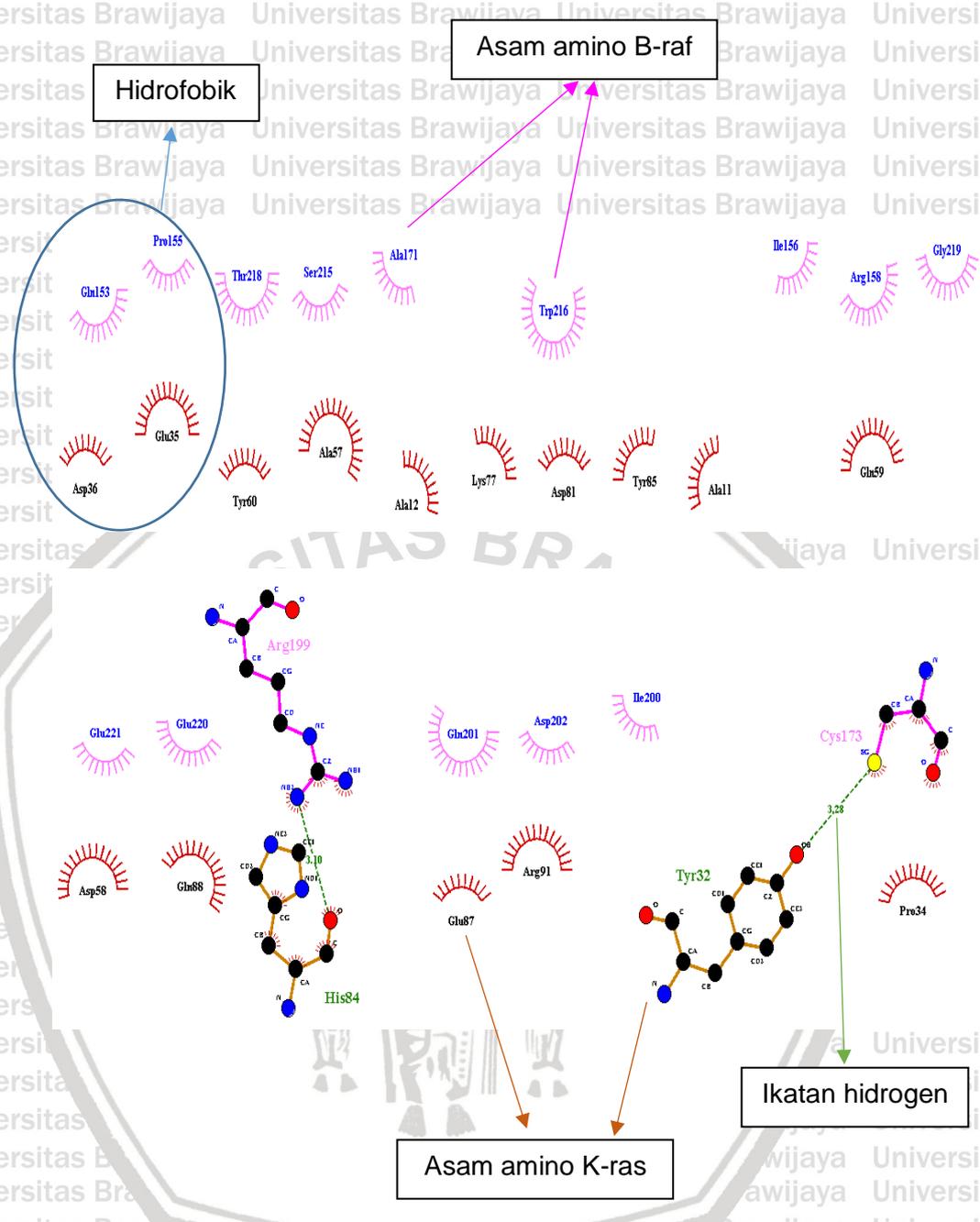
Selanjutnya, untuk mendapatkan data asam amino dan jenis ikatan yang terlibat pada kompleks tersebut, menggunakan aplikasi LigPlot dapat dilihat

ikatan antar asam amino pada kedua molekul (Gambar 5.4) dengan rincian seperti pada Tabel 5.2.



Gambar 5.3 Visualisasi kompleks ikatan B-raf dengan K-ras mutan. Gambaran tiga dimensi kompleks B-raf (kuning) dengan K-ras (biru) pada aplikasi PyMOL setelah melalui proses *docking* menunjukkan nilai *binding affinity* sebesar $-11,80$ kkal/mol dengan *binding site* seperti yang ditunjuk pada lingkaran merah.

Nilai *binding affinity* didapatkan setelah melalui proses *docking* oleh server Patchdock dan Firedock. Nilai ini menggambarkan kekuatan energi ikatan antar molekul yang dipengaruhi oleh berbagai interaksi molekuler yang memberikan kontribusi pada nilai *binding affinity*. Energi yang lebih rendah (negatif) menunjukkan ikatan yang stabil dan lebih mudah terbentuk, sementara nilai energi yang lebih besar menunjukkan bahwa kompleks yang terbentuk kurang stabil (Yunta, 2016). Suatu *binding affinity* dikatakan stabil ikatannya apabila nilai *binding affinity* $< -6,0$ kkal/mol (Shityakov *et al*, 2014).



Gambar 5.4 Hasil identifikasi asam amino yang berikatan pada kompleks B-raf dengan K-ras mutan. Identifikasi ini merupakan gambaran dua dimensi asam amino yang terlibat beserta jenis ikatan pada kompleks B-raf dengan K-ras menggunakan aplikasi LigPlot, dimana ikatan hidrogen ditandai dengan garis putus-putus berwarna hijau dan hidrofobik yang berbentuk seperti kipas. Asam amino berwarna merah muda adalah milik B-raf, sedangkan asam amino berwarna coklat adalah milik K-ras.



Tabel 5.2 Analisis Kompleks Ikatan B-raf dengan K-ras Mutan

Asam Amino B-raf	Asam Amino K-ras	Tipe Interaksi	Asam Amino B-raf	Asam Amino K-ras	Tipe Interaksi
Ile 156	Gln 59	Hidrofobik	Trp 216	Ala 11	Hidrofobik
Arg 158	Gln 59	Hidrofobik	Trp 216	Ala 12	Hidrofobik
Gly 219	Gln 59	Hidrofobik	Trp 216	Tyr 85	Hidrofobik
Gly 219	Asp 58	Hidrofobik	Trp 216	Asp 81	Hidrofobik
Glu 220	Asp 58	Hidrofobik	Trp 216	Lys 77	Hidrofobik
Gln 153	Asp 36	Hidrofobik	Ser 215	Ala 57	Hidrofobik
Glu 221	Asp 58	Hidrofobik	Ala 171	Ala 57	Hidrofobik
Ile 200	Arg 91	Hidrofobik	Thr 218	Ala 57	Hidrofobik
Asp 202	Arg 91	Hidrofobik	Thr 218	Tyr 60	Hidrofobik
Gln 201	Glu 87	Hidrofobik	Pro 155	Glu 35	Hidrofobik
Glu 220	Gln 88	Hidrofobik	Thr 218	Glu 35	Hidrofobik
Arg 199	His 84	Hidrogen	Cys 173	Tyr 32	Hidrogen
Cys 173	Pro 34	Hidrofobik	Gln 153	Glu 35	Hidrofobik

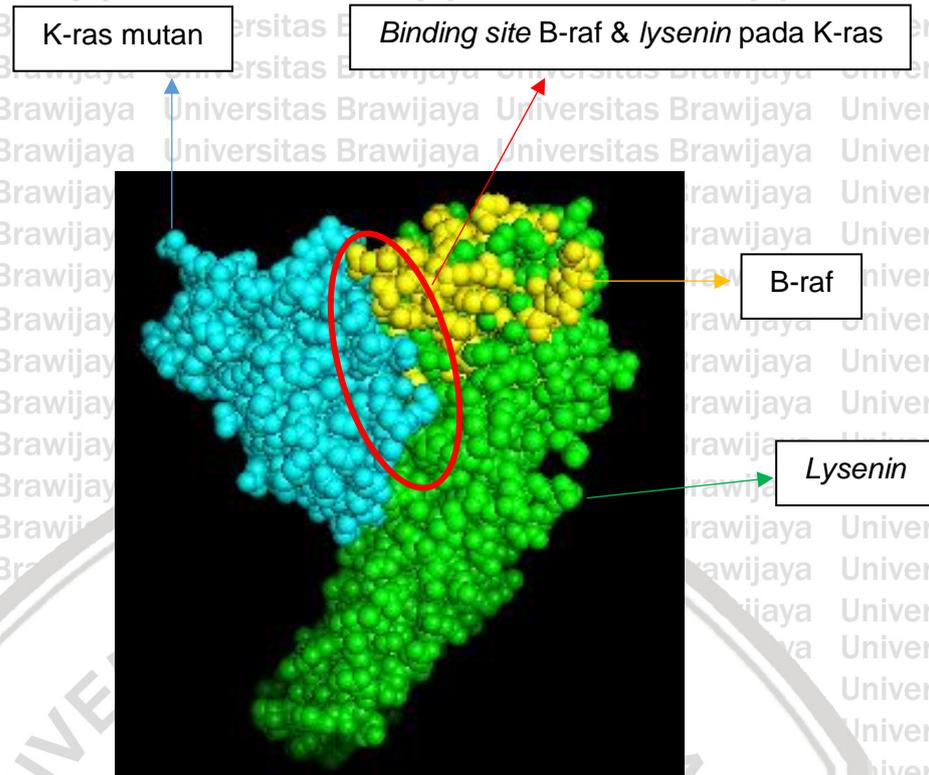
Pada kompleks B-raf dengan K-ras mutan diketahui terbentuk sebanyak 26 ikatan yang terdiri dari 2 ikatan hidrogen dan 24 hidrofobik.

Ikatan ini menunjukkan interaksi antar asam amino yang terjadi pada sisi molekul yang berikatan. Keduanya adalah interaksi molekul yang mempengaruhi afinitas ikatan dimana hidrofobik merupakan ikatan yang lebih stabil daripada ikatan hidrogen (Garrett dan Grisham, 2013). Setelah mendapat hasil *docking* K-ras dengan B-raf maupun dengan *lysenin*, dapat dilakukan perbandingan *binding affinity* serta perbandingan asam amino K-ras yang terlibat pada kompleks tersebut seperti pada Tabel 5.3.

Tabel 5.3 Perbandingan Kompleks Ikatan K-ras Mutan dengan Ligan

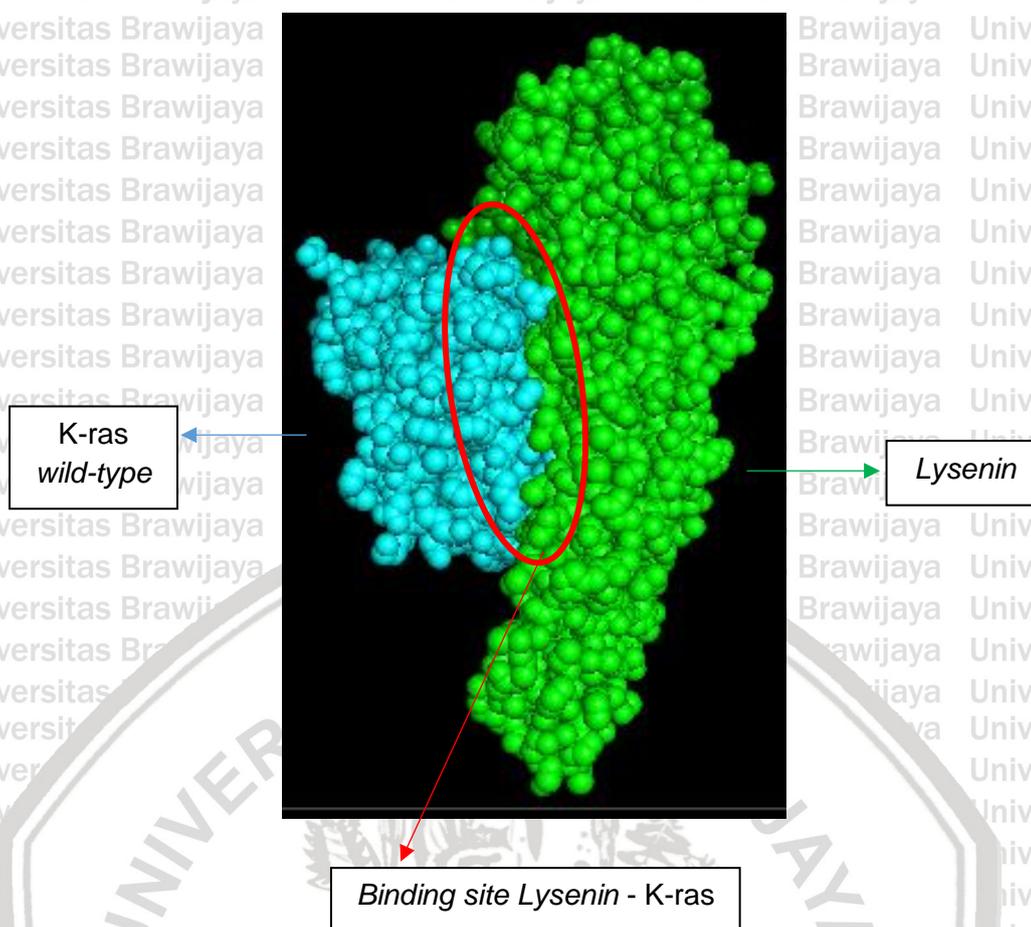
Kompleks Ikatan	Binding Affinity (kkal/mol)	Asam Amino K-ras yang Terlibat
K-ras dengan <i>Lysenin</i>	-25,06	Ala 57, Gln 59, Ser 111, Asn 74, Leu 109, Lys 77, Asp 81, Asp 58, Tyr 85, Arg 91, Gln 88, His 84, Asp 30, Glu 31, Tyr 32, Pro 34, Ala 12, Gly 13
K-ras dengan B-raf	-11,80	Gln 59, Asp 58, Asp 36, Arg 91, Glu 87, Gln 88, His 84, Tyr 32, Pro 34, Ala 11, Ala 12, Tyr 85, Asp 81, Lys 77, Ala 57, Tyr 60, Glu 35

Berdasarkan data pada Tabel 5.3, diketahui terdapat 12 asam amino K-ras yang sama, terlibat baik pada kompleks ikatan dengan *lysenin* maupun B-raf, yaitu Gln 59, Asp 58, Arg 91, Gln 88, His 84, Tyr 32, Pro 34, Ala 12, Tyr 85, Asp 81, Lys 77, Ala 57. Hal ini menunjukkan bahwa *lysenin* dapat berikatan dengan K-ras pada daerah yang sama seperti ikatan B-raf dengan K-ras, dengan harapan *lysenin* dapat menghambat terjadinya ikatan antara B-raf dengan K-ras. Untuk membuktikan bahwa ikatan kedua ligan terjadi pada daerah protein K-ras yang sama, dilakukan visualisasi pada program PyMOL secara bersamaan antara hasil *docking lysenin* dengan K-ras serta hasil *docking* B-raf dengan K-ras (Gambar 5.5). Berdasarkan nilai *binding affinity*, ikatan antara K-ras dengan *lysenin* maupun dengan B-raf termasuk ikatan yang stabil dan mengikat karena melampaui <-6 kkal/mol, namun ikatan antara K-ras dengan *lysenin* lebih negatif daripada ikatan antara K-ras dengan B-raf yang berarti bahwa *lysenin* dapat berikatan dengan K-ras lebih mudah dan lebih stabil dibandingkan dengan ligan kontrol yaitu B-raf.



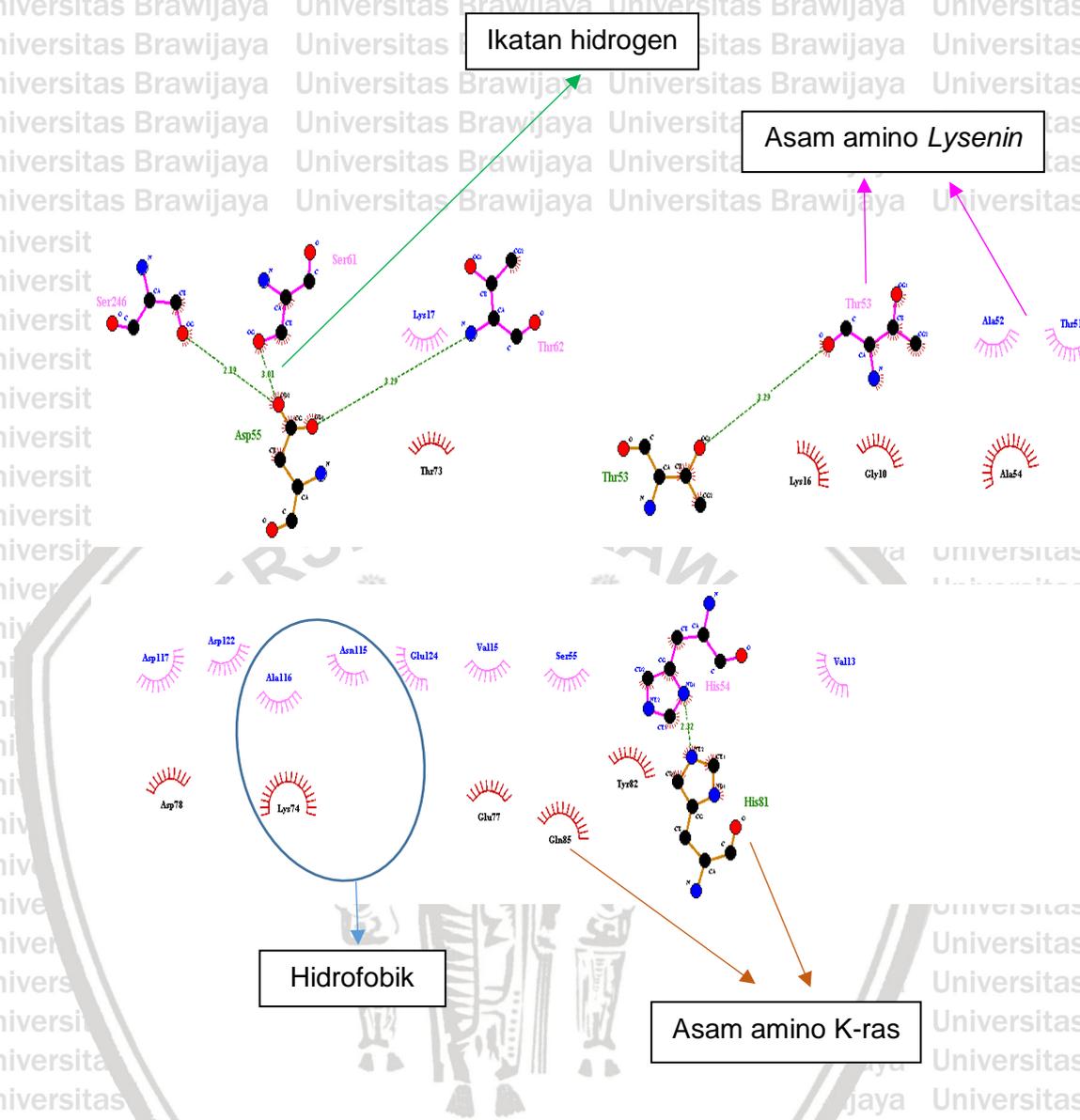
Gambar 5.5 Visualisasi kompleks ikatan K-ras mutan dengan *lysenin* dan B-raf. Gambaran tiga dimensi kompleks B-raf (kuning) dengan K-ras (biru) dan kompleks *lysenin* (hijau) dengan K-ras (biru) pada aplikasi PyMOL menunjukkan bahwa keduanya dapat terjadi pada daerah protein K-ras yang sama, sehingga *lysenin* berpotensi mampu menghambat terjadinya ikatan B-raf pada K-ras.

Penelitian ini berfokus pada K-ras mutan untuk dijadikan target terapi, namun sebagai perbandingan juga dilakukan *docking* antara K-ras *wild-type* (normal) dengan B-raf maupun *lysenin*. Berdasarkan *docking* yang telah dilakukan pada molekul *lysenin* dengan K-ras *wild-type*, diperoleh hasil bahwa terdapat ikatan antara keduanya dengan nilai *binding affinity* sebesar $-34,23$ kkal/mol. Kompleks ini kemudian divisualisasi menggunakan aplikasi PyMOL, sehingga dapat dilihat ikatan pada kedua molekul dengan bentuk tiga dimensi (Gambar 5.6). Selanjutnya, untuk mendapatkan data asam amino dan jenis ikatan yang terlibat pada kompleks tersebut, menggunakan aplikasi LigPlot dapat dilihat ikatan antar asam amino pada kedua molekul (Gambar 5.7) dengan rincian seperti pada Tabel 5.4.



Gambar 5.6 Visualisasi kompleks ikatan *Lysenin* dengan K-ras *wild-type*. Gambaran tiga dimensi kompleks *lysenin* (hijau) dengan K-ras (biru) pada aplikasi PyMOL setelah melalui proses *docking* menunjukkan nilai *binding affinity* sebesar -34,23 kkal/mol dengan *binding site* seperti yang ditunjuk pada lingkaran merah.

Nilai *binding affinity* didapatkan setelah melalui proses *docking* oleh server Patchdock dan Firedock. Nilai ini menggambarkan kekuatan energi ikatan antar molekul yang dipengaruhi oleh berbagai interaksi molekuler yang memberikan kontribusi pada nilai *binding affinity*. Energi yang lebih rendah (negatif) menunjukkan ikatan yang stabil dan lebih mudah terbentuk, sementara nilai energi yang lebih besar menunjukkan bahwa kompleks yang terbentuk kurang stabil (Yunta, 2016). Suatu *binding affinity* dikatakan stabil ikatannya apabila nilai *binding affinity* $< -6,0$ kkal/mol (Shityakov *et al*, 2014).



Gambar 5.7 Hasil identifikasi asam amino yang berikatan pada kompleks *Lysenin* dengan K-ras *wild-type*. Identifikasi ini merupakan gambaran dua dimensi asam amino yang terlibat beserta jenis ikatan pada kompleks *lysenin* dengan K-ras menggunakan aplikasi LigPlot, dimana ikatan hidrogen ditandai dengan garis putus-putus berwarna hijau dan hidrofobik yang berbentuk seperti kipas. Asam amino berwarna merah muda adalah milik *lysenin*, sedangkan asam amino berwarna cokelat adalah milik K-ras.



Tabel 5.4 Analisis Kompleks Ikatan *Lysenin* dengan K-ras *wild-type*

Asam Amino <i>Lysenin</i>	Asam Amino K-ras	Tipe Interaksi	Asam Amino <i>Lysenin</i>	Asam Amino K-ras	Tipe Interaksi
Ser 246	Asp 55	Hidrogen	Asp 117	Asp 78	Hidrofobik
Ser 61	Asp 55	Hidrogen	Asp 117	Lys 74	Hidrofobik
Thr 62	Asp 55	Hidrogen	Asp 122	Lys 74	Hidrofobik
Ser 246	Asp 55	Hidrofobik	Ala 116	Lys 74	Hidrofobik
Ser 61	Asp 55	Hidrofobik	Asn 115	Lys 74	Hidrofobik
Lys 17	Thr 73	Hidrofobik	Glu 124	Lys 74	Hidrofobik
Thr 62	Thr 53	Hidrofobik	Val 15	Glu 77	Hidrofobik
Thr 53	Thr 53	Hidrogen	Ser 55	Gln 85	Hidrofobik
Thr 53	Lys 16	Hidrofobik	His 54	Gln 85	Hidrofobik
Thr 53	Gly 10	Hidrofobik	His 54	Tyr 82	Hidrofobik
Thr 53	Ala 54	Hidrofobik	His 54	His 81	Hidrogen
Ala 52	Ala 54	Hidrofobik	Val 13	His 81	Hidrofobik
Thr 51	Ala 54	Hidrofobik			

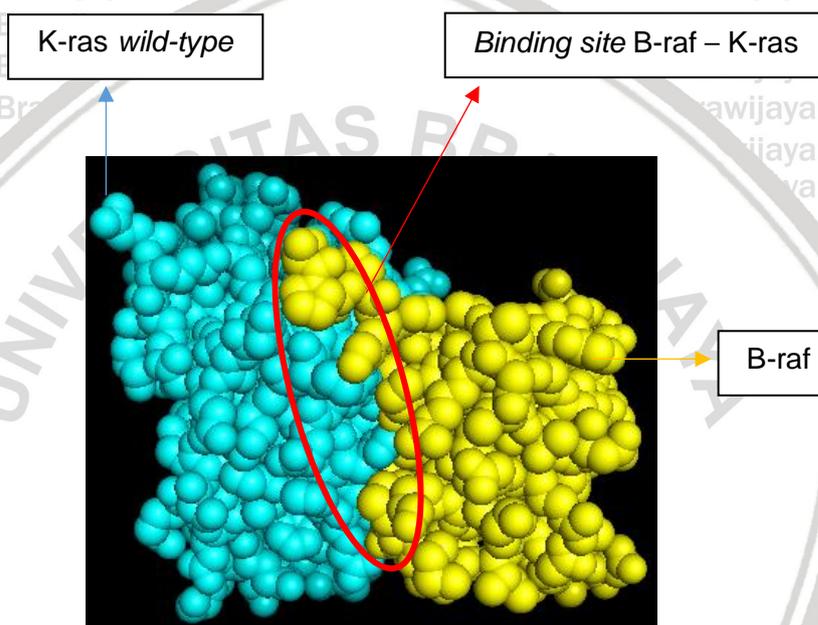
Pada kompleks *lysenin* dengan K-ras *wild-type* diketahui terbentuk sebanyak 25 ikatan yang terdiri dari 5 ikatan hidrogen dan 20 hidrofobik.

Ikatan ini menunjukkan interaksi antar asam amino yang terjadi pada sisi molekul yang berikatan. Keduanya adalah interaksi molekul yang mempengaruhi afinitas ikatan dimana hidrofobik merupakan ikatan yang lebih stabil daripada ikatan hidrogen (Garrett dan Grisham, 2013).

Berdasarkan *docking* yang telah dilakukan pada molekul B-raf dengan K-ras *wild-type*, diperoleh nilai *binding affinity* sebesar -14,34 kkal/mol.

Kompleks ini kemudian divisualisasi menggunakan aplikasi PyMOL,

sehingga dapat dilihat ikatan pada kedua molekul dengan bentuk tiga dimensi (Gambar 5.8). Selanjutnya, untuk mendapatkan data asam amino dan jenis ikatan yang terlibat pada kompleks tersebut, menggunakan aplikasi LigPlot dapat dilihat ikatan antar asam amino pada kedua molekul (Gambar 5.9) dengan rincian seperti pada Tabel 5.5.

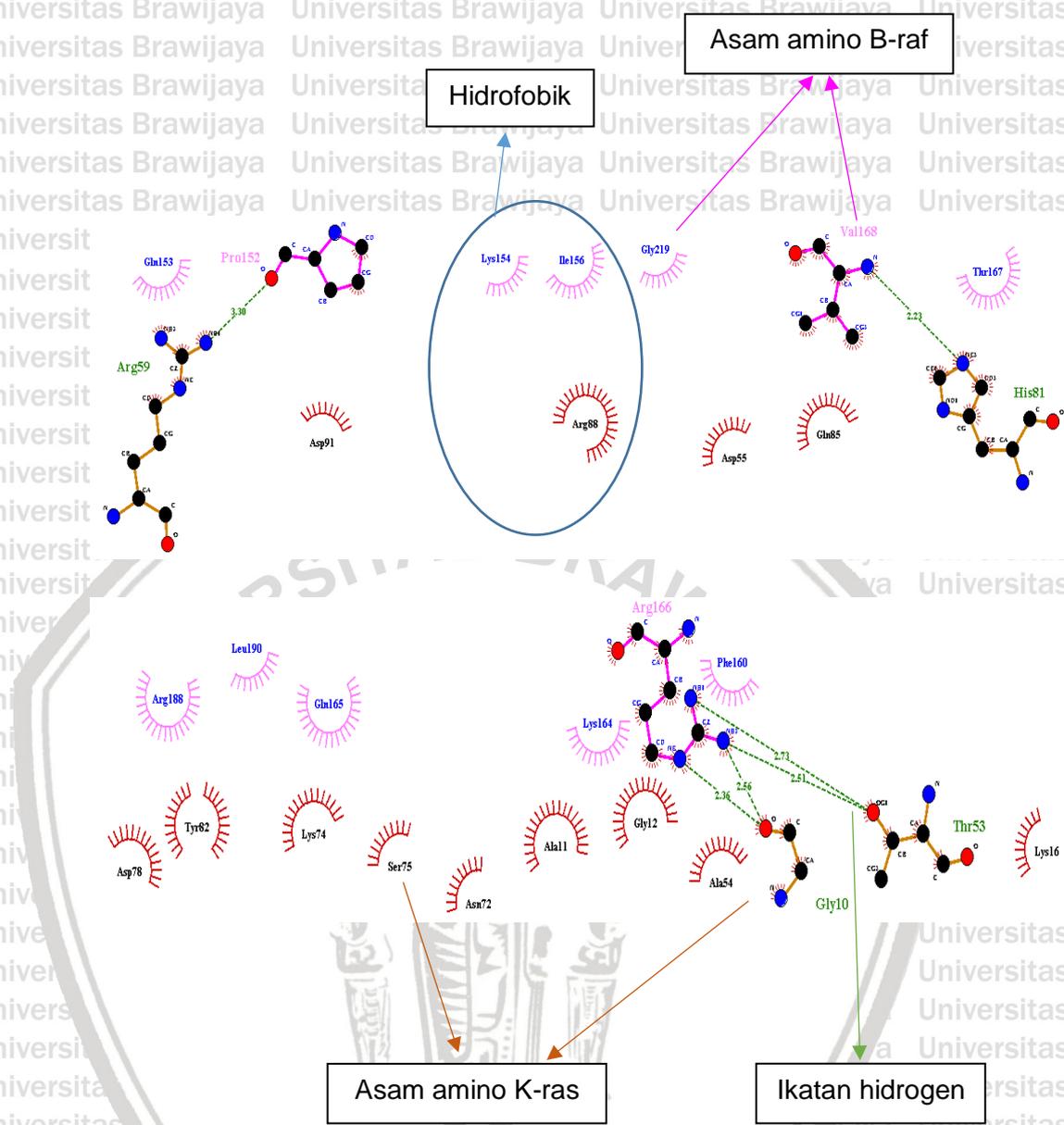


Gambar 5.8 Visualisasi kompleks ikatan B-raf dengan K-ras *wild-type*.

Gambaran tiga dimensi kompleks B-raf (kuning) dengan K-ras (biru) pada aplikasi PyMOL setelah melalui proses *docking* menunjukkan nilai *binding affinity* sebesar $-14,34$ kkal/mol dengan *binding site* seperti yang ditunjuk pada lingkaran merah.

Nilai *binding affinity* didapatkan setelah melalui proses *docking* oleh server Patchdock dan Firedock. Nilai ini menggambarkan kekuatan energi ikatan antar molekul yang dipengaruhi oleh berbagai interaksi molekuler yang memberikan kontribusi pada nilai *binding affinity*. Energi yang lebih rendah (negatif) menunjukkan ikatan yang stabil dan lebih mudah terbentuk.

Suatu *binding affinity* dikatakan stabil ikatannya apabila nilai *binding affinity* $< -6,0$ kkal/mol (Yunta, 2016; Shityakov *et al*, 2014).



Gambar 5.9 Hasil identifikasi asam amino yang berikatan pada kompleks B-raf dengan K-ras *wild-type*. Identifikasi ini merupakan gambaran dua dimensi asam amino yang terlibat beserta jenis ikatan pada kompleks B-raf dengan K-ras menggunakan aplikasi LigPlot, dimana ikatan hidrogen ditandai dengan garis putus-putus berwarna hijau dan hidrofobik yang berbentuk seperti kipas. Asam amino berwarna merah muda adalah milik B-raf, sedangkan asam amino berwarna coklat adalah milik K-ras.



Tabel 5.5 Analisis Kompleks Ikatan B-raf dengan K-ras *wild-type*

Asam Amino B-raf	Asam Amino K-ras	Tipe Interaksi	Asam Amino B-raf	Asam Amino K-ras	Tipe Interaksi
Gln 153	Arg 59	Hidrofobik	Leu 190	Lys 74	Hidrofobik
Pro 152	Arg 59	Hidrogen	Gln 165	Ser 75	Hidrofobik
Pro 152	Asp 91	Hidrofobik	Gln 165	Asn 72	Hidrofobik
Lys 154	Arg 88	Hidrofobik	Lys 164	Ala 11	Hidrofobik
Ile 156	Arg 88	Hidrofobik	Lys 164	Gly 12	Hidrofobik
Gly 219	Asp 55	Hidrofobik	Phe 160	Gly 12	Hidrofobik
Val 168	Gln 85	Hidrofobik	Phe 160	Ala 54	Hidrofobik
Val 168	His 81	Hidrogen	Arg 166	Gly 10	Hidrogen
Thr 167	His 81	Hidrofobik	Arg 166	Thr 53	Hidrogen
Arg 188	Asp 78	Hidrofobik	Arg 166	Lys 16	Hidrofobik
Thr 167	Tyr 82	Hidrofobik			

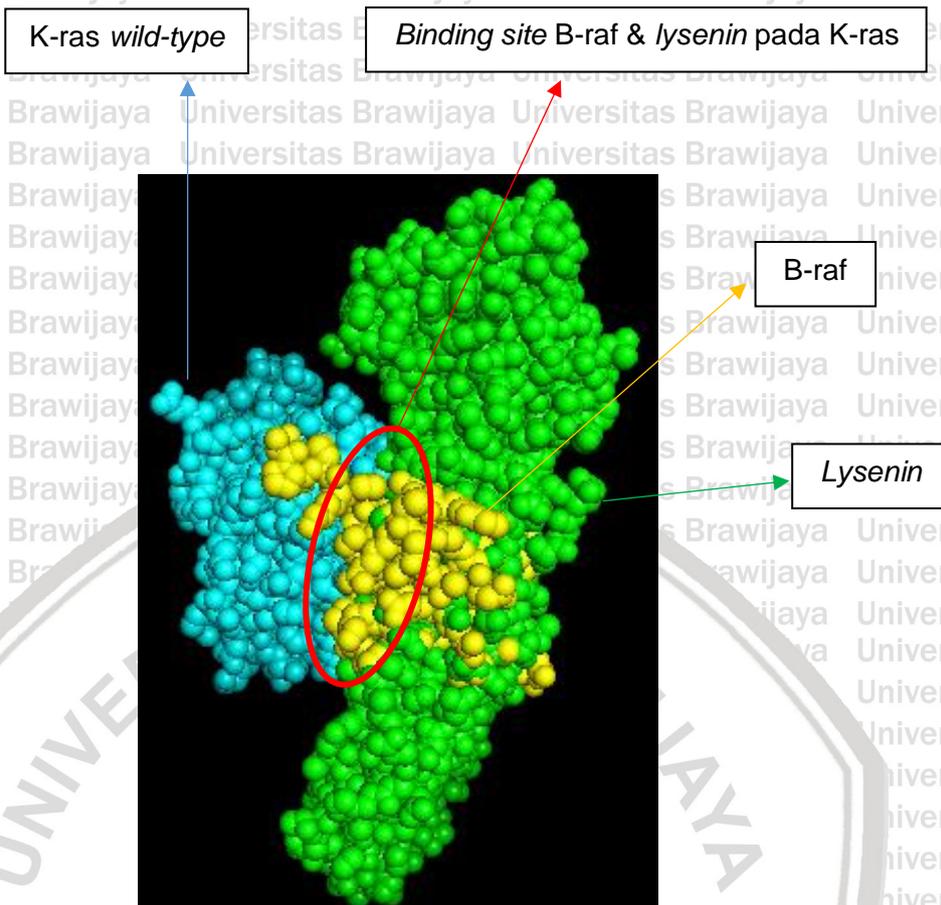
Pada kompleks B-raf dengan K-ras *wild-type* diketahui terbentuk sebanyak 22 ikatan yang terdiri dari 4 ikatan hidrogen dan 18 hidrofobik. Ikatan ini menunjukkan interaksi antar asam amino yang terjadi pada sisi molekul yang berikatan. Keduanya adalah interaksi molekul yang mempengaruhi afinitas ikatan dimana hidrofobik merupakan ikatan yang lebih stabil daripada ikatan hidrogen (Garrett dan Grisham, 2013). Setelah mendapat hasil *docking* K-ras dengan B-raf maupun dengan *lysenin*, dapat dilakukan perbandingan *binding affinity* serta perbandingan asam amino K-ras yang terlibat pada kompleks tersebut seperti pada Tabel 5.6.

Tabel 5.6 Perbandingan Kompleks Ikatan K-ras *wild-type* dengan Ligan

Kompleks Ikatan	<i>Binding Affinity</i> (kcal/mol)	Asam Amino K-ras yang Terlibat
K-ras dengan <i>Lysenin</i>	-34,23	Asp 55, Thr 73, Thr 53, Lys 16, Gly 10, Ala 54, Asp 78, Lys 74, Glu 77, Gln 85, Tyr 82, His 81
K-ras dengan B-raf	-14,34	Arg 59, Asp 91, Arg 88, Asp 55, Gln 85, His 81, Asp 78, Tyr 82, Lys 74, Ser 75, Asn 72, Ala 11, Gly 12, Ala 54, Gly 10, Thr 53, Lys 16

Berdasarkan data pada Tabel 5.6, diketahui terdapat 10 asam amino K-ras yang sama, terlibat baik pada kompleks ikatan dengan *lysenin* maupun B-raf, yaitu Asp 55, Gln 85, His 81, Asp 78, Tyr 82, Lys 74, Ala 54, Gly 10, Thr 53, Lys 16. Hal ini menunjukkan bahwa *lysenin* dapat berikatan dengan K-ras pada daerah yang sama seperti ikatan B-raf dengan K-ras, dengan harapan *lysenin* dapat menghambat terjadinya ikatan antara B-raf dengan K-ras. Untuk membuktikan bahwa ikatan kedua ligan terjadi pada daerah protein K-ras yang sama, dilakukan visualisasi pada program PyMOL secara bersamaan antara hasil *docking lysenin* dengan K-ras serta hasil *docking* B-raf dengan K-ras (Gambar 5.10). Berdasarkan nilai *binding affinity*, ikatan antara K-ras dengan *lysenin* maupun dengan B-raf termasuk ikatan yang stabil dan mengikat karena melampaui <-6 kkal/mol, namun ikatan antara K-ras dengan *lysenin* lebih negatif daripada ikatan antara K-ras dengan B-raf yang berarti bahwa *lysenin* dapat berikatan dengan K-ras lebih mudah dan lebih stabil dibandingkan dengan ligan kontrol yaitu B-raf.





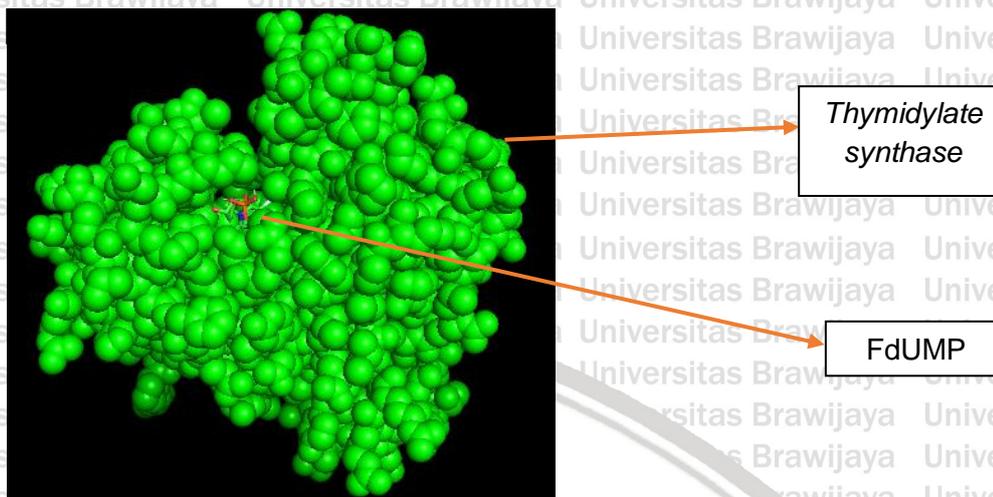
Gambar 5.10 Visualisasi kompleks ikatan K-ras *wild-type* dengan *lysenin* dan **B-raf**. Gambaran tiga dimensi kompleks B-raf (kuning) dengan K-ras (biru) dan kompleks *lysenin* (hijau) dengan K-ras (biru) pada aplikasi PyMOL menunjukkan bahwa keduanya dapat terjadi pada daerah protein K-ras yang sama, sehingga *lysenin* berpotensi mampu menghambat terjadinya ikatan B-raf pada K-ras.

5.2 Hasil Docking FdUMP dengan *Thymidylate Synthase*

Perlakuan kombinasi obat kemoterapi 5-FU dengan cairan *coelomic* dari cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) diketahui dapat meningkatkan efek anti-proliferasi dan meningkatkan apoptosis pada sel kanker kolorektal (Permana *et al*, 2018). Obat ini memiliki metabolit aktif yaitu fluorodeoksiuridilat (FdUMP) yang menghambat kerja enzim *thymidylate synthase*, membuat defisiensi timin yang diperlukan untuk sintesis DNA, akibatnya timbul ketidakseimbangan pertumbuhan dan menyebabkan

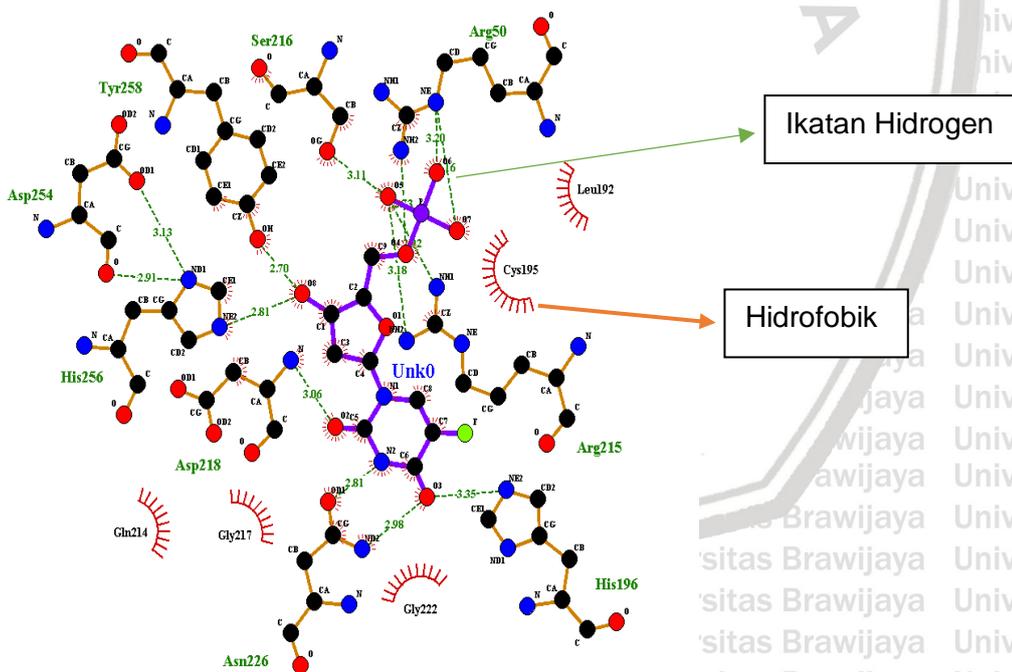
kematian sel (Wolpin dan Mayer, 2008). Selain mengetahui secara molekuler senyawa bioaktif yang terdapat pada cairan *coelomic* yaitu *lysenin*, pada penelitian ini juga akan diketahui secara molekuler metabolit aktif dari obat kemoterapi 5-FU. Oleh karena itu, dilakukan *docking* molekul FdUMP yang merupakan metabolit aktif 5-FU dengan target obat yaitu *thymidylate synthase*. *Docking* dilakukan menggunakan aplikasi PyRx, kemudian untuk visualisasi molekul menggunakan aplikasi PyMOL, serta menggunakan aplikasi LigPlot untuk mengetahui asam amino dan jenis ikatan yang terlibat.

Berdasarkan *docking* yang telah dilakukan antara FdUMP dengan *thymidylate synthase* diperoleh nilai *binding affinity* sebesar -8,0 kkal/mol, kemudian kompleks ini divisualisasi menggunakan aplikasi PyMOL (Gambar 5.11). Selanjutnya, kompleks ikatan tersebut dianalisis menggunakan aplikasi LigPlot untuk mendapatkan data asam amino dan jenis ikatan yang terlibat, pada kompleks ini diketahui terbentuk 18 ikatan yang terdiri dari 13 ikatan hidrogen dan 5 hidrofobik. Asam amino yang terlibat pada ikatan FdUMP dengan *thymidylate synthase* adalah: Ser 216, Tyr 258, Asp 254, His 256, Gln 214, Asp 218, Gly 217, Asn 226, Gly 222, His 196, Arg 215, Cys 195, Leu 192 dan Arg 50 (Gambar 5.12).



Gambar 5.11 Visualisasi kompleks ikatan FdUMP dengan *thymidylate synthase*.

Gambaran tiga dimensi ikatan antara FdUMP dengan *thymidylate synthase* terletak pada sisi cekung yang sama seperti ligan kontrol yaitu UMP pada aplikasi PyMOL setelah melalui proses *docking* menunjukkan nilai *binding affinity* -8,0 kkal/mol.

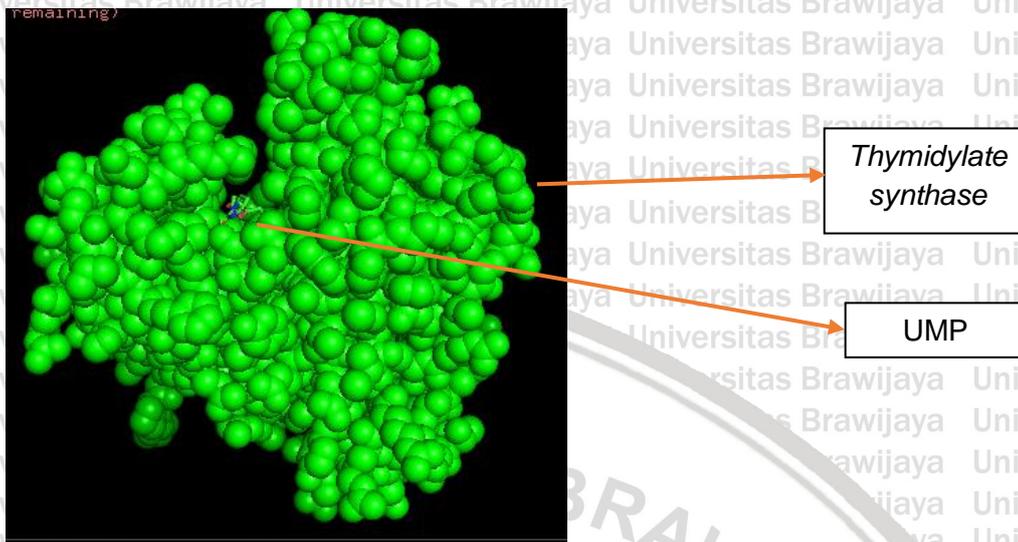


Gambar 5.12 Hasil identifikasi ikatan yang terdapat pada kompleks FdUMP

dengan *thymidylate synthase*. Identifikasi ini merupakan gambaran dua dimensi ikatan yang terbentuk antara FdUMP (molekul berwarna ungu) dengan asam amino milik *thymidylate synthase* pada aplikasi LigPlot, dimana ikatan hidrogen ditandai dengan garis putus-putus berwarna hijau dan hidrofobik yang berbentuk seperti kipas.

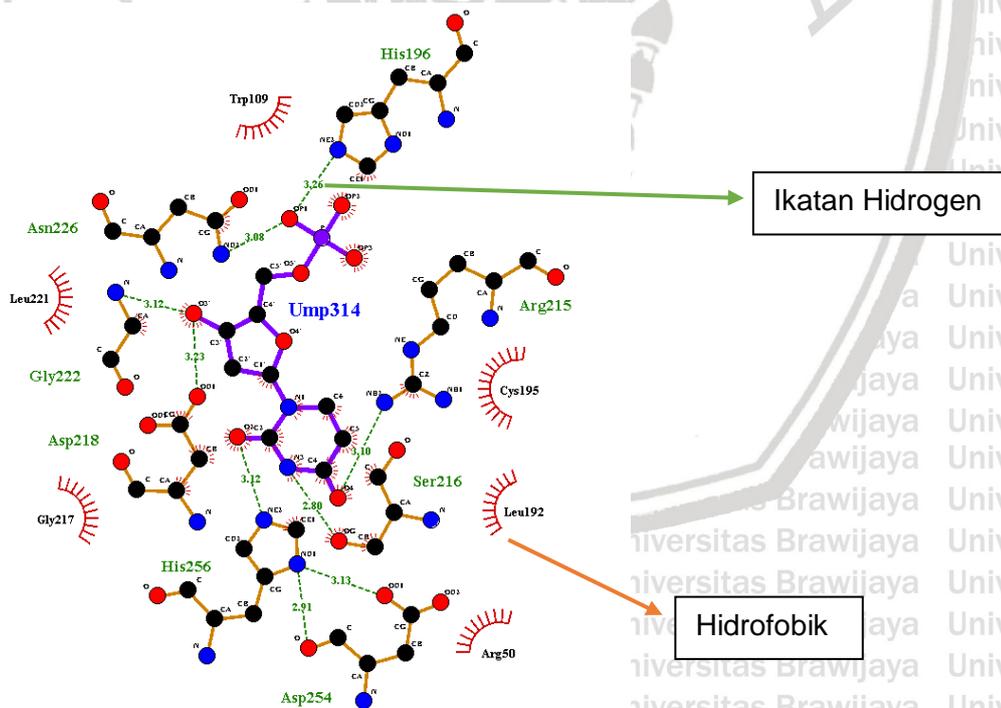
Thymidylate synthase diketahui berikatan dengan suatu ligan yaitu *uridine monophosphate* (UMP) untuk kemudian diubah menjadi *thymidine monophosphate* (TMP) yang diperlukan untuk sintesis DNA (Longley *et al*, 2003). Peran FdUMP sebagai *inhibitor* dari *thymidylate synthase* dapat diketahui melalui membandingkan kompleks tersebut dengan kompleks UMP – *thymidylate synthase*, yaitu dilihat perbedaan nilai *binding affinity*, serta asam amino yang berinteraksi. Oleh karena itu, dilakukan *docking* antara molekul UMP dengan *thymidylate synthase*. *Docking* menggunakan aplikasi PyRx, kemudian untuk visualisasi molekul menggunakan aplikasi PyMOL, serta menggunakan aplikasi LigPlot untuk mengetahui asam amino dan jenis ikatan yang terlibat.

Berdasarkan *docking* yang telah dilakukan antara UMP dengan *thymidylate synthase* diperoleh nilai *binding affinity* sebesar -7,6 kkal/mol, kemudian kompleks ini divisualisasi menggunakan aplikasi PyMOL (Gambar 5.13). Selanjutnya, kompleks ikatan tersebut dianalisis menggunakan aplikasi LigPlot untuk mendapatkan data asam amino dan jenis ikatan yang terlibat, pada kompleks ini diketahui terbentuk 14 ikatan yang terdiri dari 8 ikatan hidrogen dan 6 hidrofobik. Asam amino yang terlibat pada ikatan UMP dengan *thymidylate synthase* adalah: His 196, Trp 109, Asn 226, Leu 221, Gly 222, Asp 218, Gly 217, His 256, Asp 254, Arg 50, Leu 192, Cys 195, Ser 216 dan Arg 215 (Gambar 5.14).



Gambar 5.13 Visualisasi kompleks ikatan UMP dengan *thymidylate synthase*.

Gambaran tiga dimensi ikatan antara *thymidylate synthase* dengan ligan, yaitu UMP diketahui terletak pada sisi cekung yang sama seperti FdUMP pada aplikasi PyMOL setelah melalui proses *docking* menunjukkan nilai *binding affinity* sebesar -7,6 kkal/mol.



Gambar 5.14 Hasil identifikasi ikatan yang terdapat pada kompleks UMP dengan *thymidylate synthase*. Identifikasi ini merupakan gambaran dua dimensi ikatan yang terbentuk antara UMP (molekul berwarna ungu) dengan asam amino milik *thymidylate synthase* pada aplikasi LigPlot, dimana ikatan hidrogen ditandai dengan garis putus-putus berwarna hijau dan hidrofobik berbentuk seperti kipas.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Ikatan *Lysenin* dengan K-ras Mutan

Lysenin merupakan molekul bioaktif yang terdapat pada cairan *coelomic* cacing tanah (*Lumbricus rubellus*). *Lysenin* disekresikan dalam bentuk tidak aktif, dan dapat berikatan spesifik dengan *sphingomyelin* pada membran sel eukariotik. Setelah berikatan, *lysenin* mengalami perubahan signifikan pada strukturnya untuk menjadi aktif dan masuk melalui membran sel. *Lysenin* memiliki efek anti-proliferasi pada sel kanker yang perlu diketahui lebih lanjut secara molekuler (Bokori-Brown *et al*, 2016; Permana *et al*, 2019). K-ras adalah protein yang bertindak sebagai penentu sinyal proliferasi sel. Mutasi pada K-ras merupakan peristiwa yang paling sering terjadi dalam patogenesis kanker kolorektal. Adanya mutasi menyebabkan mekanisme inaktivasi protein K-ras terganggu, sehingga protein ini terus-menerus aktif tanpa adanya rangsangan ekstraseluler. Akibatnya, transduksi sinyal proliferasi dapat terus terjadi (Jancik *et al*, 2010). Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan sebagai bentuk pendekatan molekuler dengan menjadikan onkoprotein K-ras sebagai target dan *lysenin* sebagai ligan menggunakan metode *molecular docking*.

Molecular docking atau pertambatan molekul adalah suatu teknik dalam studi *in silico* yang dilakukan untuk mengetahui interaksi yang terjadi pada suatu kompleks molekul. *Docking* dilakukan dengan mengikatkan ligan pada sisi aktif dari molekul target yang diketahui merupakan tempat berikatan

dengan suatu ligan kontrol. Harapannya, ligan yang digunakan dapat berikatan pada sisi yang sama dengan ligan kontrol sehingga dapat dilakukan perbandingan nilai *binding affinity* untuk mengetahui potensi ikatan dari ligan terhadap target (Chaudhary dan Mishra, 2016).

Molekul onkoprotein K-ras sebagai target pada penelitian ini diketahui berada dalam bentuk aktif saat berikatan dengan GTP dan dalam bentuk tidak aktif saat berikatan dengan GDP. Pada K-ras aktif, daerah P-loop (asam amino 10–16), Switch 1 (asam amino 30–38), dan Switch 2 (asam amino 59–67) merupakan sisi aktif yang memungkinkan pengikatan protein efektor untuk melanjutkan transduksi sinyal (Jancik *et al*, 2010). Protein efektor tersebut adalah B-raf, yang berikatan dengan K-ras untuk dapat berubah menjadi bentuk aktif sehingga mampu mengaktivasi protein selanjutnya dalam jalur proliferasi. Daerah RBD (*Ras Binding Domain*) pada B-raf diketahui berikatan dengan sisi aktif K-ras (Aramini *et al*, 2015), sehingga molekul ini digunakan sebagai ligan kontrol.

Hasil *docking* antara *lysenin* dengan K-ras mutan menunjukkan bahwa *lysenin* dapat berikatan pada sisi aktif K-ras dengan nilai *binding affinity* sebesar -25,06 kkal/mol, sedangkan hasil *docking* antara ligan kontrol B-raf dengan K-ras mutan memiliki nilai *binding affinity* sebesar -11,80 kkal/mol. *Binding affinity* atau afinitas ikatan adalah kekuatan energi interaksi antara molekul ligan dengan molekul target. Energi yang lebih rendah (negatif) menunjukkan ikatan yang stabil dan lebih mudah terbentuk (Mukesh dan Rakesh, 2011; Yunta, 2016). Suatu *binding affinity* dikatakan stabil ikatannya apabila nilai *binding affinity* < -6,0 kkal/mol (Shityakov *et al*, 2014), maka dapat dikatakan bahwa ikatan *lysenin* dengan K-ras maupun ikatan B-

raf dengan K-ras mampu menciptakan ikatan yang stabil karena melampaui nilai tersebut. Namun, nilai *binding affinity* pada ikatan K-ras dengan *lysenin* lebih negatif dibandingkan dengan ligan kontrol B-raf, yang artinya kompleks ikatan dengan *lysenin* lebih mudah terbentuk dan lebih stabil.

Nilai *binding affinity* suatu kompleks ikatan dipengaruhi oleh jumlah interaksi yang terbentuk antara ligan dan target. Semakin banyak jumlah interaksi maka nilai *binding affinity* akan semakin negatif yang menandakan ikatan tersebut semakin stabil (Chaudhary dan Mishra, 2016). Pada hasil visualisasi asam amino yang berinteraksi pada kompleks *lysenin* dengan K-ras mutan terdapat 32 interaksi yang terdiri dari 4 ikatan hidrogen dan 28 hidrofobik. Sedangkan pada kompleks B-raf dengan K-ras terdapat 26 interaksi yang terdiri dari 2 ikatan hidrogen dan 24 hidrofobik. Ikatan hidrogen dihasilkan dari suatu interaksi antara atom hidrogen yang terikat pada atom elektronegatif (seperti O, N, atau S) dengan atom elektronegatif lain. Sementara hidrofobik merupakan hasil dari suatu gaya yang mendorong terjadinya asosiasi antara residu hidrofobik untuk mengurangi kontakannya dengan air, interaksi ini sangat berperan untuk kestabilan ikatan (Garrett dan Grisham, 2013). Adanya jumlah interaksi yang lebih banyak pada kompleks K-ras dengan *lysenin* dibandingkan jumlah interaksi pada kompleks dengan B-raf mendukung hasil *binding affinity* yang lebih negatif pada kompleks K-ras dengan *lysenin*.

Pada hasil visualisasi interaksi hidrofobik maupun hidrogen juga dapat dilihat asam amino K-ras yang terlibat pada interaksi tersebut dalam membentuk kompleks dengan *lysenin*, yaitu: Ala 57, Gln 59, Ser 111, Asn 74, Leu 109, Lys 77, Asp 81, Asp 58, Tyr 85, Arg 91, Gln 88, His 84, Asp 30, Glu

31, Tyr 32, Pro 34, Ala 12, Gly 13. Di antara asam amino ini terdapat Gln 59, Asp 30, Glu 31, Tyr 32, Pro 34, Ala 12, dan Gly 13 yang sesuai teori termasuk pada daerah sisi aktif K-ras. Hal ini mendukung hasil *docking lysenin* dengan K-ras yang menunjukkan bahwa *lysenin* dapat berikatan pada sisi aktif K-ras dengan nilai *binding affinity* yang stabil. Sedangkan asam amino K-ras yang terlibat pada kompleks ikatan dengan ligan kontrol B-raf adalah: Gln 59, Asp 58, Asp 36, Arg 91, Glu 87, Gln 88, His 84, Tyr 32, Pro 34, Ala 11, Ala 12, Tyr 85, Asp 81, Lys 77, Ala 57, Tyr 60, Glu 35. Di antara 17 asam amino ini, terdapat 12 asam amino yang juga terlibat pada kompleks ikatan dengan *lysenin*, yaitu Gln 59, Asp 58, Arg 91, Gln 88, His 84, Tyr 32, Pro 34, Ala 12, Tyr 85, Asp 81, Lys 77, Ala 57. Hal ini mendukung hasil *docking* bahwa *lysenin* dapat berikatan dengan K-ras mutan pada daerah yang sama dengan B-raf, ditunjukkan dengan visualisasi tiga dimensi kedua hasil *docking*. Kemampuan *lysenin* untuk berikatan dengan protein K-ras mutan pada sisi pengikatan yang sama dengan B-raf, disertai nilai *binding affinity* yang lebih negatif menunjukkan bahwa *lysenin* berpotensi menghambat terjadinya ikatan B-raf pada protein K-ras mutan.

Hasil *docking* juga menunjukkan bahwa terdapat ikatan antara *lysenin* dengan K-ras *wild-type* yang memiliki nilai *binding affinity* sebesar -34,23 kkal/mol dan jumlah interaksi asam amino sebanyak 25, sedangkan hasil *docking* antara ligan kontrol B-raf dengan K-ras *wild-type* memiliki nilai *binding affinity* sebesar -14,34 kkal/mol dan jumlah interaksi asam amino sebanyak 22. Maka, dapat dikatakan bahwa ikatan K-ras *wild-type* dengan *lysenin* lebih mudah terbentuk dan lebih stabil dibandingkan ikatan dengan ligan kontrol B-raf. Pada hasil visualisasi interaksi hidrofobik maupun

hidrogen juga dapat dilihat asam amino K-ras yang terlibat pada interaksi tersebut dalam membentuk kompleks dengan *lysenin*, yaitu: Asp 55, Thr 73, Thr 53, Lys 16, Gly 10, Ala 54, Asp 78, Lys 74, Glu 77, Gln 85, Tyr 82, His 81. Sedangkan asam amino K-ras yang terlibat pada kompleks ikatan dengan ligan kontrol B-raf adalah: Arg 59, Asp 91, Arg 88, Asp 55, Gln 85, His 81, Asp 78, Tyr 82, Lys 74, Ser 75, Asn 72, Ala 11, Gly 12, Ala 54, Gly 10, Thr 53, Lys 16. Di antara 17 asam amino ini, terdapat 10 asam amino yang juga terlibat pada kompleks ikatan dengan *lysenin*, yaitu Asp 55, Gln 85, His 81, Asp 78, Tyr 82, Lys 74, Ala 54, Gly 10, Thr 53, Lys 16. Hal ini mendukung hasil *docking* bahwa *lysenin* dapat berikatan dengan K-ras *wild-type* pada daerah yang sama dengan B-raf, ditunjukkan dengan visualisasi tiga dimensi kedua hasil *docking*.

Berdasarkan hasil *docking* juga diketahui nilai *binding affinity* B-raf dengan K-ras mutan adalah -11,80 kkal/mol, sedangkan B-raf dengan K-ras *wild-type* adalah -14,34 kkal/mol. Hal ini sesuai dengan penelitian yang menyatakan bahwa tidak terdapat perbedaan afinitas yang berarti pada ikatan protein K-ras mutan maupun *wild-type* terhadap B-raf. Perbedaan antara K-ras mutan dan *wild-type* terletak pada kemampuan protein K-ras untuk melakukan inaktivasi. K-ras *wild-type* memiliki kemampuan inaktivasi yang sangat cepat, sehingga protein K-ras bentuk aktif pada sel normal yang tidak terdapat mutasi K-ras sedikit ditemukan. Sedangkan pada K-ras mutan dapat terjadi gagal inaktivasi, akibatnya protein K-ras terus berada dalam bentuk aktif dan dapat terus berinteraksi dengan B-raf untuk melanjutkan transduksi sinyal proliferasi yang membuat terjadinya proliferasi berlebihan

pada sel kanker (Hunter *et al*, 2015). Oleh karena itu, penelitian ini berfokus pada molekul protein K-ras mutan untuk dijadikan target terapi.

Berdasarkan hasil dan pembahasan penelitian, disimpulkan bahwa *lysenin* dapat berikatan dengan K-ras mutan pada sisi aktif yaitu sisi pengikatan yang sama dengan ligan kontrol B-raf, harapannya *lysenin* dapat menghambat terjadinya ikatan antara B-raf dan K-ras mutan. Nilai *binding affinity* yang lebih negatif pada kompleks *lysenin* dengan K-ras dibandingkan dengan B-raf menunjukkan ikatan yang lebih mudah terbentuk dan lebih stabil, sehingga *lysenin* memiliki potensi untuk menghambat ikatan B-raf pada K-ras. Tidak terjadinya ikatan B-raf dengan K-ras mutan dapat membuat B-raf tetap berada dalam bentuk tidak aktif, sehingga tidak dapat melanjutkan transduksi sinyal proliferasi. Akibatnya, aktivitas proliferasi sel dapat menurun, hal ini mendukung penelitian yang menyatakan *lysenin* memiliki efek anti-proliferasi pada sel kanker (Permana *et al*, 2019).

6.2 Ikatan FdUMP dengan *Thymidylate Synthase*

5-FU merupakan obat yang berperan pada terapi kombinasi dengan cairan *coelomic* yang diketahui terjadi peningkatan efek anti-proliferasi pada sel kanker kolorektal (Permana *et al*, 2018). Selain mengetahui secara molekuler senyawa bioaktif yang terdapat pada cairan *coelomic* yaitu *lysenin*, pada penelitian ini juga akan diketahui secara molekuler metabolit aktif dari obat kemoterapi utama 5-FU, yaitu FdUMP (fluorodeoksiuridilat). FdUMP menghambat replikasi DNA melalui berikatan dengan *thymidylate synthase*, yaitu enzim yang mengkatalisis konversi *uridine monophosphate* (UMP) menjadi *thymidine monophosphate* (TMP) untuk replikasi dan

perbaikan DNA (Longley *et al*, 2007). Penurunan TMP mengakibatkan penurunan *thymidine triphosphate* (TTP) yang memicu perubahan level berbagai deoksinukleotida (dATP, dTTP, dan dCTP). Adanya ketidakseimbangan dari deoksinukleotida menghasilkan gangguan berat pada penyembuhan dan sintesis DNA yang menyebabkan kerusakan DNA dan mengarah pada kematian sel (Chua *et al*, 2011).

Hasil *docking* FdUMP dengan *thymidylate synthase* diperoleh nilai *binding affinity* sebesar -8,0 kkal/mol. Suatu *binding affinity* dikatakan stabil ikatannya apabila nilai *binding affinity* < -6,0 kkal/mol (Shityakov *et al*, 2014). Maka, dapat dikatakan bahwa terdapat ikatan yang stabil antara FdUMP dengan *thymidylate synthase*. *Thymidylate synthase* diketahui berikatan dengan suatu ligan yaitu *uridine monophosphate* (UMP) untuk kemudian diubah menjadi *thymidine monophosphate* (TMP) yang diperlukan untuk sintesis DNA (Longley *et al*, 2003). Peran FdUMP untuk menghambat *thymidylate synthase* dapat diketahui melalui membandingkan kompleks tersebut dengan kompleks UMP – *thymidylate synthase*, yaitu melalui perbedaan nilai *binding affinity*, serta asam amino yang berinteraksi. Oleh karena itu, dilakukan *docking* antara molekul UMP dengan *thymidylate synthase*. Hasil *docking* UMP dengan *thymidylate synthase* diperoleh nilai *binding affinity* sebesar -7,6 kkal/mol. Maka, juga terdapat ikatan yang stabil antara UMP dengan *thymidylate synthase*. Namun, nilai *binding affinity* pada ikatan FdUMP lebih negatif dibandingkan kompleks dengan UMP, yang artinya kompleks ikatan dengan FdUMP lebih mudah terbentuk dan lebih stabil.

Adapun pada kompleks *thymidylate synthase* dengan FdUMP terbentuk 18 interaksi yang terdiri dari 13 ikatan hidrogen dan 5 hidrofobik.

Sementara pada kompleks dengan UMP terbentuk 14 interaksi yang terdiri dari 8 ikatan hidrogen dan 6 hidrofobik. Adanya jumlah interaksi yang lebih banyak pada kompleks FdUMP mendukung hasil *binding affinity* yang lebih negatif dibandingkan pada kompleks UMP. Asam amino yang terlibat pada ikatan UMP dengan *thymidylate synthase* adalah: His 196, Trp 109, Asn 226, Leu 221, Gly 222, Asp 218, Gly 217, His 256, Asp 254, Arg 50, Leu 192, Cys 195, Ser 216 dan Arg 215. Sedangkan asam amino yang terlibat pada ikatan FdUMP dengan *thymidylate synthase* adalah: Ser 216, Tyr 258, Asp 254, His 256, Gln 214, Asp 218, Gly 217, Asn 226, Gly 222, His 196, Arg 215, Cys 195, Leu 192, dan Arg 50. Terdapat 12 asam amino yang sama antara kompleks UMP - *thymidylate synthase* dengan kompleks FdUMP - *thymidylate synthase*, yaitu: Asn 226, His 196, Ser 216, Arg 50, His 256, Asp 254, Arg 215, Asp 218, Gly 217, Gly 222, Cys 195, dan Leu 192. Persamaan asam amino pada kedua kompleks tersebut membuktikan bahwa FdUMP dapat berikatan pada sisi pengikatan yang sama dengan ligan kontrol UMP, disertai nilai *binding affinity* yang lebih negatif pada ikatan dengan FdUMP, dapat disimpulkan bahwa terbukti FdUMP menghambat *thymidylate synthase*.

6.3 Implikasi Terhadap Bidang Kedokteran

Sebelum uji pre klinis dan klinis perlu dilakukan uji ikatan *in silico* sebagai prediksi untuk dapat mengetahui target terapi secara optimal.

6.4 Keterbatasan Penelitian

Dalam penelitian ini, tidak diteliti lebih lanjut bagaimana ikatan antara ligan dan protein target di dalam keadaan pH, suhu, serta medium yang disesuaikan dengan keadaan di tubuh manusia menggunakan aplikasi YASARA. Hal ini dikarenakan keterbatasan waktu dan fasilitas yang dimiliki oleh peneliti.



BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa *lysenin* dari cairan *coelomic* cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) mampu menjadi agen kokemoterapi 5-FU pada kanker kolorektal melalui ikatan dengan K-ras mutan secara *in silico*. Hal ini dibuktikan melalui:

1. Terdapat ikatan antara *lysenin* dari cairan *coelomic* cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dengan K-ras mutan secara *in silico* dengan *binding affinity* -25,06 kkal/mol, lebih stabil dibandingkan ikatan ligan kontrol B-raf dengan K-ras yang memiliki *binding affinity* -11,80 kkal/mol, pada sisi pengikatan yang sama maka *lysenin* berpotensi menghambat ikatan K-ras dengan B-raf.
2. Terdapat ikatan antara FdUMP sebagai metabolit aktif dari 5-FU dengan *thymidylate synthase* secara *in silico* dengan *binding affinity* -8,0 kkal/mol, lebih stabil dibandingkan ikatan ligan kontrol UMP dengan *thymidylate synthase* yang memiliki *binding affinity* -7,6 kkal/mol.

7.2 Saran

Dari hasil penelitian ini disarankan adanya penelitian *in silico* lebih lanjut menggunakan aplikasi YASARA untuk dapat mengetahui dinamika molekul dari kompleks ikatan.

DAFTAR PUSTAKA

Amersi, F. and Stamos, M. (2004). Palliative care for colorectal cancer. *SurgOncolClin*, 13(3), pp.467.

Andrusier, N., Nussinov, R., & Wolfson, H. J. (2007). FireDock: fast interaction refinement in molecular docking. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 69(1), 139-159.

Aramini, J. M., Vorobiev, S. M., Tuberty, L. M., Janjua, H., Campbell, E. T., Seetharaman, J., ... & Tong, L. (2015). The RAS-binding domain of human BRAF protein serine/threonine kinase exhibits allosteric conformational changes upon binding RAS. *Structure*, 23(8), 1382-1393.

Augustine, D., Rao, R. S., Anbu, J., & Murthy, K. N. (2018). Anticancer Prospects of Earthworm Extracts: A Systematic Review of In vitro and In vivo Studies. *Pharmacognosy Reviews*, 12(23).

Bokori-Brown, M., Martin, T. G., Naylor, C. E., Basak, A. K., Titball, R. W., and Savva, C. G. (2016) 'Cryo-EM structure of lysenin pore elucidates membrane insertion by an aerolysin family protein', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 7, pp. 1–7.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R., Torre, L. and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), pp.394-424.

Campos, F. G., Logullo Waitzberg, A. G., Kiss, D. R., Waitzberg, D. L., Habr-Gama, A., and Gama-Rodrigues, J. (2005). Diet and colorectal cancer: current evidence for etiology and prevention. *Nutricion hospitalaria*, 20(1).

Chaudhary, K. K., & Mishra, N. (2016). A review on molecular docking: novel tool for drug discovery. *databases*, 3(4).

Chua, W., Kho, P. S., Moore, M. M., Charles, K. A., and Clarke, S. J. (2011). Clinical, laboratory and molecular factors predicting chemotherapy efficacy and toxicity in colorectal cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*, 79(3), pp.224-250.

Cooper, E. L., Hrzencak, T. M., and Grdiša, M. (2004). Alternative sources of fibrinolytic, anticoagulative, antimicrobial and anticancer molecules. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 17(3), pp.237-244.

Cooper, E. L., Balamurugan, M., Huang, C. Y., Tsao, C. R., Heredia, J., Tommaso-Ponzetta, M., and Paoletti, M. G. (2012). Earthworms dilong: ancient, inexpensive, noncontroversial models may help clarify approaches to integrated medicine emphasizing neuroimmune systems. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.

Cunningham, D., Atkin, W. and Lenz, H. (2010). *Colorectal Cancer*. Lancet, 375(9719), pp.1030-47.

Dallakyan, S. and Olson, A. (2014). Small-Molecule Library Screening by Docking with PyRx. *Methods in Molecular Biology*, pp.243-250.

Dar, A. M. and Mir, S. (2017) 'Molecular Docking: Approaches, Types, Applications and Basic Challenges', *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*. OMICS International, 08(02), pp. 1–3. doi: 10.4172/2155-9872.1000356.

De Leon, M. P., and Percesepe, A. (2000). Pathogenesis of colorectal cancer. *Digestive and Liver Disease*, 32(9), pp.807-821.

Diaz-Flores, E. and Shannon, K. (2007). Targeting oncogenic Ras. *Genes & Development*, 21(16), pp.1989-1992.

Doubeni, C.A., Laiyemo, A.O., Major, J.M., Schootman, M., Lian, M., Park, Y., Graubard, B.I., Hollenbeck, A.R. and Sinha, R. (2013). Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer: An analysis of more than a half million adults in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *Cancer*, 118(14), pp.3636-3644.

Dudley, J. T. and Butte, A. J. (2010) 'In silico research in the era of cloud computing', *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, 28(11), pp. 1181–1185.

Endharti, A. T., Baskoro, A. D., and Norahmawati, E. (2017). Therapeutic effect of soluble worm protein acting as immune regulatory on colitis. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(1), pp.70-77.

Favoriti, P., Carbone, G., Greco, M., Pirozzi, F., Pirozzi, R. and Corcione, F. (2016). Worldwide burden of colorectal cancer: a review. *Updates in Surgery*, 68(1), pp.7-11.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D., Forman, D. and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), pp.E359-E386.

Ferreira, L. et al. (2015) 'Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies', *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 20(7), pp. 13384–13421. doi: 10.3390/molecules200713384.

Fitzmaurice, C., Allen, C., Barber, R.M., Barregard, L., Bhutta, Z.A., Brenner, H., Dicker, D.J., Chimed-Orchir, O., Dandona, R., Dandona, L. and Fleming, T. (2017). Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015. *JAMA Oncology*, 3(4), pp.524.

Garrett, R., & Grisham, C. M. (2013). Biochemistry. 5th. Belmont, CA: Brooks/Cole Cengage Learning, 38(1169), 48.

Gonciarz, M., Pierzchalski, P., Lorens, K., Pawlik, W., and Petelenz, M. (2004). Genetic aspects of colorectal carcinogenesis. *Wiadomosci lekarskie (Warsaw, Poland: 1960)*, 57(1-2), pp.74-79.

Higginson, I. and Evans, C. (2010). What is the evidence that palliative care teams improve outcomes for cancer patients and their families. *Cancer J*, 16(5), pp.423.

Hua, Z., Wang, Y. H., Cao, H. W., Pu, L. J., and Cui, Y. D. (2011). Purification of a protein from coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida* and evaluation of its hemolytic, antibacterial, and antitumor activities. *Pharmaceutical biology*, 49(3), pp.269-275.

Hunter, J. C., Manandhar, A., Carrasco, M. A., Gurbani, D., Gondi, S., and Westover, K. D. (2015) 'Biochemical and Structural Analysis of Common Cancer-Associated KRAS Mutations', *Molecular Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 13(9), pp. 1325–1335.

Ihle, N. (2012) 'Differential Activity of the KRAS Oncogene by Method of Activation: Implications for Signaling and Therapeutic Intervention', *UT GSBS Dissertations and Theses (Open Access)*. Available at https://digitalcommons.library.tmc.edu/utgsbs_dissertations/314 (Accessed: 6 September 2019).

Jaabir, M. M., Shamsheerli, L., Yasar, M. M. D., and Kumar, S. S. (2011). Evaluation of the cell-free coelomic fluid of the earthworm *Eudrilus euginiae* to induce apoptosis in SiHa cell line. *Journal of Pharmacy Research Vol*, 4(10), pp.3417-3420.

Jančík, S. *et al.* (2010) 'Clinical Relevance of KRAS in Human Cancers', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, pp. 1–13. doi: 10.1155/2010/150960.

Kranenburg, O. (2005). The KRAS oncogene: past, present, and future. *Biochimica et biophysica acta*, 1756(2), pp.81-82.

Kulma, M., Dadlez, M., & Kwiatkowska, K. (2019). Insight into the Structural Dynamics of the Lysenin During Pre-pore-to-Pore Transition Using Hydrogen–Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Toxins*, 11(8), 462.

Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2013). Colonic Polyps and Neoplastic Disease. *Robbins Basic Pathology 9th Ed. Saunders Elsevier*, 593-600.

Laskowski, R. A., & Swindells, M. B. (2011). LigPlot+: multiple ligand–protein interaction diagrams for drug discovery.

Liu, H.C., Chen, G.G., Vlantis, A.C., Leung, B.C.S., Tong, M.C.E. and van Hasselt, C.A. (2006). 5-Fluorouracil Mediates Apoptosis and G1/S Arrest in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma via a p53-Independent Pathway, *The Cancer J*, 12(6), pp.482-493.

- Liu, X., Jakubowski, M. and Hunt, J. (2011). KRAS Gene Mutation in Colorectal Cancer Is Correlated With Increased Proliferation and Spontaneous Apoptosis. *American Journal of Clinical Pathology*, 135(2), pp.245-252.
- Longley, D.B. and Johnston, P.G. (2007). 5-Fluorouracil Molecular Mechanisms of Cell Death in Srivastava R., *Apoptosis, Cell Signaling, and Human Diseases*, Humana Press.
- McCormick, F. (2016). K-Ras protein as a drug target. *Journal of molecular medicine*, 94(3), 253-258.
- Meiyanto, E., Hermawan, A., & Anindyajati, A. (2012). Natural products for cancer-targeted therapy: citrus flavonoids as potent chemopreventive agents. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(2), 427-436.
- Meng, X.-Y. et al. (2011) 'Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery', *Current Computer Aided-Drug Design*, 7(2), pp. 146–157. doi: 10.2174/157340911795677602.
- Morcaldi, G., Bellini, T., Rossi, C., Maghnie, M., Boccardo, F., Bonioli, E., & Bellini, C. (2015) 'Lymphodysplasia and kras mutation: a case report and literature review', *Lymphology*, 48(3), pp.121-127.
- Mukesh, B., & Rakesh, K. (2011). Molecular docking: a review. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy*, 2(6), 1746-1751.
- Nandan, M. O., and Yang, V. W. (2011). An update on the biology of RAS mutations in colorectal cancer. *Current colorectal cancer reports*, 7(2), pp.113-120.
- Narayan, S., and Roy, D. (2003). Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol. Cancer.*, 2, pp.41-55.
- Permana, S., Pearlindah, Z. S., Iskandar, A., Susanti, H., and Endharti, A. T. (2018). Cytotoxic effects and anti-proliferative cancer activity of coelomic fluid from *Lumbricus rubellus* promotes apoptosis and reduces G2/M phase progression in HT-29 cells. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(11), pp.028-034.
- Permana, S., Hadi, R. P., Norahmawati, E., and Endharti, A. T. (2019). Coelomic fluid of *Lumbricus rubellus* enhances anti-proliferative effect of 5-fluorouracil by modulating focal adhesion kinase express and IL-1 β of colorectal cancer in mice. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 9(8), pp. 41–46.
- Pourhoseingholi, M. (2012). Increased burden of colorectal cancer in Asia. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 4(4), pp.68.
- Redondo-Blanco, S., Fernández, J., Gutiérrez-del-Río, I., Villar, C. J., and Lombó, F. (2017). New insights toward colorectal cancer chemotherapy using natural bioactive compounds. *Frontiers in pharmacology*, 8, pp.109.

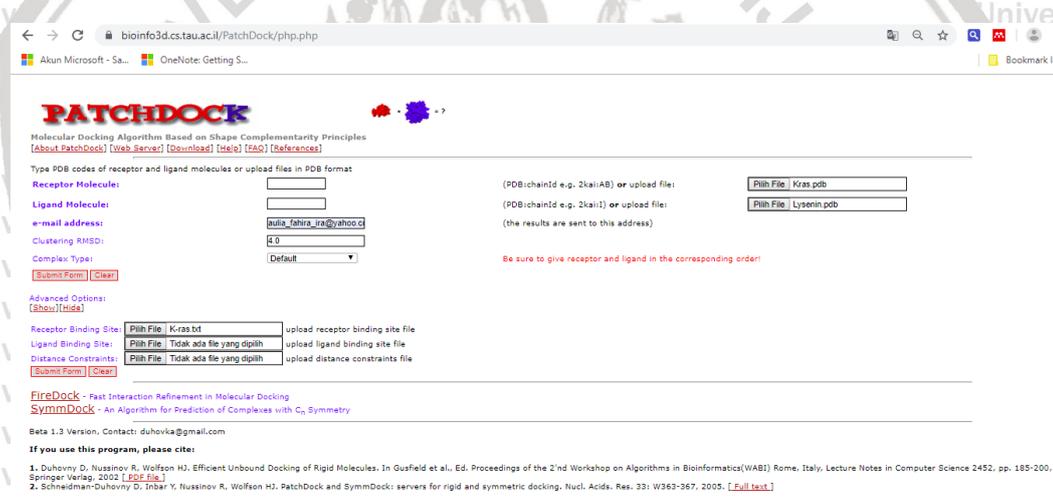
- Schneidman-Duhovny, D., Inbar, Y., Nussinov, R., & Wolfson, H. J. (2005). PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic acids research*, 33(suppl_2), W363-W367.
- Sechi, P. (2013). *An evolutionary history of the peregrine epigeic earthworm Lumbricus rubellus* (Doctoral dissertation, Cardiff University).
- Shityakov, S. and Förster, C. (2014) 'In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood-brain barrier choline transporter.', *Advances and applications in bioinformatics and chemistry: AABC*. Dove Press, 7, pp. 23–36. doi: 10.2147/AABC.S63749.
- Stein, A., Atanackovic, D., and Bokemeyer, C. (2011). Current standards and new trends in the primary treatment of colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, 47, pp.S312-S314.
- Ventura, B. et al. (2006) 'From in vivo to in silico biology and back', *Nature*. Nature Publishing Group, 443(7111), pp. 527–533. doi: 10.1038/nature05127.
- Wasserberg, N. and Kauffman, H. (2007). Palliation of colorectal cancer. *SurgOncol*, 16(4), pp.299-310.
- Wolpin, B. M. and Mayer, R. J. (2009) 'Systemic Treatment of Colorectal Cancer', *Gastroenterology*. Elsevier, 134(5), pp. 1296-1310.e1.
- Yunta, M. J. (2016). Docking and ligand binding affinity: uses and pitfalls. *Am. J. Model. Optim*, 4, pp.74-114.
- Zhang, Y., Yuan, F., Presnell, S. R., Tian, K., Gao, Y., Tomkinson, A. E., and Li, G. M. (2005). Reconstitution of 5'-directed human mismatch repair in a purified system. *Cell*, 122(5), pp.693-705.

LAMPIRAN

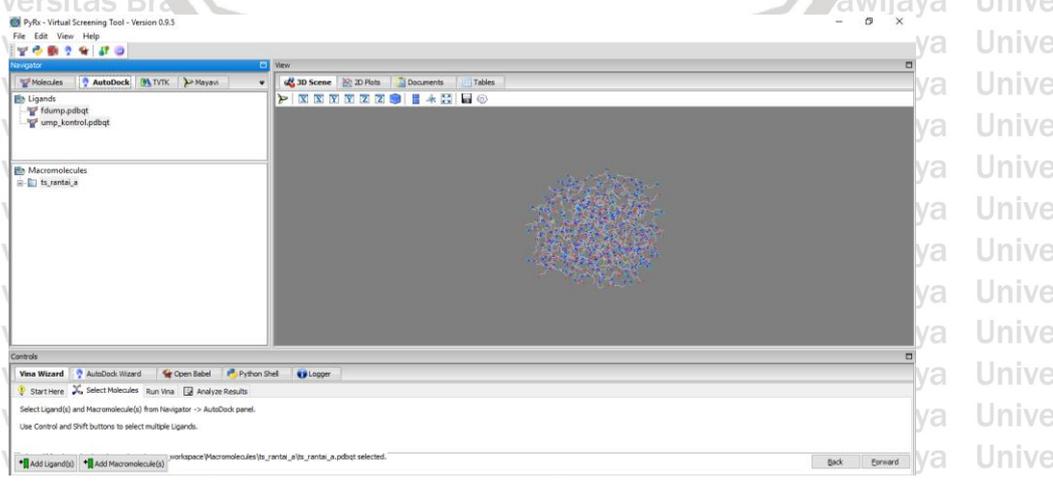
Lampiran 1. Tampilan situs *database* Protein Data Bank (PDB) dan PubChem.



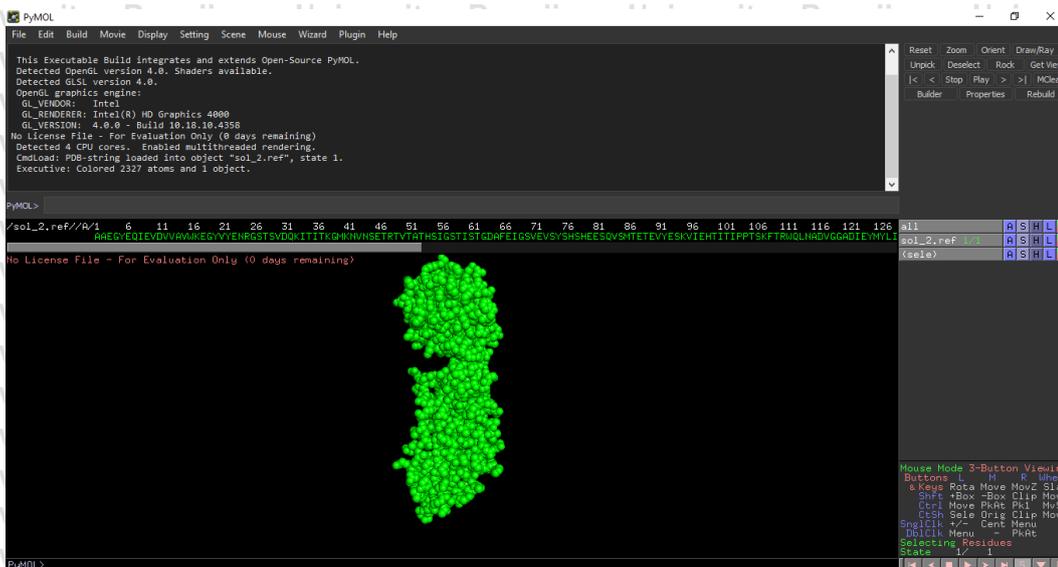
Lampiran 2. Tampilan server PatchDock untuk *docking* protein-protein.



Lampiran 3. Tampilan aplikasi PyRx untuk *docking* ligan-protein.



Lampiran 4. Tampilan aplikasi PyMOL untuk visualisasi molekuler.



Lampiran 5. Hasil docking lysenin dengan K-ras mutan.

← → 🔍 Tidak aman | bioinfo3d.cs.tau.ac.il/FireDock/runs/Kras.pdb_Lysenin.pdb_46_42_7_18_10_119/

Akun Microsoft - Sa... OneNote: Getting S...

FireDock

[\[Web Server\]](#) [\[About\]](#) [\[Download\]](#) [\[FAQ\]](#) [\[Help\]](#) [\[References\]](#)

Receptor	Ligand	TransFile	User e-mail
Kras.pdb	Lysenin.pdb	fd_trans.txt	aulia_fahira_jira@yahoo.co.id

show all/hide all

Rank	Solution Number	Global Energy	Attractive VdW	Repulsive VdW	ACE	HB	Structure show/hide
1	1	-25.06	-34.26	21.01	-1.24	-2.79	<input checked="" type="checkbox"/>
2	2	-0.30	-42.22	13.18	5.44	-3.84	<input type="checkbox"/>
3	9	10.14	-3.83	2.41	1.30	0.00	<input type="checkbox"/>
4	5	10.95	-21.04	15.06	12.22	-3.52	<input type="checkbox"/>
5	6	11.59	-8.60	2.31	9.74	-1.71	<input type="checkbox"/>
6	7	30.84	-23.37	23.33	10.30	-4.50	<input type="checkbox"/>
7	8	34.37	-7.22	6.41	3.34	-0.90	<input type="checkbox"/>
8	3	36.42	-15.65	13.98	9.94	-1.71	<input type="checkbox"/>
9	4	132.46	-37.77	215.76	3.20	-9.15	<input type="checkbox"/>
10	10	2303.17	-23.81	2848.14	15.93	-3.58	<input type="checkbox"/>

You do not have the Java Runtime Environment installed for applet support.
Visit www.java.com

[download solutions table](#)
[download best structures](#)
[download refined transformations file, sorted according to global energy](#)
[download refined transformations file, in original order](#)



Lampiran 6. Hasil *docking* B-raf dengan K-ras mutan.

← → 🔍 Tidak aman | bioinfo3d.cs.tau.ac.il/FireDock/runs/Kras.pdb_Braf.pdb_19_4_10_19_10_119/

🟢 Akun Microsoft - Sa... 🟢 OneNote: Getting S...

FireDock

[Web Server] [About] [Download] [FAQ] [Help] [References]

Receptor	Ligand	TransFile	User e-mail
Kras.pdb	Braf.pdb	fd_trans.txt	aulia_fahira_ira@yahoo.co.id

show all/hide all

Rank	Solution Number	Global Energy	Attractive VdW	Repulsive VdW	ACE	HB	Structure show/hide
1	3	-11.80	-37.36	29.84	7.93	-3.85	<input checked="" type="checkbox"/>
2	4	8.32	-28.48	12.76	9.73	-3.66	<input type="checkbox"/>
3	6	11.69	-20.81	6.83	11.48	-2.19	<input type="checkbox"/>
4	9	14.32	-26.44	17.71	13.36	-0.56	<input type="checkbox"/>
5	1	17.15	-27.99	48.70	6.81	-6.74	<input type="checkbox"/>
6	5	25.74	-22.80	14.13	17.75	-3.60	<input type="checkbox"/>
7	8	26.17	-13.49	8.06	11.15	-0.48	<input type="checkbox"/>
8	7	404.50	-32.33	554.73	0.70	-3.04	<input type="checkbox"/>
9	10	882.52	-28.33	1168.10	-5.01	-3.77	<input type="checkbox"/>
10	2	1330.34	-28.08	1736.46	-6.04	-7.03	<input type="checkbox"/>

[download solutions table](#)
[download best structures](#)
[download refined transformations file, sorted according to global energy](#)
[download refined transformations file, in original order](#)

You do not have the Java Runtime Environment installed for applet support. Visit www.java.com

Lampiran 7. Hasil *docking* lisenin dengan K-ras wild-type.

← → 🔍 Tidak aman | bioinfo3d.cs.tau.ac.il/FireDock/runs/KrasWT.pdb_Lysenin.pdb_59_9_1_5_11_119/

🟢 Akun Microsoft - Sa... 🟢 OneNote: Getting S...

FireDock

[Web Server] [About] [Download] [FAQ] [Help] [References]

Receptor	Ligand	TransFile	User e-mail
KrasWT.pdb	Lysenin.pdb	fd_trans.txt	aulia_fahira_ira@yahoo.co.id

show all/hide all

Rank	Solution Number	Global Energy	Attractive VdW	Repulsive VdW	ACE	HB	Structure show/hide
1	5	-34.23	-38.58	25.56	0.31	-8.17	<input checked="" type="checkbox"/>
2	1	-9.27	-18.92	7.88	6.71	-1.06	<input type="checkbox"/>
3	2	-3.06	-32.66	5.36	12.84	-4.98	<input type="checkbox"/>
4	3	0.79	-14.24	6.07	7.51	-2.75	<input type="checkbox"/>
5	6	6.79	-2.42	1.16	-0.69	0.00	<input type="checkbox"/>
6	9	7.61	-13.58	6.70	8.37	-2.07	<input type="checkbox"/>
7	7	11.67	-29.93	23.08	4.88	-3.25	<input type="checkbox"/>
8	10	14.52	-2.91	0.54	1.37	-0.26	<input type="checkbox"/>
9	8	16.01	-3.54	1.04	3.82	0.00	<input type="checkbox"/>
10	4	38.17	-18.77	10.35	11.79	-3.33	<input type="checkbox"/>

[download solutions table](#)
[download best structures](#)
[download refined transformations file, sorted according to global energy](#)
[download refined transformations file, in original order](#)

You do not have the Java Runtime Environment installed for applet support. Visit www.java.com

Lampiran 8. Hasil *docking* B-raf dengan K-ras *wild-type*.

FireDock

[Web Server] [About] [Download] [FAQ] [Help] [References]

Receptor: KrasWT.pdb Ligand: Braf.pdb TransFile: fd_trans.txt User e-mail: aulia.fahira.ira@gmail.com

Rank	Solution Number	Global Energy	Attractive VdW	Repulsive VdW	ACE	HB	Structure show/hide
1	4	-14.34	-19.63	3.43	5.32	-1.98	<input checked="" type="checkbox"/>
2	8	-10.13	-24.81	10.11	5.47	-2.16	<input type="checkbox"/>
3	7	-8.42	-26.18	14.65	5.81	-1.90	<input type="checkbox"/>
4	1	1.34	-22.94	13.10	10.05	-2.48	<input type="checkbox"/>
5	5	7.17	-13.39	5.38	1.78	-1.36	<input type="checkbox"/>
6	9	12.51	-1.02	0.00	1.51	-0.57	<input type="checkbox"/>
7	3	15.68	-3.74	0.79	2.89	0.00	<input type="checkbox"/>
8	10	18.00	-32.98	22.73	18.93	-4.06	<input type="checkbox"/>
9	2	1252.45	-44.49	1595.36	18.71	-7.06	<input type="checkbox"/>
10	6	2441.73	-36.56	3125.53	-2.82	-5.21	<input type="checkbox"/>

download solutions table
 download best structures
 download refined transformations file, sorted according to global energy.
 download refined transformations file, in original order.

Lampiran 9. Hasil *docking* FdUMP (5-FU) dan UMP (ligan kontrol) dengan *thymidylate synthase*.

	Ligand	Binding Affinity	rmsd/ub	rmsd/lb
1	ts_fdump	-8.1	0	0
2	ts_fdump	-7.7	5.967	3.004
3	ts_fdump	-7.5	6.63	3.457
4	ts_fdump	-7.4	3.007	2.251
5	ts_fdump	-7.3	6.324	3.244
6	ts_fdump	-7.2	2.894	2.163
7	ts_fdump	-7.1	6.531	3.488
8	ts_fdump	-6.9	3.073	2.587
9	ts_fdump	-6.8	5.577	3.806
10	ts_ump	-7.6	0	0
11	ts_ump	-7.4	6.206	2.876
12	ts_ump	-7.2	6.204	2.963
13	ts_ump	-6.9	7.291	5.067
14	ts_ump	-6.7	6.213	3.152
15	ts_ump	-6.6	4.053	2.656
16	ts_ump	-6.4	8.255	4.815
17	ts_ump	-6.3	7.529	5.109
18	ts_ump	-6.3	6.042	3.035
19	ts_ump	-6.3	6.042	3.035

