

**UJI IN SILICO IKATAN LYSENIN CACING TANAH (*Lumbricus rubellus*)
DENGAN VIMENTIN TERHADAP AKT1 SEBAGAI AGEN KOKEMOTERAPI 5-FU
PADA KANKER KOLOREKTAL**

TUGAS AKHIR
Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran



Oleh :
Nurul Reza Fadhilah
165070107111045

PROGRAM STUDI S1 PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG

2019



HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**UJI IN SILICO IKATAN LYSENIN CACING TANAH (*Lumbricus rubellus*)
DENGAN VIMENTIN TERHADAP AKT1 SEBAGAI AGEN KOKEMOTERAPI
5-FU PADA KANKER KOLOREKTAL**

Oleh :

Nurul Reza Fadhilah

165070107111045

Telah diuji pada

Hari : Senin

Tanggal : 21 Oktober 2019

dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji-I

dr. Taufiq Nur Budaya, Sp.U
NIP. 198608292009121003

Pembimbing-I/Penguji-II,

Pembimbing-II/Penguji-III,

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

Prof. Dr.dr. Teguh Wahyu Sardjono, DTM&H, MSc., Sp.ParK
NIP. 195204101980021001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Kedokteran

dr. Triwahju Astuti, M.Kes., Sp.P
NIP. 196310221996012001

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nurul Reza Fadhilah

NIM : 165070107111045

Program Studi : S1 Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas
Brawijaya

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 21 Oktober 2019

(Nurul Reza Fadhilah)

NIM 165070107111045

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT yang telah memberi petunjuk dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini dengan judul “Uji In Silico Iktatan Lysenin Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) dengan Vimentin terhadap AKT1 sebagai Agen Kokemoterapi 5-FU pada Kanker Kolorektal”.

Ketertarikan penulis akan topik ini disadari oleh fakta bahwa kemoterapi untuk kanker kolorektal memiliki banyak efek samping, sehingga dibutuhkan agen kokemoterapi yang dapat bekerja sama untuk meningkatkan efektifitas kemoterapi utama yaitu 5-FU. Penelitian ini bertujuan membuktikan lysenin memiliki peranan penting dengan menghambat fosforilasi vimentin dalam kanker kolorektal.

Dengan selesainya Tugas Akhir ini, penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Agustina Tri Endharti, S.Si, Ph.D sebagai pembimbing I yang telah membimbing, membantu dan memberi masukan selama pengerjaan menyelesaikan Tugas Akhir ini.
2. Prof. Dr.dr. Teguh Wahyu Sardjono, DTM&H, MSc., Sp.ParK sebagai pembimbing II yang telah membimbing, membantu dan memberi masukan selama penulisan Tugas Akhir ini.
3. dr. Taufiq Nur Budaya, Sp.U sebagai dosen penguji yang bersedia meluangkan waktu dan memberi kritik dan saran yang membangun.
4. dr. Triwahju Astuti, M.Kes., Sp.P(K), selaku Ketua Program Studi Kedokteran yang telah membimbing penulis menuntut ilmu di Program Studi Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

5. Dr. dr. Wisnu Barlianto, Msi.Med, Sp.A(K) ., selaku Dekan Fakultas Kedokteran

Universitas Brawijaya yang telah memberikan kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

6. Penanggung jawab dalam proses penelitian, Pak Didik Huswo Utomo, M.Si yang telah membantu dalam proses penelitian.

7. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB, yang telah membantu penulis dalam penyelesaian Tugas Akhir ini.

8. Orang tua saya; ayah saya Zaenal A., ibu saya Resti G., dan adik tercinta M. Yahya I.dan Azzahra P. H. serta seluruh keluarga besar atas doa, kasih sayang dan dukungan selalu kepada penulis.

9. Teman-temanku, Amalda, Eza, Nisa, Bela, Fena, Lita, Zizi, Gita, Ira, Riski, Caca, Harira, Annisa, Rina serta teman-teman Pendidikan Dokter 2016 yang turut mendukung penulis dalam penelitian ini.

10. Semua pihak yang telah membantu dan menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun. Akhir kata semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 21 Oktober 2019

Penulis



ABSTRAK

Fadhilah, N.R. 2019. *Uji In Silico Ikatan Lysenin Cacing Tanah (Lumbricus rubellus) dengan Vimentin terhadap AKT1 sebagai Agen Kokemoterapi 5-FU pada Kanker Kolorektal*. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Agustina Tri Endharti, S.Si, Ph.D. (2) Prof. Dr.dr. Teguh Wahyu Sardjono, DTM&H, MSc., Sp.ParK

Kanker merupakan kondisi terjadinya pertumbuhan sel yang tidak terkontrol. Kanker kolorektal adalah kanker ketiga yang paling sering didiagnosis dan menduduki peringkat ke-2 sebagai jenis kanker yang sering menyebabkan kematian di dunia tahun 2018. Pada kanker kolorektal terdapat peningkatan vimentin yang berperan dalam apoptosis. AKT1 yang berikatan dengan vimentin menyebabkan fosforilasi vimentin menghasilkan gagal apoptosis. Terhambatnya fosforilasi vimentin mengakibatkan apoptosis melalui caspase. Salah satu terapi yang digunakan adalah kemoterapi yaitu 5-Fluorouracil (5-FU) yang bekerja menghambat enzim *thymidylate synthase*. Namun, pemberian kemoterapi tunggal menimbulkan berbagai efek samping serta kurang memberikan efek yang adekuat sehingga perlu dikombinasikan dengan agen yang dapat bekerja sinergis sebagai agen kokemoterapi. *Lumbricus rubellus* memiliki potensi sebagai antikanker melalui kandungan lysenin dan kombinasi cairan coelomic *Lumbricus rubellus* dengan 5-FU dapat meningkatkan apoptosis sel. Penelitian ini dilakukan untuk memprediksi secara molekuler peran lysenin dalam berikatan dengan vimentin sehingga terjadi apoptosis dan berperan sinergis sebagai kokemoterapi kanker kolorektal. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in silico* melalui metode docking menggunakan sampel dari database *pubchem* dan Protein Data Bank, yang bertujuan untuk mengetahui daya ikatan lysenin dengan vimentin. Metode molecular docking dalam penelitian ini dilakukan menggunakan software PyRX 0.8, Patchdock, Firedock untuk mengetahui afinitas ikatan, PyMOL 2.0.6 untuk melihat dalam 3 dimensi dan Ligplot untuk melihat ikatan asam amino. Hasilnya *docking* didapatkan afinitas ikatan lysenin dengan vimentin sebesar -37,69 kkal/mol sementara afinitas ikatan Vimentin dengan AKT1 (kontrol) sebesar -23,04. Lysenin memiliki afinitas ikatan yang lebih tinggi maka, lysenin berpotensi menghambat fosforilasi vimentin sehingga terjadi apoptosis dan berpotensi sebagai terapi kombinasi untuk kanker kolorektal.

Kata kunci : lysenin, vimentin, 5-FU, cacing tanah (*Lumbricus rubellus*)

ABSTRACT

Fadhilah, N.R. 2019. *in Silico Binding Test from Lysenin Earthworms (*Lumbricus rubellus*) with Vimentin against AKT1 as Cocemotherapy for 5-FU on Colorectal Cancer*. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Agustina Tri Endharti, S.Si, Ph.D. (2) Prof. Dr.dr. Teguh Wahyu Sardjono, DTM&H, MSc., Sp.ParK

Cancer is an uncontrolled growth of cells. Colorectal cancer is known as the third most diagnosed cancer and second most cancer that cause death in the world in 2018. There is an increasing vimentin in colorectal cancer, which has role in apoptosis. AKT1 bind to vimentin causing phosphorylation and failure in apoptosis. Inhibition of vimentin phosphorylation result in apoptosis via caspase. One of therapy that used for colorectal cancer is chemotherapy using 5-fluorouracil (5-FU), working by inhibiting *thymidylate synthase*. However, single chemotherapy may cause side effects and relatively inadequate effect so it needs to be combined with agent that work synergistically. *Lumbricus rubellus* has potential as anticancer through lysenin and combination of its *coelomic* fluid with 5-FU can increase cell apoptosis. This research was conducted to predict the role of lysenin in binding with vimentin so that apoptosis can occurs and has synergistic role as colorectal cancer cocemotherapy. This is an experimental study conducted in silico through docking method which took samples from pubchem database and Protein Data Bank, which aims to determine the binding affinity between lysenin and vimentin. Molecular docking method was conducted using PyRX 0.8, Patchdock, Firedock to determine binding affinity, PyMOL 2.0.6 to see in 3 dimensions and Ligplot to identify amino acid bonds. The result showed -37,69 kcal/mol binding affinity was found between lysenin-vimentin while -23,04 kcal/mol between vimentin-AKT1 (control). Lysenin has higher binding affinity, lysenin has the potential to inhibit vimentin phosphorylation resulting in apoptosis and potentially as combination therapy for colorectal cancer.

Keyword : lysenin, vimentin, 5-FU, earthworm (*Lumbricus rubellus*)

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
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	5
1.2.1 Rumusan Masalah Umum	5
1.2.2 Rumusan Masalah Khusus	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Tujuan Umum	5
1.3.2 Tujuan Khusus	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
1.4.1 Manfaat Akademik	6
1.4.2 Manfaat Praktis	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Kanker Kolorektal	7
2.1.1 Pengertian Kanker Kolorektal	7
2.1.2 Epidemiologi	7
2.1.3 Mekanisme Kanker Kolorektal	8
2.1.4 Klasifikasi Kanker Kolorektal	10

2.1.5	Faktor Resiko	11
2.1.6	Tatalaksana	13
2.2	5- Fluorouracil	17
2.2.1	Mekanisme Kerja 5- Fluorouracil	17
2.2.2	Kekurangan 5- fluorouracil	20
2.3	<i>Lumbricus rubellus</i>	22
2.3.1	Klasifikasi Ilmiah	22
2.3.2	Morfologi <i>Lumbricus rubellus</i>	22
2.3.3	Manfaat <i>Lumbricus rubellus</i>	24
2.3.4	Kandungan Coelomic Fluid Cacing Tanah	25
2.3.5	Lysenin	25
2.4	Vimentin	26
2.4.1	Vimentin pada Kanker Kolorektal	27
2.4.2	Vimentin pada <i>Cell Signalling</i>	29
2.5	Metode In Silico	32
2.5.1	Metode Docking	32
2.5.2	Patchdock	33
2.5.3	Firedock	34
2.5.4	Ligplot	34
2.5.5	PyRx	35
2.5.6	PyMol	35
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN		36
3.1	Kerangka Konsep Penellitian	36
3.2	Deskripsi Kerangka Konsep	37
3.3	Hipotesis Penelitian	37
BAB 4 METODE PENELITIAN		38
4.1	Rancangan Penelitian	38
4.2	Populasi dan Sampel	38
4.2.1	Populasi	38

4.2.2	Sampel	38
4.3	Lokasi dan Waktu Penelitian	38
4.4	Identifikasi Variabel	39
4.4.1	Variabel Bebas	39
4.4.2	Variabel Tergantung	39
4.5	Definisi operasional	39
4.6	Alat dan Bahan Penelitian	40
4.6.1	Alat untuk Penelitian	40
4.6.2	Bahan untuk Penelitian	40
4.7	Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data	41
4.8	Analisis Data	48
4.9	Alur Penelitian	49
BAB 5	HASIL PENELITIAN	50
5.1	Hasil <i>Docking</i> Ikatan Lysenin dengan Vimentin	50
5.1.1	Hasil <i>Binding Affinity</i> Ikatan Lysenin dengan Vimentin	50
5.1.2	Hasil Identifikasi Ikatan Lysenin dengan Vimentin	53
5.2	Hasil <i>Docking</i> Ikatan Kompleks Lysenin Vimentin dengan AKT1	56
5.2.1	Hasil <i>Binding Affinity</i> Ikatan Kompleks Lysenin Vimentin dengan AKT1	56
5.2.2	Hasil Identifikasi Ikatan Kompleks Lysenin Vimentin dengan AKT1	57
5.3	Hasil <i>Docking</i> Ikatan FdUMP dengan <i>Thymidylate Synthase</i>	61
5.3.1	Hasil <i>Binding Affinity</i> Ikatan FdUMP dengan <i>Thymidylate Synthase</i>	61
5.3.2	Hasil Identifikasi Ikatan FdUMP dengan <i>Thymidylate Synthase</i>	63
BAB 6	PEMBAHASAN	67
6.1	Ikatan antara Lysenin dengan Vimentin	67
6.1.1	Afinitas Ikatan antara Lysenin dengan Vimentin	67

6.1.2 Interaksi Ikatan antara Lysenin dengan Vimentin	69
6.2 Ikatan antara Kompleks Lysenin Vimentin dengan AKT1	71
6.2.1 Afinitas Ikatan antara Kompleks Lysenin Vimentin dengan AKT1	71
6.2.2 Interaksi Ikatan Kompleks Lysenin Vimentin dengan AKT1	72
6.3 Ikatan antara FdUMP dengan <i>Thymidylate Synthase</i>	73
6.3.1 Afinitas Ikatan antara FdUMP dengan <i>Thymidylate Synthase</i>	73
6.3.2 Interaksi Ikatan antara FdUMP dengan <i>Thymidylate Synthase</i>	75
6.4 Keterbatasan Penelitian	77
BAB 7 PENUTUP	78
7.1 Kesimpulan	78
7.2 Saran	78
DAFTAR PUSTAKA	79
LAMPIRAN	84

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Nilai *Binding Affinity* Vimentin dengan Ligan 52

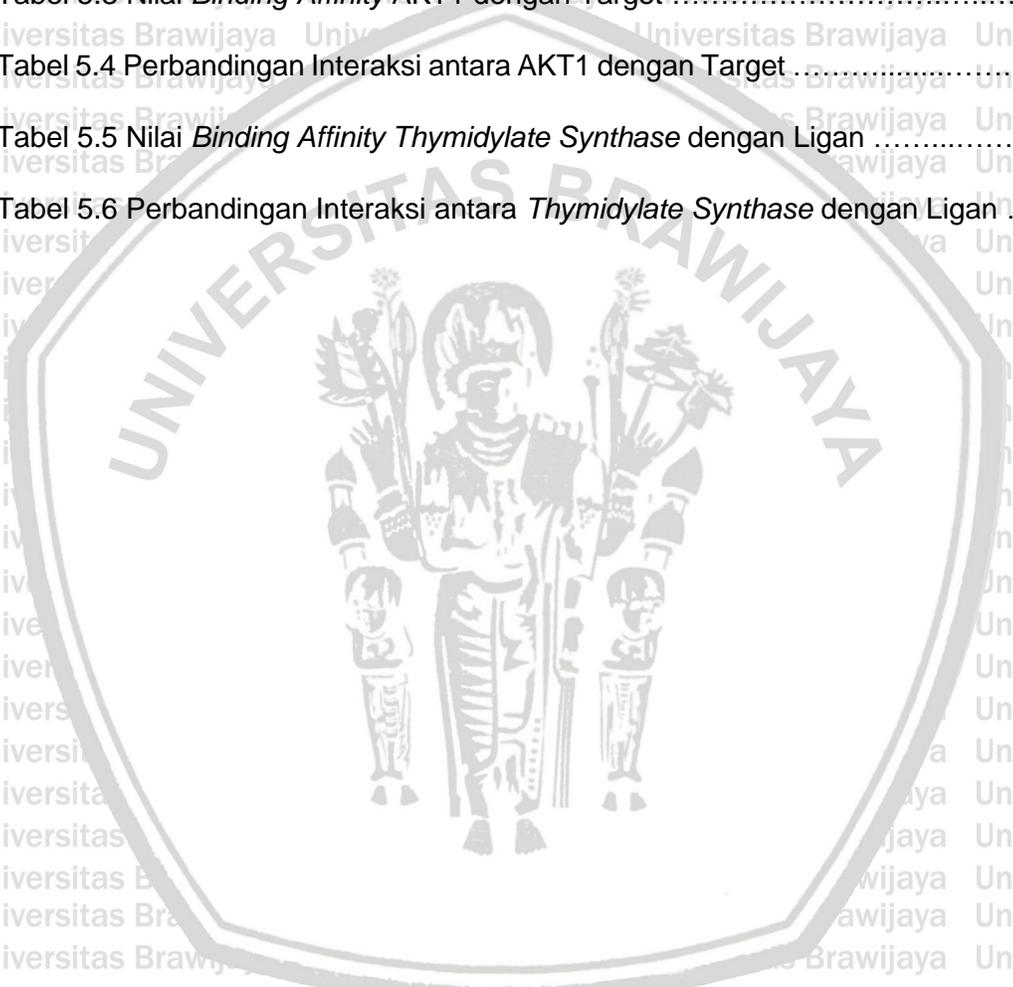
Tabel 5.2 Perbandingan Interaksi antara Vimentin dengan Ligan 54

Tabel 5.3 Nilai *Binding Affinity* AKT1 dengan Target 57

Tabel 5.4 Perbandingan Interaksi antara AKT1 dengan Target 60

Tabel 5.5 Nilai *Binding Affinity Thymidylate Synthase* dengan Ligan 63

Tabel 5.6 Perbandingan Interaksi antara *Thymidylate Synthase* dengan Ligan 66



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Mekanisme Kanker Kolorektal	9
Gambar 2.2 Senyawa 5-FU	18
Gambar 2.3 Mekanisme 5-FU Menghambat <i>Thymidylate Syanthase</i>	19
Gambar 2.4 <i>Lumbricus rubellus</i>	23
Gambar 4.1 Struktur Lysenin	41
Gambar 4.2 Struktur Vimentin	41
Gambar 4.3 Struktur AKT1	42
Gambar 4.4 FdUMP dan UMP	42
Gambar 4.5 <i>Thymidylate synthase</i>	43
Gambar 5.1 Hasil <i>Docking</i> Lysenin dengan Vimentin	51
Gambar 5.2 Hasil <i>Docking</i> AKT1 dengan Vimentin	52
Gambar 5.3 Hasil Identifikasi Asam Amino, Ikatan Hidrogen dan Ikatan Hidrofobik pada kompleks Lysenin Vimentin	53
Gambar 5.4 Hasil Identifikasi Asam Amino, Ikatan Hidrogen dan Ikatan Hidrofobik pada kompleks AKT1 dan Vimentin	54
Gambar 5.5 Hasil <i>Docking</i> Kompleks Lysenin Vimentin dengan AKT1	57
Gambar 5.6 Hasil Identifikasi Asam Amino, Ikatan Hidrogen dan Ikatan Hidrofobik pada kompleks AKT1 dan Vimentin	58
Gambar 5.7 Hasil Identifikasi Asam Amino, Ikatan Hidrogen dan Ikatan Hidrofobik pada ikatan AKT1 dengan kompleks Lysenin Vimentin	59
Gambar 5.8 Hasil <i>Docking Thymidylate Synthase</i> dengan FdUMP	62
Gambar 5.9 Hasil <i>Docking Thymidylate Synthase</i> dengan UMP	63

Gambar 5.10 Hasil Identifikasi Asam Amino, Ikatan Hidrogen dan Ikatan Hidrofobik pada kompleks *Thymidylate Synthase* dan FdUMP 64

Gambar 5.11 Hasil Identifikasi Asam Amino, Ikatan Hidrogen dan Ikatan Hidrofobik pada kompleks *Thymidylate Synthase* dan UMP 65



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil *Docking* Lyseenin dan Vimentin 84

Lampiran 2. Hasil *Docking* Vimentin dan AKT1 84

Lampiran 3. Hasil *Docking* Ikatan Kompleks Lyseenin Vimentin dan AKT1 85

Lampiran 4. Hasil *Docking* FdUMP dan *Thymidylate synthase* 85

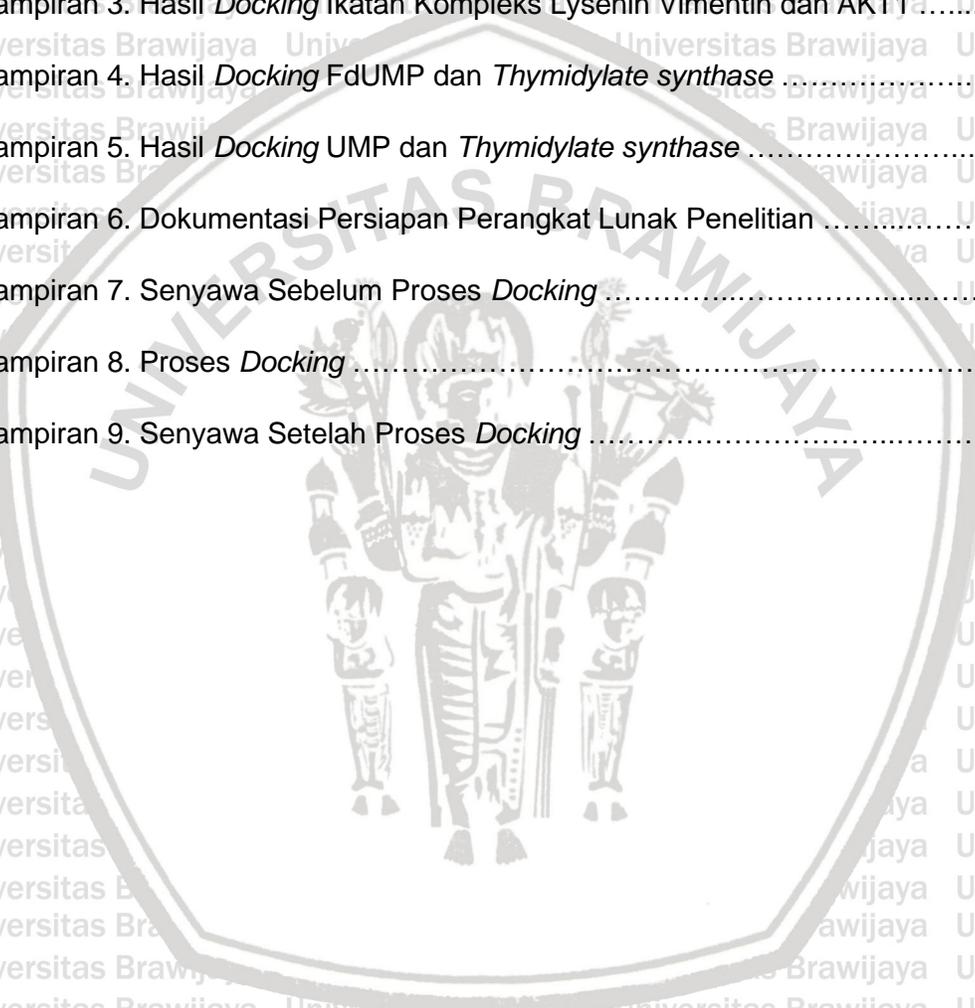
Lampiran 5. Hasil *Docking* UMP dan *Thymidylate synthase* 86

Lampiran 6. Dokumentasi Persiapan Perangkat Lunak Penelitian 86

Lampiran 7. Senyawa Sebelum Proses *Docking* 88

Lampiran 8. Proses *Docking* 89

Lampiran 9. Senyawa Setelah Proses *Docking* 92



DAFTAR SINGKATAN

- 5-FU : 5-fluoro urasil
- APC : *adenomatous polyposis coli*
- BMI : body mass index
- CH₂THF : 5,10 methylenetetrahydrofolic
- CIN : chromosomal instability
- DNA : deoxyribonucleic acid
- dTMP : deoxythymidine monophosphate
- dTTP : deoxythymidine triphosphate
- dUMP : deoxyuridinemonophosphate
- dUTP : deoxyuridine thriphosphate
- EGF : epidermal growth factor
- EMT : epithelial mesenchymal transition
- FUTP : fluorouridine triphosphate
- FdUMP : fluorodeoxyuridine monophosphate
- IF : intermediate filaments
- KGB : kelenjar getah bening
- PDB : Protein Data Bank
- PI3K : Phosphoinositide 3 kinases
- RNA : Ribonucleic Acid
- TGFβ : Transforming growth factor beta
- TS : *thymidylate synthase*
- WHO : World Health Organization
- CKI : casein kinase I
- GSK3 : glycogen synthase kinase 3
- β TrCP : Beta-transducin repeats-containing proteins
- LRP : lipoprotein receptor-related protein



HALAMAN PENGESAHAN
TUGAS AKHIR
UJI IN SILICO IKATAN LYSENIN CACING TANAH (*Lumbricus rubellus*)
DENGAN VIMENTIN TERHADAP AKT1 SEBAGAI AGEN KOKEMOTERAPI 5-FU
PADA KANKER KOLOREKTAL

Oleh :

Nurul Reza Fadhillah

165070107111045

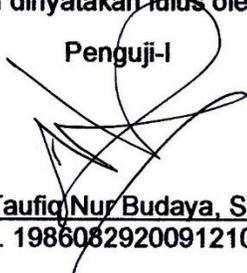
Telah diuji pada

Hari : Senin

Tanggal : 21 Oktober 2019

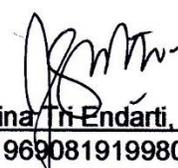
dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji-I


dr. Taufiq Nur Budaya, Sp.U
NIP. 198608292009121003

Pembimbing-I/Penguji-II,

Pembimbing-II/Penguji-III,


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


Prof. Dr.dr. Teguh Wahyu Sardjono, DTM&H, MSc., Sp.ParK
NIP. 195204101980021001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Kedokteran




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

ABSTRAK

Fadhilah, N.R. 2019. *Uji In Silico Ikatan Lysenin Cacing Tanah (Lumbricus rubellus) dengan Vimentin terhadap AKT1 sebagai Agen Kokemoterapi 5-FU pada Kanker Kolorektal*. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Agustina Tri Endharti, S.Si, Ph.D. (2) Prof. Dr.dr. Teguh Wahyu Sardjono, DTM&H, MSc., Sp.ParK

Kanker merupakan kondisi terjadinya pertumbuhan sel yang tidak terkontrol. Kanker kolorektal adalah kanker ketiga yang paling sering didiagnosis dan menduduki peringkat ke-2 sebagai jenis kanker yang sering menyebabkan kematian di dunia tahun 2018. Pada kanker kolorektal terdapat peningkatan vimentin yang berperan dalam apoptosis. AKT1 yang berikatan dengan vimentin menyebabkan fosforilasi vimentin menghasilkan gagal apoptosis. Terhambatnya fosforilasi vimentin mengakibatkan apoptosis melalui caspase. Salah satu terapi yang digunakan adalah kemoterapi yaitu 5-Fluorouracil (5-FU) yang bekerja menghambat enzim *thymidylate synthase*. Namun, pemberian kemoterapi tunggal menimbulkan berbagai efek samping serta kurang memberikan efek yang adekuat sehingga perlu dikombinasikan dengan agen yang dapat bekerja sinergis sebagai agen kokemoterapi. *Lumbricus rubellus* memiliki potensi sebagai antikanker melalui kandungan lysenin dan kombinasi cairan coelomic *Lumbricus rubellus* dengan 5-FU dapat meningkatkan apoptosis sel. Penelitian ini dilakukan untuk memprediksi secara molekuler peran lysenin dalam berikatan dengan vimentin sehingga terjadi apoptosis dan berperan sinergis sebagai kokemoterapi kanker kolorektal. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in silico* melalui metode docking menggunakan sampel dari database *pubchem* dan Protein Data Bank, yang bertujuan untuk mengetahui daya ikatan lysenin dengan vimentin. Metode molecular docking dalam penelitian ini dilakukan menggunakan software PyRX 0.8, Patchdock, Firedock untuk mengetahui afinitas ikatan, PyMOL 2.0.6 untuk melihat dalam 3 dimensi dan Ligplot untuk melihat ikatan asam amino. Hasilnya *docking* didapatkan afinitas ikatan lysenin dengan vimentin sebesar -37,69 kkal/mol sementara afinitas ikatan Vimentin dengan AKT1 (kontrol) sebesar -23,04. Lysenin memiliki afinitas ikatan yang lebih tinggi maka, lysenin berpotensi menghambat fosforilasi vimentin sehingga terjadi apoptosis dan berpotensi sebagai terapi kombinasi untuk kanker kolorektal.

Kata kunci : lysenin, vimentin, 5-FU, cacing tanah (*Lumbricus rubellus*)

ABSTRACT

Fadhilah, N.R. 2019. *in Silico Binding Test from Lysenin Earthworms (*Lumbricus rubellus*) with Vimentin against AKT1 as Cocemotherapy for 5-FU on Colorectal Cancer*. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Agustina Tri Endharti, S.Si, Ph.D. (2) Prof. Dr.dr. Teguh Wahyu Sardjono, DTM&H, MSc., Sp.ParK

Cancer is an uncontrolled growth of cells. Colorectal cancer is known as the third most diagnosed cancer and second most cancer that cause death in the world in 2018. There is an increasing vimentin in colorectal cancer, which has role in apoptosis. AKT1 bind to vimentin causing phosphorylation and failure in apoptosis. Inhibition of vimentin phosphorylation result in apoptosis via caspase. One of therapy that used for colorectal cancer is chemotherapy using 5-fluorouracil (5-FU), working by inhibiting *thymidylate synthase*. However, single chemotherapy may cause side effects and relatively inadequate effect so it needs to be combined with agent that work synergistically. *Lumbricus rubellus* has potential as anticancer through lysenin and combination of its *coelomic* fluid with 5-FU can increase cell apoptosis. This research was conducted to predict the role of lysenin in binding with vimentin so that apoptosis can occurs and has synergistic role as colorectal cancer cocemotherapy. This is an experimental study conducted in silico through docking method which took samples from pubchem database and Protein Data Bank, which aims to determine the binding affinity between lysenin and vimentin. Molecular docking method was conducted using PyRX 0.8, Patchdock, Firedock to determine binding affinity, PyMOL 2.0.6 to see in 3 dimensions and Ligplot to identify amino acid bonds. The result showed -37,69 kcal/mol binding affinity was found between lysenin-vimentin while -23,04 kcal/mol between vimentin-AKT1 (control). Lysenin has higher binding affinity, lysenin has the potential to inhibit vimentin phosphorylation resulting in apoptosis and potentially as combination therapy for colorectal cancer.

Keyword : lysenin, vimentin, 5-FU, earthworm (*Lumbricus rubellus*)

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan kondisi terjadinya pertumbuhan sel yang tidak terkontrol, ketika kondisi tersebut terjadi pada sel penyusun kolon ataupun rektum maka disebut kanker kolorektal. Pada tahun 2015, terdapat 8,8 juta kematian di dunia yang disebabkan oleh kanker. Oleh karena itu kanker dikatakan sebagai penyakit penyebab kematian terbanyak ke-2 di dunia (WHO, 2018). Kanker kolorektal adalah kanker ketiga yang paling sering didiagnosis dengan insiden 1.284.287 kasus dan menduduki peringkat ke-2 sebagai jenis kanker yang sering menyebabkan kematian dengan jumlah kematian 880.792 jiwa pada tahun 2018 di dunia (GLOBOCAN, 2018).

Menurut Riskesdas (2018), prevalensi kanker di Indonesia meningkat dari 1,4 ‰ menjadi 1,8 ‰. Data dari GLOBOCAN 2018 menunjukkan insiden kanker kolorektal di Indonesia pada wanita adalah 8,4 per 100.000 penduduk dan laki – laki 16,2 per 100.000 penduduk. Sementara angka kematian pada penderita kanker kolorektal wanita mencapai 4,8 per 100.000 penduduk dan pada laki – laki mencapai 9,3 per 100.000 penduduk. Beberapa faktor yang diduga berpengaruh pada peningkatan insiden kanker kolorektal adalah penyakit inflamasi pada usus (*Crohn Disease*), riwayat keluarga berhubungan, peningkatan BMI, merokok, aktivitas fisik rendah, konsumsi sayuran dan buah rendah berhubungan dengan resiko terkena kanker kolorektal (Johnson *et al.*, 2013).

Pada keadaan kanker terjadi gagalnya proses apoptosis, hal tersebut berkaitan dengan peran dari vimentin. Pada keadaan normal vimentin berfungsi untuk

mempertahankan bentuk sel dan integritas jaringan, sementara pada keadaan kanker vimentin berperan pada gagalnya apoptosis. Hal tersebut diperantarai oleh ikatan langsung AKT1 dengan vimentin secara langsung yang mengakibatkan fosforilasi vimentin sehingga tidak dapat dikenali oleh caspase. sebagai target dari kaskade caspase, vimentin yang terfosforilasi tidak dapat dipecah sehingga gagal apoptosis (Zhu *et al.*, 2011). Peningkatan ekspresi vimentin telah dilaporkan pada kasus kanker kolorektal dan berkorelasi dengan peningkatan migrasi, sifat invasif dan prognosis yang buruk terkait dengan gagalnya proses apoptosis sel kanker (Du *et al.*, 2018).

Sebagai usaha untuk memperbaiki kondisi tersebut, berbagai terapi telah ditawarkan untuk kanker kolorektal antar lain pembedahan, radioterapi serta kemoterapi. Salah satu agen kemoterapi, 5-fluorouracil (5-FU) diketahui dapat meningkatkan kelangsungan hidup seseorang dengan berbagai jenis kanker.

5-fluorouracil merupakan antimetabolit yang bersifat analog terhadap urasil. Saat masuk ke dalam tubuh, 5-FU diubah menjadi metabolit aktif fluorouridine triphosphate (FUTP) yang menggantikan urasil, sehingga bergabung dengan RNA dan menghambat proses translasi RNA yang menyebabkan hambatan pada pertumbuhan sel. Sementara metabolit aktif lainnya, fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP) menyebabkan terhambatnya *thymidylate synthase* yang berpengaruh pada depleksi timin salah satu nukleotida trifosfat yang digunakan dalam sintesis DNA sehingga mengakibatkan hambatan proliferasi dan apoptosis (Milone, 2012)

Penggunaan 5-FU tidak lepas dari berbagai efek samping, karena tidak hanya berefek pada sel kanker tapi juga mengenai sel yang sehat. Pasien mengeluh mengalami diare, mual, muntah, leukopenia, alopecia, *hand-foot syndrome* dan

gangguan neurologis (Thomas *et al.*, 2016). 5-FU dikatakan memicu terjadinya luka pada endotel, pembentukan thrombus dan kardiotoksisitas (Polk *et al.*, 2014). Selain itu, adanya resistensi terhadap 5-FU pada penderita kanker kolorektal menurunkan efektifitas terapi dan penggunaan kombinasi 5-FU dikatakan mampu meningkatkan efektifitas terapi namun belum bisa menjadi harapan untuk mencapai kesuksesan dalam terapi (Hu *et al.*, 2016).

Tingginya efek samping akibat pemberian 5-FU merupakan masalah yang perlu diselesaikan. Diketahui pemberian obat kombinasi dapat menurunkan efek samping penggunaan 5-FU, dengan prinsip mengurangi jumlah obat 5-FU yang dikonsumsi dan menambahkan agen yang dapat memicu proses apoptosis sel, karena bersifat sinergis atau aditif. Pendekatan ini berpotensi mengurangi resistensi obat, secara bersamaan memberikan manfaat anti kanker, mengurangi pertumbuhan tumor dan potensi metastatik, serta menginduksi apoptosis. Pemberian terapi kombinasi sebagai strategi baru dengan target hasil terapi yang lebih efisien dan efektif dengan biaya terjangkau sedang dipertimbangkan (Mokhatari *et al.*, 2017).

Cacing tanah diketahui memiliki berbagai fungsi dibidang kedokteran salah satunya sebagai antikanker. Hal tersebut didukung dengan penelitian yang telah dilakukan secara *in vitro* pada sel HT-29 oleh Permana *et al.* (2018), kombinasi cairan *coelomic* dari *Lumbricus rubellus* dengan 5-FU dapat meningkatkan apoptosis sel, efek sitotoksik dan menghambat proliferasi sel kanker kolorektal. Penelitian lebih lanjut yang dilakuakn secara *in vitro* oleh Endharti *et al.* (2019), mengatakan bahwa penggunaan kombinasi cairan *coelomic* dari *Lumbricus rubellus* dengan 5-FU pada sel HT-29 mampu meningkatkan apoptosis dan memiliki sifat anti tumor melalui

penurunan FAK. Selain itu diketahui secara *in vivo*, penggunaan cairan *coelomic* dari *Lumbricus rubellus* dengan 5-FU mampu menurunkan proliferasi sel kanker kolorektal melalui penurunan FAK dan IL-1 β (Permana *et al.*, 2019). Hal tersebut menunjukkan bahwa cairan *coelomic* memiliki sifat antikanker dan berpotensi menjadi terapi kombinasi 5-FU. *Lumbricus rubellus* memiliki efek anti tumor melalui cairan *coelomic* yang mengandung lysenin. Penggunaan lysenin dikatakan dapat mengaktifkan caspase 9 dan caspase 8 dalam sel target dan menyebabkan apoptosis sel (McIlwain *et al.*, 2013; Permana *et al.*, 2018).

Lysenin merupakan salah satu protein yang terdapat pada cacing tanah, khususnya diproduksi oleh *coelomocytes* sebagai bagian dari sistem kekebalan tubuh cacing tanah. Lysenin disekresikan dalam bentuk tidak aktif, dan memiliki kemampuan untuk berikatan dengan sphingomyelin sebelum masuk ke dalam membrane sel (Boroki-Brown *et al.*, 2016). Jalur caspase 9 dan caspase 8 akan mengubah pro-caspase 3, pro-caspase 6 dan pro-caspase 7 menjadi caspase 3, caspase 6 dan caspase 7 dimana bisa memecah vimentin untuk apoptosis (McIlwain *et al.*, 2013).

Untuk memprediksi peran lysenin secara molekuler dalam apoptosis, maka prediksi interaksi antara lysenin dan vimentin dapat difasilitasi oleh *molecular docking*. Proses tersebut berguna dalam proses perancangan obat, untuk memprediksi afinitas pengikatan dari ligan yang didesain terhadap target tertentu yang ingin dihambat aktivitasnya. *Molecular docking* juga berguna sebagai komplemen dari penelitian *in vivo* maupun *in vitro* (Meng *et al.*, 2011).

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Rumusan Masalah Umum

Apakah protein lysenin dari coelomic fluid *Lumbricus rubellus* dapat menjadi agen kokemoterapi 5-FU melalui ikatan dengan vimentin terhadap AKT1 pada kanker kolorektal secara in silico?

1.2.2 Rumusan Masalah Khusus

1. Apakah terdapat ikatan antara protein lysenin dari coelomic fluid *Lumbricus rubellus* dengan vimentin secara in silico?
2. Apakah ikatan protein lysenin dari coelomic fluid *Lumbricus rubellus* dengan vimentin dapat menurunkan *binding affinity* dan mengubah *binding site* AKT1 secara in silico?
3. 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

Untuk menguji potensi lysenin dari coelomic fluid *Lumbricus rubellus* dapat menjadi agen kokemoterapi 5-FU melalui ikatan dengan vimentin terhadap AKT1 pada kanker kolorektal secara in silico.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menguji adanya ikatan antara lysenin dari coelomic fluid *Lumbricus rubellus* dengan vimentin secara *in silico*.
2. Menguji adanya pengaruh ikatan protein lysenin dari coelomic fluid *Lumbricus rubellus* dengan vimentin terhadap penurunan *binding affinity* dan perubahan *binding site* AKT1 secara *in silico*.
3. Membuktikan adanya ikatan FdUMP sebagai metabolit aktif dari 5-FU dengan *thymidylate synthase* secara *in silico*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Menambah pengetahuan baru tentang ikatan antara kandungan protein dari coelomic fluid *Lumbricus rubellus* dalam hal ini lysenin dan vimentin secara *in silico* sehingga dapat dijadikan acuan untuk penelitian lebih lanjut.

1.4.2 Manfaat Praktis

Memperoleh informasi baru bagi tenaga medis dan masyarakat mengenai protein dari coelomic fluid *Lumbricus rubellus* yaitu lysenin yang untuk disintesis dan digunakan pada pengujian secara *in vitro* maupun *in vivo* sehingga dapat digunakan sebagai terapi kombinasi yang potensial.

BAB 2**TINJAUAN PUSTAKA****2.1 Kanker kolorektal****2.1.1 Pengertian Kanker Kolorektal**

Menurut WHO (2015), kanker adalah kondisi yang ditandai dengan adanya pertumbuhan dan penyebaran sel yang tidak terkontrol. Kanker kolorektal merupakan kanker yang dimulai dari rektal maupun kolon. Dikatakan sebagai kanker kolon atau kanker rektal tergantung dari dimana kanker itu berawal. Kolon dan rektum sering disebut sebagai usus besar, bagian dari sistem gastrointestinal yang memiliki fungsi untuk memproses asupan sehingga menghasilkan energi dan membuang limbah padat yang dirasa sudah tidak berguna lagi (feses).

2.1.2 Epidemiologi

Kanker kolorektal merupakan salah satu jenis kanker yang sering menyebabkan kematian (WHO, 2018). Jumlah kematian yang disebabkan oleh kanker kolorektal mencapai 881.000 jiwa pada tahun 2018 di dunia, yang menduduki peringkat kedua di dunia kematian terbanyak akibat kanker setelah kanker paru (IARC, 2018). Data dari GLOBOCAN 2018 menunjukkan insiden kanker kolorektal di Indonesia pada wanita adalah 8,4 per 100.000 penduduk dan laki – laki 16,2 per 100.000 penduduk. Sementara angka kematian pada penderita kanker kolorektal wanita mencapai 4,8 per 100.000 penduduk dan pada laki – laki mencapai 9,3 per 100.000 penduduk.

2.1.3 Mekanisme Kanker Kolorektal

Kanker kolorektal biasanya diawali dengan terbentuknya polip adenoma pada daerah kolon atau rektum yang tumbuh secara perlahan sekitar 10-20 tahun.

Namun tidak semua polip adenoma akan menyebabkan kanker kolorektal. Ketika sudah menjadi kanker, sel tersebut bisa tumbuh ke dinding kolon maupun rektum.

Sel kanker biasanya paling cepat menyebar ke kelenjar limfe terdekat. Namun sel kanker juga bisa ditransport ke organ dan jaringan lain melalui pembuluh darah, seperti liver, paru – paru dan peritoneum. Penyebaran sel kanker ke bagian tubuh yang jauh dari tempat asal disebut metastasis (American Cancer Society, 2017).

Kanker kolorektal dapat timbul dari satu atau kombinasi dari mekanisme yang berbeda. Salah satu kemungkinan bisa ditimbulkan dari ketidakstabilan kromosom (CIN) yang didefinisikan dengan adanya mutasi pada *adenomatous polyposis coli* (APC), mutasi onkogen KRAS dan inaktivasi gen penekan tumor p53.

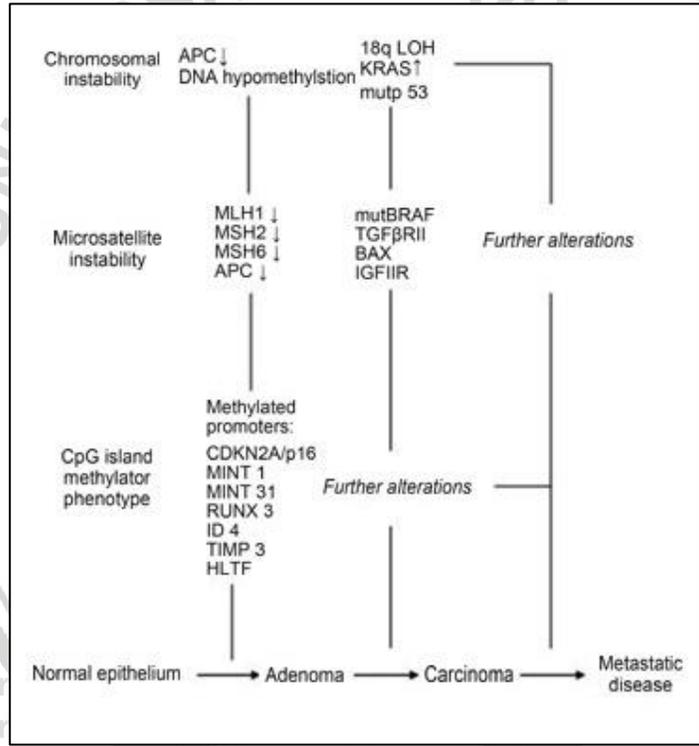
APC sendiri memiliki peran untuk menjaga agar kadar β catenin pada sel tetap rendah sehingga factor transkripsi DNA yang mengkode gen mesenkimal tetap tidak aktif. Pada keadaan kanker KRAS yang aktif dapat mengaktifkan c-Myc, c-

Jun dan c-Fos yang berperan dalam peningkatan proliferasi sel. Dalam sel p53 berperan untuk menghentikan transkripsi DNA yang mengalami mutasi. Selain itu

adanya hipometilasi pada DNA secara umum dan hipermetilasi pada daerah promotor DNA merupakan kejadian epigenetik yang sering terjadi pada kanker kolorektal. Hipermetilasi pada daerah promotor dan hipometilasi pada DNA menyebabkan inaktivasi transkripsi DNA yang mengkode gen tumor supresor.

Inaktivasi DNA *repair gene* dapat mengakibatkan kanker kolorektal, proses ini

dinamakan instabilitas mikrosatelit. DNA *repair gene* yang terlibat pada kanker kolorektal adalah hMSH2, hMSH6, hMLH1, hPMS2, hPMS1, dan hMLH3. Instabilitas mikrosatelit dapat mengakibatkan terganggunya fungsi protein di dalam sel dan menyebabkan pertumbuhan sel yang tidak normal. Pada kasus instabilitas mikrosatelit sering dikaitkan dengan kolon bagian proksimal dan memiliki gambaran histologi diferensiasi buruk. Namun, beberapa mekanisme tersebut sering tumpang tindih dalam kasus kanker kolorektal (Tariq dan Ghias, 2015).



Gambar 2.1 Mekanisme Kanker Kolorektal

Keterangan : kanker kolorektal dapat timbul dari ketidakstabilan kromosom (CIN) yang didefinisikan dengan adanya mutasi *adenomatous polyposis coli* (APC), mutasi onkogen KRAS dan inaktivasi gen penekan tumor p53. Instabilitas mikrosatelit yang menyebabkan inaktivasi DNA *repair gene* dan terjadinya hipermetilasi pada promotor DNA dapat menyebabkan kanker kolorektal (Tariq dan Ghias, 2015).

Gangguan transkripsi DNA pada kanker kolorektal dapat dimediasi oleh aktivasi beberapa jalur. Berikatannya Wnt dengan Frizzled akan mengaktifkan jalur Wnt, sementara jalur PI3K dapat diinisiasi oleh aktivasi beberapa reseptor yaitu berikatannya TGF β pada TGF β reseptor dan EGF yang berikatan pada tirosin kinase reseptor sebagai EGFR. TGF β juga dapat mengaktifkan kaskade Smad yang sering disebut dengan jalur kanonikal. Akhir dari jalur tersebut akan mengaktifkan beberapa faktor transkripsi yang akan mengakibatkan laju proliferasi sel yang meningkat, peningkatan vimentin dan kehilangan sifat adhesi antar sel sehingga meningkatkan sifat invasif dari sel dan mengakibatkan metastasis (Pandurangan, 2013; Ormanns *et al.*, 2014).

2.1.4 Klasifikasi Kanker Kolorektal

Menurut WHO (2010) terdapat beberapa tipe kanker kolorektal, yaitu:

a. Adenocarcinoma

Tumor ini berawal dari sel kelenjar, atau sel yang memiliki fungsi sekresi. Pada kanker kolorektal, tumor berawal sebagai polip adenomatosa kecil yang terus tumbuh dan kemudian berubah menjadi tumor ganas. Sebagian besar kanker kolorektal adalah adenokarsinoma.

b. Adenosquamous carcinoma

Jenis kanker yang mengandung dua jenis sel yaitu sel skuamosa (sel tipis dan datar yang melapisi organ tertentu) dan sel yang menyerupai kelenjar.

c. Spindle cell carcinoma

Jenis kanker yang dimulai dari jaringan yang melapisi atau menutupi organ dalam dan berbentuk spindle panjang.

d. Squamous cell carcinoma

Kanker yang dimulai di sel-sel skuamosa. Sel skuamosa adalah sel tipis dan datar yang terlihat seperti sisik ikan, dan ditemukan di jaringan yang membentuk permukaan kulit, lapisan organ berongga tubuh, dan lapisan saluran pernapasan dan pencernaan.

e. Undifferentiated carcinoma

Keadaan di mana sel-sel sangat belum matang dan "primitif", tidak terlihat seperti sel-sel di jaringan dari itu muncul. Kanker yang tidak terdiferensiasi lebih ganas daripada kanker jenis yang terdiferensiasi dengan baik. Sel yang tidak berdiferensiasi disebut anaplastik. Karsinoma yang tidak berdiferensiasi ditandai oleh pertumbuhan sel yang padat seperti lembar tanpa pola, dengan perjalanan klinis yang agresif.

2.1.5 Faktor risiko

Menurut American Cancer Society (2017), faktor resiko dari kanker kolorektal adalah sebagai berikut :

a. Usia

Resiko terkena penyakit kanker kolorektal meningkat seiring dengan bertambahnya usia. Mayoritas kasus kanker kolorektal ditemukan pada pasien dengan usia kurang lebih 40 tahun.

b. Jenis Kelamin

Kasus kanker kolorektal terjadi 30% lebih tinggi pada pria dibandingkan dengan wanita, sementara tingkat mortalitas pada pria lebih tinggi 40%. Alasan mengapa terjadi perbedaan insiden maupun tingkat mortalitas bisa terjadi

masuk belum bisa dipahami sepenuhnya, namun sebagian peneliti menyatakan

hal tersebut dipengaruhi oleh paparan oleh faktor resiko lain seperti merokok.

Sementara hubungan antara hormon esterogen dengan kanker kolorektal belum dapat disimpulkan.

c. Faktor Genetik dan Riwayat Keluarga

Hampir 30% pasien kanker kolorektal memiliki riwayat keluarga, sekitar

5 % disebabkan oleh kelainan genetik yang diturunkan. Orang dengan riwayat

keluarga inti terkena kanker kolorektal memiliki resiko 2 – 4 kali lebih besar

menderita kanker kolorektal dibandingkan dengan orang yang tidak memiliki

riwayat keluarga.

d. Riwayat Penyakit

Orang yang memiliki penyakit radang usus kronis, sebuah kondisi

dimana terjadi inflamasi pada kolon dalam jangka waktu yang panjang memiliki

resiko dua kali lebih tinggi terkena kanker kolorektal. Bentuk radang usus

kronis yang paling sering adalah Chron disease dan kolitis ulseratif. Resiko

kanker meningkat seiring dengan durasi, dan keparahan penyakit.

Orang dengan penyakit diabetes tipe 2 memiliki peningkatan resiko

terkena kanker kolorektal. Karena diabetes tipe 2 dan kanker kolorektal

memiliki banyak faktor risiko yang sama, termasuk obesitas, sedentary

lifestyle, aktivitas fisik, indeks massa tubuh, dan lingkaran pinggang.

e. Faktor Perilaku

Aktivitas fisik berhubungan kuat dengan penurunan kanker kolorektal.

Studi menunjukkan bahwa orang yang secara fisik aktif memiliki resiko 25%

lebih rendah untuk terkena tumor kolorektal dibandingkan dengan orang yang kurang aktif. Banyak analisa penelitian menyatakan bahwa orang yang secara fisik kurang aktif memiliki peningkatan risiko terkena kanker kolorektal 25% hingga 50% dibandingkan dengan mereka yang lebih aktif.

2.1.6 Tatalaksana

Menurut Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (2017), penatalaksanaan kanker kolorektal bersifat multidisiplin. Terapi bedah merupakan modalitas utama untuk kanker stadium dini dengan tujuan kuratif. Kemoterapi adalah pilihan pertama pada kanker stadium lanjut dengan tujuan paliatif. Radioterapi merupakan salah satu modalitas utama terapi kanker rektum. Saat ini, terapi biologis (targeted therapy) dengan antibodi monoklonal telah berkembang pesat dan dapat diberikan dalam berbagai situasi klinis, baik sebagai obat tunggal maupun kombinasi dengan modalitas terapi lainnya.

A. Tatalaksana Bedah

1. Eksisi Lokal (Polipektomi Sederhana)

Eksisi lokal dapat diterapkan untuk polip kolon maupun polip rektum dan dapat dilakukan apabila struktur morfologik polip memungkinkan. Namun ada beberapa kontraindikasi relatif polipektomi yang perlu diperhatikan seperti, pasien yang mendapat terapi antikoagulan, memiliki kecenderungan perdarahan (bleeding diathesis), kolitis akut, dan secara klinis terdapat bukti yang mengarah pada keganasan invasif, seperti ulserasi sentral, lesi keras dan terfiksasi atau nekrosis.

2. Kolektomi dan reseksi KGB regional en-Bloc

Teknik ini diindikasikan untuk kanker kolorektal yang masih dapat direseksi dan tidak ada metastasis jauh. Luas kolektomi sesuai lokasi tumor, jalan arteri yang berisi kelenjar getah bening, serta kelenjar lainnya yang berasal dari pembuluh darah yang ke arah tumor dengan batas sayatan yang bebas tumor. Bila ada kelenjar getah bening yang mencurigakan sebaiknya direseksi. Reseksi harus lengkap mencegah adanya KGB positif yang tertinggal.

3. Bedah laparoskopik

Pembedahan laparoskopik dapat dipertimbangkan untuk penatalaksanaan kanker kolorektal. Penggunaan rutin laparoskopi tidak direkomendasikan pada, tumor rektum stadium lanjut, tumor dengan obstruksi akut atau perforasi, invasi tumor secara lokal ke struktur sekitar, dan terdapat perlengketan saat dilakukan laparoskopi eksplorasi.

4. Tindakan bedah untuk kanker metastatic

a. Tumor primer resektabel dan metastasis resektabel

Pada kanker kolorektal stadium 4 dengan metastasis hati dan atau paru dengan kondisi tumor masih dapat direseksi, tindakan yang paling tepat dilakukan adalah reseksi tumor. Tiga paradigma pada terapi kanker kolorektal dengan metastasis hati adalah klasik yaitu kanker kolorektal terlebih dahulu, bersamaan antara kanker kolorektal dan metastasis hati, atau pendekatan terbalik yaitu pengangkatan tumor metastasis hepar

terlebih dahulu. Keputusan dibuat berdasarkan di tempat manakah yang lebih dominan secara onkologikal dan simtomatis.

b. Tumor primer resektabel dan metastasis tidak resektabel

Pada keadaan seperti ini, dapat dilakukan reseksi tumor primer dilanjutkan dengan kemoterapi untuk metastasisnya.

c. Tumor primer tidak resektabel, metasatasis tidak resektabel

Penanganan yang bisa dilakukan untuk pasien dengan kanker kolorektal metastasis adalah kombinasi kemoterapi dan pembedahan atau radiasi paliatif. Pada kasus dengan penyakit metastasis tidak dapat direseksi maka terapi pilihannya adalah kemoterapi sistemik. Untuk penyakit yang sudah jelas tidak dapat dioperasi, intervensi seperti stenting atau laser ablation dapat dijadikan pilihan terapi paliatif yang berguna.

B. Prinsip Tatalaksana Sistemik

1. Kemoterapi

Kemoterapi pada kanker kolorektal dapat diberikan sebagai terapi adjuvan, neoadjuvan atau paliatif. Pada pasien kanker kolorektal dengan stadium III dan stadium II yang memiliki risiko tinggi dan pasien dengan performance status (PS) 0 atau 1 dapat direkomendasikan menggunakan kemoterapi sebagai terapi adjuvan. Yang termasuk risiko tinggi diantaranya jumlah KGB yang terambil <12 buah, tumor berdiferensiasi buruk, invasi vascular, limfatik atau perineural, tumor dengan obstruksi atau perforasi, dan pT4. Efek samping yang mungkin muncul pada pasien harus di pantau, sebelum terapi perlu dilakukan pemeriksaan darah tepi lengkap, uji

fungsi hati, uji fungsi ginjal (ureum dan kreatinin), serta elektrolit darah.

Beberapa contoh dari kemoterapi yang digunakan untuk pasien dengan kanker kolorektal diantaranya, 5-Flourourasil (5-FU), eucoverin/Ca-folinat, Capecitabine, Oxaliplatin dan Irinotecan (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017).

Menurut Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (2017), regimen standar kemoterapi baik ajuvan maupun paliatif yang dianjurkan adalah FOLFOX 6 atau modifikasinya (mFOLFOX6). Regimen Kemoterapi yang ada di Indonesia antara lain Capecitabine. 5-FU/ leucovorine dengan roswell park regimen, simplified biweekly infusional dan mingguan. Selain itu terdapat regimen mFOLFOX6 yang terdiri dari Oxaliplatin 85 mg/m² IV selama 2 jam hari ke-1, Leucovorin 400 mg/m² IV selama 2 jam hari ke-1 dan 5-FU 400 mg/m² IV bolus pada hari ke-1, kemudian 1200 mg/m²/hari x 2 hari secara IV infus kontinyu. Ulangi setiap 2 minggu. Regimen lain yang tersedia adalah CapeOX yang terdiri dari Oxaliplatin 130 mg/m² selama 2 jam hari ke-1 dan Capecitabine 1000 mg/m² dua kali sehari, per oral hari ke-1 sampai ke-14. Ulangi setiap 3 minggu x 24 minggu. Regimen selanjutnya, FOLFIRI yang terdiri dari Irinotecan 180 mg/m² IV selama 30 – 90 menit hari ke1, Leucovorin 400 mg/m² IV selama 2 jam hari ke-1 dan 5-FU 400 mg/m² IV bolus pada hari ke-1 kemudian 1200 mg/m²/hari x 2 hari secara IV infus kontinyu. Regimen diulangi setiap 2 minggu. Refimen terakhir yang dapat diberikan adalah IROX, yang terdiri dari Oxaliplatin 85 mg/m² IV selama 2 jam, diikuti irinotecan 200 mg/m² selama 30 atau 90 menit setiap 3 minggu.

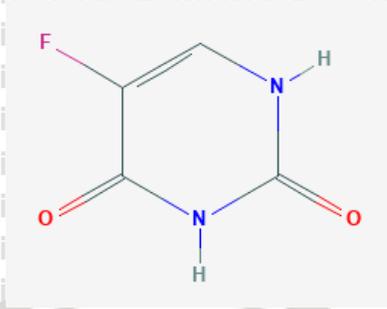
2. Terapi Tertarget (*Targeted therapy*)

Yang termasuk terapi tertarget diantaranya molekul dengan ukuran kecil, antibody monoklonal, polipeptida dan susbtansi lain yang dapat menginterferensi sinyal spesifik yang meregulasi sel tumor sehingga menghambat pertumbuhan sel tumor. Antibodi monoklonal akan memberikna memiliki target dengan ukuran besar yang berada di luar sel maupun di permukaan sel. Sedangkan molekul kecil memiliki target di dalam sel. Terapi tertarget bekerja dengan target sebagai berikut: hormone, inhibitor sinyal transduksi, modulator ekspresi gen, induser apoptosis maupun inhibitor angiogenesis (Desriani, 2016). Contoh dari terapi tertarget diantaranya, Bevacizumab, Cetuximab, Ziv-Aflibercept, Panitumumab, Regorafenib, BIBF 1120, Cediranib, Panitumumab, dan regorafenib (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017).

2.2 5- Fluorouracil

2.2.1 Mekanisme Kerja 5- Fluorouracil

Pada kasus kanker kolorektal, agen kemoterapi utama yang digunakan adalah 5-Fluorouracil (5-FU). 5-Fluorouracil (5-FU) merupakan analog dari urasil (DUMP) yang akan dikonversi menjadi 3 metabolit aktif yaitu fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP), fluorodeoxyuridine triphosphate (FdUTP) dan fluorouridine triphosphate (FUTP). 5-Fluorouracil (5-FU) memiliki efek anti kanker melalui inhibisi dari thymidylate synthase (TS) dan kesalahan pada DNA dan RNA (Milone, 2012).

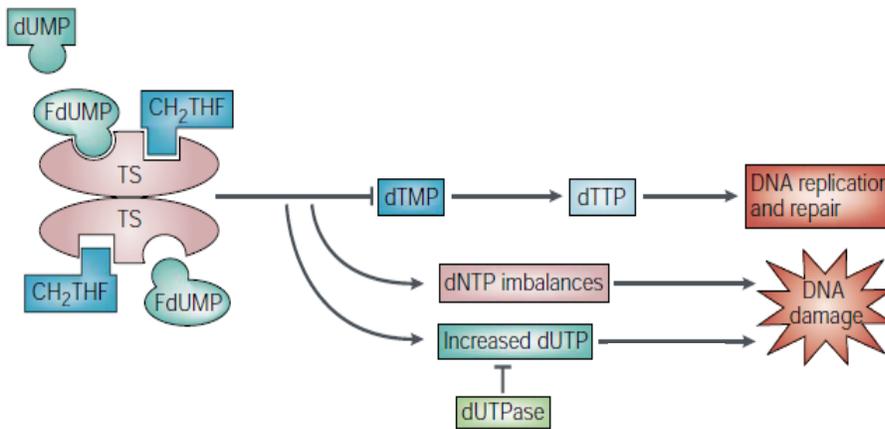


Gambar 2.2 Senyawa 5-FU Fluorourasil adalah antimetabolit analog urasil (PubChem)

Thymidylate synthase (TS) memiliki peran mengkatalis proses metilasi dari deoxyuridinemonophosphate (dUMP) menjadi deoxythymidine monophosphate (dTMP). Dengan adanya katabolisme tersebut mampu menyediakan timin yang dibutuhkan untuk memperbaiki dan replikasi DNA. Salah satu metabolit Fluorouracil (5-FU), FdUMP mampu berikatan dengan *thymidylate synthase* (TS) membentuk *ternary complex* dengan CH₂THF sehingga menghalangi tempat berikatan dari dUMP dan menghambat sintesis dTMP (Milone, 2012).

Penurunan dTMP mengakibatkan penurunan deoxythymidine triphosphate (dTTP) yang memicu perubahan level berbagai deoxynucleotide (dATP, dGTP, dan dCTP). Adanya ketidakseimbangan dari deoxynucleotide menghasilkan gangguan berat pada penyembuhan dan sintesis DNA yang menyebabkan kerusakan DNA. Sebagai tambahan, penghambatan *Thymidylate synthase* (TS) menyebabkan peningkatan akumulasi dari dUMP yang ternyata meningkatkan kadar dari deoxyuridine triphosphate (dUTP). Metabolit dari 5-FU, FdUTP bisa menyebabkan kesalahan replikasi DNA. Perbaikan dari urasil dan DNA yang mengandung 5-FU oleh enzim urasil DNA glycosylase (UDG)

merupakan hal yang sia - sia ketika konsentrasi dari dUTP/dTTP tinggi, karena menghasilkan inkorporasi nukleotida yang salah. Siklus ini mengarah pada untaian DNA pada fase istirahat dan kematian sel (Milone, 2012).



Gambar 2.3 Mekanisme 5-FU Menghambat *Thymidylate Synthase*

Keterangan : FdUMP metabolit dari 5-FU menghambat *thymidylate synthase* sehingga tidak terjadi katalis dUMP menjadi dTMP mengakibatkan jumlah thymidylate yang diproduksi tidak memadai dan mengganggu proses replikasi DNA. Peningkatan dUMP mengakibatkan dNTP tidak stabil sehingga terjadi kerusakan DNA. dUTP maupun FdUTP mengakibatkan kesalahan dalam integrasi DNA (Longley *et al.*, 2003; Milone, 2012).

Metabolit 5-FU, FUTP bergabung dengan RNA akan mengganggu fungsi dan proses pada RNA normal yaitu proses transkripsi RNA. Korelasi signifikan antara RNA yang terganggu oleh 5-FU dan hilangnya potensi klonogenik telah ditunjukkan pada sel kanker kolorektal dan sel kanker payudara pada manusia. Kekeliruan pada RNA akibat 5-FU dapat menyebabkan toksisitas terhadap RNA pada beberapa level. Tidak hanya menghambat proses perubahan pra-rRNA menjadi rRNA tetapi juga mengganggu modifikasi pasca-transkripsi tRNA dan perakitan serta aktivitas kompleks snRNA, sehingga menghambat penyambungan pra-mRNA. Selain itu, rRNA, tRNA dan snRNA semua mengandung pseudouridine, dan 5-FU telah ditujukan untuk menghambat

konversi paska transkripsi uridin menjadi pseudouridine pada RNA. 5-FU berpotensi mengganggu banyak aspek pengolahan dari RNA, yang mengarah kepada metabolisme dan viabilitas sel (Milone, 2012).

Pada kaitannya dengan siklus 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 TS untuk sintesis basa penyusun DNA. TS diekspresikan tinggi pada fase G1 melalui perantara aktivitas transkripsi dari E2F. Setelah diekspresikan, TS sendiri langsung mensintesis prekursor dUMP yang diperlukan dalam fase sintesis. Perlakuan dengan 5-FU pada sel kanker dapat menyebabkan akumulasi sel pada fase G1 dan awal fase sintesis (*G1/S arrest*). Namun, aktivitas penghambatan siklus sel oleh 5-FU tergantung pada jenis sel kanker. Pada sel kanker kolon HCT-15 dan HT-29, 5-FU menunjukkan penghambatan pada fase G2/M. 5-FU meningkatkan ekspresi cyclin A, cyclin B, dan CDC2 yang merupakan protein regulator pada fase G2/M (Milone, 2012).

2.2.2 Kekurangan 5- fluorouracil

Selain dapat memberikan efek yang bermanfaat sebagai agen yang dapat menyebabkan apoptosis pada sel kanker 5-FU juga memiliki efek samping seperti agen kemoterapi yang lain karena bekerja tidak hanya pada sel kanker, tetapi juga bekerja pada sel yang sehat. Efek samping yang paling umum yang dapat ditemukan pada lebih dari 30% pasien adalah diare, mual, muntah, sariawan, nafsu makan yang buruk, fotosensitivitas, rasa logam, neutropenia dan trombositopenia. Efek samping yang cenderung jarang terjadi, menimpa sekitar

10-20% dari pasien adalah perubahan warna kulit, efek dermatologis, alopecia, perubahan kuku dan *hand foot syndrome*. 5-FU juga dapat menimbulkan efek samping yang serius yang jarang terjadi (sekitar 1% pasien) adalah efek jantung, dan neurologis (Thomas *et al.*, 2016).

Pengobatan menggunakan 5-FU pada kanker memiliki efek samping jangka pendek maupun efek samping yang muncul setelah penghentian proses pengobatan. Efek samping yang muncul dalam waktu cepat adalah diare, mual, muntah, sariawan, kehilangan nafsu makan, fotosensitivitas, rasa logam dan perubahan warna kulit. Namun efek samping yang kurang dikenal dari 5-FU adalah efek samping jangka panjang pada neurologis, terjadinya kematian sel-sel otak yang sehat setelah perawatan selesai. Sebuah istilah yang biasa digunakan oleh penderita kanker adalah *chemo brain*, kondisi di mana penderita kanker memiliki gangguan kognitif atau disfungsi yang paling sering terlihat terdapat kendala dalam kemampuan memori. Contohnya adalah pemikiran yang lebih lambat, kesulitan berkonsentrasi, mengerjakan beberapa hal dalam satu waktu, dan mengingat kata-kata. 5-FU diketahui bersifat toksik terhadap sel progenitor *central nervous system* dan oligodendrosit. Oligodendrosit menghasilkan selubung mielin di sistem saraf pusat, yang memungkinkan terjadinya komunikasi dan sinaps listrik antara sel-sel saraf. Jadi, kerusakan sel-sel ini dapat menyebabkan disfungsi kognitif yang terlihat pada pasien dengan *chemo brain* (Thomas *et al.*, 2016).

Kardiotoksisitas karena 5-FU merupakan hal yang tidak umum tetapi terjadi walaupun tidak bergantung pada dosis dan jadwal pemberian obat.

Kardiotoksisitas menunjukkan karakteristik iskemia telah dikaitkan dengan pemberian 5-FU pada pasien kanker. Ini dapat menyebabkan disritmia, perubahan elektrokardiogram, gejala kardiorespirasi, *acute myocard infark*, atau bahkan kematian mendadak (Thomas *et al.*, 2016).

2.3 *Lumbricus rubellus*

2.3.1 Klasifikasi ilmiah

Cacing tanah *Lumbricus rubellus* tergolong ke dalam hewan avertebrata atau tidak bertulang belakang sehingga sering disebut binatang lunak. Cacing tanah *Lumbricus Rubellus* ini bukan asli dari Indonesia melainkan dari Eropa, sehingga sering disebut cacing Eropa (Palungun, 2011). Adapun klasifikasi ilmiah *Lumbricus rubellus* Hoffmeister, 1843 adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Animalia
Filum	: Annelida
Kelas	: Clitellata
Ordo	: Crassiclitellata
Familia	: Lumbricidae
Genus	: Lumbricus
Species	: <i>Lumbricus rubellus</i>

(GBIF Backbone Taxonomy, 2017)

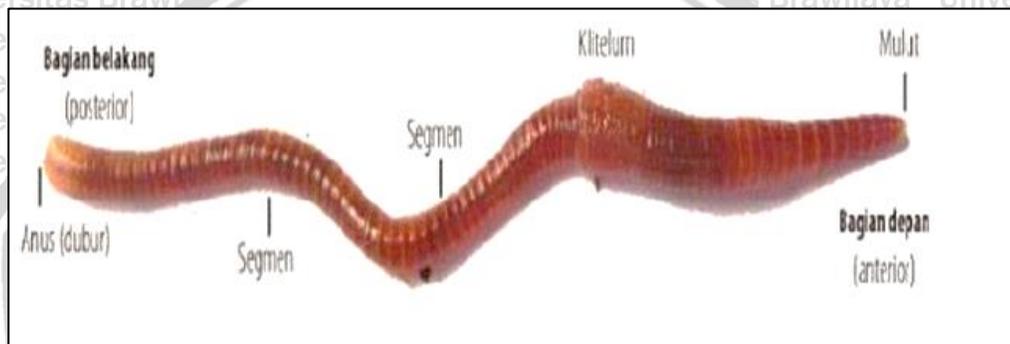
2.3.2 Morfologi *Lumbricus rubellus*

Lumbricus rubellus terdiri dari 95 – 100 segmen dengan panjang antara 8 cm – 14 cm. Warna tubuh bagian dorsal cokelat cerah sampai ungu kemerah-merahan, bagian ventral krem dan bagian ekor kekuning-kuningan. Bentuk tubuh

dorsal membulat dan ventral memipih. Klitellium terletak pada segmen ke-27

sampai 32 dengan jumlah segmen pada klitellium antara 6-7 segmen. Kelamin jantan terletak pada segmen ke-14 dan kelamin betina pada segmen ke 13.

Secara umum cacing tanah memiliki lendir, prostomium, tidak bergigi, menggunakan kulit sebagai alat pernafasan, bersifat hermafrodit, nokturnal, serta peka terhadap cahaya dan sentuhan (Palungkun, 2011).



Gambar 2.4 *Lumbricus rubellus*

Keterangan : Warna tubuh bagian dorsal coklat cerah sampai ungu kemerah-merahan, bagian ventral krem dan bagian ekor kekuning-kuningan. Bentuk tubuh dorsal membulat dan ventral memipih (Palungkun, 2011).

Cacing tanah merupakan hewan hermafrodit yang aktif untuk bereproduksi pada keadaan hangat dan lembab. Ketika dua cacing menemukan pasangan, mereka akan menyelimuti diri dengan lendir dan saling menggosokkan tubuh mereka guna menyalurkan sperma. Setelah kawin, *clitella* cacing tanah akan mengeluarkan cincin lendir di atas tubuh cacing untuk mengambil sel telur dari satu segmen cacing dan sperma dari segmen lain sehingga pembuahan dapat terjadi. Saat cacing tanah bergerak maju, cincin lender tersebut tergelincir dan disimpan di bawah tanah yang selanjutnya akan menutup dan mengeras. 3 minggu hingga 5 bulan kemudian, telur-telur akan menetas dan cacing kecil bersembunyi (Sudarminto, 2015).

Cacing tanah yang baru menetas berukuran sekitar 1.2 cm, tanpa organ reproduksi, berwarna keputihan dengan semburat merah muda yang menunjukkan pembuluh darah mereka. Cacing tanah akan mulai matang secara seksual saat *clitellum* terbentuk dengan sempurna yaitu pada usia 10-55 minggu (Sudarminto, 2015).

2.3.2 Manfaat *Lumbricus rubellus*

Cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) telah banyak digunakan sebagai obat tradisional untuk mengobati banyak penyakit selama di banyak negara Asia termasuk China, Indonesia dan Jepang. Dikatakan bahwa cacing tanah dapat digunakan untuk mengobati bronkitis kronis, asma, tifus, psikosis, ulkus peptik, epidemi parotitis, herpes zoster, urtikaria, luka bakar, melepuh, batu kandung kemih, kanker, antibakteri maupun anti tumor (Eun *et al*, 2014).

Hal tersebut didukung dengan penelitian yang telah dilakukan secara *in vitro* pada sel HT-29 oleh Permana *et al.* (2018), kombinasi cairan *coelomic* dari *Lumbricus rubellus* dengan 5-FU dapat meningkatkan apoptosis sel, efek sitotoksik dan menghambat proliferasi sel kanker kolorektal. Penelitian lebih lanjut yang dilakuakn secara *in vitro* oleh Endharti *et al.* (2019), mengatakan bahwa penggunaan kombinasi cairan *coelomic* dari *Lumbricus rubellus* dengan 5-FU pada sel HT-29 mampu meningkatkan apoptosis dan memiliki sifat anti tumor melalui penurunan FAK. Selain itu diketahui secara *in vivo*, penggunaan cairan *coelomic* dari *Lumbricus rubellus* dengan 5-FU mampu menurunkan proliferasi sel kanker kolorektal melalui penurunan FAK dan IL-1 β (Permana *et al.*, 2019). *Lumbricus rubelus* memiliki efek anti tumor melalui carian *coelomic* yang mengandung lysenin.

2.3.3 Kandungan *Coelomic Fluid* Cacing Tanah

Penelitian medis telah menunjukkan bahwa *coelomic fluid* (CF) pada cacing tanah mengandung banyak zat termasuk lektin, polisakarida, protease, peptida antibakteri, metalloenzyme, enzim fibrinolitik. Unsur yang paling menonjol pada *coelomic fluid* adalah lysenin, lysenin-related protein dan fetidin. Ketiga protein tersebut diketahui memiliki sifat sitotoksik dan aktifitas kontraksi otot polos. Lysin related protein yang memiliki 72% atau lebih residu asam amino identik dengan lysenin, sekitar 17% dari sangat mirip dan hanya sekitar 5% dari residu yang berbeda dari lysenin (Sukumwang dan Umezawa, 2013).

2.3.4 Lysenin

Menurut Boroki-Brown (2018), lysenin merupakan protein 41 kDa, 297 asam amino yang terdapat pada cairan *coelomic* yang dibentuk oleh sistem kekebalan tubuh cacing tanah. Lysenin disekresikan sebagai monomer yang tidak aktif dan larut air. Setelah berikatan dengan sphingomyelin pada membran sel eukariotik, lysenin mengalami perubahan yang signifikan pada permukaan membran sebelum masuk ke dalam membrane. Lysenin terdiri dari dua domain struktural utama: (1) PFM bagian yang memanjang pada N-terminus yang berisi situs yang berikatan dengan sphingomyelin dan *membrane-insertion loop* dan (2) domain beta-trefoil C-terminal yang berkaitan phosphocholine (POC). Untuk berikatan dibutuhkan bagian dari struktur lysenin baik yang terikat pada sphingomyelin maupun dengan POC. (Monicca *et al.*, 2016)

Menurut Boroki-Brown (2018), lysenin yang telah aktif memiliki berbentuk seperti jamur berbeda dengan lysenin fase larut air. Struktur lysenin yang

sebelumnya terbagi menjadi dua domain: N-terminal PFM dan domain beta-trefoil

C-terminal. Karena ada penataan ulang struktural terkait dengan penyisipan membran terbagi menjadi tiga domain: domain tutup terminal N (Glu10 – Ser33 dan Pro108 – Ile156), domain β -hairpin (Val34 – Ile107) dan C- domain *binding* reseptor terminal (Val157-Gly297).

Target sel dari lysenin diantaranya adalah sel – sel tumor (Podobnik *et al.* 2016). Penggunaan lysenin juga dikatakan dapat mengaktifkan caspase 9 sehingga terjadinya peningkatan apoptosis sel (Permana *et al.*, 2018). Caspase 9 akan mengubah *pro-caspase* 3 menjadi caspase 3 dimana memiliki peran dalam proteolisis. Lysenin juga mengaktifasi caspase 8 yang juga memiliki peran untuk mengubah *pro-caspase* 3 menjadi caspase 3 dan menyebabkan apoptosis (McIlwain *et al.*, 2013).

2.4 Vimentin

Vimentin merupakan protein 57 kDa yang paling banyak diekspresikan dari interfilamen kelas III. Pada orang dewasa ekspresi vimentin terbatas pada sel-sel mesenkim jaringan ikat, di CNS dan di otot. Vimentin memegang peran sebagai penanda kanonikal EMT, suatu proses *re-programming* seluler di mana sel-sel epitel memperoleh fenotipe mesenkim yang membuat sel-sel tersebut berubah bentuk dan menunjukkan peningkatan motilitas. Peningkatan ekspresi vimentin telah dilaporkan dalam berbagai sel tumor dan jaringan termasuk kanker prostat, kanker payudara, kanker endometrium, tumor otak, melanoma ganas dan tumor gastrointestinal kanker pankreas, kolorektal dan hati (Satelli dan Li, 2011).

Vimentin terdiri dari 466 asam amino, dengan domain "batang" α -heliks yang diapit oleh non- α -heliks N-terminal dan C-terminal, yang disebut "head" dan "tail".

Bersama-sama, molekul-molekul ini bergabung secara paralel dan membentuk gulungan melingkar (*coil*), yang membentuk struktural dasar untuk seluruh keluarga

protein IF. Fitur umum yang ada pada keluarga IF yaitu keberadaan domain alfa-heliks yang melingkar-lingkar memiliki peran membantu pembentukan polimer yang stabil, stabilitas yang ada pada vimentin dikendalikan oleh status fosforilasi protein tersebut.

Vimentin berpotensi sebagai target yang sangat baik untuk sejumlah kinase dan beberapa titik fosforilasi pada vimentin telah teridentifikasi. Fosforilasi vimentin berkaitan dengan fungsional termasuk pengaturan struktur IF dan beberapa jalur pensinyalan (Satelli dan Li, 2011).

2.4.1 Vimentin pada kanker kolorektal

Pada kanker kolorektal, metilasi gen vimentin dikatakan sering terjadi pada kanker kolorektal lanjut. Fenomena ini dapat dimanfaatkan untuk mengembangkan teknik sensitivitas tinggi untuk mendeteksi metilasi gen vimentin dalam sampel klinis termasuk serum darah dan feses. Ekspresi berlebih dari vimentin yang terdeteksi pada sel kanker kolorektal juga berkorelasi baik dengan peningkatan migrasi dan potensi invasif. Hal tersebut dikatakan bahwa 70% kerusakan dari vimentin sudah cukup untuk merusak sifat invasi dan kapasitas migrasi sel karsinoma. Analisis proteomik untuk melihat ekspresi protein pada sampel kanker kolorektal dari pasien dengan elektroforesis gelombang dua dimensi menunjukkan regulasi yang berbeda pada vimentin bila dibandingkan dengan jaringan normal di sekitarnya (Satelli dan Li, 2011).

Selain adanya gangguan pada metilasi gen, peningkatan vimentin kanker kolorektal dapat terjadi karena aktivasi beberapa jalur yaitu PI3K, Wnt, dan Smad yang berujung dengan aktifnya faktor transkripsi Snail, Twist dan ZEB. Faktor transkripsi merupakan protein yang memiliki fungsi untuk mengatur laju dari transkripsi DNA. Aktivasi faktor transkripsi tersebut akan meningkatkan laju dari transkripsi DNA sehingga protein yang dihasilkan juga meningkat termasuk vimentin. Vimentin pada keadaan kanker memiliki sifat invasif dan motilitas yang tinggi (Pandurangan, 2013; Ormanns *et al.*, 2014).

Wnt merupakan protein yang memiliki *Palmitoleic Acis* yang memiliki fungsi untuk berikatan. Pada sel normal, β catenin berikatan dengan protein kompleks yang terdiri dari Dvl, Axin, CKI, GSK3, APC, β TrCP yang dinamakan kompleks destruksi. β TrCP merupakan ubiquitin III ligase dan fosforilasi pada β catenin akan menginduksi proses ubiquitinasi dari β catenin oleh β TrCP yang selanjutnya akan mengalami degradasi oleh *proteasome* sehingga kadar β catenin selalu rendah. Namun pada keadaan kanker Wnt berikatan dengan reseptor frizzled yang akan mengakibatkan fosforilasi LRP dan berikatan dengan kompleks destruksi tepatnya dengan Dvl. Setelah berikatan, Dvl menjadi aktif dan mencegah β catenin dari fosforilasi sehingga adanya peningkatan β catenin. Selanjutnya β catenin mengalami translokasi dan berikatan dengan faktor transkripsi Snail, sehingga Snail dapat berikatan dengan DNA. Snail akan menekan gen epitelial sehingga meningkatkan transkripsi gen mesenkimal termasuk vimentin (Mladinich *et al.*, 2016; Vu dan Datta, 2017).

Selain itu TGF β yang berikatan dengan TGF β reseptor akan mengaktifkan jalur PI3K dengan respon terfosforilasinya domain protein tirosin kinase dan mengaktifkan PI3K. Selain melalui TGF β reseptor, faktor pertumbuhan epidermal yang berikatan dengan tirosin kinase reseptor sebagai EGFR juga dapat mengaktifkan jalur PI3K. Setelah terfosforilasinya domain kinase pada reseptor tersebut PI3K akan teraktifasi akan mengaktifkan AKT sehingga dapat memfosforilasi GSK3 dan mengubah GSK3 menjadi tidak aktif. GSK3 memiliki fungsi berikatan dengan β catenin agar tidak aktif. Karena GSK3 tidak aktif maka jumlah β catenin meningkat dan akan terjadi hal yang sama pada jalur Wnt. AKT yang aktif dapat meregulasi peningkatan faktor transkripsi Twist yang menginduksi proses transkripsi DNA dan meningkatkan proliferasi dan sifat invasif dari sel tersebut. TGF β reseptor juga akan mengalami fosforilasi pada domain kinase yang menempel pada reseptor tersebut setelah membentuk kompleks dengan TGF β reseptor. Setelah domain kinase terfosforilasi, akan terjadi aktivasi pada Smad 2 dan Smad 3 dengan penambahan gugus fosfor dan membentuk heterodimer. Setelah terbentuk heterodimer, Smad 4 yang terdapat pada sitosol juga akan bergabung sehingga tercipta heterotrimer, bentuk tersebut yang dapat melakukan translokasi dan membuat faktor transkripsi ZEB berikatan dengan DNA sehingga terjadi proliferasi, migrasi sel dan peningkatan transkripsi gen mesenkimal (Pandurangan, 2013; Jung *et al.*, 2017).

2.4.2 Vimentin pada *cell signaling*

Vimentin ditemukan di sitoplasma sel, dimana fungsinya untuk mempertahankan arsitektur dari sel dan integritas jaringan. Vimentin diketahui

mampu berinteraksi dengan sejumlah besar protein dan berpartisipasi dalam berbagai fungsi seluler. Vimentin juga terlibat dalam sejumlah proses lain yang melibatkan pembentukan kompleks dengan beberapa molekul sehingga mencetuskan sinyal sel. Seperti ketika terjadi aktivasi dari jalur AKT, khususnya AKT1 pada domain ekor mampu berikatan dengan domain kepala dari vimentin yang mengasikkan fosforilasi pada Ser 39 pada vimentin. Hal tersebut mengasikkan perlindungan untuk vimentin dari jalur caspase yang menghambat proses apoptosis (Zhu *et al.*, 2011).

Sel kanker mengekspresikan ketiga AKT dengan level yang berbeda – beda, namun hanya AKT1 yang ditemukan secara jelas memberikan efek. Hal tersebut dilihat dari penurunan AKT1 secara signifikan menghambat migrasi serta invasi sel kanker dan tidak ada efek signifikan pada penurunan AKT2. Setelah dilakukan pendekatan berbasis proteomik dengan cara protein AKT1-*coimmunoprecipitated* yang dianalisis menggunakan spektrometri massa (MS) untuk mengidentifikasi target pengikat protein AKT dan dikonfirmasi dengan *immunoprecipitation* atau western blot (WB) didapatkan tiga protein, DDX5, GRP75 dan Vimentin (Zhu *et al.*, 2011).

Interaksi antara AKT1 dan vimentin teridentifikasi di semua sel kanker yang diuji. Interaksi AKT2 dengan vimentin juga teridentifikasi, meskipun ke tingkat yang lebih rendah (Zhu *et al.*, 2011). Untuk mengkonfirmasi interaksi AKT dengan vimentin langsung, uji assay protein *in vitro* dilakukan. Tes *in vitro* ini mengkonfirmasi terdapat interaksi langsung antara domain ekor AKT1 dan domain kepala vimentin. Penurunan kadar AKT1 menunjukkan penurunan fosforilasi

vimentin, sedangkan AKT2 tidak. Ikatan pada Ser 39A dikatakan memiliki pengaruh yang paling lemah. Efek penghambatan AKT1 pada vimentin di sel selanjutnya dievaluasi, penghambatan fungsi AKT1 berpengaruh pada tingginya pembelahan vimentin dan peningkatan aktivasi caspase 3. Diketahui dalam pembelahan proteolisis vimentin diperankan oleh caspase 3 yang akan menghasilkan apoptosis sel (Zhu *et al.*, 2011).

AKT dikenal memiliki efek *pro-survival*, penghambatan AKT menghasilkan apoptosis sel yang signifikan dalam banyak model kanker. Peran vimentin dalam apoptosis diperankan melalui proses proteolisis pada berbagai rangsangan proapoptotic. Proteolisis vimentin yang terjadi melalui aktivasi jalur caspase menghasilkan pembelahan vimentin. Proteolisis vimentin melepaskan fragmen yang berpotensi sebagai proapoptotik yang secara nyata meningkatkan apoptosis dengan meningkatkan sinyal kematian sel. Terjadi umpan balik positif, di mana caspase menginduksi pembelahan vimentin dan produk pembelahan tersebut akan berkumpul dan menginduksi penyusutan sitosol, pembulatan sel dan kondensasi atau fragmentasi inti hal ini yang disebut dengan peningkatan sinyal kematian dan berakhir dengan apoptosis. Penghambatan AKT1 dikatakan dapat menginduksi caspase. Dikatakan bahwa AKT1 akan memfosforilasi vimentin setelah berikatan dan melindungi vimentin dari caspase proteolisis, menunjukkan efek prosurvival AKT1 akibatnya sel tidak dapat apoptosis. Gangguan pada ikatan antara vimentin dengan AKT1 mampu mengembalikan peran vimentin sebagai target dari jalur caspase dan menyebabkan apoptosis (Zhu *et al.*, 2011).

Vimentin sebagai target caspase proteolisis dipengaruhi oleh caspase 3, caspase 6, caspase 7 dan caspase 8. Hasil dari proteolisis caspase memiliki dua efek yaitu kerusakan yang bersifat ireversibel pada vimentin dan hasil pembelahan vimentin yang bersifat pro-apoptosis berfungsi memperkuat sinyal kematian sel. Caspase dikatakan bertanggung jawab atas apoptosis yang melibatkan oleh pembelahan vimentin. Vimentin pada awalnya mengalami pembelahan di Asp 85 oleh caspase 3 atau caspase 7 dan selanjutnya mengalami pembelahan oleh caspase 6 atau caspase 8 pada Asp 259. Apoptosis yang diinduksi dari potongan vimentin dikatakan memerlukan caspase 8 dalam prosesnya. Caspase 8 sendiri dapat mengubah pro-caspase 3, pro-caspase 6 dan pro-caspase 7 menjadi caspase 3, caspase 6 dan caspase 7 yang aktif (Lifeng *et al.*, 2017).

2.5 Metode In Silico

2.5.1 Metode Docking

Molecular docking adalah suatu teknik yang digunakan untuk memprediksi dan mempelajari interaksi yang terjadi dari suatu kompleks molekul. *Molecular docking* dapat memprediksikan orientasi dari suatu molekul ke molekul yang lain ketika berikatan membentuk kompleks yang stabil (Xuan-Yu *et al.*, 2011; Funkhouser, 2007). Metode untuk mencari posisi optimal ligand terhadap sisi aktif pengikatan dari struktur target (reseptor). *Molecular docking* dapat memprediksi afinitas ikatan kompleks yang terbentuk antara reseptor dengan ligan menggunakan parameter *inhibitor* atau ligan yang diketahui telah berikatan, ikatan hidrogen dan hidrofobik. *Molecular docking* berguna dalam proses perancangan obat, untuk memprediksi afinitas pengikatan dari inhibitor yang didesain terhadap

target tertentu yang ingin dihambat aktivitasnya (Xuan-Yu *et al.*, 2011; Yeteru dan Nagasuma, 2008).

Fungsi scoring dapat memperkirakan afinitas ikatan antara molekul yang berperan sebagai target dengan molekul yang berperan aktif. Nilai *binding affinity* yang besar menunjukkan bahwa konformasi yang terbentuk stabil dan ikatan yang terbentuk kuat, sedangkan nilai *binding affinity* yang kecil menunjukkan bahwa konformasi yang terbentuk kurang stabil dan ikatan yang terbentuk lemah.

Berdasarkan pada interaksi yang terjadi, terdapat beberapa jenis *molecular docking*, yaitu (1) Docking protein-protein, (2) Docking zat aktif-protein, dan (3) Docking ligan-DNA (Xuan-Yu *et al.*, 2011; Funkhouser, 2007).

Untuk melakukan *molecular docking*, hal pertama yang dibutuhkan adalah struktur tiga dimensi dari ligan dan target. Struktur tiga dimensi ligan dapat dimodelkan dengan menggunakan teknik *molecular modeling* sedangkan struktur tiga dimensi target dapat ditentukan secara empiris dengan menggunakan teknik *NMR spectroscopy* dan *x-ray crystallography* yang terdapat pada database protein data bank dan secara *insilico* dengan *homology modeling* (Xuan-Yu *et al.*, 2011).

2.5.2 Patchdock

Patchdock merupakan sebuah *webserver* yang digunakan untuk *molecular docking*. Input data pada patchdock dapat berupa protein, peptida dan DNA dengan output molekul kompleks. Data yang dihasilkan oleh Patchdock didapatkan berdasarkan pola kecocokan algoritma antara ligan dan reseptor. Pola algoritma memiliki 3 tahap yaitu (i) *Molecular Shape Representation*, yaitu perhitungan permukaan molekul untuk mengidentifikasi residu yang akan dihasilkan (ii) *Surface*

Patch Matching, yaitu pencocokan struktur geometrik yang teridentifikasi pada tahap sebelumnya (iii) *Filtering and Scoring*, yaitu pengelompokan kandidat kompleks yang dihasilkan dimana ligan dan reseptor yang menghasilkan kompleks sehingga didapatkan *scoring* dari komplementer geometrinya (Mashiach *et al.*, 2010).

2.5.3 Firedock

Firedock merupakan *webservice* yang digunakan sebagai perbaikan hasil yang didapatkan pada Patchdock dan dapat menghasilkan data berupa afinitas ikatan. Perbaikan pada Firedock dengan *docking* antara protein dengan protein, dimana hasil yang didapatkan kandidat molekul terbaik yang akan digunakan. Tahap perbaikan atau *refinement* bertujuan untuk menghasilkan *best solution* pada kompleks molekul, sehingga pengikatan molekulnya lebih akurat. Tahap *refinement* juga dilakukan untuk meningkatkan kekakuan kompleks molekul yang akan dihasilkan (Mashiach *et al.*, 2010).

2.5.4 LigPlot

LigPlot merupakan suatu aplikasi yang dapat menghasilkan diagram skematik secara otomatis koordinat target protein dengan ligan yang terkait. Diagram skematik ini menggambarkan pola interaksi antara dua molekul yang berguna untuk membandingkan struktur atau mempelajari interaksi yang terjadi. Interaksi yang ditampilkan oleh LigPlot berupa ikatan hidrogen dan ikatan hidrofobik (Wallace dan Laskowski, 2019).

2.5.5 PyRx

PyRx merupakan suatu perangkat lunak virtual untuk penemuan obat secara komputasi dengan melihat potensinya dengan target. Proses yang harus dilakukan adalah, preparasi ligan dan target, melakukan kalkulasi serta analisis hasil. PyRx terdiri dari AutoDock Vina, AutoDock Tools untuk membuat berkas masukan, Python sebagai dasar program, alat visualisasi dan operabel untuk pengubah format berkas sdf dan mol (Dallaykan dan Olson, 2015).

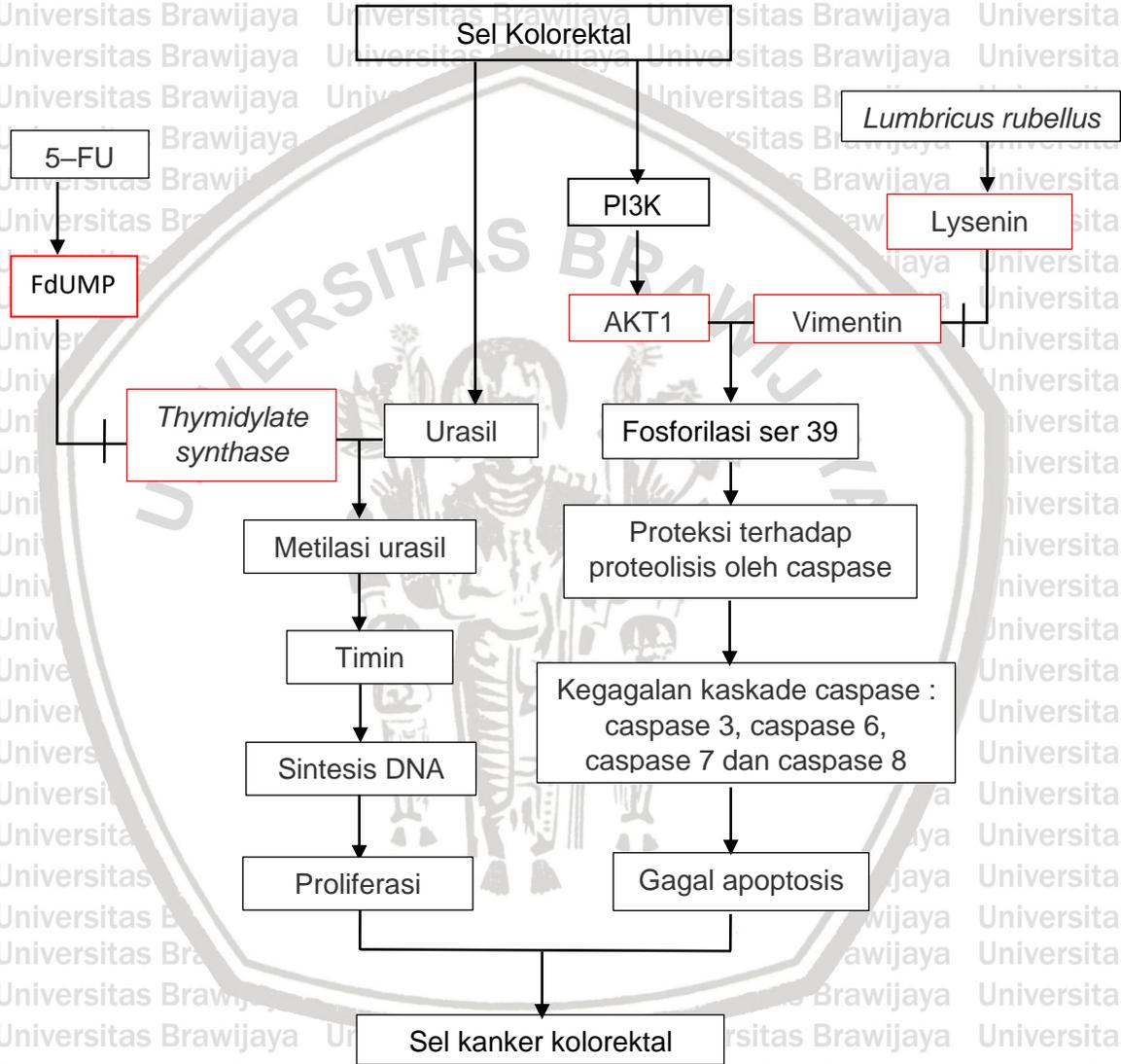
2.5.6 PyMol

PyMol merupakan program yang memiliki fungsi untuk memvisualisasikan struktur dari file yang terkait dengan proses *docking*. PyMol dapat dijalankan dalam program berbasis Windows, Linux atau MacOS dengan baik. PyMOL sebagai program visualisasi grafis molekuler dapat digunakan untuk beberapa hal antara lain untuk membaca basis data protein PDB (Protein Data Bank), menampilkan struktur 3D makromolekul dengan berbagai representasi bentuk, menseleksi dan mengedit bagian tertentu pada molekul, visualisasi warna, menampilkan sekuens protein. Selain itu, PyMol banyak digunakan guna mempersiapkan publikasi hasil *docking* dalam hal visualisasi (Yuan *et al.*, 2017).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penellitian



Universitas Brawijaya : diteliti
 : tidak diteliti
 : menghambat
 : menginduksi

3.2 Deskripsi Kerangka Konsep

Lysenin yang terdapat di dalam cairan *coelomic Lumbricus rubellus* berikatan dengan vimentin pada sel kanker sehingga terjadi gangguan ikatan antara AKT1 dan vimentin berupa penurunan *binding affinity* serta perubahan *binding site* yang berakibat pada tidak terjadinya fosforilasi vimentin pada Ser 39. Gagalnya proses fosforilasi, mampu menghilangkan sifat proteksi terhadap proteolisis yang di mediasi oleh jalur caspase sehingga dapat meningkatkan apoptosis sel kanker.

Sementara cara kerja 5-Fluorouracil dengan menghambat kerja *thymidylate synthase* sehingga menghambat proses sintesis DNA sel melalui metabolit aktif berupa FdUMP. Terjadinya gangguan pada proses sintesis DNA dapat mengakibatkan kematian sel atau berhenti pada fase istirahat.

Walaupun cara kerja lysenin terhadap vimentin berbeda dengan 5-FU, namun keduanya bertujuan untuk menghambat perkembangan sel kanker menjadi lebih buruk dengan meningkatkan apoptosis sel kanker kolorektal. Kombinasi terapi antara lysenin dan 5-FU dapat menimbulkan hubungan sinergisme sehingga terapi lebih efektif.

3.3 Hipotesis Penelitian

1. Lysenin pada *Lumbricus rubellus* dapat berikatan dengan vimentin.
2. Ikatan lysenin pada *Lumbricus rubellus* dengan vimentin dapat menurunkan *binding affinity* dan mengubah *binding site* dari AKT1.
3. Terdapat ikatan antara FdUMP dengan *thymidylate synthase*.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang mengambil sampel dari database RCSB Protein Data Bank dan Pubchem, yang bertujuan untuk mengetahui daya ikatan lysenin dalam cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dengan vimentin yang diharapkan dapat berfungsi sebagai terapi kombinasi untuk kanker kolorektal.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) yang diambil dari peternakan cacing tanah di Malang, Jawa Timur, Indonesia.

4.2.2 Sampel

Dalam penelitian ini, sampel yang digunakan adalah lysenin yang terdapat pada cairan *coelomic* cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) yang datanya didapatkan dari database RCSB Protein Data Bank.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Ruang Ketahanan Jurnal Universitas Brawijaya dan Laboratorium Bioinformatika, Institut Bioinformatika Indonesia pada 3 Oktober

2018 – 29 April 2019.

4.4 Identifikasi Variabel

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah vimentin dan FdUMP.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah lysenin pada *coelomic fluid* dari cacing tanah (*Lumbricus rubellus*), AKT1, *Thymidylate synthase*.

4.5 Definisi operasional

- Lysenin adalah protein yang diproduksi oleh sistem kekebalan tubuh cacing tanah dan ditemukan di cairan *coelomic* (Boroki-Brown *et al.*, 2016).
- Vimentin adalah target protein dari jalur caspase yang memediasi terjadinya apoptosis (Lifeng *et al.*, 2017).
- AKT1 adalah protein subunit dari AKT yang diketahui berikatan dengan Vimentin pada keadaan kanker dan berperan dalam mengatur proliferasi dan apoptosis sel (Duggal *et al.*, 2018)
- Fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP) adalah salah satu metabolit aktif dari 5-FU yang berikatan dengan *Thymidylate synthase* (Milone, 2012).
- *Thymidylate synthase* merupakan enzim katalis yang memiliki peran mengkatalis reduksi metilasi dari deoxyuridinemonophosphate (dUMP) menjadi deoxythymidine monophosphate (dTMP) guna menyediakan timin (Milone, 2012).
- Molecular docking adalah studi yang mempelajari bagaimana dua atau lebih struktur molekul dapat berikatan satu sama lain yang diukur dengan afinitas

ikatan yang memiliki satuan kkal/mol menggunakan server Patchdock, Firedock aplikasi PyMol v.2.2.0, PyRx V.0.9.5 dan LigPlot v.1.4.5. (Meng *et al.*, 2012)

- Afinitas ikatan adalah energi yang dibutuhkan suatu ligan agar dapat berikatan dengan makromolekul atau ligand lainnya yang ditetapkan sebagai target dengan satuan kkal/mol dengan besarnya yaitu secara negatif (Yunta, 2016).

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat untuk Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah perangkat keras berupa satu set laptop dengan spesifikasi: Processor tipe Intel® inside™ CORE i7, RAM 8GB dan harddisk 500 GB.

4.6.2 Bahan untuk Penelitian

- a. Struktur tiga dimensi Lysenin.
- b. Struktur tiga dimensi Vimentin.
- c. Struktur tiga dimensi AKT1.
- d. Stuktur tiga dimensi FdUMP metabolit aktif dari 5-FU.
- e. Struktur tiga dimensi UMP sebagai kontrol.
- f. Sturktur tiga dimensi *Thymidylate synthase* (TS).

4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

1. Preparasi Lyseinin.

Struktur lyseinin dapat diunduh melalui database RSCB Protein Data Bank dalam format .pdb.

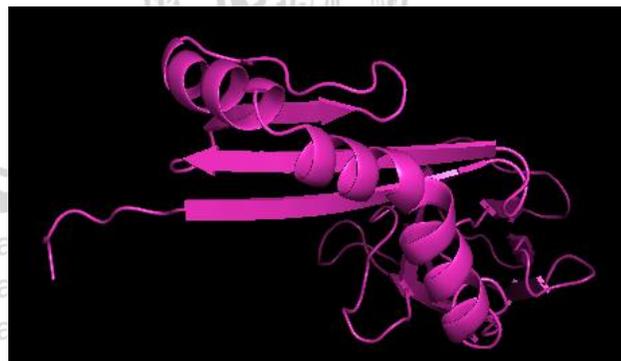


Gambar 4.1 Struktur Lyseinin

Keterangan : Struktur 3D dengan warna hijau merupakan Lyseinin yang belum di-*docking* (RCSB Protein Data Bank)

2. Preparasi Vimentin

Struktur tiga dimensi vimentin dapat diunduh melalui database RSCB Protein Data Bank dalam format .pdb.

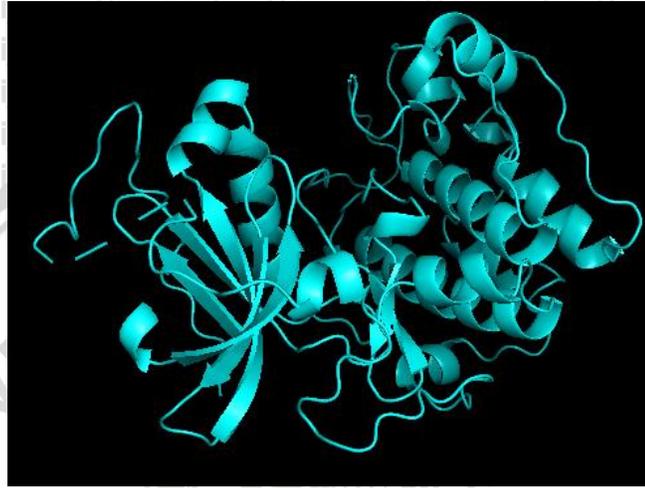


Gambar 4.2 Struktur Vimentin

Keterangan : Struktur 3D dengan warna merah muda merupakan vimentin yang belum di-*docking* (RCSB Protein Data Bank)

3. Preparasi AKT1

Struktur tiga dimensi AKT1 dapat diunduh melalui database RSCB Protein Data Bank dalam format .pdb.

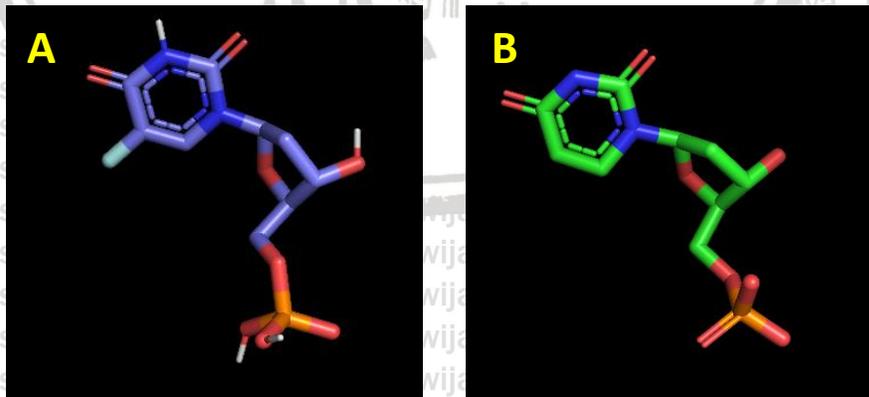


Gambar 4.3 Struktur AKT1

Keterangan : Struktur 3D dengan warna biru merupakan AKT1 yang belum di-*docking* (RCSB Protein Data Bank)

4. Preparasi FdUMP metabolit aktif dari 5-FU

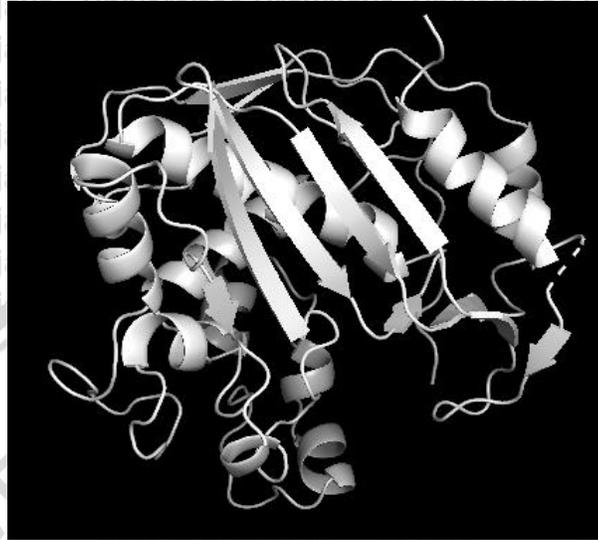
Struktur tiga dimensi FdUMP diunduh melalui database PubChem sedangkan UMP diunduh melalui database RSCB Protein Data Bank dalam format .pdb.



Gambar 4.4 FdUMP dan UMP

Keterangan : Gambar A merupakan struktur 3D FdUMP sebagai ligan (PubChem), sementara gambar B merupakan struktur 3D dari UMP sebagai kontrol (PDB) yang belum di-*docking*.

5. Preparasi *Thymidylate synthase* (TS).



Gambar 4.5 *Thymidylate synthase*

Keterangan : Struktur 3D dengan warna putih merupakan *Thymidylate synthase* yang belum di-docking (RCSB Protein Data Bank)

6. Proses Docking

Proses docking lysenin dan vimentin menggunakan server Patchdock dan Firedock. Langkah-langkah yang dilakukan yaitu sebagai berikut:

1. Pengambilan sampel lysenin dan vimentin dari database RCSB Protein Data Bank.
2. Persiapan molekul lysenin dengan menghapuskan molekul H₂O menggunakan program PyMol v.2.2.0.
3. Persiapan molekul vimentin dengan menghapuskan molekul H₂O menggunakan program PyMol v.2.2.0.
4. Mendockingkan vimentin dengan lysenin dengan membuka server patchdock.

5. Pada kolom Receptor Molecule klik browse lalu masukan struktur tiga dimensi dari vimentin.
6. Pada kolom Ligand Molecule klik browse lalu masukan struktur tiga dimensi dari lyseinin.
7. Pada kolom e-mail address, ketik alamat email yang akan dituju sebagai alamat untuk melaporkan hasil docking.
8. Pada kolom complex type pilih default karena pada penelitian ini akan melakukan docking protein dengan protein.
9. Klik submit form untuk proses docking.
10. Setelah mendapat balasan email dari server patchdock, klik link yang tercantum di email untuk melihat hasil docking.
11. Klik go yang ada pada kolom Firedock untuk mendapatkan hasil docking yang terbaik. Hasil docking akan dikirim dengan tujuan email yang sama.

Proses docking AKT1 dan vimentin menggunakan aplikasi server Patchdock dan Firedock. Langkah-langkah yang dilakukan yaitu sebagai berikut:

1. Pengambilan sampel AKT1 dan vimentin dari database RSCB Protein Data Bank.
2. Persiapan molekul AKT1 dengan menghapuskan molekul H₂O menggunakan program PyMol v.2.2.0.
3. Mendockingkan vimentin dengan AKT1 dengan membuka server patchdock.
4. Pada kolom Receptor Molecule klik browse lalu masukan struktur tiga dimensi dari vimentin.

5. Pada kolom Ligand Molecule klik browse lalu masukan struktur tiga dimensi dari AKT1.

6. Pada kolom e-mail address, ketik alamat email yang akan dituju sebagai alamat untuk melaporkan hasil docking.

7. Pada kolom complex type pilih default karena pada penelitian ini akan melakukan docking protein dengan protein.

8. Klik submit form untuk proses docking.

9. Setelah mendapat balasan email dari server patchdock, klik link yang tercantum di email untuk melihat hasil docking.

10. Klik go yang ada pada kolom Firedock untuk mendapatkan hasil docking yang terbaik. Hasil docking akan dikirim dengan tujuan email yang sama.

Proses docking AKT1 dan kompleks lysenin vimentin dilakukan untuk mengetahui pengaruh kompleks lysenin vimentin terhadap ikatan AKT1 dengan vimentin, menggunakan aplikasi server Patchdock dan Firedock. Langkah-langkah yang dilakukan yaitu sebagai berikut:

1. Pengambilan sampel AKT1 dari database RSCB Protein Data Bank.
2. Pengambilan kompleks lysenin vimentin dari hasil docking sebelumnya.
3. Mendockingkan kompleks lysenin vimentin dengan AKT1 dengan membuka server patchdock.
4. Pada kolom Receptor Molecule klik browse lalu masukan struktur tiga dimensi dari kompleks lysenin vimentin.
5. Pada kolom Ligand Molecule klik browse lalu masukan struktur tiga dimensi dari AKT1.

6. Pada kolom e-mail address, ketik alamat email yang akan dituju sebagai alamat untuk melaporkan hasil docking.
7. Pada kolom complex type pilih default karena pada penelitian ini akan melakukan docking protein dengan protein.
8. Klik submit form untuk proses docking.
9. Setelah mendapat balasan email dari server patchdock, klik link yang tercantum di email untuk melihat hasil docking.
10. Klik go yang ada pada kolom Firedock untuk mendapatkan hasil docking yang terbaik. Hasil docking akan dikirim dengan tujuan email yang sama.

Proses docking untuk FdUMP dengan *Thymidylate synthase* menggunakan aplikasi PyRX v.0.9.5. Langkah-langkah yang dilakukan yaitu sebagai berikut:

1. Pengambilan sampel FdUMP dari database PubChem.
2. Pengambilan sampel *Thymidylate synthase* yang sudah berikatan dengan UMP dari database RSCB Protein Data Bank.
3. Persiapan molekul *Thymidylate synthase* dengan menghapuskan UMP dan molekul H₂O menggunakan program PyMol v.2.2.0.
4. Klik add macromolecules pada bagian vina wizard untuk memasukkan struktur tiga dimensi *Thymidylate synthase*.
5. Klik add ligand untuk memasukkan struktur tiga dimensi FdUMP.
6. Pada bagian autodock, klik kanan pada struktur, setelah itu klik display.
7. Setelah semua ligand dipastikan, klik forward untuk proses docking.
8. Setelah proses *running* selesai maka akan keluar hasil dari ikatan dan tabel yang berisi sejumlah nilai dari kekuatan ikatan (*binding affinity*).

Proses docking untuk UMP dengan *Thymidylate synthase* menggunakan aplikasi

PyRX v.0.9.5. Langkah-langkah yang dilakukan yaitu sebagai berikut:

1. Pengambilan sampel UMP dari Protein Data Bank sebagai ligan yang terikat.
2. Pengambilan sampel *Thymidylate synthase* yang sudah berikatan dengan UMP dari database RSCB Protein Data Bank.
3. Persiapan molekul *Thymidylate synthase* dengan menghapuskan UMP dan molekul H₂O menggunakan program PyMol v.2.2.0.
4. Klik add macromolecules pada bagian vina wizard untuk memasukkan struktur tiga dimensi *Thymidylate synthase*.
5. Klik add ligand untuk memasukkan struktur tiga dimensi UMP.
6. Pada bagian autodock, klik kanan pada struktur, setelah itu klik display.
7. Setelah semua ligand dipastikan, klik forward untuk proses docking.
8. Setelah proses *running* selesai maka akan keluar hasil dari ikatan dan tabel yang berisi sejumlah nilai dari kekuatan ikatan (*binding affinity*).

Visualisasi ikatan akan dilakukan menggunakan aplikasi LigPlot v.1.4.5.

Langkah – langkah yang harus dilakukan sebagai berikut :

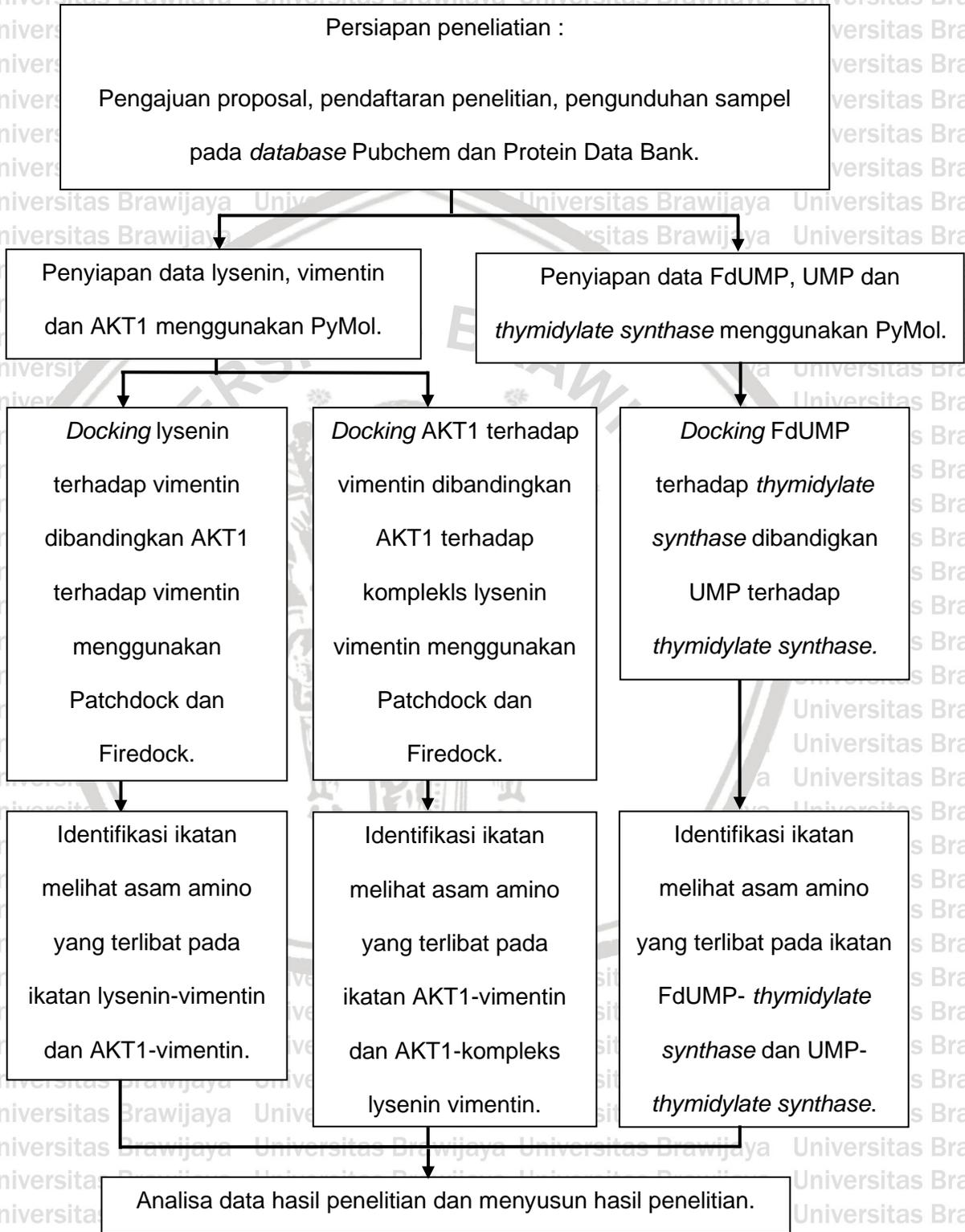
1. Buka aplikasi LigPlot v.1.4.5.
2. Klik file.
3. Klik open.
4. Klik PDB file.
5. Klik browse

- a. Untuk melihat ikatan lysenin dengan vimentin, klik file hasil docking lysenin dengan vimentin.
 - b. Untuk melihat ikatan vimentin dengan AKT1, klik file hasil docking vimentin dengan AKT1.
 - c. Untuk melihat ikatan kompleks lysenin vimentin dengan AKT1, klik file hasil docking kompleks lysenin vimentin dengan AKT1.
 - d. Untuk melihat ikatan FdUMP beserta kontrol dengan *Thymidylate synthase*, klik file hasil docking FdUMP beserta kontrol dengan *Thymidylate synthase*.
6. Klik Dimplot (untuk poin a., b., dan c.) klik Ligplot (untuk poin d.).
 7. Klik Run.
 8. Visualisasi ikatan akan muncul segera setelah proses *running* selesai.

4.8 Analisis Data

Dilakukan analisis data dari hasil docking berupa afinitas ikatan (*binding affinity*) yang diprediksi paling kuat antara ligan dan reseptor. Nilai *binding affinity* menunjukkan ikatan antara ligan dan reseptor. Nilai normal binding affinity adalah $-6,0$ kkal/mol. Suatu binding affinity dikatakan memiliki ikatan yang kuat dan stabil apabila score *binding affinity* dari ikatan tersebut $< -6,0$ kkal/mol. Nilai *binding affinity* selanjutnya dibandingkan dengan ligan yang telah diketahui berikatan dengan reseptor sebagai kontrol (Sergey dan Carola, 2014).

4.9 Alur Penelitian



BAB 5

HASIL PENELITIAN

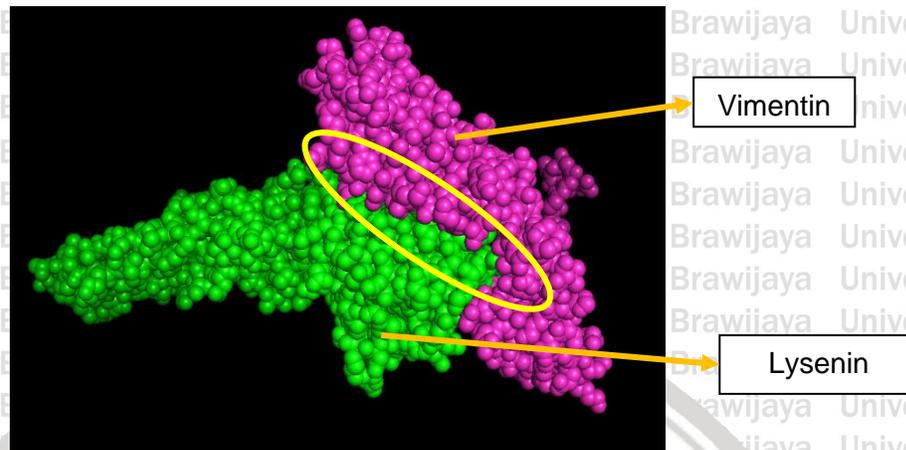
5.1 Hasil *Docking* Ikatan Lysenin dengan Vimentin

Molecular docking merupakan suatu metode komputasi yang dilakukan untuk memprediksi dan menggambarkan interaksi dari suatu ligan dan target ligan.

Molecular docking berguna untuk memprediksikan sisi aktif suatu ligan pada target dan seberapa kuat ikatan tersebut. Dalam mendesain suatu senyawa obat, sangat penting untuk mengetahui interaksi antara ligan dan targetnya karena interaksi tersebut akan menentukan terjadinya proses fisiologis di dalam sel. Sehingga *molecular docking* dapat dijadikan sebagai tahap awal sebelum selanjutnya diujikan di laboratorium.

5.1.1 Hasil *Binding Affinity* Ikatan Lysenin dengan Vimentin

Penelitian ini diawali dengan mengunduh protein lysenin sebagai ligan dan protein vimentin sebagai target pada Protein Data Bank. Kemudian melakukan proses *docking* dengan menggunakan server Patchdock dan Firedock untuk melihat nilai *binding affinity*. Berdasarkan proses *docking* yang telah dilakukan pada lysenin dengan vimentin diperoleh nilai binding affinity sebesar -37,69 kkal/mol.



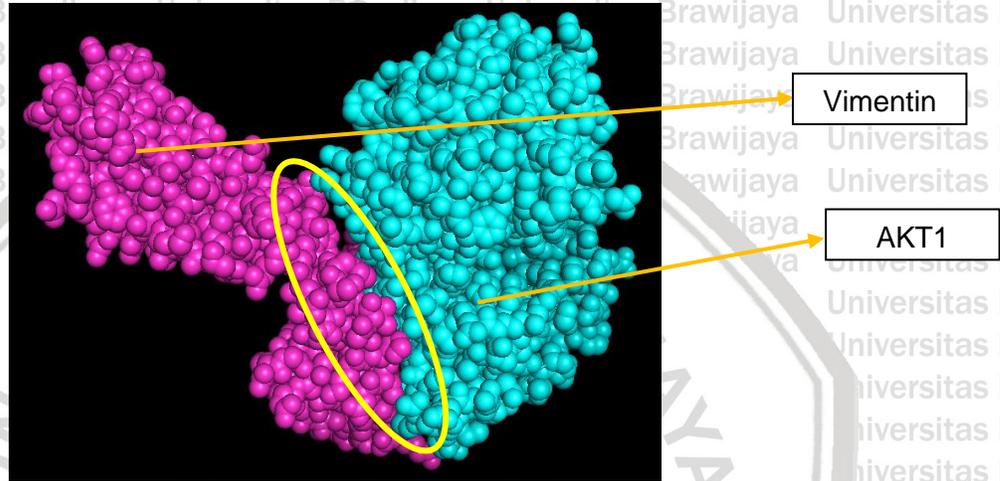
Gambar 5.1 Hasil Docking Lysenin dengan Vimentin

Keterangan : Gambaran 3 dimensi ikatan antara vimentin dengan lysenin pada aplikasi PyMol dengan nilai *binding affinity* -37,69 kkal/mol. Lingkaran kuning menunjukan sisi yang berikatan antara lysenin dan vimentin. Struktur dengan warna hijau adalah protein lysenin sebagai ligan sementara struktur dengan warna merah muda adalah protein vimentin sebagai target.

Untuk mengetahui jika ikatan lysenin dan vimentin dapat benar terbentuk, maka harus dilakukan kontrol ligan yang diperankan oleh AKT1. Kontrol dilakukan dengan membandingkan nilai *binding affinity* ikatan lysenin dan vimentin dengan nilai *binding affinity* ikatan vimentin dan AKT1. Hal tersebut dilakukan untuk mengetahui kecenderungan vimentin untuk berikatan dengan lysenin atau AKT1. Molekul akan cenderung berikatan dengan molekul lain yang memiliki nilai *binding affinity* lebih tinggi.

Proses *docking* diawali dengan mengunduh protein AKT1 sebagai ligan dan protein vimentin sebagai target pada Protein Data Bank. Kemudian melakukan proses *docking* dengan menggunakan server Patchdock dan Firedock untuk melihat nilai *binding affinity*. Berdasarkan *docking* yang telah dilakukan pada vimentin dan AKT1, diperoleh nilai *binding affinity* sebesar -23,04 kkal/mol. Dari data tersebut didapatkan bahwa nilai *binding affinity* antara lysenin dan vimentin maupun vimentin dan AKT sama – sama memiliki nilai yang baik karena sudah

melampaui nilai normal yaitu $<-6,0$ kkal/mol. Namun nilai *binding affinity* ikatan lysenin dan vimentin diketahui lebih tinggi jika dibandingkan dengan ikatan antara vimentin dan AKT1.



Gambar 5.2 Hasil Docking AKT1 dengan Vimentin

Keterangan : Gambaran 3 dimensi ikatan antara vimentin dengan AKT1 pada aplikasi PyMol dengan nilai *binding affinity* -23,04 kkal/mol. Lingkaran kuning menunjukan sisi yang berikatan antara AKT1 dan vimentin. Struktur dengan warna biru adalah protein AKT1 sebagai ligan sementara struktur dengan warna merah muda adalah protein vimentin sebagai target.

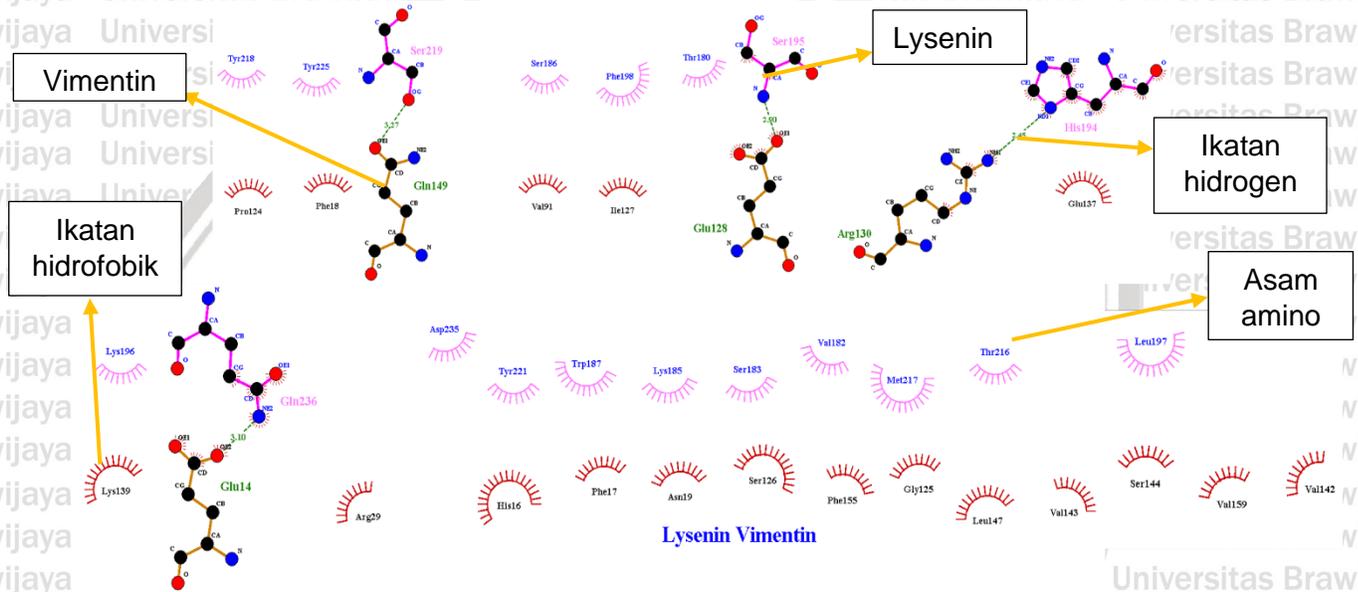
Tabel 5.1 Nilai Binding Affinity Vimentin dengan Ligan

Ligan yang Berikatan dengan Vimentin	Binding Affinity (kkal/mol)
Lysenin	-37,69
AKT1 (ligan kontrol)	-23,04

Keterangan : nilai yang ada pada tabel diperoleh dengan cara melakukan *docking* melalui server Patchdock dan Firedock. Didapatkan nilai *binding affinity* antara vimentin dengan lysenin sebesar -37,69 kkal/mol sementara nilai *binding affinity* antara vimentin dengan AKT1 sebesar -23,04 kkal/mol.

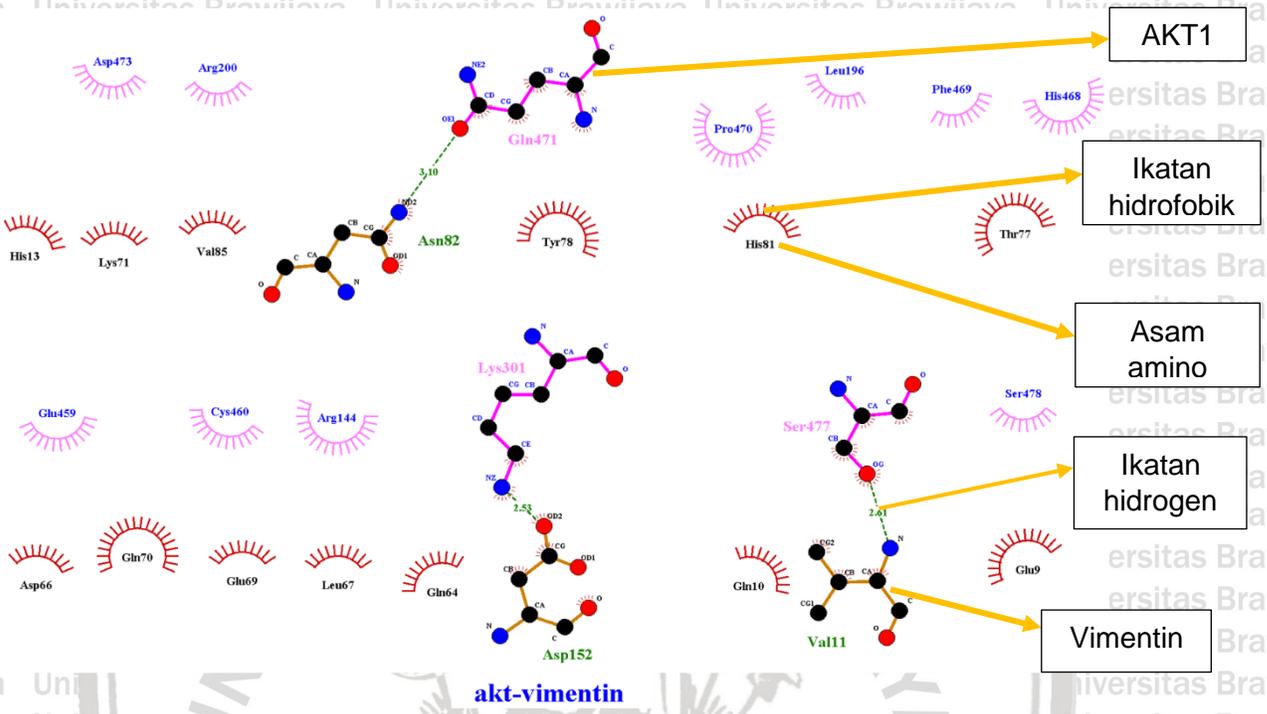
5.1.2 Hasil Identifikasi Ikatan Lysenin dengan Vimentin

Ikatan antara lysenin dengan vimentin dapat divisualisasikan menggunakan aplikasi LigPLOT untuk mengetahui keberadaan ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik serta asam asmino dari kompleks tersebut dan dibandingkan dengan AKT1 sebagai ligan kontrol.



Gambar 5.3 Hasil Identifikasi Asam Amino, Ikatan Hidrogen dan Ikatan Hidrofobik pada kompleks Lysenin Vimentin

Keterangan : Rantai berwarna merah muda mewakili lysenin sedangkan rantai berwarna coklat mewakili vimentin. Ikatan yang ditunjukkan dengan garis putus – putus berwarna hijau merupakan ikatan hidrogen. Garis – garis merah muda setengah lingkaran menunjukkan adanya ikatan hidrofobik bagian dari lysenin sedangkan garis – garis merah setengah lingkaran menunjukkan adanya ikatan hidrofobik bagian dari vimentin. Kompleks ikatan antara lysenin dan vimentin memiliki 25 ikatan asam amino.



Gambar 5.4 Hasil Identifikasi Asam Amino, Ikatan Hidrogen dan Ikatan Hidrofobik pada kompleks AKT1 dan Vimentin

Keterangan : Rantai berwarna merah muda mewakili AKT1 sedangkan rantai berwarna coklat mewakili vimentin. Ikatan yang ditunjukkan dengan garis putus – putus berwarna hijau merupakan ikatan hidrogen. Garis – garis merah muda setegah lingkaran menunjukkan adanya ikatan hidrofobik bagian dari AKT1 sedangkan garis – garis merah setegah lingkaran menunjukkan adanya ikatan hidrofobik bagian dari vimentin. Kompleks ikatan antara AKT1 dan vimentin memiliki 21 ikatan asam amino.

Tabel 5.2 Perbandingan Interaksi antara Vimentin dengan Ligan

Ikatan Lysenin dan Vimentin			ikatan AKT1 dan Vimentin		
Asam Amino pada Ligan (Lysenin)	Asam Amino pada Target (Vimentin)	Tipe Interaksi	Asam Amino pada Ligan (AKT1)	Asam Amino pada Target (Vimentin)	Tipe Interaksi
Tyr 218	Pro 124	Hidrofobik	Asp 473	His 13	Hidrofobik
Tyr 225	Phe 18	Hidrofobik	Asp 473	Lys 71	Hidrofobik
Ser 219	Gln 149	Hidrogen	Arg 200	Val 85	Hidrofobik
Ser 186	Val 91	Hidrofobik	Gln 471	Asn 82	Hidrogen
Phe 198	Ile 127	Hidrofobik	Gln 471	Tyr 78	Hidrofobik
Thr 180	Glu 128	Hidrofobik	Pro 470	His 81	Hidrofobik
Ser 195	Glu 128	Hidrogen	Leu 196	His 81	Hidrofobik

His 194	Arg 130	Hidrogen	Phe 469	Thr 77	Hidrofobik
His 194	Glu 137	Hidrofobik	His 468	Thr 77	Hidrofobik
Lys 196	Lys 139	Hidrofobik	Glu 459	Asp 66	Hidrofobik
Gln 236	Glu 14	Hidrogen	His 468	Gln 70	Hidrofobik
Gln 236	Arg 29	Hidrofobik	Glu 459	Gln 70	Hidrofobik
Asp 235	His 16	Hidrofobik	Cys 460	Gln 70	Hidrofobik
Tyr 221	His 16	Hidrofobik	Agr 144	Gln 70	Hidrofobik
Trp 187	Phe 17	Hidrofobik	Cys 460	Glu 69	Hidrofobik
Lys 185	Asp 19	Hidrofobik	Agr 144	Leu 67	Hidrofobik
Ser 183	Ser 126	Hidrofobik	Agr 144	Gln 64	Hidrofobik
Val 128	Ser 126	Hidrofobik	Lys 301	Asp 152	Hidrogen
Met 217	Phe 155	Hidrofobik	Ser 477	Gln 10	Hidrofobik
Met 217	Gly 125	Hidrofobik	Ser 477	Val 111	Hidrogen
Tyr 216	Leu 147	Hidrofobik	Ser 427	Glu 9	Hidrofobik
Leu 197	Val 143	Hidrofobik			
Leu 197	Ser 144	Hidrofobik			
Leu 197	Val 159	Hidrofobik			
Leu 197	Val 142	Hidrofobik			

Keterangan : ikatan yang terbentuk dari ikatan lysenin-vimentin terdapat 25 ikatan asam amino dengan 4 ikatan hidrogen dan 21 ikatan hifrofobik. Sedangkan ikatan yang terbentuk dari ikatan AKT1-vimentin terdapat 21 ikatan asam amino dengan 3 ikatan hidrogen dan 18 ikatan hifrofobik.

Pada kompleks ikatan lysenin dan vimentin terdapat 25 ikatan asam amino dengan 4 ikatan hidrogen yaitu Gln 149, Glu 128, Arg 130, Glu 14 dan terbentuk 21 ikatan hifrofobik Pro 124, Phe 18, Val 91, Ile 127, Glu 137, Lys 139, Arg 29, His 16, Phe 17, Asp 19, Ser 126, Phe 155, Gly 125, Leu 147, Val 143, Ser 144, Val 159, Val 142. Sedangkan pada ikatan AKT1 dan vimentin terdapat 21 ikatan asam amino dengan 3 ikatan hidrogen yaitu Asn 82, Asp 152, Val 111 dan 18 ikatan hifrofobik yaitu His 13, Lys 71, Val 85, Tyr 78, His 81, Thr 77, Asp 66, Gln

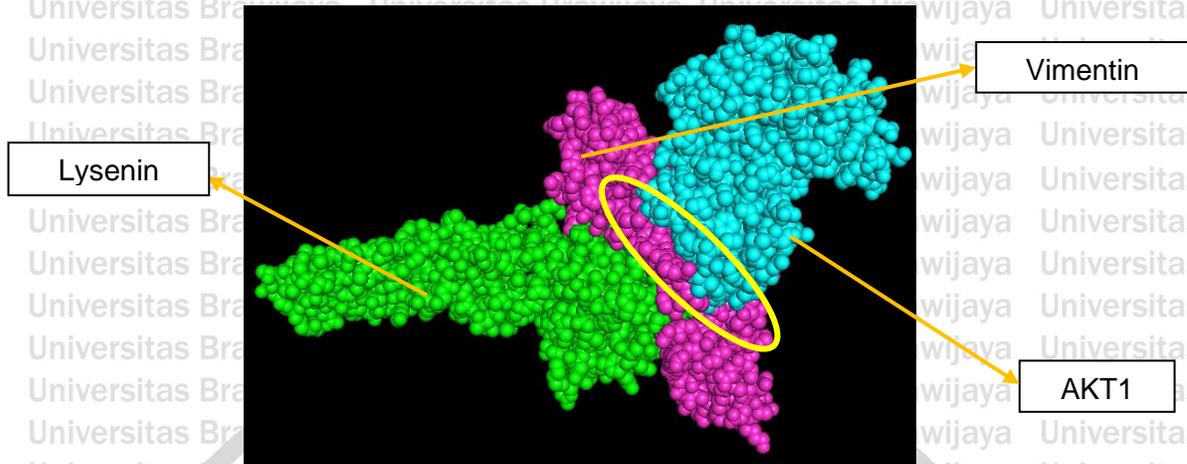
70, Glu 69, Leu 67, Gln 64, Gln 10, Glu 9. Tidak didapatkan persamaan asam amino jika dibandingkan antara ikatan lysenin dan vimentin dengan ikatan AKT1 dan vimentin, sekuen berikatan yang berbeda mengindikasikan letak berikatan yang berbeda.

5.2 Hasil *Docking* Ikatan Kompleks Lysenin Vimentin dengan AKT1

5.2.1 Hasil *Binding Affinity* Ikatan Kompleks Lysenin Vimentin dengan AKT1

Peran lysenin untuk mengganggu ikatan antara vimentin dan AKT1 dapat ditandai dengan adanya perubahan nilai *binding affinity*. Oleh karena itu, dilakukan perbandingan nilai *binding affinity* antara ikatan kompleks lysenin vimentin dan AKT1 dengan ikatan vimentin dan AKT1.

Proses *docking* diawali dengan mengunduh protein AKT1 sebagai ligan dan hasil *docking* vimentin lysenin sebagai target. Kemudian melakukan proses *docking* dengan menggunakan server Patchdock dan Firedock untuk melihat nilai *binding affinity*. Berdasarkan *docking* yang telah dilakukan, diperoleh nilai *binding affinity* sebesar -10,22 kkal/mol. Meskipun melampaui nilai normal yaitu <-6,0 kkal/mol, didapatkan penurunan nilai *binding affinity* pada ikatan kompleks lysenin vimentin dan AKT1. Dari data tersebut didapatkan bahwa nilai *binding affinity* antara kompleks lysenin vimentin dan AKT1 lebih rendah jika dibandingkan dengan ikatan antara vimentin dan AKT1.



Gambar 5.5 Hasil Docking Kompleks Lysenin Vimentin dengan AKT1

Keterangan : Gambaran 3 dimensi ikatan kompleks lysenin vimentin dengan AKT1 pada aplikasi PyMol dengan nilai *binding affinity* -10,22 kkal/mol. Lingkaran kuning menunjukan sisi yang berikatan antara AKT1 dan kompleks lysenin vimentin. Struktur dengan warna biru adalah protein AKT1 sebagai ligan, struktur dengan warna merah muda adalah protein vimentin dan struktur dengan warna hijau merupakan lysenin, dimana lysenin dan vimentin sudah menjadi kompleks yang berperan sebagai target.

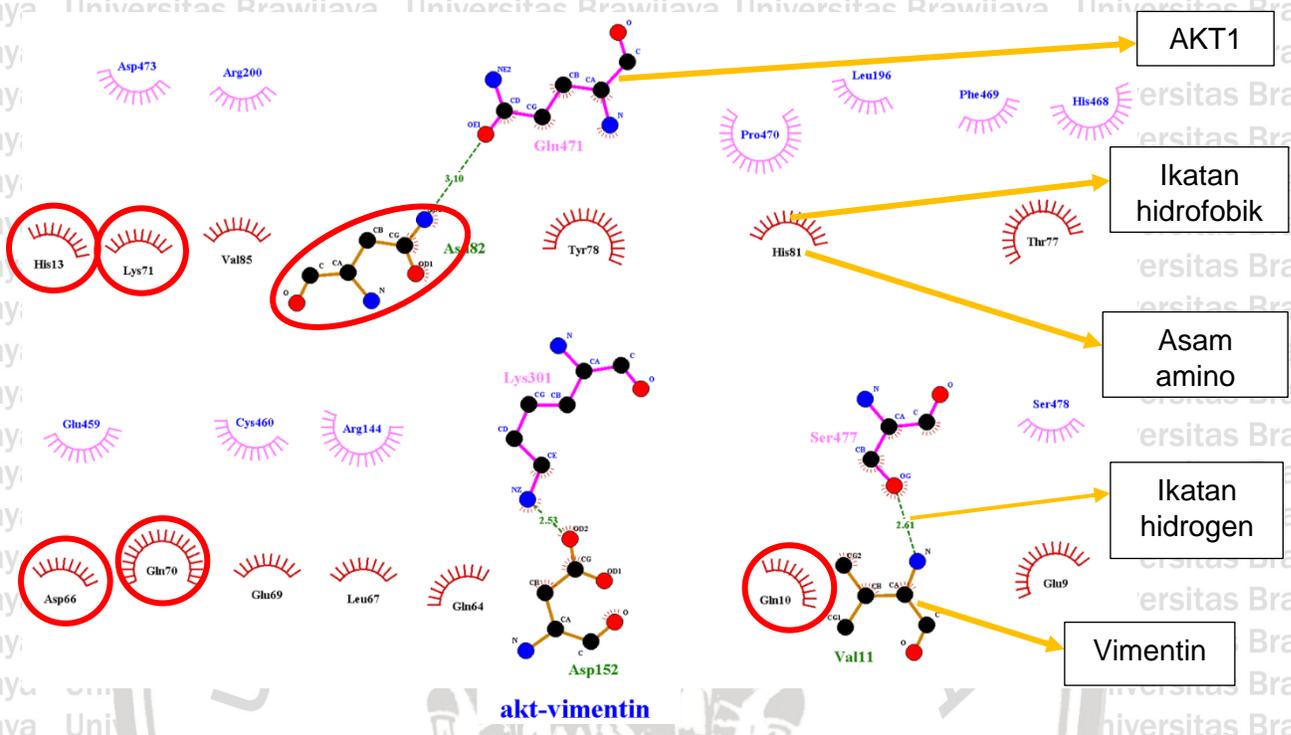
Tabel 5.3 Nilai *Binding Affinity* AKT1 dengan Target

Target yang berikatan dengan AKT1	Binding Affinity (kkal/mol)
Vimentin (kontrol)	-23,04
Kompleks Lysenin Vimentin	-10,22

Keterangan : nilai yang ada pada tabel diperoleh dengan cara melakukan *docking* melalui server Patchdock dan Firedock. Didapatkan nilai *binding affinity* antara vimentin dengan AKT1 sebesar -23,04 kkal/mol sementara nilai *binding affinity* antara kompleks lysenin vimentin dengan AKT1 sebesar -10,22 kkal/mol.

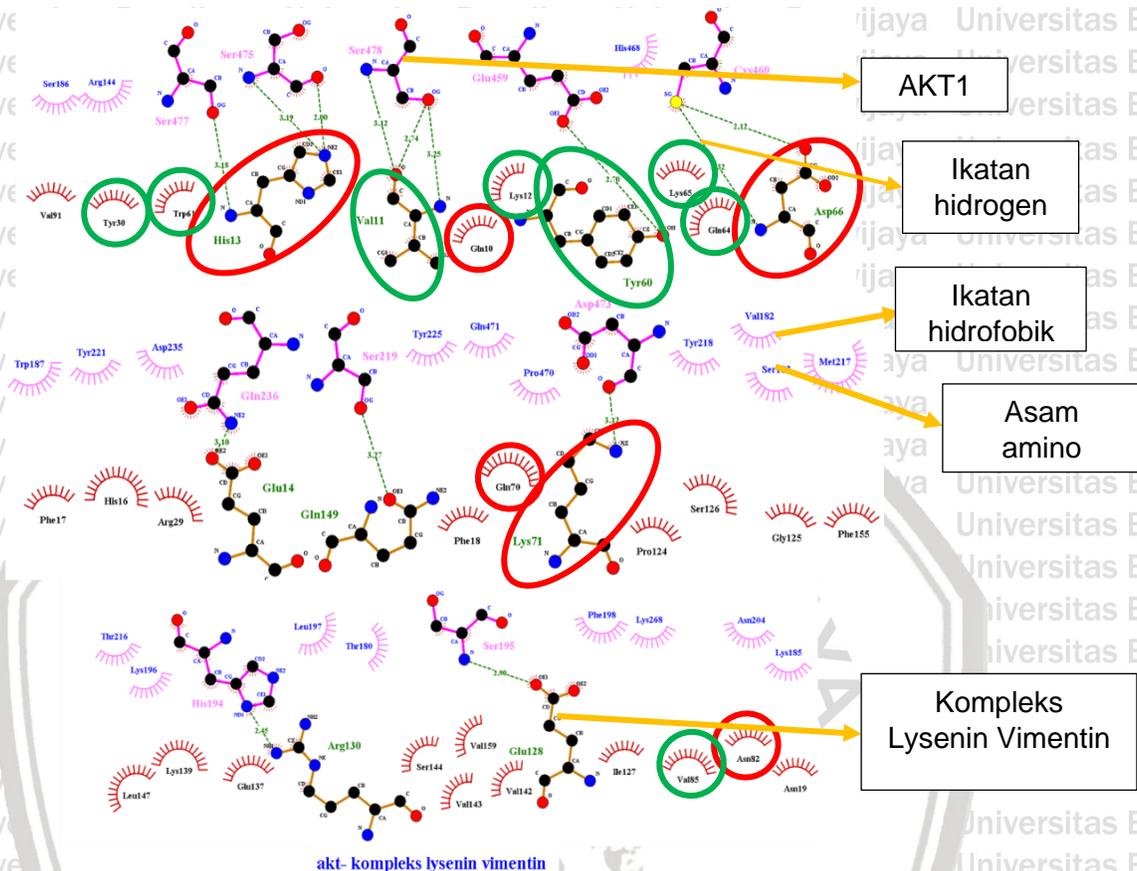
5.2.2 Hasil Identifikasi Ikatan Kompleks Lysenin Vimentin dengan AKT1

Untuk mengetahui apakah lysenin yang sudah berikatan pada vimentin dapat berperan dalam menggeser ikatan AKT1 dengan vimentin, maka perlu diidentifikasi ikatan asam aminonya. Identifikasi yang dilakukan merupakan perbandingan asam amino antara ikatan AKT1-Vimentin dan AKT1-kompleks lysenin vimentin.



Gambar 5.6 Hasil Identifikasi Asam Amino, Ikatan Hidrogen dan Ikatan Hidrofobik pada kompleks AKT1 dan Vimentin

Keterangan : Rantai berwarna merah muda mewakili AKT1 sedangkan rantai berwarna coklat mewakili vimentin. Ikatan yang ditunjukkan dengan garis putus – putus berwarna hijau merupakan ikatan hidrogen. Garis – garis merah muda setengah lingkaran menunjukkan adanya ikatan hidrofobik bagian dari AKT1 sedangkan garis – garis merah setengah lingkaran menunjukkan adanya ikatan hidrofobik bagian dari vimentin. Lingkaran merah yang mengelilingi asam amino milik vimentin yang memiliki ikatan dengan asam amino yang sama antara AKT1-vimentin dengan AKT1-kompleks lysenin vimentin. Kompleks ikatan antara AKT1 dan vimentin memiliki 21 ikatan asam amino.



Gambar 5.7 Hasil Identifikasi Asam Amino, Ikatan Hidrogen dan Ikatan Hidrofobik pada ikatan AKT1 dengan kompleks Lysenin Vimentin

Keterangan : Rantai berwarna merah muda mewakili AKT1 sedangkan rantai berwarna coklat mewakili kompleks lysenin vimentin. Ikatan yang ditunjukkan dengan garis putus – putus berwarna hijau merupakan ikatan hidrogen. Garis – garis merah muda setengah lingkaran menunjukkan adanya ikatan hidrofobik bagian dari AKT1 dan sebagian mewakili kompleks lysenin vimentin pada unsur lysenin sedangkan garis – garis merah setengah lingkaran menunjukkan adanya ikatan hidrofobik bagian dari vimentin. Lingkaran merah mengelilingi asam amino milik vimentin sebagai bagian dari kompleks lysenin vimentin yang memiliki ikatan dengan asam amino yang sama antara AKT1-vimentin dengan AKT1-kompleks lysenin vimentin. Lingkaran hijau mengelilingi asam amino milik vimentin sebagai bagian dari kompleks lysenin vimentin yang baru terlibat pada kompleks lysenin vimentin-AKT1. Ikatan antara AKT1 dan kompleks lysenin vimentin memiliki 18 ikatan asam amino.

Tabel 5.4 Perbandingan Interaksi antara AKT1 dengan Target

Ikatan AKT1 dan Vimentin			Ikatan AKT1 dan Kompleks Lysenin Vimentin		
Asam Amino pada Ligan (AKT1)	Asam Amino pada Target (Vimentin)	Tipe Interaksi	Asam Amino pada Ligan (AKT1)	Asam Amino pada Target (Kompleks Lysenin Vimentin)	Tipe Interaksi
Asp 473	His 13	Hidrofobik	Arg144	Tyr 30	Hidrofobik
Asp 473	Lys 71	Hidrofobik	Arg144	Trp 61	Hidrofobik
Agr 200	Val 85	Hidrofobik	Ser 477	His 13	Hidrogen
Gln 471	Asn 82	Hidrogen	Ser 475	His 13	Hidrogen
Gln 471	Tyr 78	Hidrofobik	Ser 478	Val 11	Hidrogen
Pro 470	His 81	Hidrofobik	Ser 478	Gln 10	Hidrofobik
Leu 196	His 81	Hidrofobik	Ser 478	Lys 12	Hidrofobik
Phe 469	Thr 77	Hidrofobik	Glu 459	Tyr 60	Hidrogen
His 468	Thr 77	Hidrofobik	His 468	Asp 66	Hidrofobik
Glu 459	Asp 66	Hidrofobik	Cys 460	Gln 64	Hidrofobik
His 468	Gln 70	Hidrofobik	Cys 460	Asp 66	Hidrogen
Glu 459	Gln 70	Hidrofobik	Cys 460	Lys 65	Hidrofobik
Cys 460	Gln 70	Hidrofobik	Gln 471	Gln 70	Hidrofobik
Agr 144	Gln 70	Hidrofobik	Pro 470	Gln 70	Hidrofobik
Cys 460	Glu 69	Hidrofobik	Asp 473	Lys 71	Hidrogen
Agr 144	Leu 67	Hidrofobik	Lys 268	Val 185	Hidrofobik
Agr 144	Gln 64	Hidrofobik	Asn 204	Val 185	Hidrofobik
Lys 301	Asp 152	Hidrogen	Asn 204	Asn 82	Hidrofobik
Ser 477	Gln 10	Hidrofobik			
Ser 477	Val 111	Hidrogen			
Ser 427	Glu 9	Hidrofobik			

Keterangan : ikatan yang terbentuk dari ikatan AKT1-vimentin terdapat 21 ikatan asam amino dengan 3 ikatan hidrogen dan 18 ikatan hifrofobik sedangkan ikatan AKT1-kompleks lysenin vimentin terdiri dari 18 ikatan asam amino dengan 6 ikatan hidrogen dan 12 ikatan hidrofobik. Sekuens asam amino yang ada pada ikatan AKT1-vimmetnin dan AKT1-kompleks lysenin vimetin dengan asam amino yang sama dicetak tebal.

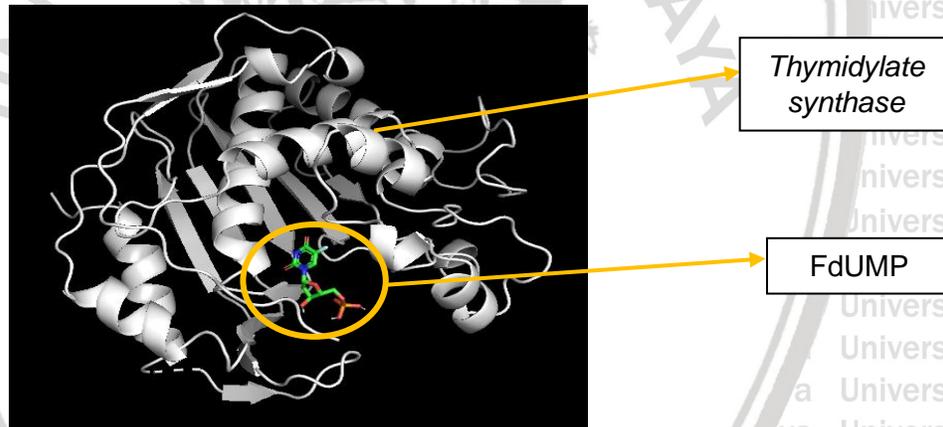
Pada ikatan AKT1-vimentin terdapat 21 ikatan asam amino dengan 3 ikatan hidrogen yaitu Asn 82, Asp 152, Val 111 dan 18 ikatan hidrofobik yaitu His 13, Lys 71, Val 85, Tyr 78, His 81, Thr 77, Asp 66, Gln 70, Glu 69, Leu 67, Gln 64, Gln 10, Glu 9. sedangkan pada ikatan AKT1-kompleks lysenin vimentin terdapat 18 ikatan asam amino dengan 6 ikatan hidrogen His 13, Val 111, Tyr 60, Asp 66, Lys 71 dan 12 ikatan hidrofobik yaitu Tyr 30, Trp 61, Gln 10, Lys 12, Asp 66, Gln 64, Lys 65, Gln 70, Val 185, Asn 82. Perbandingan antara ikatan AKT1-vimentin dengan ikatan AKT1-kompleks lysenin vimentin memiliki 6 asam amino yang sama pada sisi vimentin yaitu, His 13, Lys 71, Asn 82, Asp 66, Gln 70 dan Gln 10. Selain itu, terdapat 8 ikatan baru yang tercipta pada ikatan AKT1-kompleks lysenin vimentin yaitu, Tyr 30, Trp 61, Val 11, Lys 12, Tyr 60, Gln 64, Lys 65, Val 185.

5.3 Hasil *Docking* Ikatan FdUMP dengan Thymidylate Synthase

5.3.1 Hasil *Binding Affinity* Ikatan FdUMP dengan Thymidylate Synthase

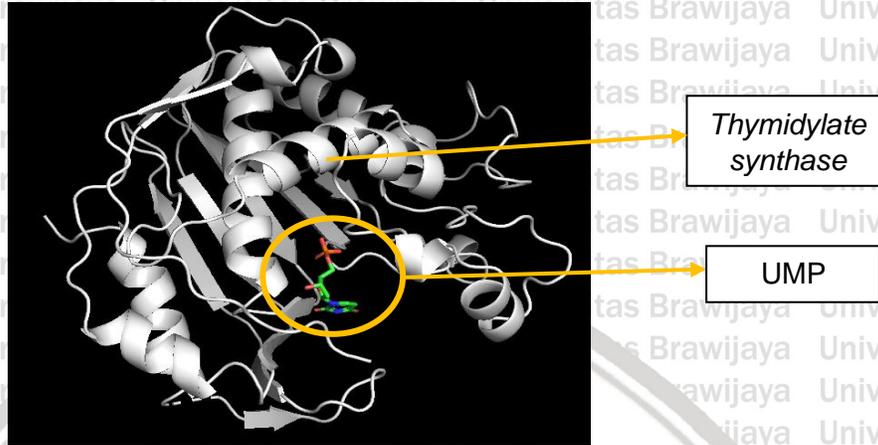
Diawali dengan mengunduh protein target *thymidylate synthase* yang masih berikatan dengan ligan kontrol yaitu UMP. Kemudian ligan kontrol UMP yang masih menempel pada *thymidylate synthase* dipisahkan dengan menggunakan aplikasi PyMOL v.2.2.0 yang selanjutnya akan dijadikan sebagai ligan pembanding dengan FdUMP. Setelah *thymidylate synthase*, UMP dan FdUMP menjadi molekul yang berdiri sendiri dalam format “.pdb” maka sudah siap untuk dilakukan proses *docking* dengan menggunakan aplikasi PyRx V.0.9.5.

Berdasarkan proses *docking* yang telah dilakukan, diperoleh nilai *binding affinity* antara *thymidylate synthase* dengan FdUMP adalah -8,0 kkal/mol. Sedangkan nilai *binding affinity* antara *thymidylate synthase* dengan UMP sebagai logan kontrol adalah -7,6 kkal/mol. Dari data tersebut didapatkan bahwa nilai *binding affinity* baik antara *thymidylate synthase* dan FdUMP maupun *thymidylate synthase* dan UMP sama – sama memiliki nilai yang baik karena melampaui nilai normal yaitu $<-6,0$ kkal/mol. Namun nilai *binding affinity* ikatan *thymidylate synthase* dan FdUMP diketahui lebih tinggi jika dibandingkan dengan ikatan *thymidylate synthase* dan UMP.



Gambar 5.8 Hasil Docking *Thymidylate Synthase* dengan FdUMP

Keterangan : Gambaran 3 dimensi ikatan *thymidylate synthase* dengan FdUMP pada aplikasi PyMol dengan nilai *binding affinity* -8,0 kkal/mol. Struktur dengan warna putih adalah *thymidylate synthase* sebagai target, struktur di dalam lingkaran kuning adalah protein FdUMP sebagai ligan.



Gambar 5.9 Hasil Docking *Thymidylate Synthase* dengan UMP

Keterangan : Gambaran 3 dimensi ikatan *thymidylate synthase* dengan UMP pada aplikasi PyMol dengan nilai *binding affinity* -7,6 kkal/mol. Struktur dengan warna putih adalah *thymidylate synthase* sebagai target, struktur di dalam lingkaran kuning adalah protein UMP sebagai ligan.

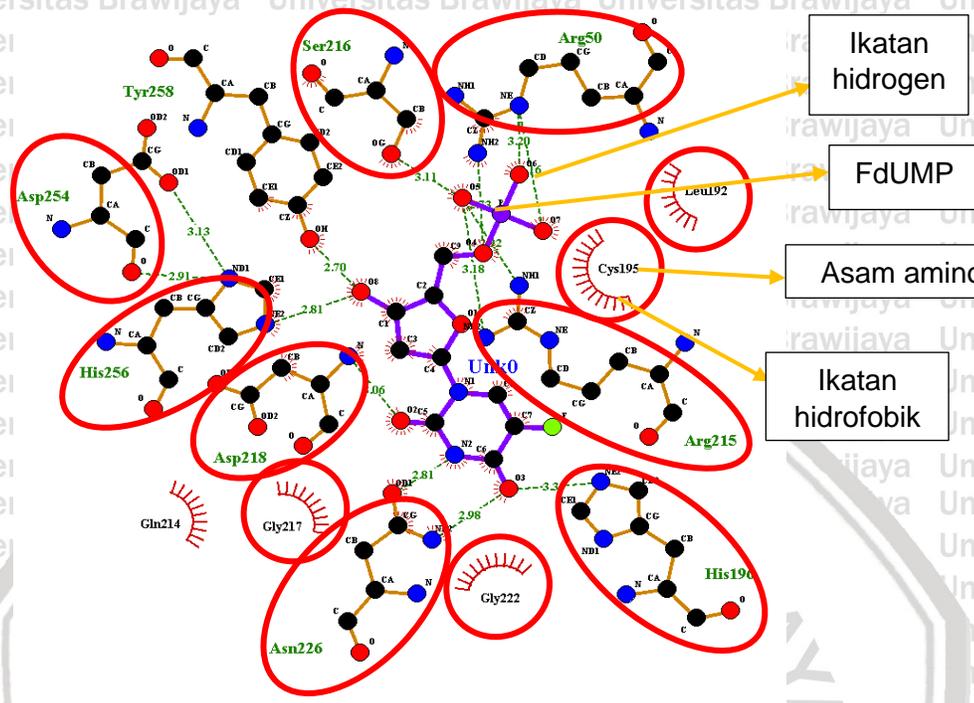
Tabel 5.5 Nilai *Binding Affinity* *Thymidylate Synthase* dengan Ligan

Ligan yang berikatan dengan <i>Thymidylate Synthase</i>	Binding Affinity (kkal/mol)
FdUMP	-8,0
UMP (kontrol)	-7,6

Keterangan : nilai pada tabel diperoleh dengan cara melakukan *docking* melalui aplikasi PyRx V.0.9.5. Didapatkan nilai *binding affinity* antara *thymidylate synthase* dengan UMP sebesar -7,6 kkal/mol sementara nilai *binding affinity* antara *thymidylate synthase* dengan FdUMP sebesar -8,0 kkal /mol.

5.3.2 Hasil Identifikasi Ikatan FdUMP dengan *Thymidylate Synthase*

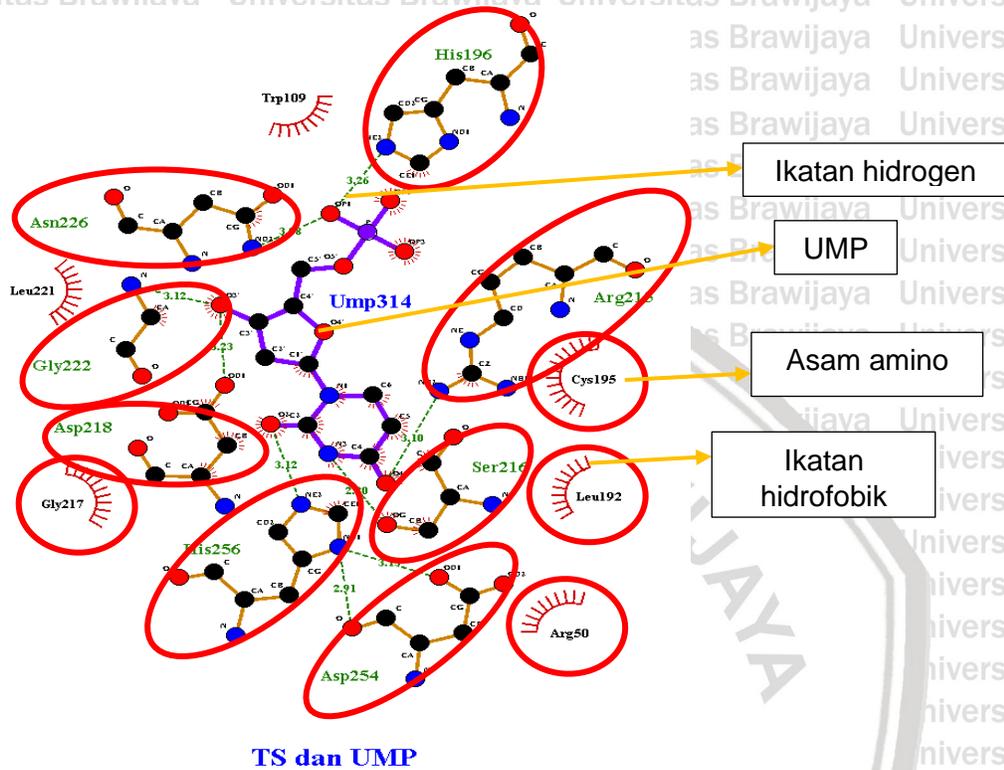
Ikatan antara *thymidylate synthase* dengan FdUMP dapat divisualisasikan menggunakan aplikasi LigPlot untuk mengetahui keberadaan ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik serta asam asmino dari kompleks tersebut dan dibandingkan dengan UMP sebagai ligan kontrol.



TS dan FdUMP

Gambar 5.10 Hasil Identifikasi Asam Amino, Ikatan Hidrogen dan Ikatan Hidrofobik pada kompleks *Thymidylate Synthase* dan FdUMP

Keterangan : Rantai berwarna ungu ditengah adalah FdUMP. Sedangkan yang disekitarnya merupakan bagian dari *thymidylate synthase*. Ikatan yang ditunjukkan dengan garis putus – putus berwarna hijau merupakan ikatan hidrogen. Garis – garis merah setengah lingkaran menunjukan adanya ikatan hidrofobik. Lingkaran merah yang mengelilingi asam amino merupakan ikatan dengan asam amino yang sama antara FdUMP dengan UMP. Kompleks ikatan antara FdUMP dengan *thymidylate synthase* memiliki 14 asam amino yaitu 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 Agr 50.



Gambar 5.11 Hasil Identifikasi Asam Amino, Ikatan Hidrogen dan Ikatan Hidrofobik pada kompleks *Thymidylate Synthase* dan UMP

Keterangan : Rantai berwarna ungu ditengah adalah UMP. Sedangkan yang disekitarnya merupakan bagian dari *thymidylate synthase*. Ikatan yang ditunjukkan dengan garis putus – putus berwarna hijau merupakan ikatan hidrogen. Garis – garis merah setengah lingkaran menunjukkan adanya ikatan hidrofobik. Lingkaran merah yang mengelilingi asam amino merupakan ikatan dengan asam amino yang sama antara FdUMP dengan UMP. Kompleks ikatan antara FdUMP dengan *thymidylate synthase* memiliki 14 asam amino yaitu His 196, Trp 109, Asn 226, Leu 221, Gly 222, Asp 218, Gly 217, His 256, Asp 254, Agr 50, Leu 192, Cys 195, Ser 216 dan Agr 215.

Tabel 5.6 Perbandingan Interaksi antara *Thymidylate Synthase* dengan Ligan

Ligan	Interaksi yang Terbentuk
FdUMP	Ikatan hidrogen : Ser 216, Tyr 258, Asp 254, His 256, Asp 218, Asn 226, His 196, Arg 215, Agr 50.
UMP	Ikatan hidrofobik : Gln 214, Gly 217, Gly 222, Cys 195, Leu 192. Ikatan hidrogen : His 196, Asn 226, Gly 222, Asp 218, His 256, Asp 254, Ser 216, Agr 215. Ikatan hidrofobik : Trp 109, Leu 221, Gly 217, Agr 50, Leu 192, Cys 195

Keterangan : ikatan yang terbentuk dari kompleks *thymidylate synthase*-FdUMP terdapat 14 ikatan asam amino dengan 9 ikatan hidrogen dan 5 ikatan hifrofobik. Sedangkan ikatan yang terbentuk dari kompleks *thymidylate synthase*-UMP terdapat 14 ikatan asam amino dengan 8 ikatan hidrogen dan 6 ikatan hifrofobik. Sekuens asam amino yang ada pada kompleks *thymidylate synthase*-FdUMP dan *thymidylate synthase*-UMP dengan asam amino yang sama dicetak tebal.

Pada kompleks ikatan *thymidylate synthase* dan FdUMP terdapat 14 ikatan asam amino dengan 9 ikatan hidrogen yaitu Ser 216, Tyr 258, Asp 254, His 256, Asp 218, Asn 226, His 196, Arg 215, Agr 50 dan terbentuk 5 ikatan hifrofobik Gln 214, Gly 217, Gly 222, Cys 195, Leu 192. Sedangkan pada kompleks *thymidylate synthase* dan UMP terdapat 14 ikatan asam amino dengan 8 ikatan hidrogen yaitu His 196, Asn 226, Gly 222, Asp 218, His 256, Asp 254, Ser 216, Agr 215 dan 6 ikatan hifrofobik yaitu Trp 109, Leu 221, Gly 217, Agr 50, Leu 192, Cys 195.

Perbandingan antara kompleks *thymidylate synthase*– FdUMP dengan kompleks *thymidylate synthase* – UMP memiliki 12 asam amino yang sama yaitu, Ser 216, Asp 254, His 256, Asp 218, Asn 226, His 196, Arg 215, Agr 50, Gly 217, Gly 222, Cys 195 dan Leu 192.

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk memprediksi ikatan dan mengetahui nilai *binding affinity* yang terdapat antara lysenin sebagai ligan dan vimentin sebagai target.

Metode yang digunakan pada penelitian ini berupa *molecular docking* dimana memprediksi ikatan yang akan tercipta antara ligan yang akan diuji pada sisi aktif dari target yang telah ditempati oleh ligan kontrol dimana sudah diketahui memiliki ikatan dengan vimentin. Ketika kedua ligan memiliki kesamaan *binding site* pada sisi aktif target maka ligan yang diuji memiliki bersifat kompetitif terhadap kontrol. Sementara jika kedua ligan tidak memiliki kesamaan *binding site* pada sisi aktif target maka ligan yang diuji memiliki bersifat tidak kompetitif terhadap kontrol. Oleh karena itu untuk memastikan ligan yang bersifat tidak kompetitif tetap memberikan efek, dilakukan perbandingan nilai *binding affinity* dan ikatan antara target dengan ligan kontrol sebelum dilakukan penambahan ligan yang akan diuji dan setelah penambahan ligan yang diuji. Dalam penelitian ini ligan yang diuji adalah lysenin, sedangkan targetnya adalah vimentin, serta sebagai pembandingnya digunakan ligan kontrol yaitu AKT1.

6.1 Ikatan antara Lysenin dengan Vimentin

6.1.1 Afinitas Ikatan antara Lysenin dengan Vimentin

Lysenin merupakan protein yang terdapat pada cairan coelomic dari cacing tanah dimana terbukti memiliki peran di bidang kesehatan. Coelomic fluid merupakan bagian dari imun sistem cacing tanah. Aktivitas lysenin yang telah diketahui mampu meningkatkan apoptosis sel kanker. Penggunaan lysenin

sebagai agen antikanker diketahui mampu mengaktifkan caspase 9 sehingga terjadi apoptosis. Selain itu lysenin juga diketahui dapat mengaktifasi caspase 8, diketahui bahwa caspase 8 dan caspase 9 akan mengubah pro-caspase 3, pro-caspase 6 dan pro-caspase 7 menjadi caspase 3, caspase 6 dan caspase 7 dimana vimentin merupakan target dari kaskade caspase pada proses apoptosis. Apoptosis sel dimulai oleh caspase 3 atau caspase 7 yang membelah vimentin pada Asp 85 dan selanjutnya mengalami pembelahan oleh caspase 6 atau caspase 8 pada Asp 259 (McIlwain *et al.*, 2013; Boroki-Brown *et al.*, 2018; Permana *et al.*, 2018).

Menurut Zhu *et al.* (2011), pada keadaan kanker vimentin diketahui secara langsung berikatan dengan AKT1 sehingga menghasilkan vimentin yang terfosforilasi pada Ser 39. Sementara untuk tercapainya apoptosis, vimentin sebagai target dari kaskade caspase tidak boleh terfosforilasi. Adanya kegagalan fosforilasi vimentin merupakan salah satu penjelasan tetap terjadinya proses apoptosis pada kanker. Selain itu, setelah proteolisis oleh caspase akan terjadi peningkatan sinyal kematian oleh pecahan vimentin itu sendiri. Hal tersebut selaras dengan penggunaan lysenin sebagai agen antikanker dimana terjadi peningkatan aktivasi caspase 9 yang berujung peningkatan apoptosis. Dalam hal ini, lysenin diprediksi memiliki fungsi untuk mengganggu ikatan vimentin dan AKT1 sehingga terjadi kegagalan fosforilasi vimentin dan tetap terjadi apoptosis.

Kontrol yang digunakan dalam penelitian ini adalah AKT1. AK1 merupakan protein yang terlibat dalam pengaturan pertumbuhan sel, proliferasi dan keberlangsungan hidup sel. Alasan digunakannya AKT1 sebagai kontrol adalah

kemampuan AKT1 untuk berikatan langsung dengan vimentin pada kondisi kanker kolorektal. Karena untuk mengetahui apakah suatu obat dapat berikatan setidaknya harus lebih kuat daripada ligan yang sudah diketahui berikatan dengan target pada keradaan kanker.

Hasil yang didapatkan setelah melakukan *docking* antara lysenin dengan vimentin adalah -37,69 kkal/mol, sedangkan hasil *docking* antara vimentin dengan AKT1 yang berperan sebagai kontrol adalah -23,04 kkal/mol. Ikatan dengan nilai *binding affinity* < -6,00 kkal/mol dikatakan mampu menciptakan ikatan yang kuat dan stabil (Sergey dan Carola, 2014). Berdasarkan hal tersebut dapat dikatakan bahwa nilai *binding affinity* ikatan lysenin dengan vimentin maupun ikatan vimentin dengan AKT1 sebagai kontrol sama – sama dibawah -6,0 kkal/mol sehingga lysenin dan AKT1 dapat berikatan dengan kuat pada vimentin dan menciptakan ikatan yang stabil. Ikatan antara target dan ligan yang terjadi cenderung akan mendahulukan interaksi yang memiliki *binding affinity* lebih kuat karena dapat menciptakan ikatan yang lebih stabil dan kuat. Dari hasil *docking*, nilai *binding affinity* lysenin lebih kuat jika dibandingkan dengan AKT1 sehingga lysenin lebih berpotensi berikatan dengan vimentin dibandingkan dengan AKT1. Selain itu, ikatan yang terbentuk antara lysenin dan vimentin memiliki ikatan yang lebih kuat dan lebih stabil jika dibandingkan dengan ikatan antara vimentin dan AKT1.

6.1.2 Interaksi Ikatan antara Lysenin dengan Vimentin

Nilai *binding affinity* dipengaruhi oleh jumlah ikatan yang terbentuk antara ligan dan target. Semakin banyak ikatan yang terbentuk maka nilai *binding affinity* akan semakin mengarah ke negatif yang menandakan semakin kuat ikatan yang

terbentuk antara ligan dan target. Pada hasil visualisasi ikatan yang didapatkan dari ikatan lysenin dengan vimentin memiliki 25 ikatan asam amino dengan 4 asam amino yang membentuk ikatan hidrogen yaitu Gln 149, Glu 128, Arg 130, Glu 14 dan terdapat 21 asam amino yang membentuk ikatan hidrofobik Pro 124, Phe 18, Val 91, Ile 127, Glu 137, Lys 139, Arg 29, His 16, Phe 17, Asp 19, Ser 126, Phe 155, Gly 125, Leu 147, Val 143, Ser 144, Val 159, Val 142. Sedangkan pada kompleks kontrol, AKT1 dan vimentin terdapat 21 ikatan asam amino dengan 3 asam amino membentuk ikatan hidrogen yaitu Asn 82, Asp 152, Val 111 dan 18 asam amino membentuk ikatan hidrofobik yaitu His 13, Lys 71, Val 85, Tyr 78, His 81, Thr 77, Asp 66, Gln 70, Glu 69, Leu 67, Gln 64, Gln 10, Glu 9.

Ikatan yang terbentuk pada lysenin – vimentin memiliki jumlah ikatan yang lebih banyak jika dibandingkan dengan ikatan AKT1 – vimentin hal tersebut menyebabkan nilai *binding affinity* dari ikatan lysenin – vimentin lebih kuat. Meskipun, kompleks lysenin -vimentin memiliki 1 ikatan hidrogen yang lebih banyak kompleks tersebut juga memiliki 3 ikatan hidrofobik lebih banyak. Ikatan hidrogen mencerminkan ikatan yang kurang stabil dibandingkan dengan ikatan hidrofobik. Karena hanya terdapat 1 jumlah ikatan hidrogen sementara di sisi lain terdapat 3 ikatan hidrofobik lebih banyak pada kompleks lysenin vimentin maka ikatan yang tercipta lebih kuat dan stabil dibandingkan dengan ikatan AKT1 dan vimentin. Hal tersebut dikarenakan atom hidrogen tidak memiliki elektron inti yang dapat melindungi (shielding) inti atom dan ukurannya cukup kecil sehingga dapat lebih didekati oleh molekul-molekul lain. Akibatnya, kutub-kutub antara hidrogen dan pasangan elektron bebas pada atom menjadi lebih mudah untuk berinteraksi.

Ikatan lysenin dan vimentin tidak memiliki ikatan asam amino yang sama dengan ikatan AKT1 dan vimentin. Maka, diketahui bahwa lysenin memiliki *binding site* yang berbeda dengan AKT1. Perbedaan *binding site* tersebut menjelaskan bahwa lysenin tidak bersifat kompetitif terhadap AKT1.

6.2 Ikatan antara Kompleks Lysenin Vimentin dengan AKT1

6.2.1 Afinitas Ikatan antara Kompleks Lysenin Vimentin dengan AKT1

Ikatan yang terbentuk antara lysenin vimentin dapat memberikan pengaruh atau tidak pada sel dapat ditandai dengan adanya perubahan nilai *binding affinity*. Untuk mengetahui hal tersebut, dilakukan perbandingan nilai *binding affinity* antara ikatan kompleks lysenin vimentin dan AKT1 dengan ikatan vimentin dan AKT1. Berdasarkan *docking* yang telah dilakukan, diperoleh nilai *binding affinity* sebesar -10,22 kkal/mol untuk ikatan kompleks lysenin vimentin dan AKT1. Dari data tersebut, diketahui terjadi penurunan *binding affinity* ikatan AKT1 dan vimentin setelah menjadi kompleks dengan vimentin dari -23,04 kkal/mol menjadi -10,22 kkal/mol. Dengan penurunan nilai *binding affinity*, dapat dikatakan bahwa lysenin mampu mengganggu ikatan antara vimentin dan AKT1. Setelah berikatan dengan lysenin, vimentin akan lebih sulit untuk berikatan dengan AKT1 karena energi yang dibutuhkan untuk berikatan lebih besar. Selain itu, ikatan yang terbentuk antara AKT1 dan vimentin yang telah berikatan dengan lysenin lebih lemah dan lebih tidak stabil jika dibandingkan dengan ikatan AKT1 dengan vimentin sebelum berikatan dengan lysenin.

6.2.2 Interaksi Ikatan antara Kompleks Lysenin Vimentin dengan AKT1

Setelah diketahui bahwa vimentin akan cenderung berikatan dengan lysenin pada *binding site* yang berbeda dengan AKT1, selanjutnya memastikan bahwa setelah lysenin dan vimentin berikatan AKT1 tidak dapat menempati *binding site* yang dapat menginduksi proses fosforilasi pada vimentin. Hal tersebut dapat diketahui melalui adanya perubahan *binding site*.

Hasil visualisasi ikatan AKT1-vimentin terdapat 21 ikatan asam amino dengan 3 ikatan hidrogen yaitu Asn 82, Asp 152, Val 111 dan 18 ikatan hidrofobik yaitu His 13, Lys 71, Val 85, Tyr 78, His 81, Thr 77, Asp 66, Gln 70, Glu 69, Leu 67, Gln 64, Gln 10, Glu 9. sedangkan pada ikatan AKT1-kompleks lysenin vimentin terdapat 18 ikatan asam amino dengan 6 ikatan hidrogen His 13, Val 111, Tyr 60, Asp 66, Lys 71 dan 12 ikatan hidrofobik yaitu Tyr 30, Trp 61, Gln 10, Lys 12, Asp 66, Gln 64, Lys 65, Gln 70, Val 185, Asn 82. Jumlah ikatan yang terbentuk pada ikatan vimentin – AKT1 lebih banyak jika dibandingkan dengan ikatan kompleks lysenin vimentin – AKT1, hal tersebut menyebabkan nilai *binding affinity* dari ikatan vimentin – AKT1 lebih kuat. Ikatan AKT1 – kompleks lysenin vimentin memiliki jumlah ikatan hidrogen yang lebih banyak dan jumlah ikatan yang terbentuk lebih sedikit jika dibandingkan dengan ikatan AKT1 – vimentin, hal tersebut berpengaruh pada nilai *binding affinity* yang lebih rendah. Ikatan hidrogen mencerminkan ikatan yang kurang stabil dibandingkan dengan ikatan hidrofobik. Hal tersebut dikarenakan atom hidrogen tidak memiliki elektron inti yang dapat melindungi (shielding) inti atom dan ukurannya cukup kecil sehingga dapat lebih didekati oleh molekul-molekul lain. Akibatnya, kutub-kutub antara hidrogen dan pasangan

elektron bebas pada atom menjadi lebih mudah untuk berinteraksi. Menurut hasil penelitian, dapat dikatakan bahwa ikatan antara AKT1 dengan vimentin yang telah berikatan dengan lysenin menjadi lebih lemah dan mengalami penurunan stabilitas ikatan.

Yang ditekankan untuk mengetahui perubahan *binding site* adalah ditemukannya 6 asam amino yang sama pada sisi vimentin yaitu, His 13, Lys 71, Asn 82, Asp 66, Gln 70, Gln 10 dan 8 ikatan baru yang tercipta pada ikatan AKT1-kompleks lysenin vimentin yaitu, Tyr 30, Trp 61, Val 11, Lys 12, Tyr 60, Gln 64, Lys 65, Val 185. Ditemukannya ikatan asam amino yang baru pada kompleks AKT1 – kompleks lysenin vimentin, menandakan adanya *binding site* yang berubah setelah kehadiran lysenin. Sementara dalam menginisiasi proses fosforilasi vimentin dibutuhkan 21 ikatan asam amino yang sama seperti sebelum terbentuknya kompleks lysenin vimentin. Maka, dapat dikatakan bahwa lysenin mampu merubah *binding site* AKT1 terhadap vimentin dan menggagalkan proses fosforilasi vimentin sehingga tidak tercipta vimentin yang kebal terhadap kaskade caspase. Selanjutnya vimentin akan mengalami pembelahan di Asp 85 oleh caspase 3 atau caspase 7 dan dilanjutkan oleh caspase 6 atau caspase 8 pada Asp 259 sehingga terjadi apoptosis.

6.3 Ikatan antara FdUMP dengan *Thymidylate Synthase*

6.3.1 Afinitas Ikatan antara FdUMP dengan *Thymidylate Synthase*

5-FU merupakan obat kemoterapi golongan antimetabolit yang sering digunakan untuk pasien kanker kolorektal. Saat masuk ke dalam tubuh manusia,

5-FU akan dikonversi menjadi beberapa metabolit aktif menjadi FdUMP, FdUTP dan FUTP. Bentuk FdUMP dapat berikatan dengan thymidylate synthase sehingga dapat mencegah dUMP berikatan dengan thymidylate synthase. Thymidylate synthase merupakan enzim yang mengkatalis *deoxyuridine monophosphate* (dUMP) dengan donor metal dari 5,10 methylene tetrahydrofolate (CH₂THF) menjadi *deoxythymidine-5 monophosphate* (dTMP) yang akan menghasilkan timin (pirimidin) dimana hal tersebut dibutuhkan dalam sintesis maupun replikasi DNA. FdUMP akan berperan sebagai antagonis UMP sehingga terjadi inhibisi sintesis DNA atau gangguan dalam replikasi DNA sehingga akan memicu apoptosis sel (Thomas *et al.*, 2016).

Hasil yang didapatkan setelah melakukan *docking* antara FdUMP dengan *thymidylate synthase* adalah -8,0 kkal/mol, sedangkan hasil *docking* antara *thymidylate synthase* dengan UMP yang berperan sebagai kontrol adalah -7,6 kkal/mol. Ikatan dengan nilai *binding affinity* <-6,00 kkal/mol dikatakan mampu menciptakan ikatan yang kuat dan stabil (Sergey dan Carola, 2014). Berdasarkan hal tersebut dapat dikatakan bahwa nilai *binding affinity* ikatan *thymidylate synthase* dengan FdUMP maupun ikatan *thymidylate synthase* dengan UMP sebagai kontrol sama – sama dibawah -6,0 kkal/mol sehingga FdUMP dan UMP dapat berikatan dengan kuat pada *thymidylate synthase* dan menciptakan ikatan yang stabil. Ikatan antara target dan ligan yang terjadi cenderung akan mendahulukan interaksi yang memiliki *binding affinity* lebih kuat. Dari hasil *docking*, nilai *binding affinity* FdUMP lebih kuat jika dibandingkan dengan UMP sehingga FdUMP lebih berpotensi untuk berikatan dengan *thymidylate synthase* jika

dibandingkan dengan UMP. Selain itu, ikatan yang terbentuk antara *thymidylate synthase* dan FdUMP memiliki ikatan yang lebih kuat dan lebih stabil jika dibandingkan dengan ikatan antara *thymidylate synthase* dan UMP.

6.3.2 Interaksi Ikatan antara FdUMP dengan *Thymidylate Synthase*

Nilai *binding affinity* dipengaruhi oleh jumlah ikatan yang terbentuk antara ligan dan target. Semakin banyak ikatan yang terbentuk maka nilai *binding affinity* akan semakin mengarah ke negatif yang menandakan semakin kuat ikatan yang terbentuk antara ligan dan target. Pada hasil visualisasi ikatan yang didapatkan dari ikatan FdUMP dengan *thymidylate synthase* memiliki 14 ikatan asam amino dengan 9 asam amino yang membentuk ikatan hidrogen yaitu Ser 216, Tyr 258, Asp 254, His 256, Asp 218, Asn 226, His 196, Arg 215, Agr 50 dan terdapat 5 asam amino yang membentuk ikatan hidrofobik Gln 214, Gly 217, Gly 222, Cys 195, Leu 192. Sedangkan pada kompleks *thymidylate synthase* dan UMP yang berperan sebagai kontrol terdapat 14 ikatan asam amino dengan 8 asam amino membentuk ikatan hidrogen yaitu His 196, Asn 226, Gly 222, Asp 218, His 256, Asp 254, Ser 216, Agr 215 dan 6 asam amino membentuk ikatan hidrofobik yaitu Trp 109, Leu 221, Gly 217, Agr 50, Leu 192, Cys 195.

Ikatan yang terbentuk pada FdUMP – *thymidylate synthase* dan UMP – *thymidylate synthase* memiliki jumlah ikatan yang sama, namun kompleks FdUMP-*thymidylate synthase* memiliki ikatan hidrogen yang lebih banyak. Ikatan hidrogen mencerminkan ikatan yang kurang stabil dibandingkan dengan ikatan hidrofobik.

Jika dilihat dari tipe interaksinya maka ikatan antara UMP dan *thymidylate synthase* lebih stabil dibandingkan dengan ikatan FdUMP dan *thymidylate synthase*, namun

tetap kembali pada nilai afinitas ikatan yang lebih tinggi pada FdUMP dimana nilai afinitas ikatan didapatkan dari perhitungan keseluruhan kekuatan. Hal tersebut dikarenakan atom hidrogen tidak memiliki elektron inti yang dapat melindungi (shielding) inti atom dan ukurannya cukup kecil sehingga dapat lebih didekati oleh molekul-molekul lain. Akibatnya, kutub-kutub antara hidrogen dan pasangan elektron bebas pada atom elektronegatif menjadi lebih mudah untuk berinteraksi.

Ikatan FdUMP – thymidylate synthase memiliki 12 ikatan asam amino yang sama dengan ikatan UMP – thymidylate synthase, yaitu Ser 216, Asp 254, His 256, Asp 218, Asn 226, His 196, Arg 215, Agr 50, Gly 217, Gly 222, Cys 195 dan Leu 192. Dari asam amino tersebut, diketahui bahwa FdUMP maupun UMP cenderung memiliki *binding site* yang sama. Karena *binding site* FdUMP dan UMP memiliki kesamaan, maka dapat dikatakan FdUMP memiliki sifat kompetitif terhadap UMP. FdUMP dikatakan mampu menghambat ikatan UMP dengan thymidylate synthase terkait dengan nilai *binding affinity* yang lebih kuat.

Mekanisme kerja antara 5-FU dan lisenin yang berbeda dalam menghambat kanker kolorektal dapat menyebabkan efek sinergis dalam menginduksi apoptosis sel, sehingga berpotensi sebagai agen terapi kombinasi 5-FU untuk pengobatan kanker kolorektal. Dengan terapi kombinasi diharapkan, dosis yang diperlukan untuk terapi menggunakan 5-FU akan menurun jika dibandingkan dengan terapi tunggal. Hal tersebut berpengaruh pada penurunan efek samping obat. Selain itu, dengan adanya perbedaan mekanisme kerja serta jalur lisenin yang dikombinasi dengan 5-FU akan menginduksi apoptosis dengan lebih efektif.

6.4 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan penelitian ini adalah tidak dilakukan simulasi dinamika molekuler untuk melihat bagaimana kestabilan ikatan antara ligan dan target yang dilihat dari jarak ikatan di dalam keadaan pH dan suhu yang disesuaikan dengan keadaan di tubuh manusia menggunakan perangkat YASARA. Hal ini dikarenakan keterbatasan waktu dan fasilitas yang dimiliki.



BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa lysenin berpotensi sebagai agen terapi kombinasi 5-FU dengan mekanisme yang berbeda untuk menghambat kanker kolorektal. Hal ini dapat dilihat melalui :

1. Lysenin dapat berikatan dengan vimentin dan memiliki *binding affinity* sebesar $-37,69$ kkal/mol dikarenakan memiliki nilai *binding affinity* yang lebih kuat dibandingkan ligan kontrol, AKT1.
2. Lysenin berpengaruh pada penurunan nilai *binding affinity* dan perubahan *binding site* pada AKT1 terhadap vimentin sehingga berpotensi untuk menghambat fosforilasi vimentin dan mendukung terjadinya proteolisis vimentin oleh kaskade caspase yang mengakibatkan apoptosis sel.
3. FdUMP sebagai metabolit aktif dari 5-FU dengan *thymidylate synthetase* memiliki ikatan dengan *binding affinity* sebesar $-8,0$ kkal/mol berpotensi menghambat *thymidylate synthase* sehingga terjadi apoptosis sel dikarenakan memiliki nilai *binding affinity* yang lebih kuat dibandingkan ligan kontrol, UMP.

7.2 Saran

Adapun saran yang dapat peneliti berikan dari penelitian ini adalah agar dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui dinamika molekul dari kompleks lysenin-vimentin dengan mengkondisikan pH dan suhu sesuai dengan keadaan yang dibuat menyerupai tubuh manusia dengan menggunakan perangkat YASARA.

DAFTAR PUSTAKA

American Cancer Society. *Colorectal Cancer Facts & Figures 2017-2019*. Atlanta.

American Cancer Society. 2017.

Bokori-Brown M., Martin T.G., Naylor C.E., Basak A.K., Titball R.W., dan Savva C.G.

Cryo-EM structure of lysenin pore elucidates membrane insertion by an aerolysin family protein. *Nature Communication*, 2016, 7: 11293.

Dallakyan S. dan Olson A. J. Small Molecule Library Screening By Docking With Pyrx.

The Scripps Research, 2015, 10 : 243-250.

Du L., Li J., Lei L., He H., Chen E., Dong J., dan Yang J. High Vimentin Expression

Predicts a Poor Prognosis and Progression in Colorectal Cancer: A Study with

Meta-Analysis and TCGA Database. *BioMed Research International*, 2018.

Endharti A.T., Purnanamasari Y. Primasari R., Poeranti S. dan Permana S. Coelomic

Fluid of *Lumbricus rubellus* Synergistically Enhance Cytotoxic Effect of 5-

Fluorouracil through Modulation of Focal Adhesion Kinase and p21 in HT-29

Cancer Cell Line. *The Scientific World Journal*, 2019, 2019: 1-9.

GLOBACON. *Estimated Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Worldwide in*

2018, WHO, 2018, Office of Information.

Jung B., Staudacher J. J., dan Beauchamp D. Transforming Growth

Factor β Superfamily Signaling in Development of Colorectal Cancer.

Gastroenterology, 2017, 152 (1): 36-52.

Johnson c.m., Wei c., Ensor J.E., Smolenski D. J., Amos C.I., Levin B., dan Berry D.A. Meta-analyses of Colorectal Cancer Risk Factors. *Cancer Causes Control*, 2013, 24 (6): 1207–1222.

Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2018. *Hasil Utama RISKESDAS 2018*, Jakarta, 2018. hal. 52.

Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2017. *Panduan Penatalaksanaan Kanker Kolorektal*, Jakarta, 2017. hal.10-22.

Longley D.B., Harkin D.P., dan Johnston P.G. 2003. 5-Fluorouracil: Mechanisms Of Action And Clinical Strategies, Northern Ireland. 2003. hal.330-338.

Mashiach E., Duhovny D. S., Peri A., Shavit Y., Nussinov R., dan Wolfson H.J. An Integrated Suite of Fast Docking Algorithms, *Poteins*, 2010, 78 (15) : 3197-3204.

McIlwain D.R, Berger T., dan Mak T.W. Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013, 5 (4):a008656.

Meng X.Y., Zhang H.X., Mezei M., dan Cui M. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug*, 2011, 7 (2):146–157.

Milone M.C. *Therapeutic Drug Monitoring of selected Anticancer Drugs*, Elsevier, United States of America, 2012. p. 301-302.

Mladinich M., Diane R., dan Chan C. Tackling Cancer Stem Cells via Inhibition of EMT Transcription Factors. Hindawi, *Stem Cells International*, vol. 2016, Article ID 5285892, 10 pages, 2016.

Mokhtari R. B., Homayouni T.S., Baluch N., Morgatskaya E., Kumar S., Das B., dan Yeger H. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*, 2017, 8 (23):38022-38043.

Ormanns S., Neumann J., Horst D., Kirchner T., dan Jung A. WNT signaling and distant metastasis in colon cancer through transcriptional activity of nuclear β -Catenin depend on active PI3K signalling. *Oncotarget*, 2014, 5 (10):2999-3011.

Palungkun R. *Usaha Ternak Cacing Tanah Lumbricus Rubellus*, Edisi ke-3, Jakarta, Penebar Swadaya, 2011.

Pandurangan A .K. Potential Targets for Prevention of Colorectal Cancer: a Focus on PI3K/Akt/mTOR and Wnt Pathways. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2013, 14 (4):1-5.

Permana S, Hadi R. P., Norahmawati E. dan Endharti A.T. Coelomic fluid of *Lumbricus rubellus* enhance anti-proliferative effect of 5-fluorouracil by modulating focal adhesion kinase express and IL-1 β of colorectal cancer in mice. *J App Pharm Sci*, 2019, 9 (08): 041-046.

Permana S, Pearlindah, Sholihah Z, Iskandar A, Susanti H, dan Endharti A.T. 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. *J App Pharm Sci*, 2018, 8 (11): 028-034.

Podobnik M., Savory P., Rojko N., Kisovec M., Wood N, dan Hambley R. Crystal structure of an invertebrate cytolysin pore reveals unique properties and mechanism of assembly. *Nature Communications*, 2016, 7: 11598.

Polk A., Vistisen K., Nilsen M.N., dan Nielsen D.L. A systematic review of the pathophysiology of 5-fluorouracil-induced cardiotoxicity. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2014, 4 (15): 47.

Satelli A. dan Li S. Vimentin as a potential molecular target in cancer therapy Or Vimentin, an overview and its potential as a molecular target for cancer therapy, *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68 (18): 3033–3046.

Satelli A., Hu J., Xia X., dan Li S. Potential Function of Exogenous Vimentin on the Activation of Wnt Signaling Pathway in Cancer cell. *J Cancer*, 2016, 7 (13): 1824-1832.

Sergey S. dan Carola F. In silico predictive model to determine vector mediated transport properties for the blood-brain barrier choline transport. *Adv Appl Bioinform Chem*, 2014, 7 : 23-36.

Sukumwang N. dan Umezawa K., Earthworm-Derived Pore-Forming Toxin Lysenin and Screening of Its Inhibitors. *Toxins*, 2013, 5 (8): 1392–1401.



Tariq K. dan Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis : a review of mechanisms.

Cancer Biol Med, 2016, 13 (1): 120–135.

Thomas S.A., Grami Z., Mehta S., dan Patel K. Adverse effects of 5-fluorouracil: Focus on rare side effects. *Cancer Cell & Microenvironment*, 2016, 3:1266.

Vu T. dan Datta P. K. Regulation of EMT in Colorectal Cancer: A Culprit in Metastasis. *Cancers*, 2017, 9 (12):171.

Wallace A.C. dan Laskowski R.A. LIGPLOT: Program for automatically plotting protein-ligand interactions. The European Bioinformatics Institute. 2019.

Yuan S., Stephen-Chan H.C., dan Hu Z. Using PyMol as a Platform For Computational Drug Design. *Wiley Interdisciplinary Reviews Computational Molecular Science*, 2017, 7 : 1-10.

Zhu Q.S., Rosenblatt K., Huang K.L, Lahat G., Brobey R., Bolshakov S., Nguyen T., dan Ding Z .Vimentin is a novel AKT1 target mediating motility and invasion. *Oncogen*, 2011, 30 (4): 457–470.

