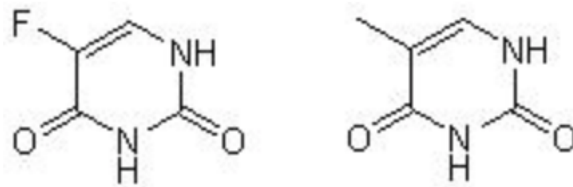


## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 5 – FU

##### 2.1.1 Ikatan 5-FU dengan reseptor pada kanker kolon



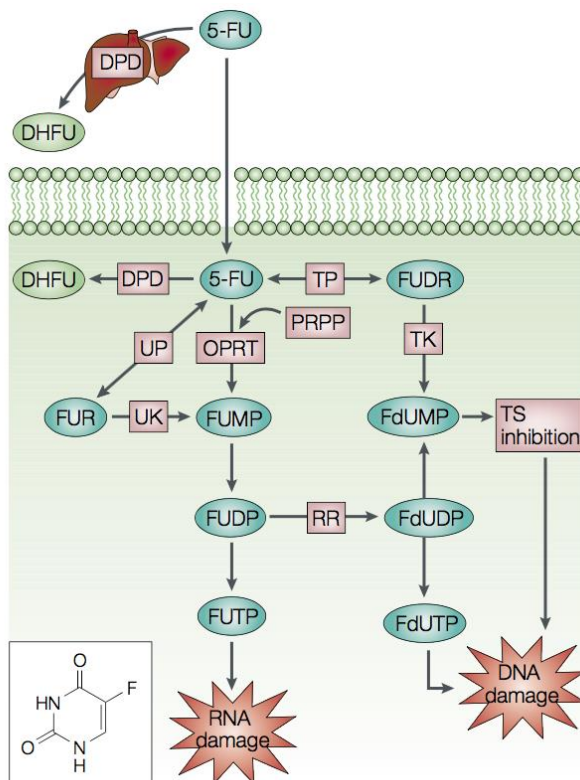
**Gambar 2.1.1(a) :** senyawa 5-fluorouracil Sebuah senyawa baru dari turunan 5-fluorourasil, 1-(4-metoksibenzoiloksimetil)-5-fluorourasil

5-Fluorouracil (5-FU) merupakan agen kemoterpi utama yang digunakan untuk terapi kanker kolon. 5-FU adalah antimetabolit yang bekerja secara antagonis dengan timin terhadap aktivitas enzim timidilat sintetase (TS). 5-FU merupakan *prodrug*, metabolisme 5-FU menghasilkan fluoridin-5'-trifosfat (FUTP) yang bergabung ke dalam RNA dan mempengaruhi fungsinya fluorodeoksiuridilat (FdUMP) yang menghambat replikasi DNA.

5-Fluorouracil (5-FU) dikonversi menjadi 3 metabolit aktif utama yaitu : (1) fluoro-deoxyuridine monophosphate (fdUMP), (2) fluorodeoxyuridine triphosphate (FdUTP), dan (3) fluoruridine triphosphate (FUTP). Mekanisme utama aktivasi 5-FU adalah konversi menjadi fluoruridine monophosphate (FUMP) juga secara langsung oleh orotate phosphoribosyl transferase (OPRT), atau secara tidak langsung via fluorouridine (FUR) melalui aksi berurutan dari uridine phosphorylase (UP) dan uridine kinase (UK). FUMP kemudian difosforilasi menjadi fluoruridine diphosphate (FUDP), yang dapat juga difosforilasi lebih lanjut

menjadi metabolit aktif fluorouridine triphosphate (FUTP), atau dikonversi menjadi fluorodeoxyridine diphosphate (FdUDP) oleh ribonucleotide reductase (RR). Di sisi lain, FdUDP dapat pula di fosforilasi atau didefosforilasi menjadi metabolit aktif masing-masing FdUTP dan FdUMP. Jalur aktivasi alternatif lainnya melibatkan thymidine phosphorylase yang mengkatalisis konversi 5-FU menjadi fluorodeoxyuridine (FdUR), kemudian difosforilasi oleh thymidine kinase (TK) dan menjadi thymidylate synthase (TS) inhibitor, FdUMP. Ada pula enzim dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) yang mengkonversi 5-FU menjadi dihydrofluorouracil yang tidak aktif (DHFU) adalah rate-limiting step katabolisme 5-FU pada sel normal dan sel tumor, dan proporsi dari pengrusakan menjadi metabolit tidak aktif mencapai 80% (Longley dan Johnston, 2007).

Hal ini akan mengakibatkan induksi apoptosis karena penghambatan sintesis DNA yang disebabkan sel kekurangan deoksitimidin trifosfat (dTTP). Peningkatan ekspresi TS pada sel kanker merupakan respon sel yang dapat mengakibatkan resistensi terhadap 5-FU (Gioyanetti et al., 2007).



**Gambar 2.1.1(b) : mekanisme kerja dari 5-FU** 5-FU dikonversikan menjadi 3 bagian FdUMP, FdUTP dan FUTP. Sebesar 80% metabolisme 5-FU terjadi di hepar.

Pada kaitannya dengan daur sel, 5-FU tidak dapat berkerja pada sel yang berada diluar daur sel (G0). 5-FU hanya bekerja pada sel yang aktif menjalankan daur sel dimana 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 *precursor* 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*) (Liu et al., 2006). Namun, bagaimanapun aktivitas penghambatan daur 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 (Lim et al., 2007).

Mekanisme yang memperantai aktivitas pada fase tersebut masih perlu ditelusuri lebih lanjut. Pada sel Lovo dan WiDr, (Backus et al., 2001) melaporkan bahwa 5-FU menyebabkan penghambatan daur sel pada fase S. hal ini menunjukkan bahwa aktivitas 5-FU tidak selamanya terkait dengan aktivitas penghambatan TS dan diperlukan penelitian untuk konfirmasi aktivitas 5-FU pada daur sel jika digunakan sel yang berbeda.

5-FU dapat menginduksi terjadinya penghentian daur sel dan pemicuan apoptosis tanpa melibatkan peran p53, tetapi melibatkan peningkatan ekspresi p21 dan pRb. Kedua protein tersebut memiliki peran penting dalam sistem *checkpoint* pada fase G1. Ekspresi pRb tinggi akan menghambat aktivitas E2F sehingga menyebabkan penghambatan sel untuk melampaui R. ekspresi p21 akan menghambat aktivitas cyclin E/CDK2 dan cyclin A/CDK2 sehingga dapat menyebabkan penghambatan daur sel. Sel kanker dengan p21 mutan tidak dapat memacu penghentian daur sel sehingga langsung memacu apoptosis tetapi sel

dengan p21 normal yang memacu penghentian daur sel akan memicu munculnya sel yang resisten.

Aktivitas 5-FU dalam pemacuan apoptosis dapat melalui jalur p53 ataupun tidak ( *dependent or independent p53*) (Levrero *et al.*, 2000). Hal ini dibuktikan bahwa 5-FU dapat menginduksi apoptosis pada sel kanker yang mengalami defisiensi p53 atau memiliki p53 mutan.

### **2.1.2 Kekurangan dari 5-FU**

Efek samping dari 5-Fu yang ditemukan pada pasien antara lain neutropenia, stomatitis, diare, dan *hand-food syndrome*. Masing-masing efek ini terkait dengan metode pemberian yang diterapkan pada pasien (Meyerhardt *and* Mayer, 2005). Kejadian efek samping 5-FU yang paling parah adalah kardiotoxistas meskipun hal ini jarang ditemui (Hosmas *et al.*, 2004). Dibandingkan dengan agen kemoterapi yang lain, 5-FU memiliki selektivitas yang tinggi pada aktivitas TS dan efek samping yang ditimbulkan relatif ringan. Meskipun demikian, efektivitas 5-FU sebagai agen kemoterapi baru mencapai 15% sehingga diperlukan pengembangan agen kokemoterapi untuk meningkatkan efektivitas terapi dengan 5-FU (Meyerhardt *and* Mayer, 2005).

## **2.2 Coelomic fluid**

### **2.2.1 Coelomic fluid pada cacing tanah ( *Eisenia eugeniae* )**

Salah satu praktis kedokteran yang sedang ditingkatkan pada abad 21 ini adalah kemoprevensi kanker. Saat ini, terdapat lebih dari 50% obat-obatan yang digunakan pada uji coba klinis untuk antikanker aktif yang diisolasi dari lingkungan aslinya atau yang serupa. Dalam beberapa tahun, pengembangan berfokus pada evolusi dari imun sistem vertebrata. Aktivitas molekul terlihat pada fase awal

evolusi. *Coelomic fluid* pada cacing tanah menunjukkan perbedaan fungsi secara biological seperti bakteriostatik, proteolitik, sitolitik, dan aktivitas mitogenik.

*Coelomic fluid* yang mengobati berbagai macam sel kanker menunjukkan efek sitotoksik dengan konsentrasi 0.5 mg/ml. *Coelomic fluid* menunjukkan efek dosis dependen pada sel kanker yang dapat terdeteksi dengan MTT assay. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa inhibisi dari sel HeLa dengan konsentrasi tinggi pada *coelomic fluid* pada *Eisenia eugeniae* dapat membunuh sel HeLa dengan cara nekrosis sel dan lisis pada dosis tertentu. Kauschke dan Mohrig menyimpulkan *Eisenia eugeniae* mempunyai efek toksik pada beberapa macam tipe sel seperti, broblasts ayam. Menurut hasil sitotoksik molekul dihasilkan dari karakter *coelomic fluid* dari *Eisenia eugeniae*. *Coelomic fluid* dari cacing tanah mengandung sitotoksik dan molekul hemaglutinin, yang mana dapat dihasilkan dari bermacam-macam variasi coelomocytes. Terdapat penemuan dimana pada *coelomic fluid* terdapat komponen yang mirip dengan protein dan peptida. Beberapa penelitian pada *coelomic fluid* juga ditemukan aktivitas fibrinolitik, anti tumor dan aktivitas microbial dan ditemukan juga pada tes yang berbeda makromolekul pada spesifik komponen mempunyai peran untuk sitotoksik (Yanqin, 2007).

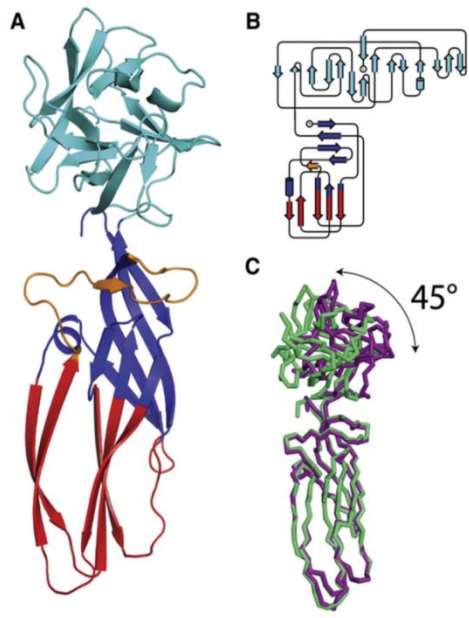
### **2.3 Lysenin dan Sphingomyelin**

#### **2.3.1 Struktur primer dan sekunder dari lysenin dan lysenin-related protein**

*Lysenin* diisolasi dari cairan koelomik (*coelomic*) dari cacing tanah *Eisenia foetida* sebagai protein yang menyebabkan kontraksi otot polos vaskular tikus. Rantai polipeptida lysenin terdiri dari 297 asam amino dengan massa molekul sebesar 33.440 kDa, yang sesuai dengan hasil kromatografi eksklusi ukuran/ *size-exclusion chromatography* (33.000 Da) dan jauh lebih kecil dari yang diukur

dengan elektroforesis gel natrium dodesil sulfat-polikrilamid/ *sodium dodecyl sulfate-polycrylamide gel electrophoresis* (SDS -PAGE) (41.000 kDa). Perbedaan ini dapat dijelaskan oleh glikosilasi dan bukan oleh kandungan residu asam yang tinggi pada lysenin karena hanya sedikit tinggi dari nilai muatan rata-rata.

Bersama dengan dua protein tambahan yang terdapat pada cairan koelomik dan disebut sebagai protein terkait lysenin (*lysenin-related proteins*), lysenin terdiri dari sekelompok protein yang memiliki sekuens homolog yang tinggi, yang sangat berbeda dari sekuens protein lain yang terdaftar pada database protein. Protein terkait lysenin mengandung 72% atau lebih residu asam amino yang identik dengan lysenin, sekitar 17% sangat mirip dan hanya sekitar 5% residu yang berbeda dari lysenin. Residu yang berbeda terdistribusi secara statistik sepanjang rantai polipeptida kecuali pada posisi 4-7 dimana residu yang berbeda terakumulasi. Pada regio ini, lysenin memiliki dua residu celah delesi dibandingkan dengan protein terkait lysenin.



**Gambar 2.3.1 : struktur ikatan *lysozyme*** (A) Lysozyme crystal structure shows it is organized into two domains: the PFM domain at the N-terminus made of subdomain 1 (red), subdomain 2 (blue) and the b-hairpin (orange); the b-trefoil C-terminal domain colored in cyan. (B) Lysozyme protomer topology diagram. Color code is the one adopted in (A). (C) Superpositions of apo and POC-bound form of lysozyme, respectively in violet and green. Superposing the PFM domains shows the alternative orientations of the head with respect to the N-terminal domain.

senin disebut fetidin atau hemolysin (gb> AAB67727.1); menurut database urutan protein TrEMBL (entry> O18425), ini adalah produk gen EFL3 dan merupakan protein yang sama, yang pada sel

*E.foetida* dapat dimodifikasi oleh komponen sakarida yang berbeda. Menurut pencarian motif PROSITE, situs N-glikosilasi untuk protein lysenin dan protein lysenin 2 telah diprediksi masing-masing pada residu N248 dan N250, yang sesuai dengan hasil observasi eksperimental. Untuk protein terkait lysenin 1, dua lokasi N-glikosilasi pada residu N33 dan N151 telah diprediksi. Situs N-myristoylation, yang bisa memudahkan penempelan protein pada membran sel.

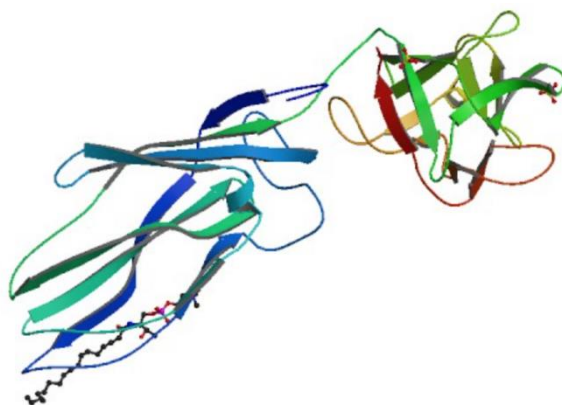
Ketiga protein tersebut memiliki beberapa lokasi potensial untuk fosforilasi spesifik dari protein kinase C, kasein kinase II dan tirosin kinase. Protein terkait lysine 1 memiliki satu lokasi tambahan spesifik untuk protein kinase cAMP- dan cGMP. Famili protein ini memiliki ligan heme yang khas dan memiliki homologi yang lemah dengan piridoksamin 5'-fosfat oksidase. Lysenin dan protein terkait lysenin 1 homolog dengan bagian domain HypA (domain protein inkorporasi nikel hidrogenase/ *hydrogenase nickel incorporation protein domain*); lysenin memiliki homologi tambahan dengan bagian dari domain pengikat selulosa (CBM-2) (Shakor, 2003).

### **2.3.2 Sphingomyelin**

Keberadaan *sphingomyelin* hanya terdapat pada eukariotik sel. Pada mamalia sel, *sphingomyelin* memiliki presentase 10-15% dari total fosfolipid. *Sphingomyelin* dengan jenis yang lebih baik dapat ditemukan pada eritrosit, lensa okuler, saraf tepi dan otak. Dalam sel, *sphingomyelin* terbanyak terdapat pada plasma membran terutama pada *outer leaflet*. Metaboli *sphingomyelin* mempunyai peran penting sebagai *second messenger* untuk sinyal transduksi walaupun pada saat perkembangan dan diferensis. *Sphingomyelin* merupakan komponen terbesar dalam *sphingolipid* atau *cholesterol-rich membrane domains* yang disebut sebagai

*lipid-rafts*. Diketahui pula bahwa beberapa *pore-forming toxins* memiliki interaksi dengan *sphingomyelin* salah satu contohnya adalah *lysenin* (Shogromori, 2007).

### 2.3.3 *Lysenin* berikatan spesifik dengan *Sphingomyelin*



**Gambar 2.3.2 : kompleks ikatan *lysenin sphingomyelin***  
*sphingomyelin* berikatan pada rantai  $\alpha$  *lysenin* dan membentuk kompleks ikatan baru yang dapat mengaktifkan kerja *lysenin* untuk mengapoptosis sel kanker.

*lysenin* berikatan secara spesifik dengan *sphingomyelin* dalam membran plasma dari berbagai sel dan oleh karena itu dapat digunakan sebagai probe untuk mempelajari distribusi dan fungsi *sphingomyelin* pada membran seluler. Selain *sphingomyelin*, *lysenin* yang diisolasi dari *E.foetida* tidak berikatan dengan *sphingolipid* lainnya atau juga *ceramide*, *sphingisine*, *sphingosin-1-fosfat*, *sphingosil-fosforilkolin* atau *galaktosilseramid*, seperti yang ditunjukkan oleh uji imunosorben, lapisan tipis *immunostaining* kromatografi dan uji lisis liposom. Penelitian-penelitian ini juga menunjukkan bahwa *lysenin* mengenali struktur molekular yang tepat dari *sphingomyelin*. Dalam molekul *sphingomyelin*, *lysenin* membutuhkan fosforilkolin, asam sphingosin dan asam lemak untuk mengikat. Pada penelitian ini menemukan bahwa rekombinan *lysenin* yang ditandai dengan polihistidin (*His-tag*) mengenali *sphingomyelin* dengan spesifisitas yang sama. Inkorporasi kolesterol ke dalam membran sintesis berbasis *sphingomyelin* secara signifikan meningkatkan jumlah total *lysenin* yang terikat pada membran. Resonansi permukaan plasmon (*Surface plasmon resonance*) menunjukkan bahwa inkorporasi kolesterol tidak mengubah parameter kinetik interaksi *lysenin-sphingomyelin*, menunjukkan bahwa inkorporasi kolesterol



dapat mengubah distribusi topikal *sphingomyelin* dalam membran, sehingga meningkatkan aksesibilitas *sphingomyelin* ke *lysenin* (Luigi, 2012).

Mekanisme molekuler kerusakan membran yang disebabkan oleh *lysenin* tidak dijelaskan, walaupun diketahui bahwa ini tidak terjadi setelah kerja *sphingomyelinase*. Adanya sekuens *lysenin* yang mampu membentuk suatu domain transmembran tersebut dipertanyakan, oleh karena itu protein dapat menempel pada permukaan membran tanpa mempenetrasi lapisan bilayer membran. Selanjutnya, domain hidrofobik leptinin dapat menyebabkan distorsi lokal pada lipid bilayer. Sebagai tambahan, perakitan *lysenin* menjadi oligomer tidak dapat diabaikan, karena fetidin dan eiseniapore, protein *E. foetida* lainnya, terbukti mengalami oligomerisasi selama interaksi dengan membran yang mengandung *sphingomyelin*. Ada kemungkinan bahwa akumulasi *sphingomyelin* pada mikrodoman membran yang berbeda seperti rakit kaya *sphingolipid* dan kolestrol/ *sphingolipid/cholesterol-rich raft* dapat membuat mikrodoman sangat rentan terhadap ikatan *lysenin*. Kompleks *lysenin-sphingomyelin* yang terkonsentrasi di dalam mikrodoman dapat menimbulkan kerusakan lokal pada membran plasma, yang diikuti dengan lisis sel. Dari sudut pandang ini, studi tentang sitolisis yang diinduksi oleh *lysenin* dapat membantu untuk mengungkapkan jika perubahan rakit lipid/ *lipid rafts* cukup untuk menginduksi kematian sel. Ada beberapa cara di mana kompleks *lysenin / sphingomyelin* dapat meningkatkan kebocoran membran, salah satunya terkait dengan destabilisasi bilayer karena perubahan lokal dari kelengkungan membran. Cara kerja ini dideskripsikan untuk protein pro-apoptotik tBid pada membran mitokondria. Dapat dibayangkan bahwa setelah permeabilisasi (Shakor, 2003).

#### **2.3.4 Potensi ikatan *lysenin* dengan *shpingomyelin* pada apoptosis sel**

Terdapat bukti bahwa *lysenin* berikatan spesifik terdapat *sphingomyelin* pada plasma membran pada berbagai macam sel dan oleh karena itu dapat digunakan sebagai pemeriksaan studi tentang distribusi dan fungsi dari sphingomyelin pada membran seluler. Diluar dari *sphingomyelin*, *lysenin* yang diisolasi dari *E. foetida* tidak berikatan dengan *sphingolipid* ataupun ceramide, *sphingosine*, *sphingosine-1-phosphate*, *sphingosylphosphorylcholine* atau *galactosylceramide*, yang ditunjukkan pada tes imunosorbent, *thin layer chromatography immunostaining* dan uji liposom lisis. Studi ini menunjukkan bahwa lisenin mengenali struktur molecular dari sphingomyelin. Mekanisme molekuler kerusakan membran yang disebabkan oleh *lysenin* tidak diketahui dengan jelas, meskipun mekanisme tersebut tidak mengikuti kerja sphingomyelin. Kompleks *lysenin sphingomyelin* terkonsentrasi di dalam mikrodoman dapat menimbulkan kerusakan lokal pada membran plasma, diikuti dengan lisis sel. Dari sudut pandang tersebut, penelitian mengenai sitolisis yang diinduksi oleh lisenin dapat membantu untuk mengungkapkan jika perubahan *lipid rafts* mampu menginduksi kematian sel. Terdapat beberapa cara dimana kompleks *lysenin/sphingomyelin* dapat meningkatkan kebocoran membran, salah satunya berkaitan dengan destabilisasi bilayer akibat perubahan lokal pada kurvatura membran. Mekanisme kerja tersebut dideskripsikan untuk protein pro-apoptosis tBid dalam membran mitokondria (Shakor, 2003).

#### **2.3.5 hnRNP M4**

hnRNPs adalah ikatan protein RNA dan membentuk kompleks dengan *heterogeneous nuclear RNA* (hnRNA). Protein ini berasosiasi dengan pre-mRNAs di nukleus dan muncul untuk mempengaruhi proses dari pre\_mRNA dan aspek lagi dari metabolisme dan transpot mRNA. Sedangkan semua hnRNPs terdapat pada nuklues, beberapa terjebak diantara nuklues dan sitoplasma. Protein hnRNP

mempunyai ikatan asam nukleus yang berbeda-beda. Protein ini juga merupakan sebuah monomer dari reseptor spesifik *N-acetylglucosamine* yang dimana sebagai dalil untuk pencetus selektif daur ulang dari molekul *GlcNAc-bearing thyroglobulin* imature. Maka dari itu terbentuklah variasi transkripsinya (anonimus, 2017).

## **2.4 Docking**

### **2.4.1 Metode docking**

*Molecular docking* adalah suatu teknik yang digunakan untuk 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. Terdapat dua aspek penting dalam *molecular docking*, yaitu fungsi scoring dan penggunaan algoritma (Funkhouser, 2007).

Metode untuk mencari posisi optimal ligand terhadap sisi aktif pengikatan dari struktur target (reseptor). *Molecular docking* dapat memprediksi afinitas pengikatan kompleks yang terbentuk antara reseptor dengan ligand menggunakan berbagai parameter seperti argo binding, konstanta inhibitor, ikatan hydrogen dan kontak hidrofobik. *Molecular docking* sangat berguna dalam proses perancangan obat, seperti untuk memprediksi afinitas pengikatan dari inhibitor yang didesain terhadap enzim tertentu yang ingin dihambat aktivitasnya (Yeturu dan Nagasuma, 2008).

Fungsi scoring dapat memperkirakan afinitas ikatan antara makromolekul dengan ligan (molekul kecil yang memiliki afinitas terhadap makromolekul). Identifikasi ini didasarkan pada beberapa teori seperti teori energi bebas Gibbs. Nilai energi bebas Gibbs yang kecil menunjukkan bahwa konformasi yang terbentuk stabil, sedangkan nilai energi bebas Gibbs yang besar menunjukkan bahwa

konformasi yang terbentuk stabil, sedangkan nilai energi bebas Gibbs yang besar menunjukkan bahwa konformasi yang terbentuk kurang atau tidak stabil. Sedangkan penggunaan algoritma berperan dalam penentuan konformasi (docking pose) yang stabil (*favourable*) dari pembentukan kompleks (Funkhouser, 2007). Berdasarkan pada interaksi yang terjadi, terdapat beberapa jenis *molecular docking*, yaitu (1) Docking protein-protein, (2) Docking ligan-protein, dan (3) Docking ligan-DNA.

Untuk melakukan *molecular docking*, hal pertama yang dibutuhkan adalah struktur tiga dimensi dari ligan (*drug*) dan protein target. Struktur tiga dimensi ligan dapat dimodelkan dengan menggunakan teknik *molecular modeling* sedangkan struktur tiga dimensi protein 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* (Lucientes, 2004).