

Analisis Kemiripan Obat, Prediksi Toksisitas dan Studi *Molecular Docking* Metabolit Sekunder Dari *Streptomyces carpaticus* Terhadap Protein Caspase-3 Sebagai Antikanker Leukemia

Adam Suduri^{1*}, Huda Shalahudin Darusman^{1,2} dan Silmi Mariya²

¹Program Studi Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, Indonesia

²Divisi Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Indonesia

²Pusat Penelitian Primata, LPPM- Institut Pertanian Bogor, Indonesia

ABSTRAK

Caspase-3 merupakan enzim protease yang berperan dalam proses apoptosis, dan menjadi target senyawa metabolit dalam menghambat pertumbuhan sel kanker. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui sifat kemiripan obat metabolit sekunder hasil produksi *Streptomyces carpaticus* yang diperoleh berdasarkan analisis kluster gen biosintesis pada program antiSMASH version 7.1.0, mengetahui hasil prediksi *mutagenicity* dan *toxicity* serta mengetahui hasil interaksi metabolit sekunder dengan protein Caspase-3 yang merupakan reseptor terkait sel kanker leukemia menggunakan *molecular docking*. Hasil analisis kemiripan obat dan prediksi ADME menunjukkan bahwa ketiga metabolit memenuhi aturan *Lipinski Rule of Five* dan memiliki kemiripan dengan obat. Ketiga metabolit tergolong pada *Toxicity Class 5*, dan memiliki sifat *mutagenic* inactive dengan probability *Pristinol*: 0.93, *Raimonol*: 0.91 dan *Cyslabdan*: 0.80 dan *toxicity* inactive dengan probability *Pristinol*: 0.75, *Raimonol*: 0.94 dan *Cyslabdan*: 0.76. Hasil studi *molecular docking*, analisis dan validasi situs ikatan dengan protokol penambatan ulang (*redocking*) ligan standar 5-[4-(1-carboxymethyl-2-OXO-propylcarbamoyl)-benzylsulfamoyl]-2-Hydroxy-Benzoic Acid memiliki nilai RMSD yaitu 0.000. Energi ikatan bebas masing-masing ligan yaitu sebesar -8,9 kkal/mol -9.2 kkal/mol, -7.0 kkal/mol, -7.1 kkal/mol, dan -7.0 kkal/mol. Hasil ini menunjukkan bahwa energi ikatan hasil penambatan metabolit sekunder dengan protein Caspase-3 yang paling baik adalah metabolit *cyslabdan* dengan nilai ikatan bebas -7.4 kkal/mol dan jumlah interaksi 12.

Kata Kunci: Caspase-3; Kemiripan Obat; Metabolit Sekunder; *Molecular Docking*; *Toxicity*

ABSTRACT

Caspase-3 is a protease enzyme that plays a role in the apoptosis process and is a target metabolite compound in inhibiting the growth of cancer cells. The purpose of this study was to determine the similarity properties of secondary metabolite drugs produced by *Streptomyces carpaticus* obtained based on the analysis of biosynthesis gene clusters in the antiSMASH version 7.1.0 program, to determine the results of *mutagenicity* and *toxicity* predictions, and to determine the results of secondary metabolite interactions with Caspase-3 proteins which are receptors associated with leukaemia cancer cells using *molecular docking*. The drug similarity analysis and ADME predictions showed that the third metabolite met the *Lipinski Rule of Five* and had similarities with the drug. The three metabolites are classified into *Toxicity Class 5* and have inactive *mutagenetic* properties with probabilities of *Pristinol*: 0.93, *Raimonol*: 0.91, and *Cyslabdan*: 0.80 and inactive *toxicity* with probabilities of *Pristinol*: 0.75, *Raimonol*: 0.94 and *Cyslabdan*: 0.76. The results of *molecular docking* studies, analysis, and validation of binding sites with the standard ligand *redocking* protocol 5-[4-(1-carboxymethyl-2-OXO-propylcarbamoyl)-benzylsulfamoyl]-2-Hydroxy-Benzoic Acid have an RMSD value of 0.000. The free binding energy of each ligand is -8.9 kcal/mol, -9.2 kcal/mol, -7.0 kcal/mol, -7.1 kcal/mol, and -7.0 kcal/mol. These results indicate that the best binding energy of the secondary metabolite docking with the Caspase-3 protein is the *cyslabdan* metabolite with a free binding value of -7.4 kcal/mol, and the number of interactions is 12.

Keywords: Caspase-3; Drug Similarity; Secondary Metabolites; *Molecular Docking*; *Toxicity*

Received: 05-08-2024, Accepted: 12-08-2024, Online: 11-09-2024

*Corresponding author:
adamsuduri@gmail.com

PENDAHULUAN

Cysteine-aspartyl protease atau disebut *caspase*, merupakan enzim protease yang berperan dalam mekanisme kematian sel seperti apoptosis. Caspase terdiri dari tiga domain yakni ujung amino terminal, domain besar dengan ukuran ~20 kDa, dan domain kecil ~10 kDa yang bersama-sama membentuk domain protease. Saat ini terdapat dua belas caspase yang ditemukan pada manusia, diantaranya *Caspase-3*. Berdasarkan fungsinya Caspase sendiri dikelompokkan menjadi caspase inflamasi (caspase -1, -4, -5, -12) dan apoptosis (Caspase -2, -3, -6, -7, -8, -9, -1) (Logue & Martin, 2009). Apoptosis merupakan proses kematian sel terprogram yang terjadi secara alamiah dialami oleh semua sel dan alasan sel melakukan apoptosis adalah pertama untuk pertumbuhan dan perkembangan sel, jaringan atau organ, kedua apoptosis untuk menghancurkan sel-sel yang dianggap membahayakan bagi integritas organisme itu sendiri, seperti sel yang terinfeksi oleh virus atau sel dengan kerusakan DNA, maupun sel kanker (Sastrowardoyo et al., 2008). Proses apoptosis diawali dengan kerusakan DNA yang menyebabkan ukuran DNA menjadi kecil. Kemudian mengalami perubahan asimetri pada permukaan sel yang dikenal dengan membran blebbing dan DNA terfragmentasi (Tulha et al., 2012).

Metabolit sekunder yang berpotensi sebagai obat antikanker saat ini diharapkan mampu membunuh sel kanker melalui mekanisme induksi apoptosis dengan menghambat kerja dari protein reseptornya seperti *Caspase-3* (Sastrowardoyo et al., 2008). Senyawa metabolit sekunder golongan terpen memiliki mekanisme aksi unik melawan kanker dan memicu jalur kematian sel terprogram. (Akhmadi & Utami, 2022), senyawa golongan menunjukkan aktivitas farmakologi yang signifikan, seperti antiviral, antibakteri, antiinflamasi yang sebagai inhibisi sintesis kolesterol dan sebagai antikanker. Salah satu cara senyawa terpen menghambat proliferasi tumor atau kanker adalah dengan memblokir aktivitas protein *Caspase-3*, yang pada gilirannya menghambat jalur transduksi sinyal yang berjalan dari membran ke inti sel. Karena peningkatan aktivitas reseptor tirosin kinase berkontribusi terhadap perkembangan sel kanker yang ganas, terpen menghambat aktivitas enzim ini. Pengurangan resistensi tumor terhadap agen kemoterapi adalah efek lain dari metabolit sekunder golongan terpen.

Penelitian dalam rangka pencarian agen-agen antikanker terus dilakukan. Salah satu penelitian yang dilakukan adalah dengan memanfaatkan metode penambatan molekuler (*molecular docking*). Penambatan molekuler yang memprediksi konformasi suatu protein serta senyawa kecil (ligan) yang dimasukkan ke dalam struktur protein dengan bantuan komputer telah banyak digunakan dalam usaha menemukan obat-obat baru. Metode ini mampu mengidentifikasi kedudukan ligan dengan ukuran yang beragam, mampu menghitung nilai afinitas ikatan, serta memprediksi geometri dan sifat elektronik molekul (Krovat et al., 2005).

Evaluasi sifat kemiripan obat secara umum dilakukan berdasarkan aturan Lipinski (rule of five) sedangkan prediksi ADMET dapat memberikan informasi mengenai bioavailabilitas oral, permease sel, metabolisme, eliminasi, dan toksisitas yang menjadi karakteristik farmakokinetik dan farmakodinamik dari sebuah molekul obat (Kalita et al., 2019).

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian berupa perangkat keras dan perangkat lunak. Perangkat keras yang digunakan adalah laptop Hp Pavilion yang didukung oleh Intel® Core™ i3-1215U. Sistem operasi Windows 11 Home Single Language, Prosesor 12th Gen Intel(R) Core (TM) i3-1215U 1.20 GHz, serta RAM 8 GB. Perangkat Lunak yang digunakan adalah PyRx-0.8-Setup, AutoDock Vina Versi 1.1.2, BIOVIA Discovery Studio 2024 Client dan Pubchem NCBI.

Bahan yang digunakan, 3 senyawa metabolit dari *Streptomyces carpaticus* yang dianalisis berdasarkan gen biosintesis pada program antiSMASH version 7.1.0. dan telah terdaftar pada situs <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Struktur reseptor atau protein target pada sel kanker leukemia yang digunakan yaitu *Caspase-3* dengan ID PDB: 1NMS, diperoleh

dari Protein Data Bank (PDB) dalam situs web <https://www.rcsb.org/>. swissADME, SCFBio (<http://www.scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp>) dan ProTox 3.0.

Prosedur Penelitian

Analisis Sifat Kemiripan Obat dan Prediksi ADME Berdasarkan Aturan Lipinski

Analisis sifat kemiripan obat dilakukan menggunakan program swissADME, sedangkan prediksi ADME (absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi) menggunakan SCFBio. Analisis sifat kemiripan obat dan prediksi ADME dari senyawa *pristinol*, *raimonol* dan *cyslabdan* dari *Streptomyces carpaticus* dilakukan dengan memasukkan canonical SMILES atau *the Simplified Molecular Input Line Entry Specification* pada program swissADME. Hasil analisis menghasilkan skor sifat senyawa berdasarkan aturan Lipinski, meliputi berat molekul senyawa, nilai koefisien partisi $\log P$, jumlah donor ikatan hidrogen, jumlah akseptor ikatan hidrogen dan molar refractivity.

Analisis Toxicity (Mutagenicity dan Cytotoxicity)

Analisis toxicity senyawa Pristinol, Raimonol dan Cyslabdan menggunakan program *ProTox-3.0-Prediction of TOXicity of chemicals*. Analisis dilakukan dengan memasukkan Canonical SMILES kedalam sistem program Tox Prediction. Dilakukan pemilihan toxicity end points, meliputi mutagenicity dan cytotoxicity selanjutnya dilakukan start *Tox-Prediction*. Hasil *Tox-prediction* menghasilkan analisis berupa LD₅₀, kelas toksisitas dan kategori serta nilai *probability* sesuai model *toxicity* yang dianalisis.

Studi Molekuler Docking

a. Preparasi dan Optimasi Struktur Protein

Struktur makromolekul protein *Caspase-3* yang di unduh dari web Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) dipreparasi terlebih dahulu menggunakan program *BIOVIA Discovery Studio 2021 Client*. Struktur makromolekul yang diunduh dalam bentuk file PDB dibuka pada software Discovery Studio Visualizer dengan menggunakan menu File - Open. Setelah itu, menghilangkan molekul air pada makromolekul pada menu Script - Selection - Select Water Molecules - Delete. Setelah keduanya terpisah, file disimpan dalam format .pdb. Preparasi makromolekul protein dengan cara menambahkan atom hidrogen dan muatan parsial pada masing-masing residu menggunakan program AutoDock Tools versi 1.5.6 dan disimpan dalam format .pdbqt. kemudian file dianalisis lebih lanjut.

b. Preparasi dan Optimasi Struktur Ligan Alami

Struktur molekul senyawa uji yang diperoleh dari *Streptomyces carpaticus* diunduh pada situs pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dalam bentuk tiga dimensi dan disimpan dalam format file .sdf. Dilakukan optimasi geometri struktur senyawa menggunakan Chem 3D Profesional. Hasil Konformasi disimpan dalam format .sdf. Makromolekul *Caspase-3* yang diunduh sudah tersedia ligan alaminya dan tinggal pemisahan ligan dengan makromolekul dengan dengan kerja pada preparasi struktur protein. Struktur ligan alami dipreparasi dengan penambahan atom hidrogen dan dilanjutkan dengan perhitungan muatan parsial Gasteiger (Forli et al., 2016). Tahapan berikutnya adalah menentukan jumlah rotasi atau perputaran torsi ligan menggunakan program AutoDock Tools versi 1.5.6. Outputnya disimpan dalam format file .pdbqt.

c. Molecular Docking

Penentuan Grid Box

Makromolekul yang sudah ditambahkan atom hidrogen pada ujung residu dan muatan parsial, dilakukan penentuan Grid Box pada native ligand yang sebelumnya terikat pada makromolekul. Dengan cara, membuka dan memilih ligan yang telah dipisahkan dari makromolekul (ligan alami) dan ligan uji (metabolit sekunder dari *Streptomyces carpaticus*) software PyRex, dengan melakukan load molekul protein *Caspase-3* pada bagian molecules dan ligan pada bagian open babel dan Vina Wizard lalu dilakukan docking dan dilakukan

maximize hingga dihasilkan nilai satuan Angstrom berupa center x,y dan z (Ishmatullah et al., 2021).

Validasi Metode Docking

Validasi metode docking menggunakan aplikasi AutoDockTools (Autodock4 dan Autogrid4) dengan melakukan docking kembali (redocking) *native ligand* protein target *Caspase-3* yang sudah dihilangkan *native ligand*nya. Parameter validasi metode yaitu RMSD dengan nilai yang diharapkan 0.000. Bila hasil penambatan ligan standar memiliki nilai RMSD <2Å, maka protokol penambatan dapat diterima atau dinyatakan valid (Zubair et al., 2020).

Docking Ligan Uji pada Makromolekul

Proses penambatan ligan uji menggunakan program AutoDock Vina Versi 1.5.6 yang terintegrasi pada program PyRx. Nilai koordinat atau posisi grid box yang digunakan akan muncul pada kolom *controls* setelah dilakukan start docking pada bagian Vina Wizard. Program ini akan menghitung dan melakukan kalkulasi nilai scoring yang di docking pada makromolekul.

Analisis dan Visualisasi Hasil Docking

Hasil molecular docking merupakan energi ikatan serta ikatan hidrogen yang terbentuk. Energi ikatan digunakan untuk menunjukkan kekuatan ikatan antara senyawa dengan protein. Semakin rendah nilai energi ikatan, maka ikatan yang terbentuk semakin kuat dan stabil. Jenis ikatan hidrogen yang terbentuk digunakan untuk menganalisis mekanisme interaksi yang terbentuk. Interaksi molekuler yang terbentuk kemudian diamati dan dieksplorasi dengan memakai software *BIOVIA Discovery Studio 2024*, residu asam amino mempunyai peran penting dalam bagian sisi aktif makromolekul protein target (*Caspase-3*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Sifat Kemiripan Obat dan Prediksi ADME

Berdasarkan Aturan Lipinski, Potensi kandidat obat, berdasarkan analisis sifat kimia fisika yang harus memenuhi aturan Lipinski, dapat dilakukan pada laman <http://scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp> dan menggunakan program swissADME. Aturan Lipinski diantaranya berat molekul ≤ 500 Dalton (Da), donor ikatan hidrogen ≤ 5 , akseptor ikatan hidrogen ≤ 10 , logP -0,4 sampai 5, dan refraktivitas molar berkisar antara 40 sampai 130. Hasil analisis menunjukkan ligan alami, ligan pembanding, dan ligan uji memenuhi semua syarat aturan Lipinski (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil analisis Sifat Kemiripan Obat dan ADME berdasarkan aturan Lipinski

Sumber metabolit	Metabolit	MM ≤ 500 g/mol	HBA ≤ 10	HBD ≤ 5	Lipophilicity (log P ≤ 5)	Molar Refractivity
<i>S. carpaticus</i>	Pristinol	220.39	0	0	5.90	71.38
	Raimonol	288.47	1	1	4.65	91.05
	Cyslabdan	467.66	5	4	2.56	129.42

Keterangan: MM (Massa Molekul), HBA (*Hydrogen Bound Acceptor*), HBD (*Hydrogen Bound Donor*)

Aturan Lipinski lain, seperti bioavailabilitas ligan perlu dilakukan karena bertujuan untuk memperkirakan kelarutan dan permeabilitas suatu senyawa serta memprediksi kualifikasinya sebagai kandidat obat, aktif secara oral atau tidak. Nilai bioavailabilitas masing-masing metabolit sekunder yaitu *pristinol* adalah 0.55, *raimonol* 0.55 dan *cyslabdan* 0.56 yang diperoleh melalui analisis menggunakan canonical SMILES (Tabel 2).

Tabel 2. Karakteristik senyawa metabolit sekunder

Metabolit	CID	Canonical SMILES
Pristinol	CID_139591490	<chem>CC1CCC2=C(CC(CC(CC12)(C)C)C)C</chem>
Raimonol	CID_102297697	<chem>CC(=CCC1C(=C)C(CC2C1(CCCC2(C)C)C)O)C=C</chem>
Cyslabdan	CID_24778014	<chem>CC(=CCC1C2(CCCC(C2CC(C1(CSCC(C(=O)O)NC(=O)C)O)O)(C)C)C)C=C</chem>

Sumber: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Canonical SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry System*) adalah representasi teks dari struktur kimia yang memastikan bahwa setiap molekul diberikan satu representasi unik. Ini sangat berguna dalam analisis kemiripan obat dan prediksi ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion). Canonical SMILES memungkinkan penggunaan algoritma seperti fingerprinting, Tanimoto coefficient, dan metode statistik lainnya untuk mengukur kemiripan molekuler. Hal ini penting dalam menemukan analog obat yang memiliki sifat serupa dan potensi terapeutik atau terapi kanker yang sama (Weininger, 1988).

Analisis kemiripan obat menunjukkan bahwa berat molekul suatu senyawa tidak boleh melebihi 500 Da (g/mol), alasannya, indikasi bahwa senyawa yang lebih besar mungkin memiliki masalah dalam penetrasi membran seluler (Lipinski, 2004). Partisi kekentalan atau *Log P* disyaratkan oleh kandidat obat kurang dari 5, ukuran kecenderungan suatu senyawa untuk larut dalam fase nonpolar (seperti lipid) dibandingkan dengan fase polar (seperti air). *Log P* yang tinggi dapat menunjukkan kemampuan senyawa untuk larut dalam lemak, yang penting untuk distribusi dalam tubuh. Hidrogen Donor (H-Donor) kurang dari 5, jumlah atom hidrogen dalam molekul yang dapat berperan sebagai donor dalam ikatan hidrogen. Jumlah donor hidrogen yang terlalu tinggi dapat mempengaruhi absorpsi oral. Hidrogen Penerima (H-Acceptor) kurang dari 10, jumlah atom oksigen dan nitrogen dalam molekul yang dapat berperan sebagai penerima dalam ikatan hidrogen. Jumlah penerima hidrogen yang terlalu tinggi dapat mempengaruhi absorpsi oral. refraktivitas molar, yang harus berada dalam kisaran 40 sampai 130 memiliki penyerapan dan *transport* yang baik dalam tubuh (Ivanović et al., 2020). Menurut (O'donnell et al., 2016), ligan yang memenuhi 3 sampai 5 aturan Lipinski dapat dijadikan sebagai target pengembangan obat, hasil identifikasi menunjukkan bahwa semua ligan memenuhi syarat aturan Lipinski sehingga metabolit *pristinol*, *raimonol* dan *cyslabdan* memiliki sifat kemiripan dengan obat (Tabel 1).

Hasil Toxicity Analysis of Compounds

Analisis *Toxicity* menunjukkan bahwa ketiga senyawa menunjukkan kelas toksisitas 5, baik *toxicity mutagenicity* maupun *cytotoxicity*. Sementara itu (Tabel 3) menunjukkan, semua senyawa menunjukkan probabilitas inactive (tidak aktif), di bawah ambang batas untuk titik akhir toksisitasnya (Silvia et al., 2024).

Tabel 3. Hasil *Toxicity Analysis of Compounds*

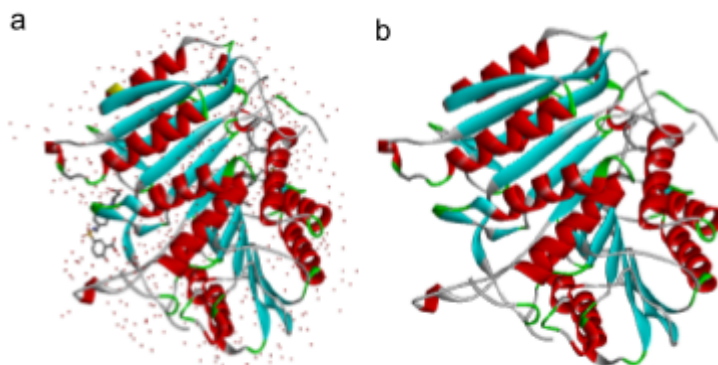
Sumber metabolit	Metabolit	LD ₅₀ (mg/Kg)	Toxicity Class	Mutagenicity		Cytotoxicity	
				Kategori	Probability	Kategori	Probability
<i>S. carpaticus</i>	Pristinol	5000	5	Inactive	0.93	Inactive	0.75
	Raimonol	3200	5	Inactive	0.91	Inactive	0.94
	Cyslabdan	5000	5	Inactive	0.80	Inactive	0.76

Kelas toksisitas *pristinol*, *raimonol* dan *cyslabdan* dianalisis menggunakan server web ProTox. Tujuan analisis ini adalah untuk memeriksa mutagenicity dan cytotoxicity suatu senyawa. Hal ini penting karena obat yang diserap akan dimetabolisme di dalam tubuh (Giménez et al., 2010). Probabilitas estimasi keyakinan digunakan untuk menilai toksisitas dan titik akhir toksisitas yang diperoleh (Banerjee et al., 2018). Dari hasil analisis, semua senyawa memiliki kelas toksisitas 5 dan dianggap aman dalam analisis toksisitas.

Analisis Molecular Docking

Preparasi dan Optimasi Struktur Protein dan Ligan

Preparasi dan optimasi dilakukan untuk memperoleh struktur protein dan ligan dalam keadaan optimum, stabil dan sesuai dengan keadaannya. Protein *Caspase-3* merupakan protein sel kanker leukemia yang diperoleh dari data bank protein dengan kode 1NMS. Protein *Caspase-3* dipreparasi digunakan *BIOVIA Discovery Studio 2021 Client* dengan memisahkan protein dan *native ligand*, sehingga diperoleh struktur protein tanpa *native ligand*. Pemisahan ini bertujuan untuk menyediakan ruang sebagai tempat senyawa metabolit uji agar berikatan dengan protein *Caspase-3*. Rantai protein yang dipilih dalam pengujian ini adalah Rantai A yang berikatan dengan *native ligand* 5-[4-(1-carboxymethyl-2-OXO-propylcarbonyl)-benzylsulfamoyl]-2-Hydroxy-Benzoic Acid yang berfungsi sebagai inhibitor *Caspase-3*. Struktur protein *Caspase-3* dapat dilihat pada (Gambar 1).



Gambar 1. Protein *Caspase-3*, a. sebelum optimasi, b. setelah optimasi

Sebelum menambatkan ligan uji pada protein *Caspase-3*, dilakukan penentuan ukuran *Grid Box*, namun pengaturan *Grid Box* dilakukan terhadap semua ligan baik ligan alami, ligan pembanding dan ligan uji. Hasil ukuran *Grid Box* yang digunakan berturut-turut yaitu center x 11.88, center y 0.02 dan center z 14.80 dengan size x 68.63, y 64.97 dan z 64.86. Dinamika molekuler dan penambatan protein-ligan dalam penambatan molekuler umumnya dievaluasi berdasarkan nilai root mean squared deviation (RMSD) (Tabel 4), yang membandingkan posisi ligan hasil penambatan dengan ligan alami dalam protein *Caspase-3* (Sargsyan et al., 2017). Berbagai perangkat lunak telah dikembangkan untuk penggambaran struktur baik secara 3D (Gambar 2) maupun 2D (Gambar 3) Penambatan molekuler, dan visualisasi hasil penambatan.

Tabel 4. Hasil Docking Ligan Alami, Ligan Pembanding dan Ligan Uji

Ligan	ID	Mode	Binding Affinity (kcal/mol)	RMSD
LA	PDB: 1NMS	1	-8.9	0.000
LP	CID_31703	1	-9.2	0.000
Ligan Uji 1	CID_139591490	1	-7.0	0.000
Ligan Uji 2	CID_102297697	1	-7.1	0.000
Ligan Uji 3	CID_24778014	1	-7.4	0.000

Sumber: program PyRx.Ink terintegrasi BIOVINA Discovery Studio

Keterangan: LA: Ligan Alami *Caspase-3*, LP: Ligan Pembanding (*Doxorubicin*), Ligan Uji 1: *Pristinol*, Ligan Uji 2: *Raimonol*, Ligan Uji 3: *Cyslabdan*

Di antara 3 senyawa metabolit, semuanya menunjukkan potensi pengikatan yang baik dengan protein target (*Caspase-3*), ditunjukkan berdasarkan skor negatifnya setelah analisis pada program PyRx, ketiga metabolit menunjukkan afinitas pengikatan yang lebih rendah daripada ligan asli dan ligan pembanding. Hasil dari docking molekuler dengan protein *Caspase-3* menunjukkan bahwa ketiga senyawa keseluruhan memiliki afinitas pengikatan yang lebih rendah (Tabel 4) dan bentuk interaksi, jarak dan tipe ikatan yang bervariasi (Tabel 5).

Penambatan molekuler secara flexible, ligand docking menunjukkan senyawa bersifat fleksibel sedangkan protein bersifat rigid yang selanjutnya dilakukan terhadap metabolit uji terhadap protein *Caspase-3* hasil preparasi. Tabel 5 mentabulasi hasil penambatan silang senyawa metabolit tersebut dengan protein *Caspase-3*, di mana afinitas ikatan (binding affinity) pose terbaik dari hasil penambatan pada *Caspase-3* lebih baik dibandingkan dengan ligan alami dan ligan pembanding. Afinitas ikatan yang menentukan kuat interaksi antara senyawa dengan protein mengindikasikan kekuatan ikatan yang lebih baik apabila bernilai lebih negatif dan menyatakan semakin baik prediksi penambatan molekuler (Dallakyan & Olson, 2015). Hasil penambatan molekuler selanjutnya divisualisasi untuk mengetahui interaksi dan mode ikatan yang terjadi pada setiap pose terbaik metabolit sekunder dengan protein *Caspase-3* (Gambar 3).

Tabel 5. Hasil *Docking* Interaksi Ligan Alami pada *Caspase-3*

Interaksi	Jarak	Kategori	Tipe Ikatan
Ligan Alami			
ARG164	3,86	Electrostatic	Pi-Cation
ARG164	4,26	Electrostatic	Pi-Cation
LYS137	1,74	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
TYR197	2,47	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
ARG164	2,59	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
LYS137	1,86	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
TYR197	2,05	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
PRO201	2,80	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond
LYS137	2,76	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond
PRO201	2,75	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond
VAL266	4,99	Hydrophobic	Pi-Alkyl
PRO201	4,92	Hydrophobic	Pi-Alkyl
Ligan Pembanding (<i>Doxorubicin</i>)			
UNK1 - GLU124	2,10	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
UNK1 - UNK1	2,47	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
UNK1 - TYR195	2,75	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
ARG164 - UNK1	4,40	Electrostatic	Pi-Cation
ARG164 - UNK1	4,27	Electrostatic	Pi-Cation
ARG164 - UNK1	4,28	Electrostatic	Pi-Cation
ARG164 - UNK1	3,81	Electrostatic	Pi-Cation
GLU124 - UNK1	4,76	Electrostatic	Pi-Anion
UNK1 - TYR195	5,60	Hydrophobic	Pi-Pi T-shaped
UNK1 - TYR197	5,52	Hydrophobic	Pi-Pi T-shaped
UNK1 - LYS137	4,83	Hydrophobic	Alkyl
UNK1 - LEU136	5,13	Hydrophobic	Alkyl
UNK1 - PRO201	4,41	Hydrophobic	Pi-Alkyl
UNK1 - PRO201	5,00	Hydrophobic	Pi-Alkyl
UNK1 - PRO201	4,10	Hydrophobic	Pi-Alkyl
UNK1 - VAL266	5,04	Hydrophobic	Pi-Alkyl
Ligan Uji I (<i>Pristinol</i>)			
UNK1 - TYR195	3,80	Hydrophobic	Pi-Sigma
UNK1 - PRO201	4,76	Hydrophobic	Alkyl
UNK1 - VAL266	3,93	Hydrophobic	Alkyl
UNK1 - PRO201	4,22	Hydrophobic	Alkyl
UNK1 - CYS264	4,66	Hydrophobic	Alkyl
UNK1 - VAL266	4,54	Hydrophobic	Alkyl

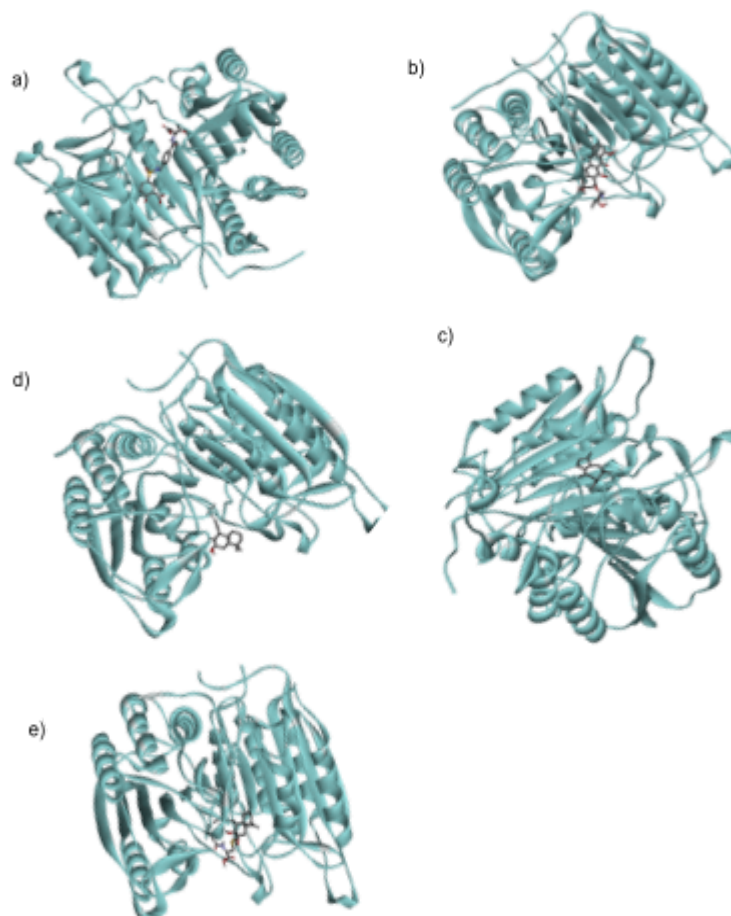
UNK1 - VAL266	3,66	Hydrophobic	Alkyl
UNK1 - PRO201	4,75	Hydrophobic	Alkyl
VAL266 - UNK1	5,47	Hydrophobic	Alkyl
PRO201 - UNK1	4,36	Hydrophobic	Alkyl
PRO201 - UNK1	4,59	Hydrophobic	Alkyl
TYR197 - UNK1	5,05	Hydrophobic	Pi-Alkyl
Ligan Uji II (<i>Raimonol</i>)			
LEU136 - UNK1	2,69	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
UNK1 - TYR195	3,95	Hydrophobic	Pi-Sigma
UNK1 - LEU136	4,52	Hydrophobic	Alkyl
UNK1 - LYS137	3,79	Hydrophobic	Alkyl
UNK1 - PRO201	4,25	Hydrophobic	Alkyl
UNK1 - VAL266	4,24	Hydrophobic	Alkyl
UNK1 - PRO201	4,87	Hydrophobic	Alkyl
UNK1 - VAL266	5,04	Hydrophobic	Alkyl
UNK1 - VAL266	3,81	Hydrophobic	Alkyl
PRO201 - UNK1	4,23	Hydrophobic	Alkyl
Ligan Uji III (<i>Cyslabdan</i>)			
UNK1 - UNK1	2,10	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
UNK1 - GLU124	2,43	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
UNK1 - UNK1	2,45	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
GLY125 - UNK1	2,58	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond
UNK1 - LYS137	4,57	Hydrophobic	Alkyl
UNK1 - PRO201	5,06	Hydrophobic	Alkyl
UNK1 - LYS137	3,90	Hydrophobic	Alkyl
UNK1 - VAL266	4,00	Hydrophobic	Alkyl
UNK1 - PRO201	4,16	Hydrophobic	Alkyl
UNK1 - CYS264	4,53	Hydrophobic	Alkyl
UNK1 - VAL266	4,51	Hydrophobic	Alkyl
UNK1 - VAL266	3,87	Hydrophobic	Alkyl
UNK1 - PRO201	4,41	Hydrophobic	Alkyl
PRO201 - UNK1	4,17	Hydrophobic	Alkyl
PRO201 - UNK1	5,04	Hydrophobic	Alkyl
TYR197 - UNK1	5,11	Hydrophobic	Pi-Alkyl

Sumber: program PyRx.Ink terintegrasi BIOVINA Discovery Studio

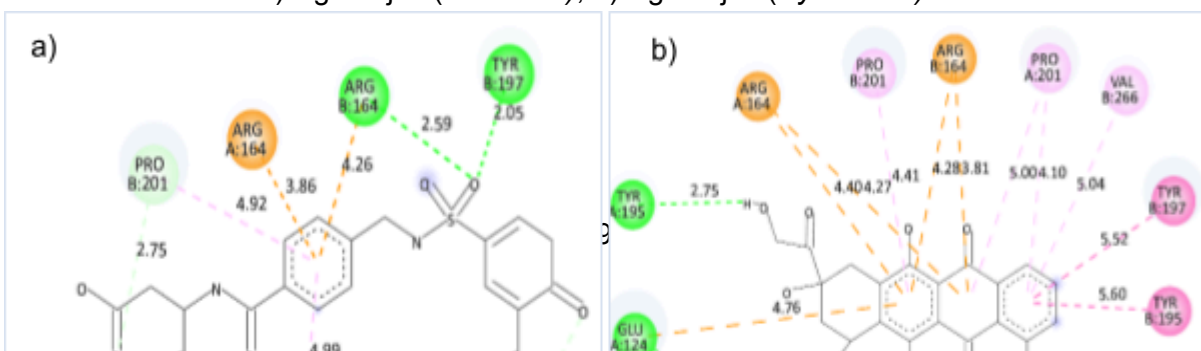
Dalam protein seperti *Caspase-3*, interaksi antar-residu asam amino dapat melibatkan berbagai jenis ikatan dan interaksi yang mempengaruhi struktur dan fungsi protein. *Caspase-3* secara selektif dapat mengenali substratnya melalui rantai peptida yang spesifik berupa residu asam amino aspartat (Asp). Selain itu, inhibitor selektif *Caspase-3* dilaporkan mampu menghidrolisis substrat *Caspase-3* dengan berikatan pada kantung aktifnya, artinya inhibitor tersebut bersifat kompetitif terhadap substrat. Penelitian mengenai substrat dan inhibitor caspase memiliki peranan penting dalam pengembangan caspase sebagai target terapeutik dan terapi kanker. Kantung katalitik *Caspase-3* (PDB ID: 1NMS) melibatkan gugus sulfhidril Cys285 (rantai A) dan cincin imidazol His237 (rantai A). His-237 menstabilkan gugus karbonil dari residu aspartat, sementara Cys285 menyerang dan akhirnya memutuskan ikatan peptida. Cys285 (rantai B), sedangkan Gly238 (rantai B) bertindak untuk menstabilkan keadaan transisi tetrahedral dari kompleks substrat-enzim melalui ikatan hidrogen (Ali et al., 2014). Penelitian lain mencoba mengeksplorasi residu asam amino kedua terbanyak yang menjadi situs pemotongan *Caspase-3* selain aspartat (Thornberry & Lazebnik, 1998).

Hasil penelitian menunjukkan kekuatan ikatan untuk situs pemotongan aspartat sebenarnya lebih lemah, tetapi proses katalitiknya lebih cepat dibandingkan glutamat. *Caspase-3* juga mampu memotong residu asam amino terfosforilasi yaitu fosfoserin. Artinya terdapat probabilitas terhadap spesifitas yang lebih luas dari *Caspase-3*. *Caspase-3* secara selektif mengenali dan memotong substratnya pada urutan peptida spesifik yang biasanya mengandung residu asam amino aspartat (D) pada posisi P1. Urutan yang dikenali oleh *Caspase-3* biasanya adalah motif tetrapeptida dengan urutan umum DXXD, di mana "D" adalah aspartat dan "X" bisa berupa berbagai residu asam amino lainnya. Beberapa contoh motif yang dikenali oleh *Caspase-3* adalah DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) (Thornberry & Lazebnik, 1998)

Hasil molecular docking menunjukkan bahwa metabolit sekunder dengan interaksi ligan dan protein paling banyak adalah metabolit *cyslabdan*, kemudian metabolit raimonol dan terakhir pristinol. Jumlah interaksi *cyslabdan* memiliki kesamaan dengan ligan pembanding, doxorubicin yaitu 16 jenis interaksi, dan pristinol memiliki kesamaan jumlah interaksi dengan ligan alami yaitu 12 pada *Caspase-3* (Tabel 5).



Gambar 2. Visual interaksi ligan dan protein *Caspase-3* dalam bentuk 3D, a). ligan alami, b). ligan pembanding (*Doxorubicin*), c). ligan uji 1 (*Pristinol*), d). ligan uji 2 (*Raimonol*), e). ligan uji 3 (*Cyslabdan*).



Gambar 3. Visual interaksi ligan dan protein *Caspase-3* dalam bentuk 2D, a). ligan alami, b). ligan pembanding (*Doxorubicin*), c). ligan uji 1 (*Pristinol*), d). ligan uji 2 (*Raimonol*), e). ligan uji 3 (*Cyslabdan*).

Ikatan *conventional hydrogen bond* pada masing-masing ligan uji, pada prinsipnya sangat penting untuk stabilisasi struktur sekunder (heliks alfa dan lembaran beta) dan pengenalan substrat saat berinteraksi. Berbeda dengan ikatan *carbon hydrogen bond*, meskipun lebih lemah, ikatan ini dapat berkontribusi pada interaksi hidrofobik dan pengenalan substrat.

SIMPULAN

Ketiga metabolit sekunder hasil produksi *Streptomyces carpaticus* berpotensi sebagai kandidat obat, berdasarkan aturan Lipinski, dan memiliki sifat toxicity *inactive* baik *mutagenicity* maupun *cytotoxicity*. Hasil *molecular docking* menunjukkan bahwa energi ikatan hasil penambatan metabolit sekunder dengan protein *Caspase-3* yang paling baik adalah metabolit *cyslabdan* (-7.4 kkal/mol), di mana energi ikatan ini lebih rendah dari kedua metabolit uji lain dan mendekati dengan nilai energi ikatan pada ligan alami dan ligan pembanding (*doxorubicin*). Jumlah interaksi *cyslabdan* memiliki kesamaan dengan ligan pembanding doxorubicin yaitu 16 interaksi, dan pristinol memiliki kesamaan jumlah interaksi dengan ligan alami yaitu 12.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami ucapkan terima kasih kepada bapak Huda Shalahudin Darusman dan Ibu Silmi Mariya selaku pembimbing yang telah mengarahkan dan membimbing proses penyusunan artikel, serta saudara Farizal yang telah membantu proses analisis data melalui sharing informasi.

DAFTAR RUJUKAN

- Akhmadi, C., & Utami, W. (2022). Senyawa Fitokimia dan Aktivitas Farmakologi Family Basellaceae sebagai Obat Luka: A Narrative Review. *Generics: Journal of Research in Pharmacy*, 2(2), 77–85.
- Ali, A. Q., Teoh, S. G., Eltayeb, N. E., Ahamed, M. B. K., & Majid, A. M. S. A. (2014). Synthesis of copper (II) complexes of isatin thiosemicarbazone derivatives: In vitro anti-cancer, DNA binding, and cleavage activities. *Polyhedron*, 74, 6–15.
- Banerjee, P., Eckert, A. O., Schrey, A. K., & Preissner, R. (2018). ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W257–W263.
- Dallakyan, S., & Olson, A. J. (2015). Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Chemical Biology: Methods and Protocols*, 243–250.
- Giménez, B. G., Santos, M. S., Ferrarini, M., & Fernandes, J. P. S. (2010). Evaluation of blockbuster drugs under the rule-of-five. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65(2), 148–152.
- Ishmatullah, M. H., Megantara, S., & Levita, J. (2021). CASPASE: REVIEW OF THE OTHER ROLES IN APOPTOSIS, THE CHARACTER OF THE CATALYTIC SITE, AND THE INTERACTIONS WITH SUBSTRATES AND THEIR INHIBITORS. *Jurnal Ilmiah Farmako Bahari*, 12(2).
- Ivanović, V., Rančić, M., Arsić, B., & Pavlović, A. (2020). Lipinski's rule of five, famous extensions and famous exceptions. *Popular Scientific Article*, 3(1), 171–177.
- Kalita, J., Chetia, D., & Rudrapal, M. (2019). Molecular docking, drug-likeness studies and ADMET prediction of quinoline imines for antimalarial activity. *J. Med. Chem. Drug Des*, 2(1), 1–7.
- Krovat, E. M., Steindl, T., & Langer, T. (2005). Recent advances in docking and scoring. *Current Computer-Aided Drug Design*, 1(1), 93–102.
- Lipinski, C. A. (2004). Lead-and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, 1(4), 337–341.
- Logue, S. E., & Martin, S. J. (2009). Mamalian caspase activation pathways in apoptosis and inflammation. *Design of Caspase Inhibitors as Potential Clinical Agents*, 1.
- O'donnell, C., Mahmoud, A., Keane, J., Murphy, C., White, D., Carey, S., O'riordain, M., Bennett, M. W., Brint, E., & Houston, A. (2016). An antitumorigenic role for the IL-33 receptor, ST2L, in colon cancer. *British Journal of Cancer*, 114(1), 37–43.
- Sargsyan, K., Grauffel, C., & Lim, C. (2017). How molecular size impacts RMSD applications in molecular dynamics simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 13(4), 1518–1524.
- Sastrowardoyo, W., Zakaria, S., & Meles, D. K. (2008). *Peranan Caspase 3 (Caspase Executor) Penyebab Apoptosis Sel Kanker Uterus Yang Terinduksi Alkaloid Achyranthes Aspera Linn Secara Invitro*.
- Silvia, P., Ongko, J., & Antonius, Y. (2024). Epidermal growth factor receptor mutant T790M-L858R-V948R inhibitor from *Calophyllum inophyllum* L. leaf as potential non-small

- cell lung cancer drugs. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 12(5), 881–891.
- Thornberry, N. A., & Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science*, 281(5381), 1312–1316.
- Tulha, J., Faria-Oliveira, F., Lucas, C., & Ferreira, C. (2012). Programmed cell death in *Saccharomyces cerevisiae* is hampered by the deletion of GUP1 gene. *BMC Microbiology*, 12, 1–10.
- Weininger, D. (1988). SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 28(1), 31–36.
- Zubair, M. S., Maulana, S., & Mukaddas, A. (2020). Penambatan molekuler dan simulasi dinamika molekuler senyawa dari genus *nigella* terhadap penghambatan aktivitas enzim protease HIV-1. *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy)(E-Journal)*, 6(1), 132–140.