



Molecular Docking Study of Anthocyanidin Compounds Against Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) as Anti-Lung Cancer

Riska Prasetiawati^{1,2}, Meilia Suherman^{1*}, Benny Permana³, Rahmawati¹

¹Departemen Kimia Farmasi Analisis, Jurusan Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Garut, Garut - Indonesia.

²Departemen Analisis Farmasi dan Kimia Medisinal, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Sumedang - Indonesia

³Departemen Fisikokimia, Fakultas Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Bandung - Indonesia

Submitted 17 July 2020; Revised 23 August 2020; Accepted 20 October 2020; Published 05 February 2021

*Corresponding author: meilia.suherman@uniga.ac.id

Abstract

It is presumed that antiproliferative activity of anthocyanidin has interaction with Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) which has effect on lung cancer cell growth. This study aimed to observe the interaction between anthocyanidin and EGFR and to find out prediction, absorption, distribution activities as well as anthocyanidin toxicity compared to Gefitinib, an EGFR inhibitor. All test compounds were optimized with Autodock Tools®, then molecular docking simulations and predictions of absorption, distribution and toxicity were carried out. Malvidin was stated to meet the Lipinski's Rule of Five, indicating good bioavailability. Result of molecular docking simulation showed that malvidin had better affinity against EGFR than Gefitinib. Molecular docking visualization result showed that malvidin had interaction with amino acid residue such as Met793, Gln791, Leu718, Thr854, Asp855 and Lys745. Absorption and distribution predictions included percentage scores of Human Intestinal Absorption (HIA), human colon adenocarcinoma (Caco-2), and Plasma Protein Binding. Toxicity test revealed that malvidin was mutagenic compound but not carcinogenic one. The findings indicated that malvidin was potential to be an anti lung cancer candidate through EGFR inhibition.

Keywords: Antiproliferative, Anthocyanidin, Epidermal Growth Factor Receptor, Molecular Docking

Studi Molecular Docking Senyawa Antosianidin Terhadap Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Sebagai Anti Kanker Paru

Abstrak

Aktivitas antiproliferatif antosianidin diduga memiliki interaksi dengan Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) yang berperaruh terhadap pertumbuhan sel kanker paru (1,2). Tujuan penelitian ini adalah untuk melihat interaksi antosianidin terhadap EGFR dan mendapatkan prediksi aktivitas, absorpsi, distribusi serta toksisitas senyawa antosianidin dibanding Gefitinib, suatu inhibitor EGFR. Semua senyawa uji dioptimasi dengan Autodock Tools® kemudian dilakukan simulasi molecular docking serta prediksi absorpsi, distribusi dan toksisitasnya. Dari 19 senyawa antosianidin yang di dockingkan, maldivin menunjukkan potensi sebagai senyawa pemandu untuk antikanker. Malvidin dinyatakan memenuhi aturan *Lipinski's Rule of Five* yang berarti memiliki bioavailabilitas yang baik. Hasil simulasi molecular docking menunjukkan bahwa senyawa malvidin memiliki afinitas yang lebih baik terhadap EGFR dibandingkan dengan senyawa Gefitinib. Hasil visualisasi menunjukkan bahwa senyawa malvidin memiliki interaksi dengan residu asam amino Met793, Gln791, Leu718, Thr854, Asp855 dan Lys745. Prediksi absorpsi dan distribusi meliputi nilai persentase Human Intestinal Absorption (HIA), human colon adenocarcinoma (Caco-2), dan Protein Plasma Binding. Pengujian toksisitas menunjukkan bahwa senyawa malvidin bersifat mutagenik namun tidak karsinogenik. Hasil yang didapat menunjukkan bahwa senyawa malvidin memiliki potensi untuk dijadikan kandidat anti kanker paru melalui inhibisi EGFR.

Kata Kunci: Antiproliperasi, Antosianidin, Epidermal Growth Factor Receptor, Penambatan Molekul

1. Pendahuluan

Kanker paru adalah penyebab utama kematian terkait kanker di AS dan di seluruh dunia, baik pada pria dan wanita, dengan perkiraan 1,3 juta total kematian setiap tahun.^{1,2} Secara nasional prevalensi penyakit kanker pada penduduk semua umur di Indonesia tahun 2013 sebesar 1,4% atau diperkirakan sekitar 347.792 orang. Data Pusat Kanker Nasional Dharmas di Indonesia juga menunjukkan bahwa kanker paru adalah salah satu dari tiga kanker teratas di tahun 2010-2013.³ Berbagai macam jenis terapi serta obat-obatan untuk penyakit kanker sudah banyak diaplikasikan untuk meningkatkan kualitas hidup pasien. Terapi penyakit kanker dapat berupa kemoterapi, radioterapi, terapi hormon, maupun terapi target. Pasien kanker wajib untuk secara rutin dan teratur mengkonsumsi obat-obatan yang telah diresepkan oleh dokter untuk tercapainya tujuan terapi kanker tersebut, namun obat-obatan dengan bahan kimia memiliki banyak efek samping yang merugikan. Saat ini penggunaan obat-obatan dari alam menjadi alternatif bahan pengobatan penyakit kanker untuk menekan efek samping yang timbul dari penggunaan obat-obatan berbahan dasar kimia yang sudah ada sebelumnya.⁴⁻⁶

Antosianin merupakan bagian metabolit sekunder yang tersebar luas di alam yang dikenal sebagai flavonoid. Antosianidin ialah aglikon antosianin yang terbentuk dari hidrolisis asam. Antosianin adalah golongan flavonoid yang larut dalam air dengan berbagai efek farmakologis, seperti pencegahan penyakit kardiovaskular, pengendalian obesitas dan aktivitas antitumor, antioksidan dan antiproliferatif.^{7,8} Antosianin adalah flavonoid yang paling teroksidasi dengan cincin C sepenuhnya tidak jenuh dan hidroksil pada posisi 3. Mereka juga dapat ditemukan sebagai bentuk turunan glikosilasi dari polihidroksi dan turunan polimetoksi dari 2-fenilbenzopirilium, diasilasi atau tidak dengan asam alifatik.⁹ Pengujian secara *in vitro*, menunjukkan bahwa senyawa antosianidin berpotensi sebagai antikanker. Adanya potensi antiproliferatif dari fraksi antosianin yang berasal dari ekstrak blueberry

dan blackcurrant ditemukan terkait dengan adanya potensi antioksidannya. Hal ini juga diperkuat dengan telah dianalisisnya aktivitas antiproliferatif yang signifikan oleh ekstrak *Syzygium cumini* dengan kandungan 5 diglukosida senyawa antosianidin terhadap sel kanker paru manusia A549.^{7,9}

EGFR adalah protein reseptor tirosin kinase reseptor transmembran yang terdapat pada epitel normal, mesenchymal, dan jaringan neurogenik. Ekspresi EGFR yang berlebihan telah dilaporkan dan terlibat dalam patogenesis kanker NSCLC (*Non Small Cell Lung Cancer*).^{1,10} Gefitinib adalah tyrosine kinase inhibitor dari EGFR. Gefitinib merupakan lini pertama untuk pasien dengan kanker paru non-sel kecil lanjut yang dipilih berdasarkan mutasi EGFR.¹¹ Keberhasilan pengobatan NSCLC bermutasi EGFR dengan erlotinib atau gefitinib diikuti dalam sebagian besar kasus dengan memperoleh resistensi terhadap masing-masing tyrosine kinase inhibitor (TKI), yang bahkan menyebabkan mutasi sekunder T790M.¹²⁻¹⁵

Studi penambatan molekul (*molecular docking*) adalah suatu proses komputasi mencari ligan yang cocok secara geometris dan energi ke situs pengikatan protein ini. Metode ini merupakan salah satu metode yang digunakan untuk meniru peristiwa interaksi suatu molekul ligan dengan protein yang menjadi targetnya pada uji *in vitro* melalui simulasi model menggunakan komputer. Penambatan molekul sering digunakan untuk memprediksi orientasi ikatan kandidat obat bermolekul kecil terhadap target proteinnnya untuk memprediksi afinitas dan aktivitas molekul kecil. Maka penambatan molekul memainkan peran penting dalam penemuan obat dan desain obat secara rasional. Tujuan utama dari simulasi penambatan molekul adalah untuk mengidentifikasi kandidat *lead compound*.¹⁶

Tujuan penelitian ini adalah untuk mencari kandidat obat kanker dari antosianidin yang memiliki aktivitas sebagai antikanker dengan berinteraksi dengan Reseptor *Epidermal Growth Factor* (EGFR). Pada penelitian ini dilakukan simulasi penambatan molekul senyawa antosianidin

terhadap EGFR, serta prediksi awal absorpsi, distribusi dan toksisitasnya, sebagai rangkaian pencarian kandidat obat anti kanker paru dengan obat golongan Gefitinib sebagai kontrol positif.

2. Metode

2.1. Alat

Perangkat Keras yang digunakan yaitu laptop HP dengan spesifikasi Processor Intel® Core i3™ 6006U @2.0GHz, RAM (Random Acces Memory) 4 gigabyte. Graphic Card Intel®, Sistem Operasi Microsoft® Windows 10® (Amerika).

Perangkat Lunak yang digunakan yaitu Sistem Operasi Windows® 10 64-bit, x64 based processor, dilengkapi dengan program MGL-Tools® terdiri dari aplikasi Autodock Tools® (The Scripps Research Institute, Amerika) dan Python Molecular Viewer® (PMV), Discovery Studio Visualizer®, Open Babel®, Marvin Sketch® (ChemAxon), Command Prompt, Notepad++® serta situs Protein Data Bank, PubChem dan Pre-ADMET.

2.2. Bahan

Struktur tiga dimensi protein yang dipilih adalah EGFR bermutasi (L858R, T790M, V948R) pada manusia yang didapat dari metode kristalografi X-ray dengan resolusi 1,46Å. Identitas makromolekul tersebut adalah 5UG8 berformat (.pdb).

Struktur tiga dimensi ligan yang digunakan adalah Gefitinib dan 19 senyawa antosianidin, baik yang diunduh pada situs PubChem dengan format (.sdf) dan dibuat pada program Marvin Sketch®.

2.3. Prosedur Rinci

2.3.1. Persiapan Reseptor

Kompleks protein 5UG8 dipisahkan antara makromolekul dan ligan Gefitinib dengan menggunakan program Discovery Studio Visualizer®, kemudian dilakukan optimasi dengan penambahan atom hidrogen dan minimisasi energi. Hasil pemisahan tersebut disimpan dalam format .pdb.

2.3.2. Penyiapan Senyawa Uji

Ligan atau Senyawa yang diuji dalam penelitian ini merupakan senyawa antosianidin. Ke 19 senyawa antosianidin merupakan senyawa turunan antosianin (Tabel 1). Ligan digambar ulang dengan menggunakan program ChemDraw® Ultra 12.0 dan diminimasi energi menggunakan program Chem3D® Pro 12.0 kemudian disimpan dengan format .pdb. Setelah dilakukan penyiapan, dilakukan penentuan sifat fisikokimia senyawa berdasarkan *Lipinski's Rule of Five*.

2.3.3. Validasi Metode

Validasi metode dilakukan untuk mengetahui apakah program yang digunakan untuk penambatan molekul sesuai persyaratan atau tidak aplikasi dapat digunakan. Validasi metode molecular docking dilakukan dengan cara redocking antara ligan bawaan yaitu N-[(3R,4R)-4-fluoro-1-{6-[(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)amino]-9-(propan-2-yl)-9H-purin-2-yl}pyrrolidin-3-yl]propanamide dari reseptor target yang diunduh (5UG8) dari situs bank data protein menggunakan perangkat lunak Autodock Tools® dengan makromolekul EGFR. Analisis yang digunakan untuk mengevaluasi hasil validasi yaitu nilai RMSD, situs pengikatan yang ditemukan dan parameter yang digunakan dianggap valid jika nilai $RMSD \leq 2\text{Å}$.

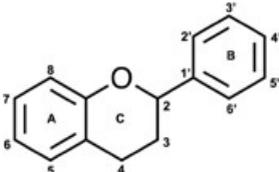
2.3.4. Mengatur Grid Box

Pengaturan Grid Box dilakukan dengan membuka menu Grid pada Autodock Tools®.

2.3.5. Running Docking

Setelah semua pengaturan docking selesai kemudian dilakukan running terhadap 19 senyawa antosianidin dengan menggunakan Autogrid4 dan Autodock4. Proses docking dilakukan dengan menggunakan pengaturan terhadap beberapa parameter seperti grid box ($x = 40$ $y = 40$ $z = 40$), Spacing (0,375 Å), grid box center ($x = -13,156$ $y = 15,093$ $z = -25,719$), number of runs (100), Number of Evals : Medium, dan Metode Algoritma : Lamarckian Genetic Algorithm yang dapat dilakukan secara langsung melalui program Autodock Tools®. Setelah running selesai

Tabel 1. Senyawa antosianidin²²

No	Antosianidin	Struktur Molekul	Pola Substituen					
			3	5	6	7	3'	5'
1	Pelargonidin		OH	OH	H	OH	H	H
2	Sianidin		OH	OH	H	OH	OH	H
3	Peonidin		OH	OH	H	OH	OMe	H
4	Delfinidin		OH	OH	H	OH	OH	OH
5	Petunidin		OH	OH	H	OH	OMe	OH
6	Malvidin		OH	OH	H	OH	OMe	OMe
7	Aurantininidin		OH	OH	OH	OH	H	H
8	6-Hidroksisianidin		OH	OH	OH	OH	OH	H
9	6-Hidroksidelfinidin		OH	OH	OH	OH	OH	OH
10	Apigenininidin		H	OH	H	OH	H	H
11	Luteolinidin		H	OH	H	OH	OH	H
12	Tricetinidin		H	OH	H	OH	OH	OH
13	5-Metilsianidin		OH	OMe	H	OH	OH	H
14	Rosininidin		OH	OH	H	OMe	OMe	H
15	Pulchellidin		OH	OMe	H	OH	OH	OH
16	Europininidin		OH	OMe	H	OH	OMe	OH
17	Capensininidin		OH	OMe	H	OH	OMe	OMe
18	Hirsutidin		OH	OH	H	OMe	OMe	OMe
19	Riccionidin A		OH	H	OH	OH	H	H

akan dihasilkan output dengan format .dlg yang dapat dibuka dengan bantuan program Notepad++®, kemudian dilihat parameter yang dihasilkan berupa (ΔG dan Cluster) dan membandingkan hasil yang didapat satu dengan yang lainnya.

2.3.6. Pengujian Pre-ADMET

Pengujian yang dilakukan bertujuan untuk menganalisa parameter awal farmakokinetika yang meliputi absorpsi dan distribusi serta uji toksisitas yang meliputi sifat mutagenik dan karsinogenik senyawa. Pengujian dilakukan dengan menggunakan program khusus yang dilakukan dengan menggunakan program khusus yang dilakukan secara online pada situs <http://preadme.bmdrc.kr/>. Struktur senyawa uji digambar dan kemudian diklik submit untuk dianalisa. Hasil yang didapat berupa data disimpan dalam format .pdb.

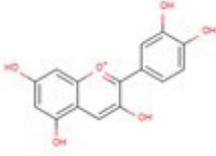
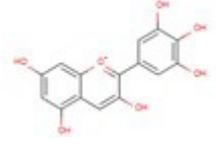
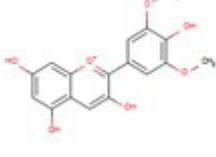
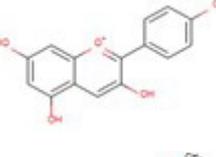
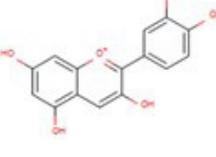
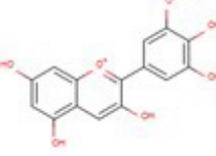
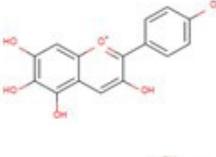
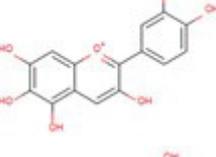
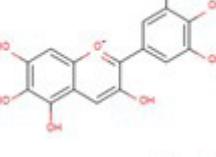
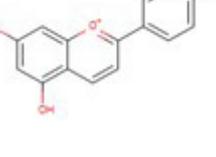
3. Hasil

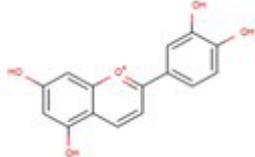
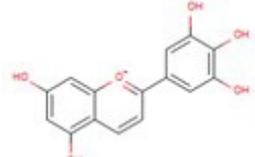
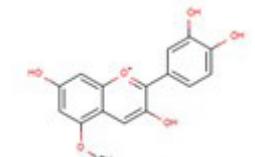
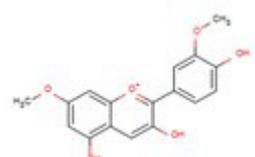
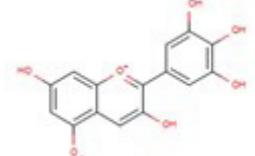
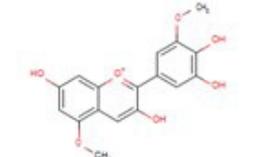
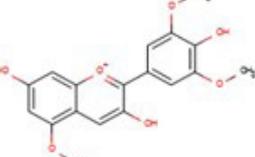
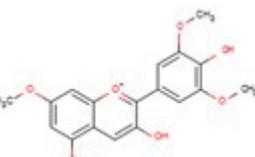
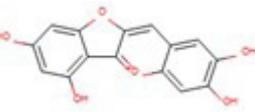
Pengujian parameter fisikokimia yang ditentukan sesuai dengan *Lipinski's Rules of Five* menunjukkan bahwa semua senyawa

antosianidin memenuhi persyaratan *Lipinski's Rules of Five* untuk bobot molekul dan log P, namun terdapat terdapat tiga senyawa yang memiliki jumlah donor dan ikatan hidrogen yang lebih dari 5, yaitu senyawa uji 6-hydroxycyanidin, delphinidin, dan 6-hydroxydelphinidin (Tabel 2). Berdasarkan optimasi ligan alami 5UG8 dengan EGFR (proses redocking) didapatkan grid box dengan koordinat $x = -13,156$, $y = 15,093$, dan $z = -25,719$ dengan RMSD 1,150 Å, sehingga sistem operasi dapat digunakan untuk menambatkan senyawa uji.

Dari hasil docking ke 19 senyawa antosianidin (Tabel 3), diperoleh 1 senyawa yang memiliki energi ikatan yang lebih baik dari ligan uji (Gefitinib dengan $\Delta G -7,08$ kkal/mol dan $K_i 584,15$ nM), yaitu malvidin dengan $\Delta G -9,83$ kkal/mol dan $K_i 62,25$ nM, Selain itu pula senyawa uji malvidin memiliki lebih banyak ikatan hidrogen, yaitu pada Met793, Gln791, Leu718, Thr854, Asp855 dan Lys745. Selain itu pula untuk pengujian pre-ADME, nilai ketiga parameter dari senyawa malvidin memberikan gambaran prediksi parameter absorpsi dan distribusi yang baik

Tabel 2. Sifat fisikokimia senyawa antosianidin

No	Nama Senyawa	Struktur Kimia	Rumus Struktur	Berat Molekul (g/mol)	Log P	Jumlah Donor Ikatan Hidrogen	Jumlah Akseptor Ikatan Hidrogen
1	Sianidin		$C_{15}H_{11}O_6^+$	287,247	2,61	5	5
2	Delfinidin		$C_{15}H_{11}O_7^+$	303,246	2,33	6	6
3	Malvidin		$C_{17}H_{15}O_7^+$	331,3	2,39	4	6
4	Pelargonidin		$C_{15}H_{11}O_5^+$	271,248	2,90	4	4
5	Peonidin		$C_{16}H_{13}O_6^+$	301,274	2,64	4	5
6	Petunidin		$C_{16}H_{13}O_7^+$	317,273	3,11	5	6
7	Aurantininidin		$C_{15}H_{11}O_6^+$	287,247	2,61	5	5
8	6-hidroksisianidin		$C_{15}H_{11}O_7^+$	303,246	2,33	6	6
9	6-hidroksidelfinidin		$C_{15}H_{11}O_8^+$	319,246	2,04	7	7
10	Apigenininidin		$C_{15}H_{11}O_4^+$	255,249	3,16	3	3

No	Nama Senyawa	Struktur Kimia	Rumus Struktur	Berat Molekul (g/mol)	Log P	Jumlah Donor Ikatan Hidrogen	Jumlah Akseptor Ikatan Hidrogen
11	Luteolinidin		$C_{15}H_{11}O_4^+$	255,249	3,16	3	3
12	Tricetinidin		$C_{15}H_{11}O_5^+$	271,248	2,90	4	4
13	5-metilsianidin		$C_{15}H_{11}O_6^+$	287,247	2,61	5	5
14	Rosinidin		$C_{16}H_{13}O_6^+$	301,224	2,64	4	6
15	Pulchellidin		$C_{17}H_{15}O_6^+$	315,301	2,67	3	5
16	Europinidin		$C_{16}H_{13}O_7^+$	317,273	2,36	5	6
17	Capensinidin		$C_{17}H_{15}O_7^+$	331,3	2,39	4	6
18	Hirsutidin		$C_{18}H_{17}O_7^+$	345,327	2,42	3	6
19	Ricciniodin A		$C_{15}H_9O_6^+$	285,231	2,67	4	5

dengan nilai HIA sebesar 83,1034%; Caco-2 sebesar 1,7590nm.sec⁻¹; dan PPB sebesar 94,9441% (Tabel 4). Dan dari hasil pengujian toksisitas (Tabel 5), maldivin memiliki sifat mutagen namun tidak karsinogen.

4. Pembahasan

4.1. Preparasi Struktur Tiga Dimensi Makromolekul EGFR dan Ligan Struktur tiga dimensi EGFR diunduh dari Protein Data Bank pada situs <http://>

www.rcsb.org. Makromolekul protein yang dipilih adalah EGFR bermutasi (L858R, T790M, V948R) pada manusia yang didapat dari metode kristalografi X-ray dengan resolusi 1,46 Å. Makromolekul ini dipilih untuk melihat kemampuan penghambatan senyawa uji terhadap EFGR bermutasi yang menjadi penyebab kanker paru. Identitas makromolekul tersebut adalah 5UG8 berformat (.pdb). Makromolekul dengan kode 5UG8 ini dipilih karena memiliki nilai resolusi yang paling baik dan memiliki nilai validasi (*re-docking*) yang baik pula (<2Å). Struktur tiga dimensi ligan yang digunakan adalah Gefitinib dan 19 senyawa antosianidin, baik yang diunduh pada situs PubChem dengan format (.sdf) dan dibuat pada Marvin

Sketch® (ChemAxon). Ke-19 senyawa antosianidin yang dipilih merupakan senyawa turunan antosianin (Tabel 1).

4.2. *Lipinski's Rule of Five*

Parameter fisikokimia yang ditentukan sesuai dengan *Lipinski's Rules of Five* terkait kemampuan permeabilitas untuk difusi pasif, antara lain lipofilisitas (C Log P) kurang dari 5, jumlah donor ikatan hidrogen kurang dari 5, jumlah akseptor ikatan hidrogen kurang dari 10, dan bobot molekul (BM) yang kurang dari 500 g/mol.¹⁷ Semua senyawa antosianidin memenuhi persyaratan *Lipinski's Rules of Five* untuk bobot molekul dan log P, namun terdapat terdapat tiga senyawa yang memiliki jumlah donor dan ikatan

Tabel 3. Hasil penambatan molekul senyawa gefitinib dan antosianidin

No	Ligan	ΔG (kcal/mol)	Konstanta Inhibisi (nM)	Jumlah Ikatan Hidrogen	Residu Asam Amino
1	Gefitinib	-7,08	584,15	2	Met793, Ser 720
2	Sianidin	-9,35	140,16	6	Met793, Gln791, Thr854, Asp855, Lys745
3	Delfinidin	-9,59	94,10	8	Met793 (2), Leu718 (2), Gln791, Thr854
4	Malvidin	-9,83	62,25	6	Met793, Gln791, Leu718 Thr854, Asp855, Lys745
5	Pelargonidin	-9,27	108,23	6	Met793, Gln791, Leu718 Thr854, Asp855, Lys745
6	Peonidin	-9,48	112,81	6	Met793, Gln791, Leu718 Thr854, Asp855, Lys745
7	Petunidin	-9,71	76,53	6	Met793, Gln791, Leu718 Thr854, Asp855, Lys745
8	Aurantininidin	-8,64	461,93	5	Met793, Gln791, Leu718, Thr854 (2)
9	6-hidroksisianidin	-8,63	469,45	5	Met793, Gln791, Leu718, Thr854 (2)
10	6-hidroksidelfinidin	-7,42	3.640	6	Met793, Leu718, Gln791, Cys797, Asp800 (2)
11	Apigenininidin	-8,86	319,02	5	Gln791, Leu718, Thr854, Asp855, Lys745
12	Luteolinidin	-9,02	242,45	5	Met793, Thr854, Asp855, Lys745, Gln791
13	Tricetinidin	-9,05	230,54	7	Met793, Gln791, Thr854, Asp855, Lys745, Leu718(2)
14	5-metilsianidin	-8,56	535,66	5	Gln791, Lys745, Leu718, Thr854 (2)
15	Rosinidin	-7,92	1.560	5	Met793 (2), Gln791, Cys797, Asp800
16	Pulchellidin	-7,62	2.600	6	Met793, Cys797, Leu718, Gln791, Asp800 (2)
17	Europininidin	-9,12	207,09	6	Met793, Thr854, Asp855, Lys745, Leu718 (2)
18	Capensininidin	-9,03	241,09	5	Met793, Leu718, Thr854, Asp855, Lys745
19	Hirsutidin	-7,90	1.630	5	Met793(2), Gln791, Cys797, Asp800
20	Ricciniodin A	-7,73	2.140	3	Met793, Thr854, Lys745

Tabel 4. Hasil uji pre-ADME senyawa ligan alami 5UG8, gefitinib dan antosianidin

No	Ligan	Caco-2 (nm.sec ⁻¹)	HIA (%)	Protein Plasma Binding (%)
1	Ligan alami 5UG8	22,1465	93,3514	20,0030
2	Gefitinib	48,1068	96,6375	79,9981
3	Sianidin	0,6532	72,5057	100
4	Delfinidin	0,3754	54,2244	100
5	Malvidin	1,7590	83,1034	94,9441
6	Pelargonidin	1,2937	83,5832	100
7	Peonidin	1,6510	83,4343	100
8	Petunidin	0,9684	71,3174	100
9	Aurantininidin	0,6527	72,4918	100
10	6-hidroksisianidin	0,3754	54,2071	100
11	6-hidroksidelphinidin	0,2692	32,0734	100
12	Apigenininidin	1,0145	89,7256	100
13	Luteolinidin	0,6829	83,5778	100
14	Tricetinidin	0,4325	72,4977	100
15	5-metilsianidin	1,6511	83,4334	98,4563
16	Rosininidin	2,1245	90,1303	87,7842
17	Pulchellidin	0,9685	71,3159	100
18	Europininidin	1,7591	83,1024	89,7021
19	Capensininidin	2,9877	90,2363	75,2381
20	Hirsutidin	2,3472	90,2336	80,6339
21	Ricciniodin A	2,3417	87,1771	94,0949

Klasifikasi:

In Vitro Caco-2 cell permeability (nm sec-1) : > 70 higher permeability (a),
4-70 medium permeability (b),
<4 low permeability (c)

% human intestinal absorption (% HIA) : 70-100% well absorbed (a),
20-70% moderately absorbed (b),
0-20% poorly absorbed (c);

% plasma protein binding: > 90% strongly bound (a),
<90% weakly bound (b).

hidrogen yang lebih dari 5, yaitu senyawa uji 6-hydroxycyanidin, delphinidin, dan 6-hydroxydelphinidin. Jumlah donor ikatan hidrogen mendeskripsikan semakin tinggi kapasitas ikatan hidrogen, maka semakin tinggi energi yang dibutuhkan agar proses absorpsi dapat terjadi.¹⁷ Sehingga ke-3 senyawa antosianidin tersebut menunjukkan sifat absorpsi yang kurang baik.

4.3. Molecular Docking dengan AutoDock

Proses penambatan molekul dilakukan dengan menggunakan aplikasi AutoDock Tools. Parameter hasil penambatan molekul dapat dilihat dari nilai energi bebas Gibbs atau energi ikatan (ΔG) dan konstanta

inhibisi (KI). Semakin rendah nilai energi ikatannya, maka ikatan kompleks senyawa dengan reseptor akan semakin kuat karena terjadi kestabilan dan kekuatan interaksi non-kovalen pada senyawa dengan reseptor. Tahapan pertama yang dilakukan adalah proses validasi dengan melakukan re-docking antara ligan standar dan makromolekul. Hasil re-docking makromolekul EGFR dan ligan alaminya N-[(3R,4R)-4fluoro-1-{6-[(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)amino]-9-(propan-2-yl)-9H-purin-2-yl}pyrrolidin-3-yl]propanamida yang sebelumnya telah dioptimasi dengan aplikasi Autodock Tools® (The Scripps Research Institute, Amerika) kemudian di dockingkan kembali.

Tabel 5. Hasil uji pre-ADME senyawa ligan alami 5UG8, gefitinib dan antosianidin

No	Ligan	Mutagenik	Karsinogenik
1	Ligan alami 5UG8	Non-mutagen	Negatif
2	Gefitinib	Mutagen	Positif
3	Sianidin	Mutagen	Negatif
4	Delfinidin	Mutagen	Negatif
5	Malvidin	Mutagen	Negatif
6	Pelargonidin	Mutagen	Negatif
7	Peonidin	Mutagen	Negatif
8	Petunidin	Mutagen	Negatif
9	Aurantininidin	Mutagen	Negatif
10	6-hidroksisianidin	Mutagen	Negatif
11	6-hidroksidelfinidin	Mutagen	Negatif
12	Apigenininidin	Mutagen	Negatif
13	Luteolinidin	Mutagen	Negatif
14	Tricetinidin	Mutagen	Negatif
15	5-metilsianidin	Mutagen	Negatif
16	Rosininidin	Mutagen	Negatif
17	Pulchellidin	Mutagen	Negatif
18	Europininidin	Mutagen	Negatif
19	Capensininidin	Mutagen	Negatif
20	Hirsutidin	Mutagen	Negatif
21	Ricciniodin A	Mutagen	Negatif

Berdasarkan hasil validasi didapatkan posisi $x = -13,156$ $y = 15,093$ $z = -25,719$ dengan RMSD 1,150 Å, dan nilai ΔG -8,60 kkal/mol konstanta inhibisi 495,16 nM. Visualisasi hasil *re-docking* dapat dilihat pada Gambar 1. Dari hasil *re-docking* didapatkan nilai RMSD sebesar 1,150 Å yang artinya reseptor tersebut memenuhi syarat karena nilai hasil RMSD < 2Å dan dapat digunakan untuk menambatkan senyawa uji. Kemudian dilanjutkan simulasi penambatan molekul dilakukan dengan aplikasi yang sama, menggunakan 19 senyawa antosianidin dan Gefitinib sebagai ligan terhadap EGFR secara *oriented docking*. Dari 19 senyawa antosianidin yang ditambatkan diperoleh bahwa senyawa terbaik adalah malvidin dengan ΔG -9,83kkal/mol dan Ki 62,25nM, bahkan lebih baik dibandingkan Gefitinib yang merupakan kontrol positif (ΔG -7,08kkal/mol; Ki 584,15nM). Hal ini menunjukkan bahwa EGFR akan memiliki ikatan yang lebih stabil dengan senyawa malvidin dibandingkan Gefitinib (Tabel 3).

Adapun visualisasi hasil *re-docking*

ligan alami 5UG8 dengan EGFR diamati dengan bantuan Discovery Studio Visualizer®. Telah dilakukan analisis ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik yang terbentuk antara ligan alami dengan EGFR. Berdasarkan hasil optimasi, jumlah ikatan hidrogen yang terjadi antara ligan alami dengan EGFR adalah 2 ikatan hidrogen yang melibatkan 1 asam amino yaitu Met793. Selain ikatan hidrogen terdapat juga interaksi hidrofobik yang melibatkan Ser720, Phe723, Phe856, Arg841, Cys797, Asn842, Gly796, Pro794, Leu792, dan Thr854.

Berdasarkan hasil analisis ikatan hidrogen senyawa uji dengan EGFR, menunjukkan bahwa beberapa senyawa uji memiliki ikatan pada residu asam amino yang sama dengan ligan alami dan Gefitinib pada reseptor. Senyawa uji yang berikatan pada residu asam amino yang sama dengan ligan alami memiliki kemungkinan adanya aktivitas biologi yang sama dengan ligan alami.

Ikatan hidrogen yang terbentuk pada interaksi EGFR dan ligan alaminya

jarak ikatan yang terbentuk dari interaksi ikatan hidrogen dari senyawa malvidin terhadap EGFR memiliki nilai kurang dari 3Å (Gambar 1e). Hal ini menunjukkan bahwa ikatan yang terbentuk antara senyawa malvidin dan EGFR adalah ikatan yang kuat.

4.4. Absorpsi, Distribusi, dan Toksisitas

Parameter absorpsi, distribusi dan toksisitas diukur dengan bantuan program yang diakses secara online melalui situs <https://preadmet.bmdrc.kr/adme/>. Struktur kimia dari senyawa digambar dan di-submit pada situs tersebut, kemudian program akan secara otomatis menghitung nilai prediksi. Parameter yang dipilih, yaitu: permeabilitas sel human colon adenocarcinoma (Caco-2), *Human Intestinal Absorption* (HIA) dan Plasma Protein Binding (PPB). Prediksi absorpsi obat dikaji berdasarkan kemampuan obat terabsorpsi pada usus (*Human Intestinal Absorption*) dan kemampuan permeabilitas pada sel Caco-2. HIA merupakan penjumlahan dari bioavailabilitas dan absorpsi yang dievaluasi dari rasio ekskresi melalui urin, empedu, dan feses. Sebagian besar senyawa antosianidin memiliki persentase HIA yang berada pada rentang diabsorpsi dengan baik yaitu pada rentang 70-100%, kecuali senyawa Cyanidin, Delphinidin, dan 5-methyl-delphinidin.

Sel Caco-2 merupakan model *in vitro* untuk mengetahui transport obat melalui epitel intestinal yang berasal dari adenocarcinoma kolon manusia yang memiliki jalur transportasi ganda.¹⁹ Nilai Caco-2 tertinggi dimiliki oleh senyawa malvidin dan europinidin, yaitu pada 1,7590 dan 1,7591 nm. sec⁻¹. Data menunjukkan bahwa permeabilitas antosianidin untuk dapat melewati epitel testinal masih cukup kecil dan hal ini dapat mempengaruhi bioavailabilitas nya dalam darah, sehingga diperlukan modifikasi baik secara farmasetik ataupun modifikasi struktur untuk meningkatkan sifat permeabilitas dari senyawa-senyawa antosianin tersebut.

Parameter distribusi yang diprediksi berdasarkan keterikatan pada protein plasma. Protein Plasma Binding (PPB) merupakan fraksi obat yang tersedia dalam bentuk bebas

untuk didistribusikan ke berbagai jaringan. Ikatan terhadap protein plasma digambarkan melalui persentase pada rentang dari 0-100% yang menunjukkan kekuatan ikatan. Ikatan obat yang bersifat *irreversible* dapat terjadi akibat ikatan kimia yang kuat seperti ikatan kovalen yang dapat menyebabkan munculnya toksisitas obat tertentu baik yang muncul dalam jangka waktu panjang ataupun pendek. Secara umum obat-obat berikatan secara *reversible* yang terjadi akibat ikatan kimia yang lemah seperti ikatan hidrogen dan Van der Waals.²⁰ Sebagian besar nilai PPB antosianidin berkisar pada rentang 90-100% yang menunjukkan ikatan yang kuat. Senyawa malvidin memiliki nilai PPB sebesar 94,9441%.

Prediksi toksisitas melalui situs yang sama, dengan metode Tes Ames, metode sederhana untuk menguji sifat senyawa berupa sifat mutagenik dan karsinogen sebagai Frameshift Mutagen. Hasil prediksi berupa data menunjukkan bahwa semua senyawa antosianidin bersifat mutagenik namun bukan karsinogenik. Respon mutagenik pada senyawa mutagen tergantung dari struktur kimia senyawa mutagen.²¹ Untuk itulah diperlukan penelitian lanjutan untuk menghilangkan sifat mutagenik tersebut dengan memodifikasi struktur kimia yang bersifat mutagen pada senyawa-senyawa antosianidin.

5. Simpulan

Dari hasil pengujian terhadap 19 senyawa antosianidin, malvidin menunjukkan afinitas terbaik dari semua antosianidin yang diujikan, dengan interaksi berupa jumlah ikatan yang lebih banyak, serta pada residu Met793 yang berperan dalam aktivasi EGFR. Afinitas dan interaksi malvidin bahkan lebih baik dibandingkan Gefitinib. Prediksi absorpsi, distribusi dan toksisitas melalui Caco-2, HIA, PPB menunjukkan potensi malvidin sebagai kandidat *lead compound* untuk antikanker paru, hanya saja untuk tes toksisitas menunjukkan sifat mutagenik namun tidak karsinogen, sehingga diperlukan modifikasi lebih lanjut untuk menghilangkan sifat mutagen dari malvidin.

Daftar Pustaka

1. Liu TC, Jin X, Wang Y, Wang K.. Role of epidermal growth factor receptor in lung cancer and targeted therapies. *Am J Cancer Res* 2017;7(2):187-202
2. Aqil F, Jeyabalan J, Kausar H, Munagala R, Singh IP, Gupta R. Lung cancer inhibitory activity of dietary berries and berry polyphenolics. *J Berry Res.* 2016;6(2):105–14.
3. RI PD dan IKK. Situasi Penyakit Kanker [Internet]. Jakarta; 2015. Available from: <https://pusdatin.kemkes.go.id/article/view/15090700004/situasi-penyakit-kanker.html>
4. Pucci C, Martinelli C, and Ciofani G. Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges. *Ecancermedicalsecience.* 2019; 13: 961.
5. Falzone L, Salomone S, Libra M. Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium. *Front Pharmacol.* 2018;9(11):1300.
6. Aqil F, Gupta A, Munagala R, Jeyabalan J, Kausar H, Sharma RJ, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of anthocyanin/ellagitannin-enriched extracts from *Syzygium cumini* L. (Jamun, the Indian Blackberry). *Nutr Cancer.* 2012;64(3):428–38.
7. Schirrmacher V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *Int J Oncol.* 2019;54(2):407–19.
8. Lin BW, Gong CC, Song HF, Cui YY. Effects of anthocyanins on the prevention and treatment of cancer. *Br J Pharmacol.* 2017;174(11):1226–43.
9. Diaconeasa Z, Leopold L, Rugină D, Ayvaz H, Socaciu C. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin rich extracts from blueberry and blackcurrant juice. *Int J Mol Sci.* 2015;16(2):2352–65.
10. Zhu SJ, Zhao P, Yang J, Ma R, Yan XE, Yang SY, et al. Structural insights into drug development strategy targeting EGFR T790M/C797S. *Oncotarget.* 2018;9(17):13652–65.
11. Nurwidya F, Takahashi F, Takahashi K. Gefitinib in the treatment of nonsmall cell lung cancer with activating epidermal growth factor receptor mutation. *J Nat Sci Biol Med.* 2016;7(2):119-123.
12. Heald R, Bowman KK, Bryan MC, Burdick D, Chan B, Chan E, et al. Correction to Noncovalent Mutant Selective Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors: A Lead Optimization Case Study. *J Med Chem.* 2016;59(6):2848–2848.
13. Kong LL, Ma R, Yao MY, Yan XE, Zhu SJ, Zhao P, et al. Structural pharmacological studies on EGFR T790M/C797S. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;488(2):266–72.
14. Yoshikawa S, Kukimoto-Niino M, Parker L, Handa N, Terada T, Fujimoto T, et al. Structural basis for the altered drug sensitivities of non-small cell lung cancer-associated mutants of human epidermal growth factor receptor. *Oncogene.* 2013;32(1):27–38.
15. Metro G and Crinò L. Advances on EGFR mutation for lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* 2012 Mar; 1(1): 5–13.
16. Agarwal S, Mehrotra R. An overview of Molecular Docking. *JSM Chem.* 2016;4(2):1024.
17. Schneider G. Prediction of Drug-Like Properties. In: *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6404/>
18. Gajiwala KS, Feng J, Ferre R, Ryan K, Brodsky O, Weinrich S, et al. Insights into the aberrant activity of mutant EGFR kinase domain and drug recognition. *Structure.* 2013;21(2):209–19.
19. Nursamsiar, Toding AT, Awaluddin A. Studi In Silico Senyawa Turunan Analog Kalkon dan Pirimidin sebagai Antiinflamasi: Prediksi Absorpsi, Distribusi, dan Toksisitas. *Pharmacy.* 2016;13(1):92–100.
20. Shargel L, Yu ABC. *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics* 7th Edition. New York : McGraw Hill, 2016;. 273 p.

21. Hsu KH, Su BH, Tu YS, Lin OA, and Tseng YJ. Mutagenicity in a Molecule: Identification of Core Structural Features of Mutagenicity Using a Scaffold Analysis. *PLoS One*. 2016; 11(2).
22. Andersen OM, Jordheim M. Anthocyanins. *Encyclopedia of live science (ELS)*. 2010;(10). <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001909.pub2>