

ANALISIS TNFR1 SEBAGAI PROTEIN TARGET PADA UJI ANTIKANKER BERAS HITAM (*Oryza sativa* L.) SECARA *IN SILICO*

Fadjar Kurnia Hartati dan Arlin Besari Djauhari

Program Studi Teknologi Pangan Fakultas Pertanian

Universitas Dr. Soetomo

e-mail: fadjar.kurnia@unitomo.ac.id

ABSTRACT

This study aims to determine the prediction of TNFR1 as a target protein in the *in silico* anticancer test of black rice. The research method uses the PDP website, KEGG, STRING and COFACTOR server. The results showed that TNFR1 is a receptor / target protein that induces cell apoptosis by means of several pathways such as IKBKB, TNFRSF, TRAF and others. TNFR1 will bind with ligands to the amino acids Phe60, Thr61, Ala62, Leu67, Leu71. The active site has a bond strength of 0.52, which means that the bond is very strong because the bond between the target protein and the ligand is said to be strong if it has a value between 0-1. The BS (Binding Site) value is greater than 1.94 which means it has a high degree of accuracy. The TM (modeling template) value is 1, and the RMSD (Root Mean Square Deviation) value is 0.

Key words: target protein, anti cancer, TNFR1, black rice, *in silico*

ABSTRAK

Penelitian ini mempunyai tujuan untuk mengetahui prediksi TNFR1 sebagai protein target pada uji antikanker beras hitam secara *in silico*. Metode penelitian menggunakan website PDP, KEGG, STRING dan COFACTOR server. Hasil penelitian menunjukkan bahwa TNFR1 merupakan reseptor/protein target yang meninduksi apoptosis sel dengan pathway melalui beberapa jalur seperti IKBKB, TNFRSF, TRAF dan lain-lain. TNFR1 akan berikatan dengan ligan pada asam amino-asam amino Phe60, Thr61, Ala62, Leu67, Leu71. Sisi aktif tersebut mempunyai kekuatan ikatan dengan ligan sebesar 0,52 berarti ikatannya sangat kuat karena ikatan antara protein target-ligan dikatakan kuat apabila mempunyai nilai antara 0-1. Nilai BS (Binding Site) lebih besar dari 1,94 yang berarti mempunyai tingkat akurasi tinggi. Nilai TM (template modelling) sebesar 1, dan nilai RMSD (Root Mean Square Deviation) sebesar 0.

Kata kunci: protein target, antikanker, TNFR1, beras hitam, *in silico*

A. PENDAHULUAN

Beras hitam dikenal sebagai *forbidden rice* sehingga belum banyak dikonsumsi oleh masyarakat umum. Padahal Indonesia memiliki beberapa varietas yang tersebar di seluruh wilayah yang ada di Indonesia, misal di sekitar Jawa Tengah adalah varietas Cempo Ireng dan Melik, varietas Cibeusi di Jawa Barat, varietas Joko Bolot di Malang Jawa Timur, varietas Manggarai dari Nusa Tenggara Timur, varietas Wojalaka dari Toraja, dan di Bali terdapat varietas beras hitam yang lebih pulen (BBPADI, 2020). Senyawa bioaktif yang dikandung oleh beras hitam cyanidin-3-O-arabidoside, cyanidin-3,5-diglucoside, pelargonidin-3-O-glucoside, cyanidin-3-O-glucoside, peonidin-3-O-glucoside, campesterol ferulate, cycloartenol ferulate, 24-methylenecycloartenol ferulate, quercetin-3-O-glucoside, isorhamnetin-3-O-glucoside, lycopene, zeaxanthin, lutein, β -carotene, quercetin-3-O-rutinoside (Caro *et al*, 2013).

Ekstrak antosianin beras hitam dilaporkan dapat menghambat sel kanker liver (Chen *et al.*, 2012). Menurut Kim (2005); Xia *et al.*, (2006); Wang *et al.*, (2007) dan Zawistowski *et al.* (2009), antosianin beras hitam dapat menurunkan kadar kolesterol, trigliserida, LDL (*Low Density Lipoprotein*) dan meningkatkan HDL (*High Density Lipoprotein*) dan sangat potensi untuk terapi kardiovaskuler. Antosianin beras hitam juga dapat meningkatkan fungsi limpa, liver, lambung dan usus, juga sebagai agen *hematopoietic* dibidang farmasi (Yang *et al.*, 2011), mencegah arterosklerosis (Lu dan Foo, 2008), anti-inflamatori (Min *et al.*, 2010). Lebih lanjut Nontasan *et al.*, (2012) memanfaatkan dedak beras hitam sebagai pewarna alami dan Hou *et al.*, (2013) mengamati pengaruh ekstrak dedak beras hitam sebagai antioksidan dan hepatoprotektif. Hartati *et al* (2017^a) menunjukkan bahwa beras hitam mempunyai aktivitas antioksidan dan imunomodulator; juga telah membuktikan bahwa ekstrak beras hitam mampu menghambat sitokin-sitokin pro-inflamasi yang diproduksi oleh sel imunokompeten dari mencit model diabetes mellitus/DM (Hartati *et al.* 2017^a).

Berdasarkan hal tersebut diatas maka beras hitam sangat berpotensi sebagai bahan antikanker. Uji aktivitas antikanker dapat dilakukan dengan berbagai metode, salah satu metode yang sangat sesuai pada masa pandemic covid-19 seperti saat ini adalah metode *in silico* dengan menggunakan metode pemodelan molekul atau *Molecular Docking* (MD) antara sel target yang dipilih dengan molekul yang akan diprediksi aktivitasnya (Singh dan Mishra, 2018). Metode ini mampu mengeksplorasi interaksi dua molekul seperti interaksi antara kandidat obat dan suatu protein target yang saling berikatan satu dengan yang lain. Program *docking* ini dapat mengidentifikasi interaksi kompleks molekul bioaktif/ligan-protein target dan afinitas ikatan mereka dievaluasi menggunakan simulasi energi bebas (Fatmawati *et al*, 2015).

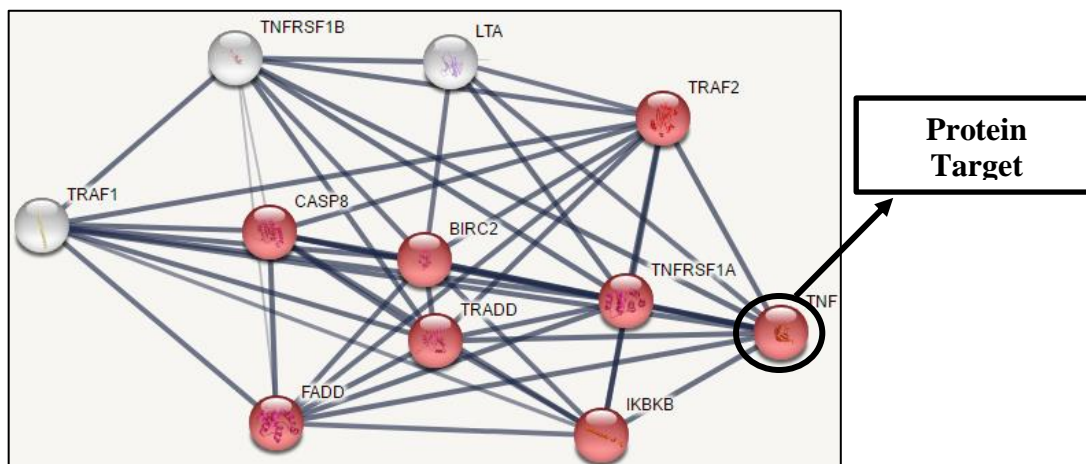
Proses *docking* hanya bisa dilakukan dengan menggunakan sampel 3 dimensi, yaitu sampel dari protein target dan sampel 3D ligan (senyawa bioaktif). Sampel 3D *ligan* dapat didownload langsung dari database *PubChem*, sedangkan 3D protein target bisa diambil melalui website PDB (Protein Data Base) yang merupakan database yang mengkoleksi struktur 3D protein hasil eksperimen (X-kristalografi, NMR, dan lain-lain). Protein target yang digunakan pada uji *in silico* ini adalah TNFR1, karena apoptosis bisa terjadi melalui reseptor TNFR1 dan TNFR2 (Faustman dan Davis (2010). Reseptor kematian terletak di permukaan sel adalah famili reseptor TNF (*Tumor Necrosis Factor*), meliputi TNF-R1, CD 95 (Fas), dan TNF-Related Apoptosis Inducing Ligan (TRAIL)-R1 dan R2. Jalur instrinsik terjadi dalam mitokondria yang mengalami stres, misalnya adanya ROS (*Reactive Oxygen Spesies*) yang berlebih. Mitokondria akan melepaskan sitokrom C dan mengaktifkan caspase untuk menginduksi apoptosis (CCRC, 2016).

B. METODE

Alat yang digunakan dalam analisis protein target dan interaksinya adalah computer. Langkah awal dalam analisis protein target adalah menemukan struktur 3D nya di PDB melalui <http://www.rcsb.org>, selanjutnya mencari sequence asam amino, motif, domain, fungsi, mutase bahkan informasi struktur 3D protein target di <http://www.uniprot.org>. berikutnya adalah melakukan tinjauan pada <http://www.string-db.org> dan KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) di <http://www.genome.jp/kegg/> untuk mengetahui prediksi pathway TNFR1 sebagai antikanker.

C. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pencarian struktur 3D protein target, dapat diketahui bahwa protein target TNFR1 mempunyai kode P19438. Langkah selanjutnya adalah mengetahui prediksi patway TNFR1 sebagai antikanker, dapat dilihat pada Gambar 1.



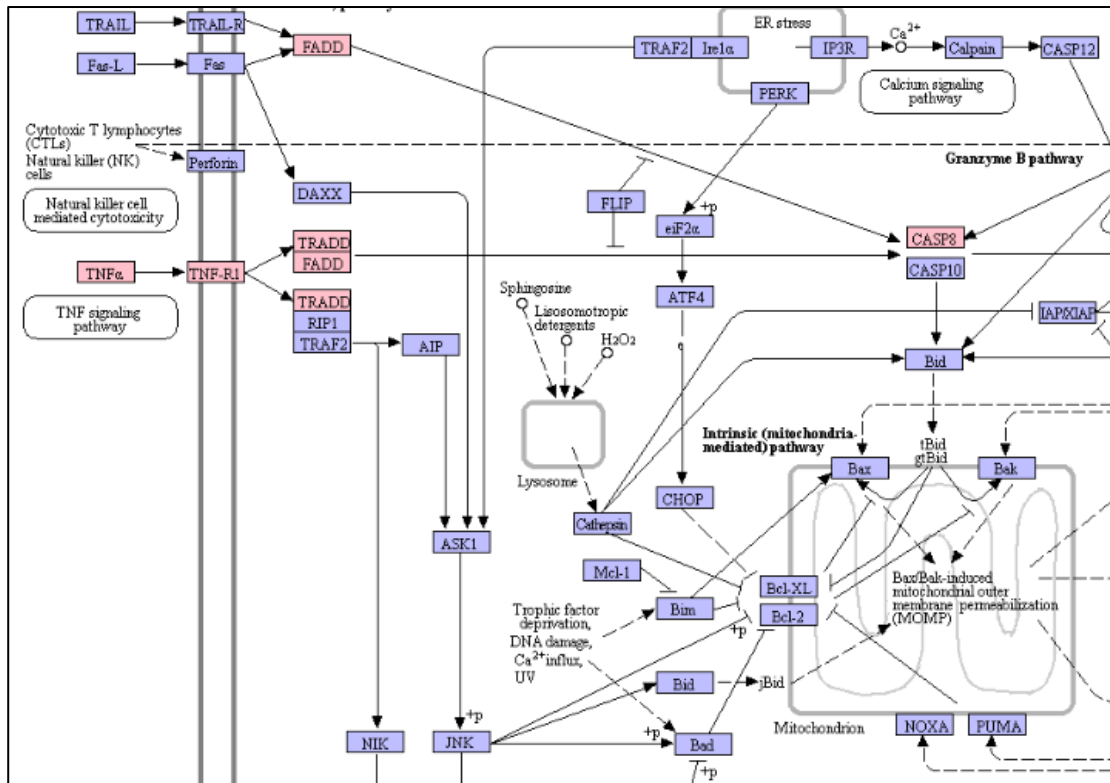
Gambar 1. Prediksi Pathway TNFR1

Gambar 1. menunjukkan bahwa pathway TNF dapat melalui beberapa pathway seperti IKKKB, TRAF2, TNFRSF1A. Hal ini sesuai dengan pendapat Wajant dan Siegmund (2019) bahwa TNF merupakan yang terdiri dari TNFR1 dan TNFR2 merupakan reseptor yang berperan dalam mengendalikan kehidupan dan kematian sel, yang berintegrasi dengan IKKKB dan TNFRSF. Penjelasan ini diperkuat dengan hasil analisis di KEGG (Gambar 2).

KEGG Pathways			
pathway ID	pathway description	count in gene set	false discovery rate
04668	TNF signaling pathway	11	1.22e-23
04064	NF-kappa B signaling pathway	8	1.32e-15
04210	Apoptosis	8	1.32e-15

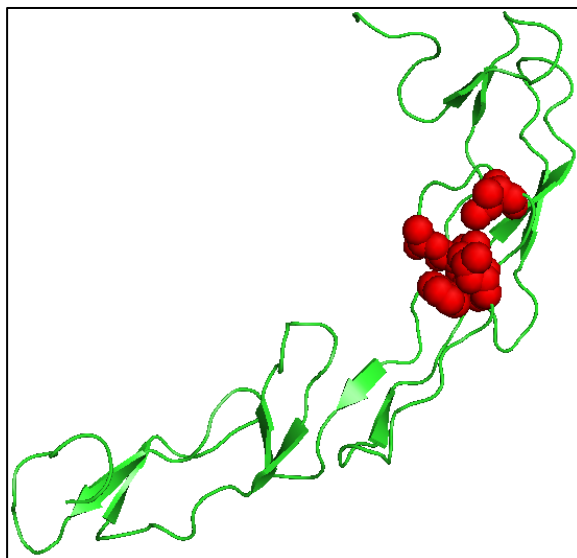
Gambar 2. Prediksi *Pathway* TNFR1 Hasil Analisis STRING (Keterangan: Nilai confidence 0,400 (medium confidence) dan Jumlah protein interaktor adalah 8 protein)

Hasil analisis STRING mempertegas hasil analisis KEGG yang menunjukkan bahwa TNFR1 merupakan reseptor yang berperan pada proses apoptosis. Hal ini sesuai dengan pendapat Hendarto *et al* (2010) yang menyatakan bahwa TNF merupakan sitokin yang berperan dalam apoptosis sel.



Gambar 3. *Pathway* TNF-R1 pada KEGG Menginduksi Mekanisme Apoptosis Melalui Aktivasi Caspase 8.

Setelah dipastikan bahwa TNFR merupakan protein target yang sesuai untuk uji antikanker maka selanjutnya perlu dilakukan analisis untuk mengetahui sisi aktif TNFR1 (ID 04210) yaitu untuk mengetahui asam amino-asam amino yang berikatan dengan ligan (senyawa bioaktif). Tahap ini dilakukan dengan menggunakan fasilitas *COFACTOR server* pada Zhanglab (Roy *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2017)



- Keterangan:
1. Sisi aktif TNFR1:
Phe60, Thr61, Ala62, Leu67, Leu71
 2. Daerah sisi aktif ditunjukkan pada struktur sphere berwarna **merah**

Template proteins with similar binding site:											
Click to view	Rank	Cscore ^{LB}	PDB Hit	TM-score	RMSD ^a	IDEN ^a	Cov.	BS-score	Lig. Name	Download Complex	Predicted binding site residues
<input checked="" type="radio"/>	1	0.52	1ft4A	1.000	0.00	1.000	1.000	1.94	7ø3	Download	60,61,62,67,71
<input type="radio"/>	2	0.49	1tnr1	0.834	2.31	0.978	0.957	1.98	111	Download	69,70,71,72,75,77,78,79,80
<input type="radio"/>	3	0.12	1extø	0.749	2.55	0.816	0.907	1.24	111	Download	15,16,17,21,60,69,71,72,77,104,106,107,110
<input type="radio"/>	4	0.05	2aw21	0.596	2.26	0.270	0.714	1.34	111	Download	16,17,18,28,29,31,32,34,37,40,45,46,47,48,49,50,51,52,54,64
<input type="radio"/>	5	0.05	1jmaø	0.570	2.75	0.273	0.700	1.32	111	Download	31,32,34,35,36,37,40,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,89,90,91
<input type="radio"/>	6	0.01	2bgrA	0.428	5.23	0.078	0.829	0.82	UUU	Download	55,59,69,71,72,73

Click on the radio buttons to visualize predicted binding site and residues.

(a) Cscore^{LB} is the confidence score of predicted binding site. Cscore^{LB} values range in between [0-1]; where a higher score indicates a more reliable ligand-binding site prediction.

(b) BS-score is a measure of local similarity (sequence & structure) between template binding site and predicted binding site in the query structure. Based on large scale benchmarking analysis, we have observed that a BS-score >1 reflects a significant local match between the predicted and template binding site.

(c) TM-score is a measure of global structural similarity between query and template protein.

(d) RMSD^a the RMSD between residues that are structurally aligned by TM-align.

(e) IDEN^a is the percentage sequence identity in the structurally aligned region.

(f) Cov. represents the coverage of global structural alignment and is equal to the number of structurally aligned residues divided by length of the query protein.

Gambar 4. Prediksi Sisi Aktif TNFR1

Gambar 4 diatas menunjukkan bahwa sisi aktif dari TNFR1 terletak pada asam amino Phe60, Thr61, Ala62, Leu67, Leu71. Kekuatan ikatan dengan ligan sebesar 0,52 berarti ikatannya sangat kuat karena ikatan antara protein target-ligan dikatakan kuat apabila mempunyai nilai antara 0-1. Nilai BS (Binding Site) lebih besar dari 1,94 yang berarti mempunyai tingkat akurasi tinggi. Nilai TM (template modelling) sebesar 1, nilai RMSD (Root Mean Square Deviation) sebesar 0 dan secara structural teridentifikasi secara jelas. Hal ini sesuai pendapat Wilks (2010) yang menyatakan bahwa protein target dan ligan akan berikatan kuat apabila mempunyai nilai CS antara 0-1, nilai BS lebih besar dari 1, nilai TM lebih besar dari 0,5. RMSD adalah parameter yang digunakan untuk melihat kemiripan antara ligan hasil docking dengan hasil kristalografi. Validasi metode docking dilakukan dengan DOCK6 menggunakan dua metode interaksi yaitu metode fleksibel dan metode rigid. Menurut Sigal *et al.*, 2015, Semakin kecil nilai RMSD menunjukkan bahwa posisi ligan yang diperkirakan semakin baik karena semakin mendekati konformasi asal (Dany *et al.*, 2013).

D. KESIMPULAN

Penentuan protein target merupakan salah satu tahap penting dalam uji *in silico*, selain struktur 3D senyawa bioaktif/ligan. Oleh karena itu harus dilakukan beberapa tahap uji untuk memastikan bahwa protein target yang digunakan benar-benar memenuhi syarat dan ketentuan yang berlaku yaitu nilai CS antara 0-1, nilai BS lebih besar dari 1, nilai TM lebih besar dari 0,5 dan nilai RMSD kecil. TNFR1 sebagai protein target telah memenuhi syarat dan ketentuan yaitu nilai CS sebesar 0,52, nilai BS lebih besar dari 1,94, nilai TM sebesar 1, dan nilai RMSD sebesar 0.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih yang tak terhingga kami sampaikan kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Pada Masyarakat (DRPM) atas kesempatan dan dukungan materiil yang telah diberikan kepada tim peneliti kami.

DAFTAR PUSTAKA

- BBPADI (Balai Besar Penelitian tanaman Padi). 2020. *Padi Hitam Kaya Manfaat*. <http://bbpadi.litbang.pertanian.go.id/index.php/info-berita/info-teknologi/padi-hitam-jeliteng-kaya-manfaat> diakses tanggal 18 Agustus 2020.
- CCRC. 2016. *Mekanisme dan Regulasi Apoptosis*. <http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id>. Diakses tanggal 15 Oktober 2016.
- Caro, G.P., S. Watanabe, A. Crozier, T. Fujimura dan T. Yokota. 2013. Phytochemical Profile of a Japanese Black-purple Rice. *Food Chemistry*. Vol.141 (7): 2821-2827
- Chen, X.Q., N. Nagao, T. Itani dan K. Irifune. 2012. Anti-oxidative Analysis, and Identification and Quantification of Anthocyanin Pigments in Different Coloured Rice. *Food Chemistry*. Vol.135 (6): 2783-2788.
- Faustman, D. dan M. Davis. 2010. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nature*. Vol.9.
- Kim, O.S., 2005, Radical Scavenging Capacity and Antioxidant Activity of The Vitamin Fraction In rice bran. *J Food Sci.* (3): 208-213.
- Xia, X., W. Ling, J. Ma, M. Xia, M. Hou and Q. Wang. 2006. An Anthocyanin-rich Extract from Black Rice Enhances Atherosclerotic Plaque Stabilization in Apolipoprotein E Deficient Mice. *The Journal of Nutrition*. Vol.136 (6): 2220-2225.
- Wang, Q., M. Xia, C. Liu, H. Guo, Q. Hu, Y. Zhang, M. Hou, H. Zhu, J. Ma and W. Ling. 2007. Cyanidin-3-O- β -glucoside Inhibits iNOS and COX-2 Expression by Inducing Liver X Receptor Alpha Activation in THP-1 Macrophages. *Life Science*. Vol.83 (9): 176-184.
- Zawistowski, J., A. Kopec dan D.D. Kitts. 2009. Effect of a Black Rice Extract (*Oryza sativa* L.) on Cholesterol Levels and Plasma Lipid Parameters in Wistar Kyoto Rats. *Journal of Functional Foods*. Vol.I (7): 50-56.
- Yang, Y., M.C. Andrews, Y. Hu, D. Wang, Y. Qin dan Y. Zhu. 2011. Anthocyanin Extract from Black Rice Significantly Ameliorates Platelet hyperactivity and Hypertriglyceridemia in Dyslipidemic Rats Induced by High Fat Diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol.59 (5): 6759-6764.
- Lu, Y. dan L.Y. Foo. 2008. Polyphenolic Constituents of Black Rice Seed Residue. *Food Chemistry*. Vol.80 (5): 71-76.
- Min, S., S. Ryu dan D. Kim. 2010. Anti-inflammatory Effect of Black Rice, Cyanidin-3-O- β -glycoside, and Its Metabolites, Cyanidin and Protocatechuic Acid. *International Immunopharmacology*. Vol.10 (7): 959-966.
- Nontasan, S., A. Moongngarm and S. Deeseenthum. 2012. Application Of Functional Colorant Prepared from Black Rice Bran in Yogurt. *Asia-Pacific Chemical, Biological & Environmental Engineering Society*. Vol.2 (6): 62.

- Hendarto H, Prabowo P, Moeloek FA and Soetjipto S. 2010. Growth differentiation factor-9 concentration in the follicular fluid of infertile women with endometriosis. *Fertility and Sterility*. Vol. 94(2):758-60.
- Hou, Z., P. Qin, Y. Zhang, S. Cui and G. Ren. 2013. Identification of Anthocyanins Isolated from Black Rice (*Oryza sativa* L.) and Their degradation Kinetics. *Food Research International*. Vol.50 (8): 691-697.
- Hartati, F.K., Simon, B.W., Tri Dewanti, M., dan M. Rifa'I (2017). Antioxidant Activity And Immunomodulator Of Indonesia Black Rice (*Oryza sativa* L. *indica*) Extract. *Journal of Global Pharma Technology*. Vol. 8(9):176-182.
- Hartati, F.K., Simon, B.W., Tri Dewanti, M., dan M. Rifa'I (2017). Anti-Inflammatory Evaluation of Black Rice against TNF- α , IFN- γ and IL-6 Cytokines Produced by Immunocompetent Cells. *Food and Agricultural Immunology*. Vol.28(6): 1116-1125.
- Singh, I., & Mishra, S. (2018). Molecular docking analysis of Pyrimethamine derivatives with Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase. *Bioinformation*. Vol.14(5), 232.
- Wilks, D. S. (2010). "Sampling distributions of the Brier score and Brier skill score under serial dependence". *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society*. Vol.136 (1): 2109–2118. [doi:10.1002/qj.709](https://doi.org/10.1002/qj.709).