

Analisis *In Silico* Mekanisme *Cell Survival* Zat Aktif Daun Sirsak (*Annona Muricata* Linn) pada Kanker Kolorektal

Hur'iyazzahra Kariima Romli*, Julia Hartati, Lelly Yuniarti

Prodi Pendidikan Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Bandung, Indonesia.

*kareemazzhr@gmail.com, jay.mathabiya@gmail.com, lely.yuniarti@gmail.com

Abstract. Colorectal cancer (CRC) is a malignancy of the colon which is the second leading cause of cancer death. The first-line treatment for CRC consists of chemotherapy and monoclonal antibodies that target cell survival. The efficacy of chemotherapy drugs in most cases of CRC still needs to be improved because the cancer cells show that they still have a defense mechanism. In several studies, the active compounds of soursop leaves have several anticancer effects such as cell survival. The drug discovery process requires time, several stages of clinical trials, and large funds so we need a method that can help make them more efficient, one of which is in silico method. This study used the in silico method by looking for the active compound of soursop leaves from published scientific articles and also looking for three-dimensional structures, predicting, and analysis of target proteins using several databases. The results of this study found 18 target proteins of soursop leaf active compound is involved in cell survival mechanism of CRC by regulating cell cycle regulation, miRNA transcription regulation, decreasing cell proliferation, triggering apoptosis, decreasing cell invasion and metastasis. The conclusion of this study is that the active substances of soursop leaves have some target proteins that can have some anticancer mechanism, one of which is by suppressing cell survival in CRC.

Keywords: *Soursop Leaf (Annona Muricata L.), Cell Survival, Colorectal Cancer, In Silico.*

Abstrak. Kanker kolorektal (KKR) merupakan keganasan pada usus besar yang menjadi kanker kedua penyebab kematian tertinggi akibat kanker. Pengobatan lini pertama KKR diantaranya kemoterapi dan antibodi monoklonal yang memiliki target salah satunya mekanisme cell survival. Efikasi obat kemoterapi pada sebagian besar kasus KKR masih perlu ditingkatkan karena sel kanker menunjukkan masih memiliki mekanisme pertahanan. Pada beberapa penelitian, zat aktif daun sirsak memiliki efek sebagai antikanker seperti melalui cell survival. Proses penemuan obat memerlukan waktu, beberapa tahap uji klinis, dan dana yang besar sehingga perlu metode yang membantu agar lebih efisien, salah satunya in silico. Penelitian ini menggunakan metode in silico dengan melakukan penelusuran zat aktif daun sirsak dari artikel ilmiah yang terpublikasi dan dilakukan pencarian struktur tiga dimensi, prediksi, serta analisis protein target menggunakan beberapa database. Hasil dari penelitian ini yaitu ditemukan 18 protein target zat aktif daun sirsak yang terlibat pada mekanisme cell survival KKR dengan mengatur regulasi siklus sel, regulasi transkripsi miRNA, memicu apoptosis, menurunkan proliferasi sel, kemampuan invasi, dan metastasis sel. Kesimpulan pada penelitian ini yaitu zat aktif daun sirsak memiliki protein target yang dapat memiliki mekanisme antikanker salah satunya dengan menekan cell survival pada KKR.

Kata Kunci: *Daun Sirsak (Annona Muricata L.), Cell Survival, Kanker Kolorektal, In Silico.*

A. Pendahuluan

Kanker kolorektal (KKR) merupakan keganasan akibat pembelahan sel abnormal pada jaringan usus besar. Pada tahun 2020 menurut data *GLOBOCAN*, secara global terdapat 1,8 juta kasus KKR. Insidensi KKR cenderung meningkat pada etnis Asia di rentang usia 35–64 tahun dan lebih tinggi pada wanita dibandingkan pria. Di Indonesia, kanker kolorektal merupakan kanker keempat terbanyak. Penyebab keganasan pada jaringan usus besar dapat disebabkan oleh beberapa mekanisme seperti mutase pada onkogen, gen perbaikan DNA, serta *tumor suppressor gene*. Beberapa gen yang berperan dalam mutasi tersebut diantaranya yaitu BRAF, KRAS, TP53, PIK3CA, serta gen lainnya.^{1–6}

Pengobatan lini pertama KKR berupa pembedahan, kemoterapi serta antibodi monoklonal sebagai tambahan. Menurut *American Cancer Society*, kemoterapi menghambat mikrometastasis setelah pembedahan. Obat kemoterapi yang digunakan saat ini seperti 5-fluorouracil (5-FU), Oxaliplatin, Capecitabine, Irinotecan, dan Leucovorin serta obat kemoterapi lainnya menarget mekanisme yang terlibat dalam kanker sehingga memiliki efek sitotoksik sebagai antikanker. Masing-masing obat kemoterapi memiliki target mekanisme kankernya tersendiri contohnya Oxaliplatin yang bekerja yang berefek sitotoksik melalui kerusakan DNA dan Irinotecan yang bekerja spesifik pada siklus sel di fase S. Pemberian obat kemoterapi KKR umumnya diberikan dalam bentuk kombinasi sehingga efek samping dan efikasinya kemungkinan merupakan gabungan efek dari masing-masing obat kemoterapi KKR.^{1–6}

Pada sebagian besar kasus, efek samping obat kemoterapi standar KKR masih cukup tinggi seperti memicu hipersensitivitas, menekan sistem imun sehingga menurun, pansitopenia, kerontokan rambut, serta efek samping lainnya. Selain itu, efikasinya masih perlu ditingkatkan karena sel kanker masih dapat menyebabkan progresi dan metastasis sel serta memiliki mekanisme pertahanan yang mampu meningkatkan kemampuan *cell survival* sel kanker. Sehingga memicu pengembangan obat menggunakan herbal yang mengandung zat aktif dengan aktivitas antikanker dengan efek samping yang cenderung ringan dan efikasi yang cukup tinggi, salah satunya Sirsak (*Annona muricata L.*). Kandungan zat aktif sirsak seperti *annonaceous acetogenin*, *alkaloid*, *flavonoid*, dan zat aktif lainnya ditemukan memiliki aktivitas mekanisme antikanker yang selektif.^{1,4,7,8}

Proses penemuan obat melalui beberapa tahapan uji klinis, sehingga memerlukan waktu yang cukup lama dan dana yang besar. Sehingga diperlukan metode yang dapat membantu proses penemuan obat baru melalui identifikasi protein target kandidat obat baru yang lebih efisien salah satunya menggunakan metode *in silico*. Metode *in silico* digunakan untuk menganalisis target obat melalui protein target dengan berbagai proses identifikasi dan analisis. Proses pada metode *in silico* menggunakan komputer sehingga lebih cepat dan ekonomis sebagai proses awal penemuan obat.⁹ Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi protein target dan menganalisis mekanisme *cell survival* zat aktif daun sirsak (*Annona muricata L.*) pada kanker kolorektal dengan metode *in silico*.

B. Metodologi Penelitian

Peneliti menggunakan metode komputasi *in silico* dan data yang didapatkan berasal dari beberapa database seperti PubChem, STRING, dan Swiss Target Predictions serta laman pencarian daring seperti PubMed, Science Direct, Springer Link, dan Google Scholar. Data yang digunakan yaitu zat aktif daun sirsak (*Annona muricata L.*) dan zat aktif obat kemoterapi KKR yang didapatkan dari artikel ilmiah yang terpublikasi nasional dan internasional.

Proses identifikasi dan analisis protein target dilakukan dengan melakukan penelusuran zat aktif daun sirsak dan obat kemoterapi standar KKR pada laman pencarian seperti PubMed, Science Direct, Springer Link dan laman lainnya, serta penelusuran struktur tiga dimensi zat aktif pada database PubChem, memprediksi protein target zat aktif pada database Swiss Target Prediction, seleksi protein target senyawa aktif daun sirsak yang sama dengan obat kemoterapi standar KKR, serta menganalisis proses biologis dan interaksi antara protein target zat aktif daun sirsak dan obat kemoterapi yang terlibat dalam mekanisme *cell survival* KKR pada database STRING.

C. Hasil Penelitian dan Pembahasan

Hasil Pencarian Zat Aktif, Struktur Tiga Dimensi (*Canonical SMILE*), Prediksi Protein Target Zat Aktif, dan Analisis Interaksi Zat Aktif Daun Sirsak

Hasil penelusuran zat aktif daun sirsak yang diperoleh dari artikel ilmiah ditemukan sejumlah 404 zat aktif, dengan hasil penelusuran struktur tiga dimensi pada *PubChem* ditemukan 383 zat aktif yang memiliki struktur tiga dimensi dan terdapat 173 protein target zat aktif daun sirsak dengan nilai probabilitas $\geq 0,7$ pada hasil prediksi *Swiss Target Prediction* yang ditemukan pada 68 zat aktif daun sirsak. Zat aktif daun sirsak tersaji pada Tabel 1.

Tabel 1. Zat Aktif Daun Sirsak

Zat Aktif Daun Sirsak	Referensi
(4)-epi-cubedol	10
(8)-Octadecanoic acid	10
(9)-Octadecanoic acid	10
(R)-4'-O-methylcoclaurine	11,12
(R)-O,O-dimethylcoclaurine	11
(S)-norcorydine	11,12
4-feruloyl-5-caffeoylquinic acid	11
5-caffeoylquinic acid	11
α -sitosterol	10
β -caryophyllene	10,13
Annonaine	11–13
Apigenin-6-C-glucoside	12
Argentinine	12
Asimilobine	12
Atherospermine	13
Atherosperminine	11
Caffeic acid	12
Caffeoylquinic acid	12
Casuarine	12
Campesterol	10
Chlorogenic acid	11,12

Cinnamic acid	12
Coclaurine	12,14
Coreximine	12,13
Coumarid acid	12
Daidzein	12
Dicaffeoylquinic acid	12
DMDP (2,5- Dihydroxymethyl-3,4, dihydroxypyrrolidine)	12
DMJ (deoxymannojirimycin)	12
DNJ (deoxynojirmycin)	12
Emodin	12
Fisetin	12
Gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid)	11,12
Genistein	12
Gentisic acid	12,13
Glycitein	12
Homoorientin	12
Isocaryophyllene	13
Isoboldine	12
Isoferulic acid	12
Kaempferol	11,12,15
Kaempferol 3-O-robinobioside	11
Muricinine	12
Myricetin	12
N-methylcoclaurine	12
N-p-coumaroyl tyramine	12
Naringenin (5,7-dihydroxy-(2-4-hydroxyphenyl) chroman-4-one)	7
Oleic acid	10
p-coumaric acid	11

p-coumaric acid methyl ester	11
Palmitic acid	16
Procyanidin dimer B1	15
Quercetin	11,12,15
Quercetin 3-O-a-rhamnosyl	12
Quercetin 3-O-glucoside	11,12
Quercetin 3-O-neohispredoside	11,12
Quercetin 3-O-robinoside	11,12
Quercetin 3-O-rutinoside	11,12
Remerine	12
Reticuline	12,14
Robinetin	12
Rutin (quercetin 3-O-rutinoside)	11
Stearic Acid	13
Swainsonine	12
Tangeretin	12
Vitexin	12
Xylopine	11,12

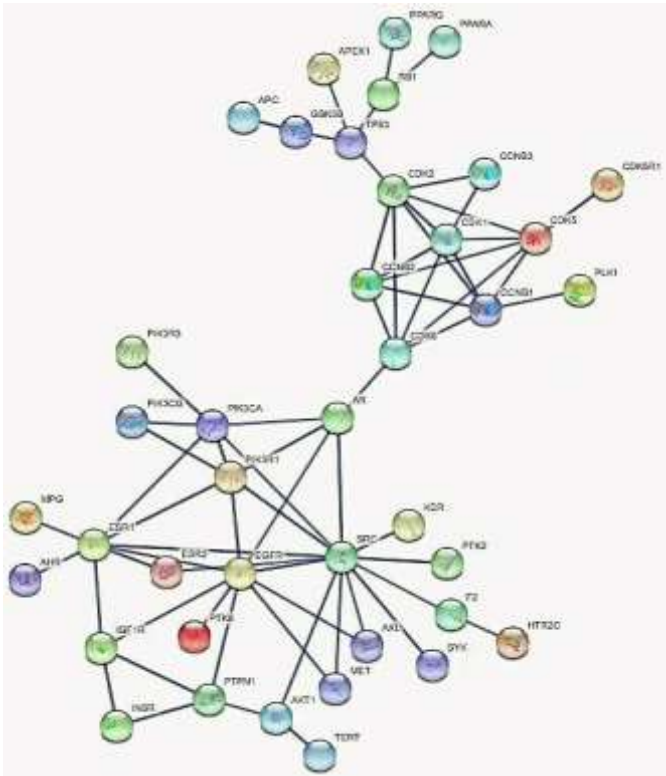
Hasil seleksi protein target zat aktif sirsak yang sama dengan zat aktif obat kemoterapi standar KKR ditemukan sejumlah 29 protein target. Zat aktif yang memiliki protein target yang sama dengan obat kemoterapi standar KKR terdiri atas Myricetin, Quercetin, Robinetin, Daidzein, Genistein, Glycitein, Emodin, Kaempferol, Caffeic acid, Fisetin, N-p-coumaroyl tyramine, Procyanidin dimer B1, Procyanidin trimer C1, Kaempferol 3-O-robinobioside, Kaempferol 3- O-a-rhamnosyl, Quercetin 3-O-glucoside, Quercetin 3-O-glucoside, Quercetin 3- O-robinoside, Quercetin 3-O-rutinoside, Quercetin 3-O-rutinoside. Rutin, Tangeretin, N-p-coumaryl tyramine, Asimilobine, Annonaine, Asimilobine. Remerine, Isoboldine, dan Muricinine.

Hasil penelusuran protein target kanker kolorektal yang terlibat dalam mekanisme antikanker seperti *cell survival* diperoleh dari hasil *review article* Mármol dkk terdiri atas 13 protein target. Protein target mekanisme antikanker kolorektal *cell survival* tercantum pada Tabel 2.

Tabel 2. Protein Target Mekanisme Antikanker *Cell Survival*

Mekanisme Antikanker	Protein Target
<i>Cell survival</i>	PIK3R3 Orai1 HBP1 p53 APC Rb TGF- β RASSF1A MAPK PI3K BRAF SOX4 NT5E PTK6

Analisis interaksi dan proses biologis zat aktif daun sirsak dengan protein target mekanisme antikanker kolorektal menggunakan *database STRING* dengan menetapkan tingkat kepercayaan tertinggi (*confidence*) ≥ 0.9 untuk menganalisis kekuatan ikatan protein target dan proses biologis terkait mekanisme antikanker yaitu *cell survival*, ditemukan sejumlah 18 protein target zat aktif sirsak yang berikatan kuat dan berinteraksi dengan protein target yang terlibat dalam mekanisme proses biologis *cell survival*. Hasil tersaji pada Gambar 1.



Gambar 1. Interaksi antara Protein Target Senyawa Aktif Daun Sirsak dan Protein yang Berperan dalam *Cell Survival* Kanker Kolorektal

Mekanisme *Cell Survival* Zat Aktif Daun Sirsak

Pada hasil analisis menggunakan *database STRING*, zat aktif daun sirsak menunjukkan terlibat dalam proses biologis *cell survival*. Pada mekanisme *cell survival*, protein target zat aktif daun sirsak yang terlibat yaitu CDK1, CCNB1, CCNB2, CDK6, APC, PLK1, PPARG, PPARA, INSR, TP53, TERT, RB1, EGFR, AHR, ESR1, APEX, F2, dan SYK. Proses biologis yang ditemukan dari hasil analisis yaitu regulasi siklus sel (mitosis), transkripsi pri-miRNA, respon seluler terkait cAMP, proses metabolik ATP, dan *reactive oxygen species (ROS)* serta menekan kemampuan proliferasi sel, menghindari apoptosis, serta menekan kemampuan metastasis dan invasi sel.^{17,18}

Beberapa protein target lain seperti CDK1, CCNB2, CCNB1, PLK1 berperan dalam *mitotic nuclear envelope disassembly*. Protein target PPARG, PPARA, TP53, dan TERT berperan dalam regulasi transkripsi pri-miRNA oleh RNA polymerase II dan CDK6 berperan dalam dediferensiasi sel. Pada pengaturan proses mitosis siklus sel, protein target APC, RB1, CCNB1, PLK1, APEX, RB1, CDK1, CCNB1, EGFR, AKT1, dan TERT terlibat dalam tahap metafase dan anafase. Selain itu, pada mitosis sel protein target RB1, PLK1, CCNB1, dan APC terlibat dalam segregasi *sister chromatid*. Adapun proses biologis berupa respon seluler terhadap cAMP diregulasi oleh APEX1, AHR, dan PIK3CG serta protein target TP53, ESR1, AKT1, SYK, EGFR, INSR, dan F2 berperan dalam meregulasi proses metabolik *reactive oxygen species (ROS)*.^{17,18}

Hasil penelitian *in vitro* kultur cell line kanker kolorektal HCT116, LoVo, SW480, and SW620, ditemukan protein target TERT berperan dalam aktivasi telomerase yang berfungsi membentuk panjang telomer dan membuat sel kanker imortal. Pada penelitian lain seperti penelitian Liu dkk, TERT ditemukan berperan dalam aktivasi telomer dan metilasi TERT yang cukup berhubungan kuat dengan progresi tumor. Pada hasil penelitian *in vitro* lain menggunakan kultur cell line HT29 dan HCT8, ditemukan TP53 terlibat dalam regulasi siklus sel, perbaikan DNA, dan apoptosis sel sehingga berperan penting dalam *cell survival* dan progresi tumor. Sehingga ekspresi TP53 yang tinggi dianggap berkaitan dengan prognosis yang buruk pada survival pasien kanker kolorektal.^{17,18}

Berdasarkan penelitian Ammazalorsoa dkk, menunjukkan aktivasi PPARG berperan dalam pengaturan diferensiasi sel, metabolisme lipid dan glukosa, serta sensitivitas insulin, dan homeostasis energi menggunakan kultur *cell line* kanker kolorektal, paraglioma, dan kanker pankreas. Pada penelitian Gavamukulya dkk, pemberian ekstrak etanol daun sirsak pada kultur cell line HeLa, PC3, dan PNT1a ditemukan aktivitas antikanker yang tinggi melalui inhibisi metastasis dan proliferasi sel melalui jalur CXCL1/CXCR2 dan CASP9 axis.¹⁹⁻²¹

D. Kesimpulan

Pada penelitian ini, ditemukan protein target zat aktif daun sirsak terlibat dalam mekanisme *cell survival* kanker kolorektal yang terdiri atas protein target CDK1, CCNB1, CCNB2, CDK6, APC, PLK1, PPARG, PPARA, INSR, TP53, TERT, RB1, EGFR, AHR, ESR1, APEX, F2, dan SYK melalui regulasi siklus sel (mitosis), transkripsi pri-miRNA, respon seluler terkait cAMP, proses metabolik ATP, dan *reactive oxygen species (ROS)* serta menekan kemampuan proliferasi sel, menghindari apoptosis, serta menekan kemampuan metastasis dan invasi sel.

Acknowledge

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Islam Bandung yang telah mendukung pendanaan penelitian ini (kontrak hibah PDU nomor 100/B.04/LPPM/XII/2020).

Daftar Pustaka

- [1] American Cancer Society. Colorectal Cancer Facts & Figures 2020-2022. Am Cancer Soc Inc. 2020;(page 32):1–32.
- [2] Vogel JD, Eskicioglu C, Weiser MR, Feingold DL, Steele SR. The American Society of Colon and Rectal Surgeons: Clinical Practice Guidelines for The Treatment of Colon Cancer. Dis Colon Rectum. 2017;60(10):999–1017.
- [3] Tariq K, Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. Cancer Biol Med. 2016;13(1):120–35.
- [4] Kesehatan K, Nasional KPK. Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran: Kanker Kolorektal. Pedoman Nas Pelayanan Kedokt Kanker Kolor. 2016;1–172.
- [5] Alcindor T, Beauger N. Oxaliplatin: A review in the era of molecularly targeted therapy. Curr Oncol. 2011;18(1):18–25.
- [6] Negarandeh R, Salehifar E, Saghafi F, Jalali H, Janbabaie G, Abdhaghighi MJ, et al. Evaluation of adverse effects of chemotherapy regimens of 5-fluoropyrimidines derivatives and their association with DPYD polymorphisms in colorectal cancer patients. BMC Cancer. 2020;20(1):1–7.
- [7] Balderrama-carmona AP, Patricia N, Juan-carlos G, Chaidez-quiroz C, Felipe E. Antiviral, Antioxidant, and Antihemolytic Effect of *Annona muricata* L. Leaves Extract. Plants. 2020;9(1650):1–11.
- [8] Jacobo-Herrera N, Pérez-Plasencia C, Castro-Torres VA, Martínez-Vázquez M, González-Esquinca AR, Zentella-Dehesa A. Selective Acetogenins and Their Potential as Anticancer Agents. Front Pharmacol. 2019;10(July):1–12.
- [9] Khurshid Ahmad MH. Drug Discovery and In Silico Techniques: A Mini-Review. Enzym Eng. 2014;04(01):1–3.
- [10] Gyesi JN, Opoku R, Borquaye LS. Chemical Composition, Total Phenolic Content, and Antioxidant Activities of the Essential Oils of the Leaves and Fruit Pulp of *Annona muricata* L. (Soursop) from Ghana. Biochem Res Int. 2019;2019.
- [11] Patel S, Patel JK. A review on a miracle fruits of *Annona muricata*. J Pharmacogn Phytochem. 2016;5(51):137–48.
- [12] Coria-Téllez A V., Montalvo-González E, Yahia EM, Obledo-Vázquez EN. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. Arab J Chem. 2016;11(5):662–91.
- [13] Sawant TP, Dongre RS. Bio-Chemical Compositional Analysis of *Annona Muricata*: A Miracle Fruit's Review. 2013;2(June):285–97.
- [14] Fatema IB, Chowdhury NS, Charu TK, Sultana FI, Liya, Nafia. Phytochemical and Pharmacological Studies of the genus *Annona*: A Review. Int J Recent Innov Acad Res. 2021;5(1):23–34.
- [15] Yathzamiry VGD, Cecilia EGS, Antonio MCJ, Daniel NFS, Carolina FGA, Alberto AVJ, et al. Isolation of Polyphenols from Soursop (*Annona muricata* L.) Leaves Using Green Chemistry Techniques and their Anticancer Effect. Brazilian Arch Biol Technol. 2021;64:1–15.
- [16] adrie N, Schauss AG. Soursop (*Annona muricata* L.): Composition, nutritional value, medicinal uses, and toxicology. Bioact Foods Promot Heal. 2010;(January):621–43.
- [17] Liu L, Liu C, Fotouhi O, Fan Y, Wang K, Xia C, et al. TERT Promoter Hypermethylation in Gastrointestinal Cancer: A Potential Stool Biomarker . Oncologist. 2017;22(10):1178–88.
- [18] Hsa circ 0020397 regulates colorectal cancer cell viability, apoptosis, and invasion by promoting the expression of the miR-138 targets TERT and PD-L1. Cell Biol Int. 2017;10:1–27.
- [19] Li C, Bu J, Liao Y, Zhang J, Han J, Zhang H, et al. High expressions of CUL4A and TP53 in colorectal cancer predict poor survival. Cell Physiol Biochem. 2019;51(6):2829–42.

- [20] Ammazalorso A, De Lellis L, Florio R, Laghezza A, De Filippis B, Fantacuzzi M, et al. Synthesis of novel benzothiazole amides: Evaluation of PPAR activity and anti-proliferative effects in paraganglioma, pancreatic and colorectal cancer cell lines. *Bioorganic Med Chem Lett* [Internet]. 2019;29(16):2302–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.06.020>
- [21] Gavamukulya Y, Maina EN, El-Shemy HA, Meroka AM, Kangogo GK, Magoma G, et al. *Annona muricata* silver nanoparticles exhibit strong anticancer activities against cervical and prostate adenocarcinomas through regulation of CASP9 and the CXCL1/CXCR2 genes axis. *Tumour Biol*. 2021;43(1):37–55.
- [22] Tulloh, Neng Resan Aulia, Andriane, Yuke (2021). *Sediaan Nanopartikel Alginat Ekstrak Etanol Daun Sirsak (Annona muricata Linn) Memiliki Efek Antikanker pada Kultur Sel Kanker Paru (HTB183)*. 1(2). 124-129.