

Uji *In-Silico* Aktivitas Antikanker Kolorektal Senyawa Organosulfur Bawang Putih (*Allium sativum L.*) terhadap Protein Target COX-2

Muhammad Fillah*, apt. Diar Herawati, M.Si., apt. Taufik M. Fakih, M.Farm

Prodi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Indonesia.

*muhammadfillah33@gmail.com, diarmunawar@gmail.com,

Abstract. Colorectal cancer is cancer that grows in the colon (large intestine) or in the lower colon that is connected to the rectum. Colorectal anticancer compounds are found in the garlic plant (*Allium sativum L.*) which contains organosulfur compounds. The COX-2 receptor is a receptor that plays an important role in anticancer activity. The purpose of this study was to prove based on *in-silico* study whether the organosulfur compounds could be used as a colorectal anticancer candidate. The identification of the physicochemical properties of organosulfur compounds was carried out using ChemBioDraw 2D software. The organosulfur compound was optimized using Gauss View software version 5.0.8 and Gaussian version 09. Then proceed to the docking simulation to COX-2 receptor which has been separated from its natural ligand validation of molecular docking system was carried out using MGL Tools version 1.5.6 software which has been equipped with Autodock Tools version 4.2. The result showed that S-Allylmercaptogluthathione compound had a better affinity than the other six organosulfur compounds to COX-2. The S-Allylmercaptogluthathione compound obtained a bond free energy value of -7,53 kcal/mol and the value of the inhibition constant (Ki) was 3,01 μ M. According toxicity test results, S-Allylmercaptogluthathione has a high potential for toxicity, with a low risk of exposure and does not cause carcinogenicity or mutagenicity. The S-Allylmercaptogluthathione compound is not better than its natural ligand S58. Where the natural ligand S58 has a free energy value of -10,73 kcal/mol and an inhibition constant (Ki) of 0,0137 μ M. It can be concluded that the S-Allylmercaptogluthathione test compound cannot be used as a colorectal anticancer candidate, because it does not have anticancer activity.

Keywords: Colorectal Cancer, COX-2, Organosulfur, In-Silico.

Abstrak. Kanker Kolorektal merupakan kanker yang pertumbuhannya terjadi di kolon (usus besar) atau di usus besar bagian bawah yang terhubung ke rektum (anus). Senyawa antikanker kolorektal ditemukan dalam tanaman bawang putih (*Allium sativum L.*) yang mengandung senyawa organosulfur. Reseptor COX-2 adalah reseptor yang berperan penting dalam antikanker kolorektal. Tujuan dilakukannya penelitian ini untuk membuktikan secara *in-silico* senyawa organosulfur dapat dijadikan sebagai kandidat antikanker kolorektal. Pada penelitian ini dilakukan identifikasi sifat fisikokimia pada senyawa organosulfur menggunakan software ChemBioDraw 2D. Senyawa organosulfur dilakukan optimasi menggunakan software Gauss View versi 5.0.8 dan Gaussian versi 09. Kemudian dilanjutkan ke tahap simulasi docking senyawa uji organosulfur terhadap reseptor COX-2 yang telah dipisahkan dengan ligan alaminya dan telah di validasi menggunakan software MGL Tools versi 1.5.6 yang telah dilengkapi dengan Autodock Tools versi 4.2. Berdasarkan hasil penelitian, hasil docking senyawa S-Allylmercaptogluthathione memiliki afinitas lebih baik dibandingkan dengan keenam senyawa organosulfur lainnya. Senyawa S-Allylmercaptogluthathione diperoleh nilai energi bebas ikatan yaitu -7,53 kcal/mol dan nilai konstanta inhibisi (Ki) 3,01 μ M. Hasil prediksi toksisitas S-Allylmercaptogluthathione memiliki potensi toksisitas yang tinggi, dengan risiko paparan yang rendah serta tidak menyebabkan karsinogenik atau mutagenisitas. Senyawa S-Allylmercaptogluthathione tidak lebih baik dibandingkan ligan alaminya. Dimana ligan Alami S58 memiliki nilai energi bebas ikatan yaitu -10,73 kcal/mol dan nilai konstanta inhibisi (Ki) 0,0137 μ M. Maka dapat disimpulkan bahwa senyawa uji S-Allylmercaptogluthathione tidak dapat dijadikan sebagai kandidat antikanker kolorektal, karena tidak memiliki aktivitas antikanker.

Kata Kunci: Kanker Kolorektal, COX-2, Organosulfur, In-Silico.

A. Pendahuluan

Salah satu penyebab kematian utama di dunia adalah penyakit kanker. Kanker adalah penyakit yang disebabkan oleh sel abnormal jaringan tubuh yang tumbuh dan berkembang dengan cepat serta tak terkendali, menekan jaringan tubuh sehingga mempengaruhi organ tubuh. Berdasarkan data *Globocan* pada tahun 2020 terdapat 1,9 juta kasus baru kanker kolorektal di dunia dan di Indonesia sendiri terdapat 34 ribu kasus baru kanker kolorektal (Global Cancer Observatory, 2018). Berbagai jenis kanker salah satunya adalah kanker kolorektal. Kanker kolorektal adalah pertumbuhan abnormal pada kolon atau rektum (usus). Kanker kolorektal diakibatkan karena pola makan atau pola diet yang kurang tepat. Asupan makanan yang lebih tinggi lemak dan protein tetapi kurangnya asupan serat (Tamba, 2012).

Salah satu protein target yang dapat digunakan sebagai target pada kanker kolorektal adalah siklooksigenase-2 (COX-2), yang merupakan salah satu protein target yang berperan dalam patogenesis terjadinya kanker kolorektal. Ekspresi COX-2 biasanya terjadi pada tahap awal karsinogenesis CRC (*Colorectal cancer*) yaitu pada tahap inisiasi yang membentuk awal adenoma, dan terus terekspresi dan ekspresinya meningkat seiring karsinogenesis (Aust DE, dkk., 2002).

Adenoma sendiri merupakan tumor jinak yang terbentuk di jaringan epitel dan melapisi kelenjar atau organ tubuh. Polip di usus besar merupakan jenis adenoma yang paling umum terjadi. Contoh berbagai proses karsinogenesis seperti meningkatkan proliferasi sel, menekan apoptosis, meningkatkan kemampuan invasi dan meningkatkan kemampuan metastasis sel ganas. Ekspresi COX-2 dapat ditemukan pada jaringan maligna dan premaligna dari tumor epitelial maupun non epitelial. Pada jaringan maligna, terjadi peningkatan ekspresi COX-2 bila dibandingkan dengan jaringan yang non maligna (Wheeler JMD, dkk., 2002).

Ekspresi COX-2 meningkat secara dramatis pada jaringan yang mengalami keganasan bila dibandingkan dengan mukosa normal. Pada jaringan kolorektal, COX-2 terekspresi pada 50% adenoma dan pada 85% jaringan karsinoma (Brown dkk., 2005). Penelitian lain, COX-2 terekspresi pada 72% adenoma, 84,7% tumor primer dan terekspresi pada 100% CRC yang telah metastase (Zhang H., 2002).

Induksi atau overekspresi dari COX-2 berhubungan dengan peningkatan produksi PGE2 yang diketahui mempunyai peranan dalam memodulasi proliferasi sel, kematian sel dan invasi beberapa tipe tumor pada kolon, payudara dan paru-paru (Geisslinger G., 2006). Sehingga Overekspresi dari COX-2 pada kejadian kanker kolorektal dihubungkan dengan adanya mekanisme inflamasi dengan peningkatan sintesis prostaglandin yang menyebabkan meningkatnya proliferasi sel, terjadinya penghambatan apoptosis, perubahan adhesi sel, dan peningkatan metastase (Wu and Sun, 2015; dan Laksmini, et al., 2018). Penelitian sebelumnya yang membuktikan efek apoptosis organosulfur yaitu pada penelitian yang dilakukan oleh Shirin *et al.*, (2001) dengan membandingkan dua senyawa organosulfur yaitu S-Allylcystein dan S-Allyl merkaptosistein yang terkandung di dalam bawang putih pada sel kanker kolon HT-29 dan SW-480, hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa S-Allyl merkaptosistein (SAMC) dapat menghambat pertumbuhan serta menonaktifkan sel pada fase G-2-M dan menginduksi terjadinya apoptosis (Shirin *et al.*, 2001).

Menurut pendapat Ishikawa et al., (2006) kandungan senyawa di dalam bawang putih (*Allium sativum L.*) memiliki khasiat sebagai antioksidan, memiliki efek imunomodulatif, meningkatkan jumlah dan aktivitas sel natural killer (NK) serta mencegah kanker kolorektal. Pada penelitian Tanaka et al., (2006) mengonsumsi bawang putih dapat menekan progresi dari adenoma kolorektal dan meningkatkan aktivitas serta jumlah dari sel *natural killer* oleh senyawa aktifnya yaitu *S-allylcysteine* (S-allyl-sistein). Senyawa lain yang terkandung dalam bawang putih yaitu senyawa organosulfur yang dapat mencegah terjadinya kanker, termasuk kanker kolorektal. Senyawa organosulfur yang ada didalam bawang putih meliputi S-Allylcystein (SAC), S-Allylmerkaptosistein (SAMC), Allicin, Alliin, Diallyl disulfide, Diallyl trisulfide, dan S-Allylmerkaptogluthione. Dari semua senyawa organosulfur yang ada di bawang putih terdapat persamaan dan perbedaan karakteristiknya. Untuk persamaan karakteristiknya terdapat pada struktur khasnya yaitu terdapat senyawa sulfur (S) sedangkan untuk perbedaan karakteristiknya yaitu terdapat pada jumlah masing-masing sulfurnya dan

strukturnya yang berbeda-beda.

Tanaka juga membuktikan bahwa bawang putih memiliki aktivitas sebagai antitumor dan teruji secara *in vitro* dapat menginduksi terjadinya apoptosis pada sel kanker kolorektal WiDr. WiDr merupakan salah satu sel yang memiliki sensitivitas yang rendah terhadap perlakuan dengan 5-fluorouracil (5-FU), agen kemoterapi golongan antimetabolit (Giovannetti *et al.*, 2007).

Berdasarkan mekanisme terjadinya kanker kolorektal di dalam tubuh, dan potensi bawang putih sebagai senyawa organosulfur yang dapat menginduksi apoptosis, maka perlu dilakukan eksplorasi bawang putih untuk *co-chemotherapy* kanker kolorektal. Oleh karena itu maka perlu dilakukan prediksi aktivitas melalui interaksi suatu protein target tertentu terhadap suatu ligan (bawang putih) dengan menggunakan metode *molecular docking*. Protein target yang akan digunakan yaitu COX-2. Analisis *docking* memungkinkan untuk identifikasi awal terhadap molekul target yang berpotensi sebagai agen antikanker dari senyawa alami, selain itu juga dilakukannya analisis *docking* bertujuan untuk mengetahui model pengikatan yang terjadi sehingga dapat digunakan untuk memastikan fungsinya sebagai agen antikanker (Phosrithong & Ungwitayatorn., 2010).

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka perumusan masalah dalam penelitian ini sebagai berikut: “Apakah kandungan organosulfur pada Bawang Putih (*Allium sativum L.*) memiliki aktivitas antikanker kolorektal terhadap protein target COX-2 secara *In-silico*?”. Selanjutnya, tujuan dalam penelitian ini diuraikan dalam pokok-pokok sebagai berikut:

1. Untuk membandingkan ketujuh senyawa organosulfur yaitu S-Allylcystein (SAC), S-Allilmerkaptosistein (SAMC), Allicin, Alliin, Diallyl disulfide, Diallyl trisulfide, dan S-Allylmercaptogluthathione terhadap protein target (COX-2) secara *in-silico*.

B. Metodologi Penelitian

Peneliti menggunakan metode *docking* secara *In-silico* yang dilakukan antara struktur protein target COX-2 dengan senyawa organosulfur bawang putih (*Allium sativum L.*). Senyawa organosulfur yang dipilih dalam penelitian ini adalah senyawa S-Allylcystein (SAC), S-allil merkaptosistein (SAMC), Allicin, Alliin, Diallyl disulfide, Diallyl trisulfide, dan S-Allylmercaptogluthathione.

Dengan teknik pengujiannya yaitu pertama-tama senyawa yang akan digunakan digambar dalam bentuk 2D dan 3D menggunakan *software ChemBio Draw* versi 16.0 dan *ChemBio 3D Ultra* versi 16.0. Selanjutnya dilakukan optimasi geometri pada senyawa S-Allylcystein (SAC), S-allil merkaptosistein (SAMC), Allicin, Alliin, Diallyl disulfide, Diallyl trisulfide, dan S-Allylmercaptogluthathione dengan menggunakan *software GaussView* versi 5.0.8 dan *software Gaussian* 09 dengan metode DFT basis set 3-21 G.

Pada proses penambatan molekuler, pengunduhan makromolekul COX-2 sebagai protein target yang dibutuhkan pada proses *docking* yang dapat diunduh melalui website Protein Data Bank (www.rcsb.org) dengan kode PDB 6COX. Selanjutnya, dilakukan penghapusan molekul air, kemudian dipisahkan preparasi pada ligan alami dan protein. Kemungkinan dilakukan preparasi meliputi penambahan atom hidrogen dan penambahan muatan parsial.

Selanjutnya dilakukan validasi metode *docking* protein target yaitu COX-2, menggunakan *software MGL Tools* versi 1.5.6 yang telah dilengkapi dengan *AutoDock Tools* versi 4.2. Setelah divalidasi, dilakukan simulasi *docking* antara COX-2 dengan senyawa S-Allylcystein (SAC), S-allil merkaptosistein (SAMC), Allicin, Alliin, Diallyl disulfide, Diallyl trisulfide, dan S-Allylmercaptogluthathione menggunakan *software MGL Tools* versi 1.5.6 dan *software AutoDock Tools* versi 4.2. Kemudian dianalisis hasil *docking* menggunakan *software BIOVIA Discovery Studio Visualizer* versi 2019.

Hasil prediksi toksisitas dilakukan menggunakan *software Toxtree* versi 3.1.0 dengan menggunakan 3 parameter yaitu, pertama *Cramer Rules* dimana digunakan untuk melihat tingkatan toksisitas dilihat dari gugus fungsinya, kedua *kroes TTC decision tree* dimana untuk memperkirakan ambang batas paparan senyawa obat pada manusia, dan ketiga *Benigni* atau

Bossa rulebase dimana untuk mengetahui apakah senyawa tersebut dapat menyebabkan karsinogenesis dan mutagenesis.

C. Hasil Penelitian dan Pembahasan

Pencarian Data Aktivitas Biologi

Data aktivitas biologi senyawa S-Allylcystein (SAC) memiliki aktivitas terhadap sel kanker kolorektal hal ini dapat dibuktikan pada salah satu jurnal penelitian yang menunjukkan bahwa senyawa organosulfur yaitu S-Allylcystein (SAC) memiliki aktivitas terhadap penghambatan sel kanker kolorektal. Dalam hal ini, bawang putih adalah tumbuhan yang telah menunjukkan kemopreventif kanker yang kuat dan memiliki khasiat antikanker terhadap berbagai penyakit berbahaya termasuk kanker kolorektal. Senyawa organosulfur pada bawang putih sangat berefek pada proliferasi sel, kinetika siklus sel, dan apoptosis di dalam sel kanker kolon yang ditandai dengan baik yaitu pada sel HT-29 dan SW-480 yang merupakan termasuk sel Widr (sel kanker kolon manusia) (Shirin *et al.*, 2001).

Penentuan data biologi yang digunakan pada penelitian kali ini berdasarkan jurnal acuan yang telah menunjukkan hasil aktivitas senyawa organosulfur terhadap penghambatan sel kanker kolorektal secara *in-vitro*, dan pada penelitian ini saya mengambil beberapa senyawa lain organosulfur yaitu S-allil merkaptosistein (SAMC), Allicin, Alliin, Diallyl disulfide, Diallyl trisulfide, dan S-Allylmercaptogluthione sebagai pembanding S-Allylcystein (SAC) terhadap sel kanker kolorektal.

Parameter Sifat Fisikokimia Lipofilisitas ($^{\circ}\log P$)

Tabel V.1. Parameter fisikokimia lipofilisitas ($^{\circ}\log P$)

No.	Nama Senyawa	Lipofilisitas (ClogP)
1.	S-Allylcystein (SAC)	-1,19
2.	S-allil merkaptosistein (SAMC)	-1,51
3.	Allicin	1,9
4.	Alliin	-2,7
5.	Diallyl disulfide	3,29
6.	Diallyl trisulfide	3,72
7.	S-Allylmercaptogluthione	-1,26
8.	S58701 (Ligan Alami)	4,73

Dari hasil data **Tabel V.1**, menunjukkan bahwa ketujuh senyawa uji dan ligan alami S58 memiliki lipofilisitas yang baik, yaitu dengan nilai lipofilisitas dibawah 5 berdasarkan acuan *Lipinski rule of five* (Barret., 2018). Dari data yang dihasilkan dapat dilihat bahwa senyawa Alliin memiliki nilai koefisien partisi yang menunjukkan lipofilisitas paling baik diantara 6 senyawa uji yang lainnya. Jika nilai lipofilisitasnya lebih dari 5 maka senyawa uji akan sulit terlarut dalam lipid serta penembusan senyawa uji ke membran biologis pun akan terhambat dan efeknya senyawa uji akan sulit saat absorpsi-difusi ke membran biologis dan proses metabolisme nya tidak berjalan dengan baik yang menyebabkan efek toksisitasnya yaitu senyawa uji akan mengendap didalam tubuh (Ruswanto, 2015). Maka dapat dipastikan antara ketujuh senyawa uji yang digunakan pada penelitian ini, senyawa yang paling baik berdasarkan nilai ($^{\circ}\log P$) atau koefisien partisi adalah senyawa Alliin karena memiliki sifat hidrofob dengan nilai koefisien partisinya paling kecil dan memenuhi nilai batas ketentuan dari nilai koefisien partisi seharusnya.

Parameter Sifat Fisikokimia *Molar Refractivity* (MR)

Tabel V.2. Parameter fisikokimia molar refractivity

No.	Nama Senyawa	Molar Refractivity (MR)
1.	S-Allylcystein (SAC)	42,2
2.	S-allil merkaptosistein (SAMC)	49,46
3.	Allicin	45,27
4.	Alliin	42,74
5.	Diallyl disulfide	45,13
6.	Diallyl trisulfide	52,45
7.	S-Allylmercaptogluthione	90,86
8.	S58701 (Ligan Alami)	95,25

Berdasarkan data Tabel V.2, menunjukkan bahwa nilai *molar refractivity* (MR) ketujuh senyawa uji dan ligan alami yang digunakan telah memenuhi persyaratan *Lipinski rule of five* karena memiliki rentang diantara 40-130. Diantara ketujuh senyawa uji tersebut diperoleh nilai *molar refractivity* (MR) yang paling kecil yaitu pada senyawa S-Allylcystein (SAC) sebesar 42,2. Karena jika semakin kecil nilai MR maka semakin kecil pula efek steriknya, sehingga interaksi senyawa uji terhadap reseptornya menjadi lebih baik (Syahputra, dkk., 2014). Sehingga semakin besar nilai MR maka akan berpengaruh terhadap proses absorpsi atau permeabilitas yang menjadi kurang baik (Ruswanto, 2015).

Parameter Sifat Fisikokimia Bobot Molekul (BM)

Tabel V.3. Parameter fisikokimia bobot molekul

No.	Nama Senyawa	Bobot Molekul (BM)
1.	S-Allylcystein (SAC)	161,22 g/mol
2.	S-allil merkaptosistein (SAMC)	193,29 g/mol
3.	Allicin	162,27 g/mol
4.	Alliin	177,22 g/mol
5.	Diallyl disulfide	146,27 g/mol
6.	Diallyl trisulfide	178,34 g/mol
7.	S-Allylmercaptogluthione	379,45 g/mol
8.	S58701 (Ligan Alami)	446,24 g/mol

Berdasarkan hasil data **Tabel V.3**, ketujuh senyawa uji dan ligan alami yang digunakan menunjukkan hasil yang baik. Tetapi dari ketujuh senyawa uji tersebut, yang paling baik berdasarkan bobot molekulnya adalah senyawa Diallyl disulfide, karena hasil yang ditunjukkan sangat rendah dibandingkan dengan nilai bobot molekul keenam senyawa uji lainnya dan hasil yang didapat sesuai dengan persyaratan pada *Lipinski rule of five*, yang berarti menunjukkan bahwa bobot molekul Diallyl disulfide ini lebih baik dibandingkan dengan bobot molekul keenam senyawa uji lainnya (Barret., 2018). Karena jika semakin kecil nilai bobot molekul maka semakin mudah senyawa uji untuk menembus membran dan proses absorpsi senyawa uji akan semakin cepat untuk mencapai tempat kerjanya, sehingga senyawa uji akan menjadi lebih efektif (Ruswanto, 2015).

Parameter Sifat Fisikokimia Donor dan Akseptor Ikatan Hidrogen

Tabel V.4. Parameter fisikokimia Donor dan Akseptor Ikatan Hidrogen

No.	Nama Senyawa	Jumlah Donor Ikatan Hidrogen	Jumlah Akseptor Ikatan Hidrogen
1.	S-Allylcystein (SAC)	2	3
2.	S-allil merkaptosistein (SAMC)	1	2
3.	Allicin	0	1
4.	Alliin	2	4
5.	Diallyl disulfide	0	0
6.	Diallyl trisulfide	0	0
7.	S-Allylmercaptogluthathione	5	7
8.	S58701 (Ligan alami)	1	7

Berdasarkan hasil data **Tabel V.4**, dari ketujuh senyawa uji dan ligan alami yang digunakan menunjukkan hasil yang baik dan memenuhi syarat *Lipinski rule of five* karena masih memenuhi rentang untuk Ikatan Hidrogen Donor ≤ 5 dan untuk ikatan Hidrogen Akseptor ≤ 10 . Tetapi dari ketujuh senyawa uji tersebut, yang paling baik berdasarkan Ikatan hidrogen donor dan ikatan hidrogen akseptornya adalah senyawa S-Allylmercaptogluthathione, karena hasil yang ditunjukkan memiliki Ikatan hidrogen donor dan akseptor yang lebih banyak dibandingkan dengan keenam senyawa uji lainnya sehingga semakin tinggi kapasitas ikatan hidrogennya, maka dari itu semakin tinggi juga energi yang dibutuhkan agar proses absorpsi dapat terjadi dan menyebabkan prosesnya lebih efektif atau lebih efisien (Lipinski, dkk., 1997).

Optimasi Geometri

Tahap selanjutnya dilakukan optimasi geometri pada ketujuh senyawa uji yaitu S-Allylcystein (SAC), S-allil merkaptosistein (SAMC), Allicin, Alliin, Diallyl disulfide, Diallyl trisulfide, dan S-Allylmercaptogluthathione, dimana optimasi ini bertujuan untuk memperoleh konformasi struktur yang paling baik. Optimasi dilakukan dengan menggunakan *software Gauss View* versi 5.0.8 dan *Gaussian* versi 09 dengan menggunakan metode *Density Functional Theory* (DFT) basis set 3-21G. Berdasarkan proses optimasi ini, didapatkan hasil berupa energi total terendah dan analisis homo lumo.

Penentuan Energi Total

Tabel V.5. Data Energi Total

No.	Nama Senyawa	Energi Total (kJ/mol)
1.	S-Allylcystein (SAC)	-834,24 kJ/mol
2.	S-allil merkaptosistein (SAMC)	-1230,49 kJ/mol
3.	Allicin	-1100,53 kJ/mol
4.	Alliin	-908,97 kJ/mol
5.	Diallyl disulfide	-1025,79 kJ/mol
6.	Diallyl trisulfide	-1422,02 kJ/mol
7.	S-Allylmercaptogluthathione	-1909,93 kJ/mol

Berdasarkan data **Tabel V.5**, dari hasil optimasi geometri diatas menunjukkan bahwa senyawa S-Allylmercaptogluthathione memiliki energi total dengan nilai terkecil yaitu sebesar -1909,93 kJ/mol yang menunjukkan bahwa senyawa S-Allylmercaptogluthathione memiliki konformasi paling stabil dibandingkan dengan keenam senyawa uji lainnya yaitu S-Allylcystein (SAC), S-allil merkaptosistein (SAMC), Allicin, Alliin, Diallyl disulfide, dan Diallyl trisulfide yang memiliki nilai yang lebih besar sehingga konformasi yang dihasilkan pada senyawa tersebut kurang stabil. Karena semakin stabil ikatan maka toksisitasnya akan semakin rendah (Li, dkk., 2004).

Analisis Homo Lumo

Tabel V.6. Data HOMO-LUMO

No.	Nama Senyawa	HOMO	LUMO	HOMO-LUMO
1.	S-Allylcystein (SAC)	-0,216	-0,007	0,209
2.	S-allil merkaptosistein (SAMC)	-0,238	-0,076	0,162
3.	Allicin	-0,232	-0,103	0,129
4.	Alliin	-0,210	-0,011	0,199
5.	Diallyl disulfide	-0,237	-0,070	0,167
6.	Diallyl trisulfide	-0,238	-0,090	0,148
7.	S-Allylmercaptogluthathione	-0,204	-0,070	0,134

Berdasarkan data **Tabel IV.6**, dari hasil optimasi geometri yang paling baik yaitu senyawa uji Allicin karena memiliki nilai selisih HOMO-LUMO sebesar 0,129 dimana nilai tersebut lebih rendah dibandingkan dengan keenam senyawa uji lainnya. Jika dibandingkan dengan keenam senyawa uji lainnya, senyawa uji Allicin memiliki konformasi yang paling stabil karena memiliki nilai selisih energi Homo-lumo yang kecil. Karena jika selisih energi HOMO-LUMO nya terlalu besar maka akan menyebabkan aktivitasnya terlalu kuat, sehingga senyawa obat akan mudah di metabolisme oleh tubuh, serta dapat menimbulkan efek obat yang sulit untuk dikontrol (Bi, dkk., 2014).

Preparasi Struktur Makromolekul

Tahap selanjutnya dilakukan pengunduhan makromolekul reseptor Siklooksigenase-2 (COX-2) dari data base situs resmi yaitu www.rcsb.org (*Protein Data Bank*) dengan kode PDB 6COX yang akan digunakan untuk tahap selanjutnya yaitu pada proses validasi metode *docking*. Alasan digunakannya reseptor Siklooksigenase-2 (COX-2) karena reseptor Siklooksigenase-2 (COX-2) ini merupakan reseptor spesifik pada kanker kolorektal, sehingga diharapkan senyawa yang nantinya diuji dapat berikatan dengan reseptor untuk mengobati penyakit kanker kolorektal itu sendiri.

Setelah dilakukan pengunduhan reseptor tersebut, makromolekul tersebut dibuka dengan menggunakan *software* BIOVIA *Discovery Studio* Visualizer 2019. Tetapi pada saat diunduh dari data base situs resmi www.rcsb.org (*Protein Data Bank*), makromolekul tersebut banyak mengandung molekul air sehingga perlu dilakukan penghapusan molekul air agar tidak mengganggu proses *docking*. Kemudian dilakukan preparasi menggunakan *software* *Autodock Tools* versi 4.2 meliputi penambahan atom hidrogen, dimana penambahan atom hidrogen hidrogen itu sendiri bertujuan untuk melengkapi hidrogen pada strukturnya karena pada saat makromolekul tersebut di download atom hidrogennya belum lengkap. Selanjutnya

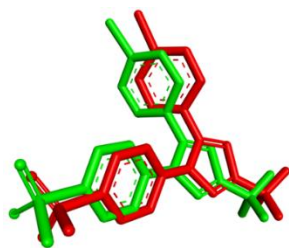
ditambahkan muatan parsial yang bertujuan untuk menetralkan muatan yang terkandung pada reseptor tersebut.

Validasi Metode Docking

Tahap selanjutnya dilakukan validasi dengan tujuan untuk mengkalibrasi metode docking. Proses validasi dilakukan pada kondisi tanpa air untuk meminimalisir pengaruh keberadaan air terhadap proses docking. Keberadaan air sangat mencerminkan kondisi fisiologis tubuh. Secara teoritis, air akan menghalangi ikatan ligan dengan reseptornya karena air dapat membentuk ikatan hidrogen dengan reseptor. Proses validasi dilakukan untuk mendapatkan aplikasi penambatan yang sesuai dengan cara melakukan pengamatan hasil nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*) antara ligan dengan protein target. Nilai RMSD merupakan jarak yang ditimbulkan akibat interaksi antar ligan internal dengan protein target mulai dari nilai paling rendah sampai paling tinggi. Semakin kecil nilai RMSD maka semakin baik dengan ketentuan spesifik nilai $\text{RMSD} \leq 2\text{\AA}$. Nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*) sangat dipengaruhi juga oleh resolusi protein reseptor dan metode pemodelan reseptor yang digunakan. Proses validasi dilakukan pada binding site pocket ligan dengan 100 kali replikasi. Semakin banyak replikasi yang dilakukan maka semakin baik aplikasi tersebut digunakan untuk penambatan (Muchtaridi et al., 2018).

Reseptor yang digunakan yaitu reseptor Siklooksigenase-2 (COX-2) yang telah diunduh pada situs resmi www.rcsb.org (*Protein Data Bank*). Ukuran grid box yang digunakan pada proses validasi metode docking ini dengan ukuran grid box.

Hasil Validasi Metode Docking



Gambar V.1. Visualisasi ligand alami Sebelum (merah) dan Sesudah (hijau) dilakukan validasi

Tabel V.7. Hasil Validasi Metode Docking (Tabel RMSD)

Rank	Sub-Rank	Run	Binding Energy	Cluster RMSD	Reference RMSD	Grep Pattern
1	1	10	-10,73	0,00	0,82	RANKING
1	2	58	-10,72	0,02	0,82	RANKING
1	3	46	-10,72	0,08	0,78	RANKING
1	4	65	-10,72	0,07	0,79	RANKING
1	5	98	-10,72	0,11	0,76	RANKING
1	6	18	-10,72	0,03	0,81	RANKING
1	7	28	-10,72	0,07	0,81	RANKING
1	8	27	-10,72	0,08	0,78	RANKING
1	9	72	-10,72	0,07	0,79	RANKING
1	10	20	-10,72	0,05	0,80	RANKING

Berdasarkan **Tabel V.8**, nilai RMSD yang didapat pada proses validasi penelitian ini

adalah 0,82 Å dimana, nilai RMSD yang dihasilkan dibawah nilai ketentuan dari nilai RMSD yaitu ≤ 2 angstrom. Berdasarkan hasil yang didapat dari hasil validasi ini yaitu dapat dipastikan bahwa metode yang digunakan bersifat valid atau memenuhi syarat seharusnya, nilai RMSD menunjukkan bahwa posisi ligan yang diperkirakan semakin baik karena semakin mendekati konformasi asal. Dan juga diperoleh nilai *binding energy* sebesar -10,73 dimana nilai *binding energy* yang diperoleh kecil, sehingga ikatan antara ligan dan reseptornya semakin baik dan semakin stabil.

Berdasarkan gambar hasil visualisasi validasi metode *docking* ini dapat dinyatakan bahwa validasi yang dilakukan mendapat hasil yang baik dan metode yang digunakan sudah valid. Dapat dilihat pada gambar visualisasi validasi bahwa jarak antara ligand alami dan ligand hasil *docking* yaitu 0,82 Å, dan tidak lebih dari 2 angstrom.

Simulasi *Docking* Senyawa Uji

Tabel V.8. Hasil Simulasi Docking Senyawa Uji

No.	Nama Senyawa	Nilai Binding Energi (ΔG) (Kcal/mol)	Nilai Konstanta Inhibisi (K _i) [μM (micromolar)]
1.	S-Allylcystein (SAC)	-4,11 kcal/mol	972,27 μM
2.	S-allil merkaptosistein (SAMC)	-4,90 kcal/mol	255,74 μM
3.	Allicin	-3,14 kcal/mol	5030 μM
4.	Alliin	-4,49 kcal/mol	509,89 μM
5.	Diallyl disulfide	-3,85 kcal/mol	1500 μM
6.	Diallyl trisulfide	-4,50 kcal/mol	502,10 μM
7.	S-Allylmercaptogluthathione	-7,53 kcal/mol	3,01 μM
8.	S58701 (Ligan Alami)	-10,73 kcal/mol	0,0137 μM

Berdasarkan **Tabel V.9** data hasil simulasi *docking* senyawa uji diatas, menunjukkan bahwa nilai energi ikatan yang paling baik diantara ketujuh senyawa uji diatas adalah senyawa S-Allylmercaptogluthathione karena senyawa S-Allylmercaptogluthathione memiliki nilai energi ikatan yang paling kecil dengan nilai energi ikatan sebesar -7,53 kcal/mol, yang artinya bahwa ikatan senyawa S-Allylmercaptogluthathione dengan reseptor siklooksigenase-2 (COX-2) ini memiliki ikatan yang semakin stabil dibandingkan dengan keenam senyawa lainnya tetapi masih lebih tinggi dari ligan alaminya. Sedangkan jika dilihat dari data nilai Konstanta Inhibisi (K_i) terlihat bahwa senyawa S-Allylmercaptogluthathione memiliki nilai konstanta inhibisi yang paling kecil dibandingkan dengan keenam senyawa uji lainnya, dengan nilai K_i sebesar 3,01 μM yang artinya bahwa senyawa S-Allylmercaptogluthathione mempunyai ikatan yang semakin stabil dibandingkan dengan keenam senyawa uji lainnya yaitu S-Allylcystein (SAC), S-allil merkaptosistein (SAMC), Allicin, Alliin, Diallyl disulfide, dan Diallyl trisulfide tetapi masih lebih tinggi dari ligan alaminya.

Analisis Hasil *Docking*

Interaksi senyawa uji organosulfur terhadap sisi aktif reseptor COX-2 bertujuan untuk mengetahui lebih jauh mengenai karakteristik dari area pengikatan senyawa uji organosulfur terhadap reseptor COX-2. Berikut ini tabel interaksi senyawa uji organosulfur dan ligan alami S58 (1-Phenylsulfonamide-3-Trifluoromethyl-5-Parabromo phenylpyrazole) terhadap reseptor yang berisi residu asam amino, tipe ikatan dan jarak interaksi.

Tabel V.9. Interaksi senyawa S-Allylcystein (SAC) terhadap reseptor COX-2

No.	Residu Asam Amino	Tipe Ikatan	Jarak (Å)
1.	LEU352	Ikatan Hidrogen	2,02779
2.	LEU352	Ikatan Hidrogen	2,23675
3.	HIS90	Ikatan Hidrogen	2,87719
4.	SER353	Ikatan Hidrogen	2,01817
5.	LEU384	Interaksi Hidrofobik	4,80927
6.	MET522	Interaksi Hidrofobik	4,48607
7.	TRP387	Interaksi Hidrofobik	4,96554

Tabel V.10. Interaksi senyawa S-Alлил merkaptosistein (SAMC) terhadap reseptor COX-2

No.	Residu Asam Amino	Tipe Ikatan	Jarak (Å)
1.	ILE517	Ikatan Hidrogen	3,08261
2.	PHE518	Ikatan Hidrogen	2,69486
3.	GLN192	Ikatan Hidrogen	2,90039

Tabel V.11. Interaksi senyawa Allicin terhadap reseptor COX-2

No.	Residu Asam Amino	Tipe Ikatan	Jarak (Å)
1.	GLN192	Ikatan Hidrogen	1,97954
2.	LEU352	Ikatan Hidrogen	1,74831
3.	PHE518	Ikatan Hidrogen	2,16523

Tabel V.12. Interaksi senyawa Alliin terhadap reseptor COX-2

No.	Residu Asam Amino	Tipe Ikatan	Jarak (Å)
1.	LEU352	Ikatan Hidrogen	1,75718
2.	GLN192	Ikatan Hidrogen	2,10093
3.	PHE518	Ikatan Hidrogen	2,08312

Tabel V.13. Interaksi senyawa Diallyl disulfide terhadap reseptor COX-2

No.	Residu Asam Amino	Tipe Ikatan	Jarak (Å)
1.	ALA516	Interaksi Hidrofobik	3,57403
2.	LEU384	Interaksi Hidrofobik	4,61824
3.	MET522	Interaksi Hidrofobik	4,31556
4.	ARG513	Interaksi Hidrofobik	3,55415
5.	VAL523	Interaksi Hidrofobik	4,62967
6.	TRP387	Interaksi Hidrofobik	5,40339
7.	TRP387	Interaksi Hidrofobik	4,93053

Tabel V.14. Interaksi senyawa Diallyl trisulfide terhadap reseptor COX-2

No.	Residu Asam Amino	Tipe Ikatan	Jarak (Å)
1.	VAL349	Interaksi Hidrofobik	4,11835
2.	LEU352	Interaksi Hidrofobik	4,84189
3.	VAL523	Interaksi Hidrofobik	3,78038
4.	TYR348	Interaksi Hidrofobik	4,63921
5.	PHE518	Interaksi Hidrofobik	4,72763

Tabel V.15. Interaksi senyawa S-Allylmercaptogluthione terhadap reseptor COX-2

No.	Residu Asam Amino	Tipe Ikatan	Jarak (Å)
1.	ARG120	Ikatan Hidrogen	3,02126
2.	ARG120	Ikatan Hidrogen	3,03253
3.	ARG120	Ikatan Hidrogen	3,38823
4.	TYR355	Ikatan Hidrogen	2,85686
5.	TYR355	Ikatan Hidrogen	3,10919
6.	GLN192	Ikatan Hidrogen	2,05715
7.	LEU352	Ikatan Hidrogen	1,7238
8.	PHE518	Ikatan Hidrogen	2,22052
9.	TYR355	Ikatan Hidrogen	2,12185
10.	MET522	Interaksi Hidrofobik	4,12456
11.	TRP387	Interaksi Hidrofobik	5,20275
12.	PHE518	Interaksi Hidrofobik	3,5856

Tabel V.16. Interaksi senyawa S58 (Ligan Alami) terhadap reseptor

No.	Residu Asam Amino	Tipe Ikatan	Jarak (Å)
1.	ARG120	Ikatan Hidrogen	3,11915
2.	PHE518	Ikatan Hidrogen	3,03967
3.	GLN192	Ikatan Hidrogen	3,09825
4.	SER353	Ikatan Hidrogen	3,57687
5.	ARG120	Elektrostatik	4,79554
6.	SER353	Interaksi Hidrofobik	3,70466
7.	VAL523	Interaksi Hidrofobik	3,65668
8.	VAL523	Interaksi Hidrofobik	3,69646
9.	LEU384	Interaksi Hidrofobik	4,6375
10.	MET522	Interaksi Hidrofobik	4,7958
11.	VAL349	Interaksi Hidrofobik	4,82968
12.	LEU359	Interaksi Hidrofobik	4,77337
13.	TYR355	Interaksi Hidrofobik	4,94525
14.	TRP387	Interaksi Hidrofobik	5,38263
15.	TRP387	Interaksi Hidrofobik	4,79822
16.	VAL349	Interaksi Hidrofobik	5,02386
17.	ALA527	Interaksi Hidrofobik	4,30989
18.	VAL523	Interaksi Hidrofobik	5,18195
19.	ALA527	Interaksi Hidrofobik	4,54196

Berdasarkan **Tabel V.10**, **Tabel V.11**, **Tabel V.12**, **Tabel V.13**, **Tabel V.14**, **Tabel V.15**, **Tabel V.16**, dan **Tabel V.17** yang menghasilkan interaksi masing-masing yang terdiri dari interaksi senyawa uji S-Allylcystein (SAC) terhadap reseptor yaitu tujuh interaksi, interaksi senyawa uji S-Allyl merkaptosistein (SAMC) terhadap reseptor yaitu tiga interaksi, interaksi senyawa uji Allicin terhadap reseptor yaitu tiga interaksi, interaksi senyawa uji Alliin terhadap reseptor yaitu tiga interaksi, interaksi senyawa uji Diallyl disulfide terhadap reseptor yaitu lima interaksi, interaksi senyawa uji Diallyl trisulfide terhadap reseptor yaitu tujuh interaksi, interaksi senyawa uji S-Allylmercaptogluthione terhadap reseptor yaitu dua belas interaksi, dan interaksi ligan alami S58 (1-Phenylsulfonamide-3-Trifluoromethyl-5-Parabromophenylpyrazole) terhadap reseptor yaitu sembilan belas interaksi. Dari ketujuh senyawa uji

tersebut menunjukkan interaksi yang sama yaitu 2 ikatan hidrogen (GLN192, dan PHE518) serta 4 interaksi hidrofobik (LEU384, MET522, TRP387, dan VAL523). Dari hasil interaksi diatas dapat diprediksi semua asam amino yang ada pada senyawa ligan alami S58 (1-Phenylsulfonamide-3-Trifluoromethyl-5-Parabromo phenylpyrazole) dan ketujuh senyawa uji organosulfur berperan sebagai penyusun sisi aktif dari reseptor COX-2 sebagai makromolekul target. Dimana senyawa uji S-Allylmercaptogluthione memiliki interaksi paling banyak diantara keenam senyawa uji organosulfur lainnya yaitu sebanyak dua belas interaksi, namun interaksinya tidak lebih banyak dari ligan alami S58. Karena semakin banyak interaksi yang terjadi maka kestabilan konformasi struktur senyawa dengan reseptornya semakin baik.

Prediksi Toksisitas

Tabel V.17. Parameter Prediksi Toksisitas Senyawa S-Allylcystein (SAC)

Parameter	S-Allylcystein (SAC)
Cramer Rules	High (Class III)
Kroes TTC	Substance would not be expected
Decision Tree	to be a safety concern
Benigni / Bossa rulebase	Negative for genotoxic and nongenotoxic carcinogenicity

Tabel V.18. Parameter Prediksi Toksisitas Senyawa S-allil merkaptosistein (SAMC)

Parameter	S-Allil merkaptosistein (SAMC)
Cramer Rules	High (Class III)
Kroes TTC	Substance would not be expected
Decision Tree	to be a safety concern
Benigni / Bossa rulebase	Negative for genotoxic and nongenotoxic carcinogenicity

Tabel V.19. Parameter Prediksi Toksisitas Senyawa Allicin

Parameter	Allicin
Cramer Rules	High (Class III)
Kroes TTC	Substance would not be expected
Decision Tree	to be a safety concern
Benigni / Bossa rulebase	Negative for genotoxic and nongenotoxic carcinogenicity

Tabel V.20. Parameter Prediksi Toksisitas Senyawa Alliin

Parameter	Alliin
Cramer Rules	High (Class III)
Kroes TTC	Substance would not be expected
Decision Tree	to be a safety concern
Benigni / Bossa rulebase	Negative for genotoxic and nongenotoxic carcinogenicity

Tabel V.21. Parameter Prediksi Toksisitas Senyawa Diallyl disulfide

Parameter	Diallyl disulfide
Cramer Rules	High (Class III)
Kroes TTC	Substance would not be expected
Decision Tree	to be a safety concern
Benigni /	Negative for genotoxic and
Bossa rulebase	nongenotoxic carcinogenicity

Tabel V.22. Parameter Prediksi Toksisitas Diallyl trisulfide

Parameter	Diallyl trisulfide
Cramer Rules	High (Class III)
Kroes TTC	Substance would not be expected
Decision Tree	to be a safety concern
Benigni /	Negative for genotoxic and
Bossa rulebase	nongenotoxic carcinogenicity

Tabel V.23. Parameter Prediksi Toksisitas S-Allylmercaptogluthathione

Parameter	S-Allylmercaptogluthathione
Cramer Rules	High (Class III)
Kroes TTC	Substance would not be expected
Decision Tree	to be a safety concern
Benigni /	Negative for genotoxic and
Bossa rulebase	nongenotoxic carcinogenicity

Berdasarkan hasil prediksi toksisitas dari ketujuh senyawa uji yang digunakan yaitu S-Allylcystein (SAC), S-allil merkaptosistein (SAMC), Allicin, Alliin, Diallyl disulfide, Diallyl trisulfide, dan S-Allylmercaptogluthathione dengan parameter *Cramer rules* didapatkan hasil bahwa ketujuh senyawa uji memiliki klasifikasi toksisitas pada kelas 3, yang artinya bahwa ketujuh senyawa tersebut memiliki toksisitas yang besar. Selanjutnya untuk parameter *Benigni* atau *Bossa rulebase*, didapatkan hasil bahwa senyawa S-Allylcystein (SAC), S-allil merkaptosistein (SAMC), Allicin, Alliin, Diallyl disulfide, Diallyl trisulfide, dan S-Allylmercaptogluthathione tidak bersifat karsinogenik. Sedangkan berdasarkan parameter *Kroes TTC decision Tree* yang berfungsi untuk memperkirakan ambang batas paparan senyawa obat pada manusia, didapatkan hasil bahwa senyawa S-Allylcystein (SAC), S-allil merkaptosistein (SAMC), Allicin, Alliin, Diallyl disulfide, Diallyl trisulfide, dan S-Allylmercaptogluthathione tidak mengandung asupan melebihi ambang batas paparan senyawa obat pada manusia.

D. Kesimpulan

Berdasarkan pembahasan dalam penelitian ini, peneliti menyimpulkan beberapa hasil

penelitian sebagai berikut:

1. Senyawa uji S-Allylmercaptogluthione memiliki afinitas yang lebih baik dibandingkan dengan keenam senyawa uji lainnya. Senyawa uji S-Allylmercaptogluthione diperoleh nilai energi bebas ikatan yaitu -7,53 kcal/mol dan nilai konstanta inhibisi (K_i) 3,01 μ M.
2. Hasil prediksi toksisitas S-Allylmercaptogluthione memiliki potensi toksisitas yang tinggi, berada dalam ambang batas paparan dengan risiko paparan yang masih rendah serta tidak dapat menyebabkan karsinogenik atau mutagenisitas.
3. Senyawa uji S-Allylmercaptogluthione tidak lebih baik dibandingkan dengan ligan alaminya. Dimana ligan alami S58 memiliki nilai energi bebas ikatan yaitu -10,73 kcal/mol dan nilai konstanta inhibisi (K_i) 0,0137 μ M.
4. Senyawa uji S-Allylmercaptogluthione tidak dapat dijadikan sebagai kandidat antikanker kolorektal, karena tidak memiliki aktivitas antikanker.

Acknowledge

Berisi ucapan terima kasih kepada pihak-pihak terkait yang membantu penelitian Anda.

Daftar Pustaka

- [1] Aust DE, Terdiman JP, Willenbacher RF, et al., (2002). *The APC/ β -Catenin Pathway in Ulcerative Colitis-Related Colorectal Carcinomas*. Cancer. 94:1421-7
- [2] Brown, JR, DuBois RN. *COX-2: A Molecular Target for Colorectal Cancer Prevention*; J Clin Oncol. (2005); 23:2840-55.
- [3] Barret, R. (2018). *In Therapeutical Chemistry*. Lipinski's Rule of Five.
- [4] Global Cancer Observatory. (2018). *Breast Cancer Facts and Figure*. Jakarta.
- [5] Geisslinger, G., Schiffmann, S., Maier, TJ., and Grosh, S. (2006). *Cyclooxygenase-2 (COX2)-Independent Anticarcinogenic Effect of selective COX-2 Inhibitor*. Journal of National Cancer Institute, 98(11): 736-747
- [6] Giovannetti, E., et al. (2007). *Changes in the status of p53 affect drug sensitivity to thymidylate synthase (TS) inhibitors by altering TS levels*. British Journal of Cancer, 96(5), pp. 769–775.
- [7] Ishikawa H, saeki T, Otani T, Suzuki T, Shimozuma K, Nishino H, Fukuda S, Morimoto K. (2006). *Aged garlic extract prevents a decline of NK Cell Number and Activity in Patients with Advanced Cancer*. J Nutr, 136: 816S-820S.
- [8] Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. (1997). *Experimental and Computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Adv Drug Deliv. Rev. 23, hal 3-25.
- [9] Li; Qian-Shu; Xu, Xiu-Dong; Zhang S. (2004). *Predicting Energies and Geometries for Reaction Involved in Atmosphere Chemistry: A Comparison Study Between Hybrid DFT Methodes*. J. Chem. Phy.
- [10] Muchtaridi., A. Yanuar., S. Megantara dan H. Purnomo. (2018). *Kimia Medisinal: Dasar-dasar dalam perancangan obat Edisi pertama*. Jakarta: Prenadamedia group.
- [11] Phosrithong N dan Ungwitayatorn J. (2010). *Molecular docking study on anticancer activity of plant-derived natural products*. Medicinal Chemistry Research 19: 817-835.
- [12] Ruswanto; Mardhiah; Mardianingrum, R.; & Novitriani, K. (2015). *Sintesis dan Studi In Silico Senyawa 3-Nitro-N'-[(Pyridin-4-YL) Carbonyl] Benzohydrazide Sebagai Kandidat Antituberkulosis*. STIKES Bakti Tunas Huasada.
- [13] Shirin, H., J.T. Pinto, Y Kawabata, J.W Soh, T. Dolohery, S.F. Moss, V. Murty, R.S.Rivlin, P.R.Holt, dan I.B. Weinstein. (2001). *Antiproliferative Effect of S-Allylmercaptocysteine on Collon Cancer Cells When Tested Alone or in Combination with Sulindac Sulfide*. Cancer Research 61:725-731.

- [14] Syahputra, G.; Ambarsari, L.; Sumaryada, T. (2014). *Simulasi Docking kurkumin Enol, Bisdemetoksikurkumin dan Analognya Sebagai Inhibitor Enzim 12-Lipoksigenase*. Jurnal Biofisika 10(1): 55-67.
- [15] Tamba, E. (2012). *Karsinogenesis Kanker Kolorektal, Hubungannya dengan Diet dan Mikroflora Usus*. Jurnal Kedokteran Meditek. 18: 25-34.
- [16] Tanaka SH, Haruma K, Yoshihara M, Kajiyama G, Kira K, Amagase H, Chayama K. (2006). *Aged Garlic Extract Has Potential Suppressive Effect on Colorectal Adenomas in Humans*. J Nutr, 136: 821S-826S.
- [17] Wheeler JMD, Warren BF, Mortensen NJ, et al. *An insight into the genetic pathway of adenocarcinoma of the small intestine*. Gut. (2002);50: 218-23.
- [18] Wu, Q.B. and Sun, G. P. (2015). *Expression of COX-2 and HER-2 in Colorectal Cancer and Their Correlation*. World Journal of Gastroenterology. Edisi 21 hal. 6206-6214.
- [19] Zhang H, Sun XF. *Overexpression of Cyclooxygenase-2 Correlates with Advanced Stages of Colorectal Cancer*. Am J Gastroenterol. (2002); 9:1990-4.