

**PENAMBATAN MOLEKUL SENYAWA VOLATIL EKSTRAK
DIKLOROMETANA SAMBILOTO TERHADAP JALUR PENSINYAL
*EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR***

Muhammad Faisal¹⁾, Nurlaili²⁾, Potchanapond Graidist^{3,4)}, Varomyalin Tipmanee³⁾

¹⁾Departemen Biomedik, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Abdurrah

²⁾Departemen Kimia Sintesis, Program Studi Analisis Kesehatan, Akademi Kesehatan Kartini Batam

³⁾Department of Biomedical Sciences and Engineering, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University

⁴⁾The Excellence Research Laboratory of Cancer Molecular Biology, Prince of Songkla University

email: faisal1310422008@gmail.com

Abstrak

Onkoprotein *Epidermal Growth Factor Receptor* telah banyak dipelajari dalam mengatasi perkembangan sel kanker. Namun hingga kini senyawa penghambat EGFR masih menimbulkan masalah kesehatan lain. Ekstrak tumbuhan dipercaya dapat menjadi penghambat ekspresi EGFR tanpa menimbulkan masalah kesehatan lain. 17 senyawa volatil diketahui terdapat dalam ekstrak diklorometana dari daun *Andrographis paniculata*. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisa interaksi antara senyawa volatil daun *Andrographis paniculata* dari ekstrak diklorometana terhadap jalur pensinyal EGFR. Teknik *in silico* penambatan molekul ligan-reseptor digunakan dalam studi ini. Struktur senyawa volatil diposisikan sebagai ligan, sementara onkoprotein dalam jalur pensinyal EGFR seperti EGFR, PIK3CA, KRAS-GTP, BRAF V600E dan AKT diposisikan sebagai reseptor. PyRx dan *Biovia Discovery Studio* digunakan dalam uji penambatan molekul ini. Sifat-sifat senyawa seperti drug-likeness dan lead-likeness diprediksi oleh web-tool seperti *SwissADME* dan *Pre-ADME/Tox*. Beta-amirin dan stigmasterol menunjukkan energi bebas ikatan yang terkuat pada PIK3CA dan BRAF V600E masing-masingnya. Kedua senyawa tersebut secara struktur menunjukkan sifat *drug-likeness* dan non-mutagenik. Ringkasnya, beta-amirin dan stigmasterol dapat berpotensi menjadi penghambat onkoprotein PIK3CA dan BRAF V600E. Studi *in vitro* dan model hewan perlu dilakukan untuk memvalidasi dosis yang aman dari penggunaan beta-amirin dan stigmasterol.

Kata Kunci: EGFR; Penambatan molekul; Sambiloto; Senyawa volatil

Abstract

EGFR oncoprotein has been commonly studied in combating cell cancer development. However, until this moment the EGFR inhibitors were reported to cause other health issues. Plant extracts are trusted as the potential inhibitor of EGFR expression level without affect our health. We previously observed seventeen volatile compounds in the dichloromethane extract of Andrographis paniculata. Our objective was to analyze the interaction of volatile compounds from the dichloromethane extract of Andrographis paniculata on EGFR signalling pathway. In silico technique with ligand-receptor molecular docking was used in this study. The structure of volatile compounds was set as the ligands. EGFR signalling

pathway such as EGFR, PIK3CA, KRAS-GTP, BRAF V600E, and AKT protein structures were assigned as the receptors. PyRx and Biovia Discovery Studio were used in this docking study. Drug-likeness and lead-likeness properties were appraised by SwissADME and Pre-ADME/Tox web tools. Beta-amyrin and stigmasterol showed the strongest binding affinity to PIK3CA and BRAF V600E, respectively. Those compounds structurally showed drug-likeness and non-mutagenic. Briefly, beta-amyrin and stigmasterol will be potentially used as the inhibitors of selected oncoproteins. In vitro technique and animal model are suggested to be performed to validate the mutagenic mechanisms of beta-amyrin and stigmasterol.

Keywords: Bitter leaves; EGFR, Molecular docking; Volatile compounds

1. PENDAHULUAN

Kasus kematian akibat kanker telah dilaporkan sebanyak hampir 10 juta kasus kematian (IARC, 2020). Secara teori, pembelahan sel dikendalikan oleh dua jenis gen yaitu onkogen dan gen *tumor suppressors*. Onkogen dapat mengekspresikan onkoprotein yang berfungsi dalam menjalankan siklus seluler. Pembelahan sel dikendalikan oleh protein seperti p53 dan pRb yang diekspresi oleh gen tumor *Tumor Suppressor* (Kontomanolis et al., 2020; Vélez-Cruz & Johnson, 2017). Namun, kedua gen tersebut dapat dengan mudah mengalami kerusakan yang disebabkan oleh makanan dan hormon (Dolatkhah et al., 2018). Pertumbuhan sel yang tidak terkontrol dapat menyebabkan masalah pada organ tubuh dikarenakan sel-sel tersebut dapat berkumpul yang disebut sebagai tumor.

Perkembangan sel kanker dipengaruhi oleh berbagai mekanisme molekuler yang berfungsi mengatur laju proliferasi sel. Berbagai jenis gen dilaporkan terlibat dalam perkembangan sel tumor. Salah satu jenis gen tersebut *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR). EGFR adalah sebuah protein transmembran yang berperan sebagai *Receptor Tyrosine Kinase* (RTK). Masalah yang akan timbul apabila protein EGFR ekspresi secara berlebihan yaitu akan menyebabkan gagalnya sel dalam apoptosis, meningkatnya laju proliferasi sel, meningkatkan kecenderungan angiogenesis, dan invasi sel kanker (Wu et al., 2013).

Dalam proses perkembangan sel tumor, onkoprotein EGFR akan mengekspresikan berbagai jenis protein lain. *Growth factor receptor bound protein 2* (Grb2) dan protein *the son of sevenless* (SOS) merupakan dua jenis protein yang

terkoneksi dengan EGFR dalam mengaktifkan sebuah onkoprotein bernama Rat Sarcoma Virus (RAS-GTP) dengan memfosforilasi asam amino tirosin. Aktifnya RAS-GTP mengakibatkan onkoprotein RAF yang mengalami peningkatan perkembangan sel tumor seperti laju proliferasi, survival, angiogenesis, anti-apoptosis, invasi dan metastasis. GRB2 mampu merangsang onkoprotein *phosphatidyl-inositol-3-kinase* (PI3K), yang merupakan salah satu mediator dominan dalam jalur sinyal onkoprotein EGFR. PI3K memiliki dua sub-unit, regulator (p85) dan katalitik (p110). P110 merupakan sub-unit dengan tiga tipe yang berbeda, yaitu tipe alfa (PIK3CA), beta (PIK3CB), dan gama (PIK3CD). Adapun mutasi pada PIK3CA (p110 α) dapat menyebabkan kegagalan pada proses apoptosis. Peran PIK3CA sebagai onkoprotein tidak terlepas dari perannya yang mampu memfosforilasi protein *phosphatidylinositol-4,5-biphosphate* (PIP2) menjadi *phosphatidylinositol-3,4-5-triphosphate* (PIP3) dan mengaktifkan protein AKT (Alqahtani, Ayesh, & Halawani, 2020). Dengan kata lain, mutasi PIK3CA dapat menyebabkan ekspresi berlebihan pada protein AKT/PKB.

Hingga saat ini, peneliti masih melakukan pencarian atas penghambat onkoprotein dengan memadukan ilmu onkologi dan farmakologi. Sebuah penelitian mengungkapkan bahwa anti-EGFR seperti *cetuximab* dapat mengurangi ekspresi EGFR pada pasien dengan ekspresi EGFR yang tinggi. Selain itu, aspirin juga dapat mengatur laju proliferasi, apoptosis dan autofagi sel dengan menghambat enzim *cyclooxygenase-2* (COX-2) dan *prostaglandin E2* (PGE2), kedua protein tersebut merupakan protein yang direkrut oleh PI3K (Chen et al., 2020; Falzone, Salomone, & Libra, 2018; Hamada, Nowak, & Ogino, 2017; Liu, Zhou, Xu, Wang, & Zhang, 2016). Namun ditemukan sebuah dampak toksisitas pada aspirin dan cetuximab (Kwok & Loke, 2010; Pinto et al., 2011).

Penggunaan bahan alam telah banyak dilakukan dalam pengobatan. Dalam dunia teknologi modern, senyawa alam telah dapat diisolasi dan memiliki kecenderungan mampu menyerupai obat sintetik, yang lebih dikenal sebagai struktur analog (Atanasov et al., 2021). Pencarian senyawa obat-obatan hingga saat ini masih menjadi sebuah

permasalahan dikarenakan tingginya harga senyawa kimia yang diperlukan. Terlebih lagi, kegagalan dalam eksperimen yang disebabkan sifat karsinogen dan mutagen pada senyawa tersebut. Oleh karena itu, perlu dilakukan skrining molekul secara virtual dengan metode penambatan molekul. Metode penambatan molekul merupakan salah satu pendekatan dengan bantuan komputer dengan menggunakan struktur 3 dimensi dari senyawa kimia dan protein-protein yang tersedia dalam sebuah database (Luo, Xie, & Marmorstein, 2008). Penelitian kami sebelumnya mengenai ekstrak daun sambiloto ternyata menghasilkan kesimpulan bahwa ekstrak diklorometana dari daun sambiloto dapat menghambat pertumbuhan sel kanker kolorektal (HT-29 dan SW-620) (Faisal et al., 2021). Pada ekstrak tersebut kami mendapatkan 17 senyawa volatil ekstrak diklorometana daun sambiloto. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk menginvestigasi interaksi molekul antara 17 senyawa volatil ekstrak diklorometana daun sambiloto dengan protein-protein yang terlibat dalam jalur onkoprotein EGFR, seperti EGFR, PI3K, KRAS-GTP, BRAF V600E dan AKT secara visual dengan menggunakan PyRx dan *Biovia Discovery Studio*.

2. METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan pada bulan November – Desember 2021, dengan menggunakan netbook dengan prosesor AMD A6-9225 RADEON R4, RAM 4.0 GB dengan 5 compute cores 2C+3G, Sistem Operasi Windows® 64-bit. Software yang digunakan dalam penambatan molekul dan visualisasinya adalah PyRx versi 0.8 (Python) dan *Biovia Discovery Studio Client 2021* (Dassault Systemès). Web-tool yang digunakan dalam mendukung penelitian ini adalah Swiss ADME, Pre-ADME/Tox, Pubchem, MolView dan RCSB (*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics PDB*). Penelitian ini dilakukan dengan metode uji *molecular docking* antara struktur reseptor dengan ligan.

Struktur reseptor didapatkan di *Protein Data Bank* database (<https://www.rcsb.org>). Penelitian ini menggunakan struktur onkoprotein yaitu EGFR [PDB ID: 5GNK] (Wang et al., 2017), PIK3CA [PDB ID: 3HHM] (Mandelker et al.,

2009), KRAS (KRAS-GTP) [PDB ID: 4LDJ] (Hunter et al., 2014), BRAF V600E [PDB ID: 4XV2] (Zhang et al., 2015) dan AKT [PDB ID: 6NPZ] (Chu et al., 2018). Struktur protein dibersihkan dari molekul lain termasuk ligan alami dan air dengan program *Biovia Discovery Studio Client 2021* (Dassault Systemès).

Sedangkan struktur ligan didapatkan dengan mengunduh ekstensi .sdf melalui database *National Library of Medicine National Center of Biotechnology Information* (NLM-NCBI) (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), 1-heptatriakotanol, (6beta,17beta)-dihidroksiandrosta-1,4,3-dien-3-on, clonasterol, asam palmitat, neophytadiena, stigmasterol, 6,10,14-trimetil-2-pentadekanon, 1,2-asam benzendikarboksilat, bis(2-etilheksil) ester, alfa-tokoferol, 2-metiltetradekanal, trikosan, beta-amirin, 2-oktilakrolein, oktadekana, 2-asam oksobutanoat neopentil ester, 3,7-dimetil-2,3-epoksioktanal, dan alkohol furfural. Sebagai pembanding, inhibitor komersial pada tiap protein diunduh seperti anti-EGFR (*vandetanib*, *mocertinib* dan *dacomitinib*), anti-PIK3CA (*copanlisib*, *idelalisib* dan *umbralisib*), anti-KRAS (*adagrasib* dan *sotorasib*), anti-BRAF (*encorafenib*, *vemurafenib* dan *dabrafenib*) dan anti-AKT (*AKT inhibitor VIII* dan *ipatasertib*).

Semua struktur ligan dioptimisasi dengan metode minimisasi energi dengan formula force-field *Merck Molecular Force-Field* (MMFF94) dan dikonversi ke dalam ekstensi .pdbqt. *Grid box* diatur secara manual. Hasil dari penambatan molekul disimpan dalam ekstensi file .csv. Karakteristik ADMET senyawa diprediksi dengan dan *Pre-ADME/Tox QSARHUB*.

Model konformasi pada tiap interaksi antar molekul dipilih berdasarkan nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD). Model konformasi yang terpilih merupakan model konformasi dengan RMSD terkecil. *Biovia Discovery Studio* digunakan dalam visualisasi interaksi molekul ligan dengan reseptor.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

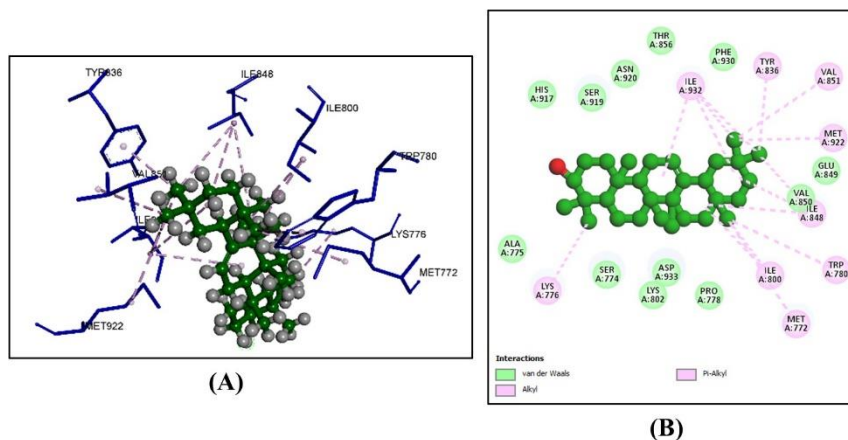
Dalam penelitian kami sebelumnya diidentifikasi 17 senyawa volatil yang terkandung dalam ekstrak diklorometana daun sambiloto yang diidentifikasi dengan instrument *Gas Chromatography-Mass Spectrometer* (GC-MS). Peneliti berhipotesis

bahwa senyawa volatil tersebut berperan dalam mekanisme kerusakan sel kanker. Dalam penelitian ini, seluruh struktur senyawa volatil dianalisis dengan menggunakan metode penambatan molekul. Analisis penambatan molekul saat ini telah menjadi tren dan berperan penting bagi peneliti bidang farmakologi dan biomedis dalam mendesain senyawa yang berpotensi dalam mengatasi permasalahan medis (Pinzi & Rastelli, 2019).

Tabel 1. Energi bebas ikatan interaksi yang terbentuk antara ligan dengan reseptor

No	Senyawa	Energi bebas ikatan (Kkal/mol)				
		EGFR	PIK3CA	KRAS	BRAF	AKT
1	1-heptatriakotanol	-4,0	-4,9	-4,1	-6,3	-5,7
2	(6beta,17beta)-dihidroksiandrosta-1,4,3-dien-3-on	-7,6	-8,1	-7,7	-8,7	-7,9
3	clionasterol	-8,9	-8,1	-7,5	-8,8	-7,7
4	asam palmitat	-5,5	-5,4	-6,0	-5,8	-5,5
5	neophytadiena	-5,0	-5,4	-5,6	-7,2	-5,3
6	stigmasterol	-9,1	-8,2	-8,7	-10,3	-8,1
7	6,10,14-trimetil-2-pentadekanon	-6,1	-5,5	-5,8	-7,2	-6,2
8	1,2-asam benzendikarboksilat, bis(2-etilheksil) ester	-4,6	-6,0	-6,1	-7,8	-6,4
9	alfa-tokoferol	-7,6	-7,3	-7,2	-8,9	-8,6
10	2-metiltetradekanal	-5,4	-4,7	-5,8	-6,3	-5,5
11	trikosan	-6,6	-4,9	-5,2	-6,8	-5,0
12	beta-amirin	-9,1	-10,2	-7,7	-9,4	-9,0
13	oktadekana	-5,5	-5,0	-5,2	-6,2	-5,3
14	2-oktilakrolein	-5,0	-4,8	-5,0	-5,3	-5,0
15	2-asam oksobutanoat neopentil ester	-4,7	-5,6	-5,3	-5,6	-5,3
16	3,7-dimetil-2,3-epoksioktanal	-4,9	-4,6	-5,4	-5,5	-4,9
17	alkohol furfural	-4,0	-4,5	-4,4	-4,4	-4,6
18	Dacomitinib (EGFR inhibitor)	-8,8	-	-	-	-
19	Mobocertinib (EGFR inhibitor)	-8,6	-	-	-	-
20	Vandetanib (EGFR inhibitor)	-9,2	-	-	-	-
21	Copanlisib (PIK3CA inhibitor)	-	-8,7	-	-	-
22	Idelalisib (PIK3CA inhibitor)	-	-8,9	-	-	-
23	Umbralisib (PIK3CA inhibitor)	-	-9,5	-	-	-
24	Adagrasib (KRAS inhibitor)	-	-	-6,9	-	-
25	Sotorasib (KRAS inhibitor)	-	-	-8,1	-	-
26	Encorafenib (BRAF inhibitor)	-	-	-	-8,0	-
27	Vemurafenib (BRAF inhibitor)	-	-	-	-9,4	-
28	Dabrafenib (BRAF inhibitor)	-	-	-	-8,8	-
29	AKT Inhibitor VIII (AKT inhibitor)	-	-	-	-	-11,5
30	Ipatasertib (AKT inhibitor)	-	-	-	-	-8,9

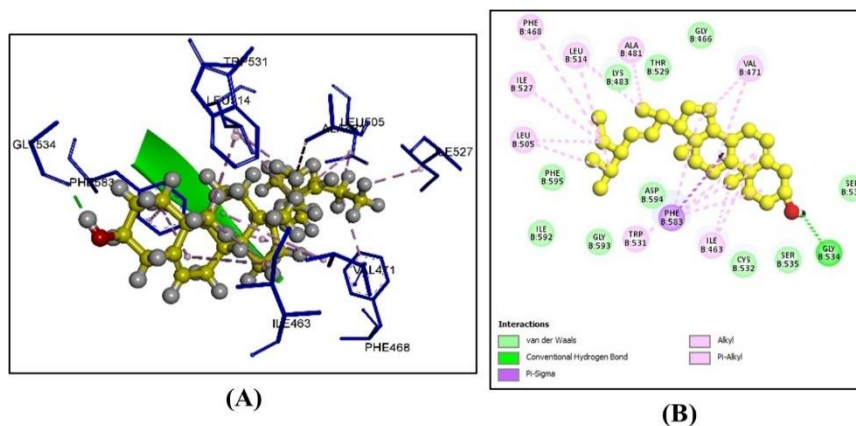
Berdasarkan Tabel 1 dapat dilihat bahwa 2 di antara 17 senyawa volatil dari ekstrak diklorometana daun sambiloto menunjukkan angka energi bebas ikatan yang tinggi terhadap seluruh onkoprotein. Uji *in silico* dengan metode penambatan molekul mendapatkan bahwa beta-amirin dan stigmasterol mengindikasikan sebagai inhibitor onkoprotein yang berpotensi, ditandai dengan skor energi bebas ikatannya yang terendah. Beta-amirin menghambat PIK3CA dengan skor energi bebas ikatan yang rendah. Sedangkan stigmasterol cenderung dapat menghambat protein BRAF (Tabel 1).



Gambar 1. Visualisasi interaksi antara beta-amirin dengan situs ikatan protein PIK3CA, (a) 3 dimensi, (b) 2 dimensi

Berdasarkan hasil visualisasi interaksi antar molekul, residu asam amino yang terlibat dalam interaksi antara ligan-reseptor telah diidentifikasi dan diilustrasikan pada Gambar 1 dan 2. Beta-amirin menunjukkan skor energi bebas ikatan terbaik terhadap PIK3CA, -10,2 kkal/mol. Terdapat residu asam amino PIK3CA yang terlibat dalam situs aktif yaitu ILE800, ILE848, ILE932 yang berikatan pada cincin benzene serta LYS776, MET772, TRP780, ILE800, TYR836, ILE848, VAL851, MET922 dan ILE932 berikatan dengan atom karbon (Gambar 1). Senyawa potensial lainnya yaitu stigmasterol yang menunjukkan skor energi bebas ikatan terbaik terhadap BRAF V600E, -10,3 kkal/mol. Dua jenis ikatan kimia juga terbentuk pada interaksi antara stigmasterol dengan BRAF V600E. GLY534 dengan atom hidrogen stigmasterol

membentuk ikatan hidrogen. Hal menarik didapatkan bahwa atom karbon ke-4 pada stigmasterol dengan PHE583 membentuk beberapa jenis ikatan hidrofobik yaitu *pi-sigma* dan alkil. Sementara itu, cincin benzene pada stigmasterol membentuk ikatan hidrofobik alkil dengan ILE463, ALA481, LEU505, LEU514 dan TRP531 (Gambar 2). Penelitian ini menitikberatkan bahwa beta-amirin dan stigmasterol dapat menunjukkan tendensi sebagai penghambat PIK3CA dan BRAF V600E pada situs ikatan protein tersebut.



Gambar 2. Visualisasi interaksi antara stigmasterol dengan situs ikatan protein BRAFV600E, (a) 3 dimensi, (b) 2 dimensi

Untuk mengurangi kegagalan dalam fase klinis, zat kimia yang akan kita gunakan sebagai pengobatan perlu diuji dari struktur kimianya. Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi dan memprediksi sifat-sifat fisikokimia dari senyawa beta-amirin dan stigmasterol. Sifat fisikokimia seperti *drug-likeness*, *lead-likeness*, penyerapan gastrointestinal, sawar darah otak/*blood brain barrier* (BBB), permeabilitas kulit dan toksisitas (mutagenisitas dan karsinogenisitas) telah didapatkan dari web-tool *SwissADME* dan *Pre-ADME/Tox QSARHUB*. Berdasarkan parameter yang diprediksi beta-amirin dan stigmasterol memenuhi aturan Lipinski dan Veber. DL adalah aspek krusial dalam pengembangan obat untuk mengetahui keamanan dari senyawa tersebut. Walaupun begitu, prediksi dengan menggunakan komputasi juga masih belum memenuhi persyaratan dalam kelayakan sebuah senyawa menjadi kandidat obat. DL juga dapat mendeskripsikan bioavailabilitas senyawa serta distribusi senyawa tersebut dalam sistem pencernaan. Mekanisme ini merupakan konsep dasar apakah sebuah

senyawa akan mudah dicerna dan ditransportasikan ke seluruh tubuh (Bickerton, Paolini, Besnard, Muresan, & Hopkins, 2012). Dalam prediksi *SwissADME*, beta-amirin dan stigmasterol memiliki skor bioavailabilitas 0,55. Hal ini merefleksikan bahwa kedua senyawa tersebut dapat diserap dengan baik oleh sel Caco-2 (sel epitel kolon) yang merepresentasikan mekanisme metabolisme dalam tubuh manusia (Martin, 2005). Aspek lain yang perlu diperhatikan dalam desain senyawa obat adalah *lead-likeness* (LL) dan toksisitas. Obat-obatan normalnya memiliki satu atau lebih senyawa *leader* (Oprea, Davis, Teague, & Leeson, 2001; Teague, Davis, Leeson, & Oprea, 1999). Tabel 2 memberikan informasi mengenai sifat fisikokimia beta-amirin dan stigmasterol yang tidak memenuhi syarat LL.

Tabel 2. Sifat Fisikokimia beta-amirin dan stigmasterol

Parameter	Senyawa	
	Beta-amirin	Stigmasterol
MW (g/mol)	426,72	412,69
M log P	6,92	6,62
X log P	9,15	8,56
HBA	1	1
HBD	1	1
NRB	0	5
PSA (Å)	20,23	20,23
<i>Drug-likeness</i>		
Lipinski	Yes	Yes
Ghose	No	No
Veber	Yes	Yes
Egan	No	No
Muegge	No	No
Bioavailability score	0,55	0,55
LL	No	No
Mut	(-)	(-)
Carc	(+)	(+)

MW: *Molecular Weight*; HBA: *Hydrogen Bond Acceptor*; HBD: *Hydrogen Bond Donor*; PSA: *Polar Surface Area*; NRB: *Number Rotatable Bond*; LL: *Lead-likeness*; Mut: *mutagenic tendency*; Carc: *carcinogenic tendency*

Mutagenisitas merupakan sebuah mekanisme yang sangat penting dalam proses perkembangan sel menjadi keganasan atau kanker. Faktor terjadinya mutasi genetik pada umumnya adalah makanan ataupun obat-obatan yang dikonsumsi. *Structure-Activity Relationship* atau dapat disingkat menjadi SAR kini telah menjadi metode analisis yang dapat digunakan untuk mengukur tendensi dari senyawa dalam merubah sekuens gen (Honma, Kitazawa, Kasamatsu, & Sugiyama, 2020). Selain itu, karsinogenisitas juga merupakan aspek yang penting dalam menentukan keamanan suatu obat. Konsensus *World Summit on Sustainable Development* (WSSD) telah merancang persetujuan dan diputuskan untuk mengendalikan efek mutagenisitas dan karsinogenisitas terhadap konsumsi obat-obatan (European Commision, 2013). *Quantitative Structure-Activity Relationship* (disingkat QSAR) merupakan metode yang diakui oleh WSSD dapat mengevaluasi toksisitas senyawa yang merupakan prinsip fundamental dalam eksplorasi senyawa obat (Honma et al., 2020). Akan tetapi evaluasi dengan komputasi tidak cukup valid untuk menentukan toksisitas kandidat senyawa. Perlu dilakukan uji lebih lanjut dengan studi *in vitro* dan *in vivo* dalam menentukan dosis atau konsentrasi yang dapat mengakibatkan efek toksik. Dalam penelitian ini, didapatkan bahwa beta-amirin dan stigmasterol tidak memiliki sifat mutagenisitas namun mempunyai kecenderungan dalam karsinogenisitas.

Tabel 3. Karakteristik farmakokinetik senyawa beta-amirin dan stigmasterol

Parameter	Senyawa	
	Beta-amirin	Stigmasterol
GI absorption	Low	Low
BBB permeant	No	No
Log Kp	-2,41	-2,74
P-gp substrate	No	No
CYP2C9 inhibitor	No	Yes

Tabel 3 dalam penelitian ini menggambarkan bahwa kedua senyawa tersebut memiliki laju absorpsi yang lambat dengan menganalisis plot *boiled-egg* (Daina &

Zoete, 2016). Beta-amirin merupakan inhibitor dari sitokrom P450 yang berperan sebagai katalis reaksi oksidasi seperti obat eksogen dan karsinogen, ataupun senyawa yang bersifat toksik (Niwa, Yanai, Matsumoto, & Shizuku, 2019). Hal ini menandakan bahwa beta-amirin dapat diproses secara fisiologis oleh enzim sitokrom P450 CYP2C9. CYP2C9 adalah sebuah gen yang mengekspresikan sebuah enzim yang berperan dalam mengeliminasi warfarin yang merupakan senyawa anti-koagulasi (Jorgensen, FitzGerald, Oyee, Pirmohamed, & Williamson, 2012). Dengan kata lain, stigmasterol memiliki kecenderungan dalam menstimulasi penggumpalan darah. Log K_p merupakan parameter hasil prediksi yang menunjukkan suatu senyawa mempunyai sifat permeabilitas kulit. Ambang batas dimana suatu senyawa dapat dikatakan permeabilitas pada kulit yaitu memiliki log $K_p > -2,5$ cm/s (Pires, Blundell, & Ascher, 2015). Berdasarkan prediksi *SwissADME*, stigmasterol memiliki permeabilitas kulit karena log $K_p -2,74$ cm/s, sebaliknya beta-amirin memiliki log $K_p -2,41$ cm/s yang dapat dikatakan beta-amirin mempunyai sifat permeabilitas kulit yang kurang baik.

4. KESIMPULAN DAN SARAN

4.1 Kesimpulan

Studi penambatan molekul dari senyawa volatil dari ekstrak diklorometana daun sambiloto menghasilkan kesimpulan bahwa beta-amirin dan stigmasterol mempunyai potensi penghambat pada PIK3CA dan BRAF V600E yang termasuk dalam jalur pensinyal EGFR. Dari prediksi ADMET, beta-amirin dan stigmasterol memiliki sifat *drug-likeness* pada aturan Lipinski dan Veber serta mempunyai skor bioavailabilitas yang baik hanya saja memiliki kecenderungan dalam karsinogenisitas.

4.2 Saran

Berdasarkan studi yang telah dilakukan, didapatkan bahwa beta-amirin dan stigmasterol mempunyai sifat karsinogenik. Sehingga diperlukan penelitian mengenai uji efek karsinogen pada kedua senyawa tersebut untuk ambang batas dosis yang aman dalam penggunaan beta-amirin dan stigmasterol dalam pengobatan.

5. REFERENSI

- Alqahtani, A., Ayeshe, H. S. K., & Halawani, H. (2020). PIK3CA gene mutations in solid malignancies: Association with clinicopathological parameters and prognosis. *Cancers*, 12(1), 1–18. <https://doi.org/10.3390/cancers12010093>
- Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., Orhan, I. E., Banach, M., Rollinger, J. M., ... Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(3), 200–216. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>
- Bickerton, G. R., Paolini, G. V., Besnard, J., Muresan, S., & Hopkins, A. L. (2012). Quantifying the chemical beauty of drugs Europe PMC Funders Group. *Nature Chemistry*, 4(2), 90–98. <https://doi.org/10.1038/nchem.1243>. Quantifying
- Chen, Z., Wang, C., Dong, H., Wang, X., Gao, F., Zhang, S., & Zhang, X. (2020). Aspirin has a better effect on PIK3CA mutant colorectal cancer cells by PI3K/Akt/Raptor pathway. *Molecular Medicine*, 26(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s10020-020-0139-5>
- Chu, N., Salguero, A. L., Liu, A. Z., Chen, Z., Dempsey, D. R., Ficarro, S. B., ... Cole, P. A. (2018). Akt Kinase Activation Mechanisms Revealed Using Protein Semisynthesis. *Cell*, 174(4), 897–907. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.003>
- Daina, A., & Zoete, V. (2016). A BOILED-Egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. *ChemMedChem*, 1117–1121. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600182>
- Dolatkhah, R., Somi, M. H., Shabanloei, R., Farassati, F., Fakhari, A., & Dastgiri, S. (2018). Main risk factors association with proto-oncogene mutations in colorectal cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 19(8), 2183–2190. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.8.2183>
- European Commission. (2013). *Interpretation of the WSSD 2020 Chemicals*. Luxembourg.
- Faisal, M., Maungchanburee, S., Dokduang, S., Rattanburee, T., Tedasen, A., & Graidist, A. P. (2021). Dichloromethane crude extract of gymnanthemum extensum combined with low piperine fractional piper nigrum extract induces apoptosis on human breast cancer cells. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83(2), 247–260. <https://doi.org/10.36468/pharmaceutical-sciences.770>
- Falzone, L., Salomone, S., & Libra, M. (2018). Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium. *Frontiers in Pharmacology*, 9(NOV). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01300>
- Hamada, T., Nowak, J. A., & Ogino, S. (2017). PIK3CA mutation and colorectal cancer precision medicine. *Oncotarget*, 8(14), 22305–22306.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.15278>

- Honma, M., Kitazawa, A., Kasamatsu, T., & Sugiyama, K. ichi. (2020). Screening for Ames mutagenicity of food flavor chemicals by (quantitative) structure-activity relationship. *Genes and Environment*, *42*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s41021-020-00171-1>
- Hunter, J. C., Gurbani, D., Ficarro, S. B., Carrasco, M. A., Lim, S. M., Choi, H. G., ... Westover, K. D. (2014). In situ selectivity profiling and crystal structure of SML-8-73-1, an active site inhibitor of oncogenic K-Ras G12C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(24), 8895–8900. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404639111>
- IARC. (2020). The Global Cancer Observatory - All cancers. Retrieved March 14, 2022, from Globocan website: <https://gco.iarc.fr/today/home>
- Jorgensen, A. L., FitzGerald, R. J., Oyee, J., Pirmohamed, M., & Williamson, P. R. (2012). Influence of CYP2C9 and VKORC1 on Patient Response to Warfarin: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*, *7*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044064>
- Kontomanolis, E. N., Koutras, A., Syllaios, A., Schizas, D., Mastoraki, A., Garmpis, N., ... Fasoulakis, Z. (2020). Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: A review. *Anticancer Research*, *40*(11), 6009–6015. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14622>
- Kwok, C. S., & Loke, Y. K. (2010). Critical overview on the benefits and harms of aspirin. *Pharmaceuticals*, *3*(5), 1491–1506. <https://doi.org/10.3390/ph3051491>
- Liu, J., Zhou, Q., Xu, J., Wang, J., & Zhang, Y. (2016). Detection of EGFR expression in patients with colorectal cancer and the therapeutic effect of cetuximab. *Journal of B.U.ON.*, *21*(1), 95–100.
- Luo, C., Xie, P., & Marmorstein, R. (2008). Identification of BRAF inhibitors through in silico screening. *Journal of Medical Chemistry*, *51*(19), 6121–6127. <https://doi.org/10.1021/jm800539g>
- Mandelker, D., Gabelli, S. B., Schmidt-Kittler, O., Zhu, J., Cheong, I., Huang, C. H., ... Amzel, L. M. (2009). A frequent kinase domain mutation that changes the interaction between PI3K α and the membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(40), 16996–17001. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908444106>
- Martin, Y. C. (2005). A bioavailability score. *Journal of Medicinal Chemistry*, *48*(9), 3164–3170. <https://doi.org/10.1021/jm0492002>
- Niwa, T., Yanai, M., Matsumoto, M., & Shizuku, M. (2019). Effect of Cytochrome P450 (CYP) 2D6 Genetic Polymorphism on the Inhibitory Action of Antidepressants on CYP2D6-Mediated Dopamine Formation from p-Tyramine.

- Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 21(1), 135–142. <https://doi.org/10.18433/JPPS29673>
- Oprea, T. I., Davis, A. M., Teague, S. J., & Leeson, P. D. (2001). Is There a Difference between Leads and Drugs? A Historical Perspective. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 41(3–6), 1308–1315. <https://doi.org/10.1021/ci010366a>
- Pinto, C., Barone, C. A., Girolomoni, G., Russi, E. G., Merlano, M. C., Ferrari, D., & Maiello, E. (2011). Management of skin toxicity associated with cetuximab treatment in combination with chemotherapy or radiotherapy. *The Oncologist*, 16(2), 228–238. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-0298>
- Pinzi, L., & Rastelli, G. (2019). Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18). <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>
- Pires, D. E. V., Blundell, T. L., & Ascher, D. B. (2015). pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(9), 4066–4072. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>
- Teague, S. J., Davis, A. M., Leeson, P. D., & Oprea, T. (1999). The design of leadlike combinatorial libraries. *Angewandte Chemie - International Edition*, 38(24), 3743–3748. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19991216\)38:24<3743::AID-ANIE3743>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19991216)38:24<3743::AID-ANIE3743>3.0.CO;2-U)
- Vélez-Cruz, R., & Johnson, D. G. (2017). The retinoblastoma (RB) tumor suppressor: Pushing back against genome instability on multiple fronts. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8). <https://doi.org/10.3390/ijms18081776>
- Wang, A., Li, X., Wu, H., Zou, F., Yan, X. E., Chen, C., ... Liu, Q. (2017). Discovery of (R)-1-(3-(4-Amino-3-(3-chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-one (CHMFL-EGFR-202) as a Novel Irreversible EGFR Mutant Kinase Inhibitor with a Distinct Binding Mode. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(7), 2944–2962. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01907>
- Wu, W. K. K., Wang, X. J., Cheng, A. S. L., Luo, M. X. M., Ng, S. S. M., To, K. F., ... Yu, J. (2013). Dysregulation and crosstalk of cellular signaling pathways in colon carcinogenesis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 86(3), 251–277. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2012.11.009>
- Zhang, C., Spevak, W., Zhang, Y., Burton, E. A., Ma, Y., Habets, G., ... Bollag, G. (2015). RAF inhibitors that evade paradoxical MAPK pathway activation. *Nature*, 526(7574), 583–586. <https://doi.org/10.1038/nature14982>