

KEMAMPUAN MENGHAMBAT DARI PEPTIDA SIKLIK YANG DIHASILKAN *Prochloron didemni* TERHADAP RESEPTOR KANKER KOLOREKTAL DAN PENYAKIT VIRUS DENGAN PENDEKATAN ANALISIS *IN SILICO*

(*Inhibitory Ability of Cyclic Peptides Produced by Prochloron didemni Toward Receptors of Colon Cancer and Viral Disease by In Silico Analysis Approach*)

Inneke F.M. Rumengan^{1*}, Angelina Goei², Rosita Lintang¹, Chatrien A. Sinjal¹, Trezya N.S. Pangemanan³

1. Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi
 2. Perintis Jaya Internasional, Denpasar, Bali
 3. Program Studi Ilmu Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi
- *Penulis Korespondensi: innekerumengan@unsrat.ac.id

ABSTRACT

The endosymbiotic microbes of tunicates, particularly those associated with the Class Ascidiacea, were found in the Malalayang Coastal area of Manado Bay. *Prochloron didemni*, one of photosymbiont microbes, is reported to produce various cyclic peptides such as patellamides A, B, C, D, E, F, G, and H, along with ulithiacyclamide. As part of the exploration of the molecular potential of these endosymbiotic microbes, an *in silico* analysis was conducted to predict the ability of the cyclic peptides to inhibit receptors that associated with colorectal cancer and dengue virus using AutoDock Vina. The binding affinity of the ligand molecules to the receptors, indicated by the ΔG values. The lowest ΔG value was obtained from the docking of patellamide A against the dengue virus ($\Delta G = -14.84$), clearly indicating the compound's potential efficacy in inhibiting the virus. Similarly, ulithiacyclamide exhibits a strong inhibitory effect on both colorectal cancer receptors ($\Delta G = -14.1$ and -14.42), which is comparable to the relevant drug, irinotecan. Other patellamide compounds also showed anticancer and antiviral capabilities, leading to the conclusion that the cyclic peptides produced by the endosymbiotic microbe *P. didemni* have the potential to be developed as anticancer and antiviral drugs. It is of course, necessary to conduct standard clinical trials in future.

Keywords: cyclic peptides, *Prochloron didemni*, *in silico*, anticancer, antiviral

ABSTRAK

Mikroba endosimbion pada golongan Tunikata dari kelas Ascidiacea sudah ditemukan di Pesisir Malalayang, Teluk Manado. *Prochloron didemni* sebagai salah satu spesies mikroba fotosimbion pada ascidia dilaporkan menghasilkan berbagai peptida siklik seperti patelamida A, B, C, D, E, F, G dan H, serta ulitiasiklamida. Sebagai bagian dari eksplorasi potensi molekuler mikroba endosimbion tersebut, telah dilakukan analisis *in silico* untuk prediksi awal kemampuan hambat senyawa-senyawa peptida siklik tersebut terhadap reseptor-reseptor pada kanker kolorektal dan virus dengue dengan menggunakan perangkat lunak AutoDock Vina. Afinitas pengikatan molekul ligan terhadap reseptor yang ditunjukkan dengan nilai ΔG . Besaran nilai ΔG terkecil diperoleh dari hasil penambatan patelamida A terhadap reseptor virus dengue ($\Delta G = -14,84$), jelas mengindikasikan betapa efektifnya senyawa ini dapat menghambat virus tersebut. Kemampuan ulitiasiklamida juga ternyata sama kuatnya dalam menghambat kedua reseptor kanker kolorektal ($\Delta G = -14,1$ dan $-14,42$), setara dengan obat, irinotecan. Kemampuan antikanker dan antivirus juga dimiliki oleh senyawa-senyawa patelamida lainnya, sehingga dapat disimpulkan peptida siklik yang dihasilkan oleh mikroba endosimbion *P. didemni* mempunyai peluang untuk dikembangkan sebagai obat antikanker dan antivirus. Tentu saja, dalam hal ini perlu dilakukan uji-uji klinik standar ke depan.

Kata kunci: peptida siklik, *Prochloron didemni*, *in silico*, antikanker, antivirus

PENDAHULUAN

Fluktuasi kondisi laut yang kompleks memicu organisme laut, termasuk mikroba yang hidup di dalamnya, untuk beradaptasi dengan melakukan metabolisme sekunder yang menghasilkan berbagai metabolit sekunder yang berpotensi dikembangkan menjadi bahan obat dan bahan farmasetika (Barzkar *et al.*, 2019). Mikroba fotosimbion, seperti yang diisolasi ascidia *L. patella* menjadi objek penelitian banyak ahli terkait karena senyawa-senyawa potensial yang disintesisnya, sebab dapat menghasilkan senyawa patelamida, peptida siklik yang memiliki sifat sitotoksik moderat (Donia *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2005). Sifat patelamida ini dapat diaplikasikan sebagai agen kemoterapi untuk penyakit kanker (McDonald & Ireland, 1992).

Prochloron didemni merupakan salah satu mikroba endosimbion pada golongan Tunikata dari kelas Ascidiacea, dan dilaporkan menghasilkan berbagai senyawa yang tergolong peptida siklik seperti patelamida A, B, C, D, E, F, G dan H, serta ulitiasiklamida yang memiliki bioaktivitas termasuk aktivitas sitotoksik (Baur *et al.*, 2022; Rumengan *et al.*, 2021; Rumengan, 2024). Kajian di Laboratorium Bioteknologi dan Farmasetika Laut, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi, antara lain mengeksplorasi potensi molekuler mikroba endosimbion dengan mengultivasinya terpisah dari inang (Rumengan *et al.*, 2020, 2021), dan dengan analisis *in silico* untuk prediksi awal kemampuan hambat ligan terhadap reseptor. Ligan dapat berupa senyawa bioaktif, dan reseptor berupa protein terkait dengan kanker atau virus tertentu (Du *et al.*, 2016).

Kanker kolorektal menempati urutan kedua sebagai penyebab kematian akibat penyakit kanker di dunia (WHO, 2023). Penyebaran kanker ini dapat bersifat hereditas oleh sebab keterlibatan riwayat keluarga, maupun secara sporadik akibat gaya hidup pasien (Zannah *et al.*, 2021). Terapi untuk pasien kanker kolorektal masih berupa operasi untuk mengangkat kanker sebagai penanganan utama serta kemoterapi sebagai penanganan lanjutan. Sementara itu, DBD yang disebabkan oleh infeksi virus dengue (DENV) masih menjadi kasus yang sering ditemui secara global, dimana setiap tahun diperkirakan terjadi sebanyak 400 juta infeksi DBD, yang mengakibatkan 36 ribu kematian (WHO, 2022). Hingga kini belum ada antivirus spesifik yang menargetkan protein dan replikasi virus dengue. Pengobatan yang dipakai untuk pasien masih berupa obat demam seperti parasetamol.

Penelitian ini bertujuan mengetahui kemampuan hambat senyawa-senyawa peptida sebagai ligan utama terhadap reseptor kanker kolorektal dan penyakit demam berdarah dengue (DBD) dengan melakukan simulasi komputer menggunakan perangkat lunak AutoDock Vina.

METODE PENELITIAN

Metode penambatan molekul dengan menggunakan perangkat lunak AutoDock Vina, terdiri dari beberapa tahap, yaitu:

Preparasi Ligan

Senyawa peptida siklik yang diuji yaitu patelamida A, B, C, D, E, F, G dan H, serta ulitiasiklamida sebagai ligan utama, masing-masing dengan struktur molekul yang diunduh dari laman

Pubchem (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) dengan format (.sdf). Demikian pula ligan pembanding yaitu obat-obat seperti irinotecan dan fluorouracil untuk kanker kolorektal, dan acetaminophen untuk demam dengue, masing-masing struktur molekulnya juga diunduh dari laman yang sama. Kemudian hasil unduhan dikonversikan ke dalam format (.pdb) menggunakan perangkat lunak Open Babel GUI. Struktur ligan dioptimasi dengan AutoDock Tools dan disimpan dengan format (.pdbqt).

Preparasi Reseptor

Struktur kristal reseptor diunduh dari laman Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB) melalui <https://www.rcsb.org/>. Reseptor yang dipilih yaitu Lewis glycan (6X5E) dan protein-tyrosine phosphatase (1WCH) untuk kanker kolorektal, sedangkan untuk virus dengue, reseptor yang dipilih yaitu dengue type 2 virus non-structural protein 1 (4O6B) dan RNA-dependent RNA Polymerase domain of dengue 2 NS5 (6IZY). Reseptor kemudian dipreparasi menggunakan perangkat lunak Discovery Studio dan dioptimasi dengan bantuan aplikasi AutoDock Tools. Reseptor yang telah dioptimasi kemudian disimpan dalam format .pdbqt.

Penambatan Molekul

Ligan dan reseptor yang telah dipreparasi dimasukkan ke dalam satu folder Vina dan dibuatkan konfigurasi menggunakan notepad dengan nama conf.txt'. Selanjutnya penambatan molekuler dijalankan dengan AutoDock Vina. Proses ini menghasilkan output berupa nilai energi bebas (ΔG). Nilai energi ini menunjukkan kekuatan afinitas senyawa ligan terhadap reseptor,

biasanya dengan nilai negatif. Makin kecil nilainya, makin kuat ikatan yang terjadi. Hasil penambatan divisualisasikan menggunakan PyMOL.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis *in silico* dengan Autodock Vina, berupa skor nilai energi bebas (ΔG) dalam satuan kcal/mol ditunjukkan pada Tabel 1. Semua nilai ΔG menunjukkan besaran yang negatif, dimana semakin kecil nilai ΔG , semakin stabil ikatan antara ligan dan reseptor (Du *et al.*, 2016). Ternyata ΔG dari ligan uji yang ditambatkan pada semua reseptor menunjukkan rata-rata nilai afinitas yang lebih kecil dibanding nilai afinitas dari ligan pembanding. Kisaran nilai ΔG terkecil diperoleh dari hasil penambatan patelamida A terhadap virus dengue ($\Delta G = -14,84$) yang menunjukkan betapa efektifnya senyawa ini dapat menghambat virus tersebut. Kekuatan afinitas yang sebanding dengan senyawa itu adalah ulitiasiklamida terhadap kedua reseptor kanker kolorektal, protein Lewis glycan (6X5E) dan protein-tyrosine phosphatase (1WCH), masing-masing dengan $\Delta G = -14,1$ dan $-14,42$, setara dengan nilai afinitas obat irinotecan.

Senyawa-senyawa patelamida lainnya masih menunjukkan kemampuan yang besar dalam menghambat semua reseptor yang diuji. Seperti yang ditunjukkan dengan penambatan senyawa-senyawa patelamida dan ulitiasiklamida pada reseptor protein Lewis glycan (6X5E) dari kanker kolorektal menunjukkan nilai ΔG yang berkisar antara $-14,1$ hingga $-12,1$. Rata-rata nilai ini masih lebih rendah dibanding afinitas yang dimiliki ligan pembanding, kecuali untuk irinotecan yang memiliki

Tabel 1. Nilai afinitas hasil penambatan molekuler

| Ligan Uji | Kanker Kolorektal | | Virus Dengue | |
|------------------------|-------------------|--------|--------------|--------|
| | 6X5E | 1WCH | 4O6B | 6IZY |
| Patelamida A | -12,98 | -11,88 | -14,84 | -11,92 |
| Patelamida C | -12,88 | -11,75 | -13,07 | -11,61 |
| Patelamida D | -13,19 | -11,61 | -13,12 | -11,87 |
| Patelamida E | -12,07 | -10,92 | -11,26 | -11,09 |
| Patelamida F | -13,36 | -11,77 | -11,85 | -12,01 |
| Patelamida G | -12,1 | -10,58 | -12,65 | -11,59 |
| Ulitasiklamida | -14,1 | -14,42 | -13,61 | -12,84 |
| Ligan Pemanding | | | | |
| Irinotecan | -14,27 | -12,59 | | |
| Fluorouracil | -6,108 | -5,269 | | |
| Acetaminophen | | | -6,673 | -6,208 |

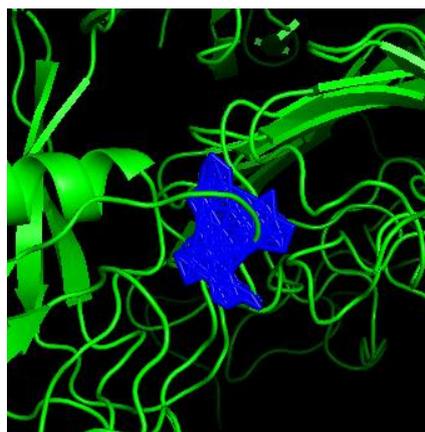
skor -14,27, namun hanya sedikit lebih rendah dari nilai afinitas ulitasiklamida. Sedangkan penambatan ligan uji pada reseptor protein-tyrosine phosphatae (1WCH) dari jenis kanker yang sama menunjukkan nilai ΔG yang berkisar -10,58 hingga -14,42. Didapati bahwa afinitas dari patelamida masih lebih besar dibanding irinotecan (-12,29), namun ulitasiklamida diprediksikan memiliki nilai afinitas yang lebih baik (-14,42). Sebagai senyawa yang ditambahkan sebagai ligan pemanding, irinotecan dan fluorouracil diketahui digunakan sebagai obat yang umum digunakan untuk terapi kanker kolorektal (Chai *et al.*, 2024).

Sementara itu, penambatan ligan uji pada reseptor dengue type 2 virus non-structural protein 1 (4O6B) dan RNA-dependent RNA Polymerase domain of dengue 2 NS5 (6IZY) pada virus dengue penyebab penyakit DBD ternyata memiliki ΔG yang berkisar -14,84 hingga -11,00. Nilai afinitas ini masih jauh lebih rendah dibanding ligan pemanding dengan nilai ΔG -6,673 hingga -6,208. Acetaminophen atau yang juga dikenal sebagai parasetamol merupakan obat yang

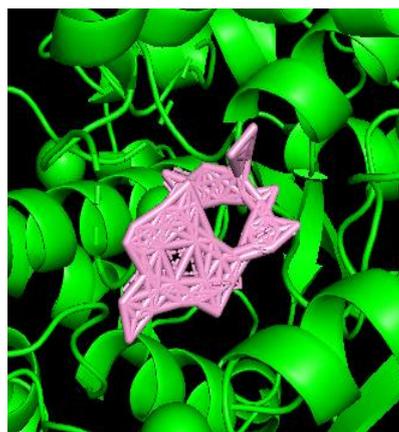
direkomendasikan WHO untuk pengobatan DBD, dengan meminimalisir gejala sakit dan demam yang muncul akibat terjangkit virus dengue (Freo *et al.*, 2021).

Gambar 1 memperlihatkan hasil visualisasi menggunakan Pymol, khususnya menyangkut penambatan molekul dengan nilai ΔG terendah. Pymol merupakan perangkat lunak yang sering digunakan untuk membuat visualisasi struktur molekul dengan kualitas yang baik dengan pilihan *rendering* yang beragam untuk desain obat berbasis struktur (Seeliger & Groot, 2010).

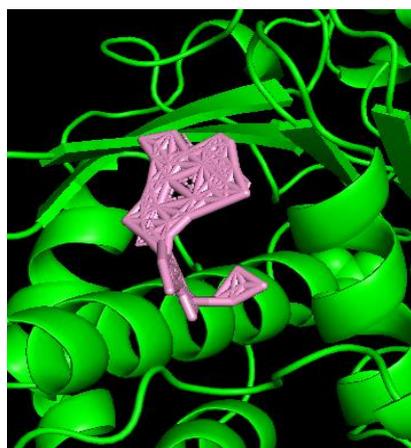
Visualisasi di atas menunjukkan posisi masing-masing ligan yang tertambat pada sisi aktif protein yang ditampilkan dalam bentuk tiga dimensi, dalam hal ini ligan diperlihatkan sebagai molekul kecil yang terikat pada reseptor protein yang molekulnya relatif besar. Selain itu, dari gambar di atas terlihat ada perbedaan posisi penambatan dari setiap ligan pada reseptor yang ditampilkan dengan warna yang berbeda-beda. Untuk reseptor ditampilkan dalam warna hijau,



Patelamida A – 4O6B



Ulitiasiklamida – 6IZY



Ulitiasiklamida – 1WCH



Ulitiasiklamida – 6X5E

Gambar 1. Visualisasi dengan menggunakan Pymol memperlihatkan penambatan molekul patelamida A terhadap reseptor virus dengue (4O6B), dan ulitiasiklamida terhadap reseptor virus dengue (6IZY) dan reseptor kanker kolorektal (1WCH dan 6X5E).

untuk patelamida A ditampilkan dalam warna biru, sementara itu ulitiasiklamida ditampilkan dalam warna merah muda. Dengan demikian bukti dengan gambar tersebut sudah jelas memprediksikan seberapa jauh mana reseptor kanker kolorektal dan virus dengue akan mengalami hambatan jika tereskospos dengan ligan peptida siklik. Pengujian lanjut tentu saja perlu dilakukan, baik secara *in vitro* maupun *in vivo* sebagai bagian prosedur standar dalam pengembangan suatu senyawa sebagai kandidat obat.

KESIMPULAN

Afinitas pengikatan molekul ligan terhadap reseptor yang ditunjukkan dengan nilai ΔG , menunjukkan rata-rata besaran dalam negatif, berarti ada penambatan molekul ligan uji terhadap reseptor target. Besaran nilai ΔG terkecil diperoleh dari hasil penambatan patelamida A terhadap virus dengue ($\Delta G = -14,84$), jelas mengindikasikan betapa efektifnya senyawa ini dapat menghambat virus tersebut. Ulitiasiklamida juga ternyata dapat sama kuatnya menghambat kedua reseptor

kanker kolorektal ($\Delta G = -14,1$ dan $-14,42$), setara dengan obat irinotecan. Kemampuan antikanker dan antivirus juga dimiliki oleh senyawa-senyawa patelamida lainnya, sehingga dapat disimpulkan bahwa senyawa-senyawa peptida siklik yang dihasilkan oleh mikroba endosimbion *P. didemni* mempunyai aktivitas sitotoksik, sehingga berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker dan anti-*in vivo*.

Hasil penelitian ini perlu ditindaklanjuti dengan pendekatan dengan uji-uji *in vitro* dan *in vivo*, serta uji-uji klinik standar. Kemampuan menghambat peptida siklik dari mikroba *P. didemni* terhadap jenis-jenis kanker lainnya, sangat menjanjikan diuji dengan pendekatan baik *in silico* dan uji-uji standar lainnya. Eksplorasi terhadap mikroba-mikroba lain yang menghasilkan peptida siklik, juga menarik untuk diimplementasikan ke depan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari kegiatan skim penelitian R_MAPALUS tahun fiskal 2023. Ucapan terima kasih disampaikan kepada Rektor Universitas Sam Ratulangi melalui Lembaga Penelitian, dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) UNSRAT yang telah memfasilitasi proses seleksi proposal, sehingga peroleh bantuan pendanaan untuk riset tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Barzkar, Tamadoni Jahromi, Poorsaheli, Vianello. 2019. Metabolites from Marine Microorganisms, Micro, and Macroalgae: Immense Scope for Pharmacology. *Marine Drugs*, 17(8), 464. <https://doi.org/10.3390/md17080464>
- Baur, P., Kühl, M., Comba, P., Behrendt, L. 2022. Possible Functional Roles of Patellamides in the Ascidian-Prochloron Symbiosis. *Marine Drugs*, 20(2), 119. <https://doi.org/10.3390/md20020119>
- Chai, Y., Liu, J.-L., Zhang, S., Li, N., Xu, D.-Q., Liu, W.-J., Fu, R.-J., Tang, Y.-P. 2024. The effective combination therapies with irinotecan for colorectal cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1356708>
- Donia, M. S., Hathaway, B. J., Sudek, S., Haygood, M. G., Rosovitz, M. J., Ravel, J., Schmidt, E. W. 2006. Natural combinatorial peptide libraries in cyanobacterial symbionts of marine ascidians. *Nature Chemical Biology*, 2(12), 729–735. <https://doi.org/10.1038/nchembio200629>
- Du, X., Li, Y., Xia, Y.-L., Ai, S.-M., Liang, J., Sang, P., Ji, X.-L., Liu, S.-Q. 2016. Insights into Protein–Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 144. <https://doi.org/10.3390/ijms17020144>
- Freo, U., Ruocco, C., Valerio, A., Scagnol, I., Nisoli, E. 2021. Paracetamol: A Review of Guideline Recommendations. *Journal of Clinical Medicine*, 10(15), 3420. <https://doi.org/10.3390/jcm10153420>
- McDonald, L. A., Ireland, C. M. 1992. Patellamide E: a new cyclic peptide from the ascidian *Lissoclinum patella*. *Journal of Natural Products*, 55(3), 376–379. <https://doi.org/10.1021/np50081a016>
- Rumengan, I. 2024. *Potensi Molekuler Mikroba Fotosimbion: Prochloron didemni pada Ascidia* (T. Pangemanan, Ed.). Unsrat Press.
- Rumengan, I. F. M., Kubelaborbir, T. M., Tallei, T. E. 2020. Data on the cultivation of Prochloron sp. at

- different salinity levels. *Data in Brief*, 29, 105241. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.105241>
- Rumengan, I. F. M., Roring, V. I. Y., Haedar, J. R., Siby, M. S., Luntungan, A. H., Kolondam, B. J., Uria, A. R., Wakimoto, T. 2021. Ascidian-associated photosymbionts from Manado, Indonesia: secondary metabolites, bioactivity simulation, and biosynthetic insight. *Symbiosis*, 84(1), 71–82. <https://doi.org/10.1007/s13199-021-00766-4>
- Seeliger, D., de Groot, B. L. 2010. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *Journal of computer-aided molecular design*, 24(5), 417–422. <https://doi.org/10.1007/s10822-010-9352-6>
- Schmidt, E. W., Nelson, J. T., Rasko, D. A., Sudek, S., Eisen, J. A., Haygood, M. G., Ravel, J. 2005. Patellamide A and C biosynthesis by a microcin-like pathway in *Prochloron didemni*, the cyanobacterial symbiont of *Lissoclinum patella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(20), 7315–7320. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501424102>
- World Health Organization. 2023. *Colorectal cancer*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/colorectal-cancer#:~:text=Colon%20cancer%20is%20the%20second,and%20mortality%20rates%20were%20observed>.
- World Health Organization (WHO). 2022. *Dengue and severe dengue*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
- Zannah, S. J., Murti, I. S., Sulistiawati, S. 2021. Hubungan Usia dengan Stadium Saat Diagnosis Penderita Kanker Kolorektal di RSUD Abdul
- Wahab Sjhanie Samarinda. *Jurnal Sains Dan Kesehatan*, 3(5), 701–705. <https://doi.org/10.25026/jsk.v3i5.629>