

The Prediction of the Interaction Genistein and Daidzein Compounds on ESR2 Expression by Molecular Docking

Prediksi Interaksi Senyawa Genistein dan Daidzein pada Ekspresi ESR2 dengan Molecular Docking

Quratul Akyuni¹, Dwi Hilda Putri^{1*}, Afifatul Achyar¹, Yuni Ahda¹

¹Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Padang, West Sumatera, Indonesia

*Corresponding author: dwi_hildaputri@fmipa.unp.ac.id

Abstract

Estrogen is known to have various roles in the body. ESR2 is an estrogen receptor expressing estrogen receptor beta (ER β). ER β is expressed in normal breast epithelial cells as well as in various other tissues such as the uterus, ovary, prostate and brain, and breast cancer cells. One plant that is thought to have the potential to increase ER β expression is soybean (*Glycine max*). Soybean plants contain very important phytochemicals, so they are widely used in the food industry as supplements and included in drug formulations. This type of research is descriptive research conducted using in silico method through the molecular docking approach. The metabolites used were genistein and daidzein for the target protein ESR 2 (PDB ID: 1QKM). The docking results showed that the binding affinity value of the metabolites genistein, daidzein, and native ligand was -9.7 kcal/mol. The RMSD value obtained from LigRMSD was 0.40 with very similar visualization between the ligand test before and after docking. The conclusion of this study is that the metabolites of genistein and daidzein are predicted to have the ability to increase ESR2 expression in the human body.

Keyword: Glycine max, genistein, daidzein, ESR2, molecular docking

Abstrak

Estrogen diketahui memiliki berbagai peran di dalam tubuh. ESR2 merupakan reseptor estrogen yang mengekspresikan estrogen reseptor beta (ER β). ER β diekspresikan dalam sel epitel payudara normal serta di berbagai jaringan lain seperti rahim, ovarium, prostat dan otak, dan sel kanker payudara. Salah satu tumbuhan yang diduga mempunyai potensi untuk meningkatkan ekspresi ER β adalah tanaman kedelai (*Glycine max*). Tanaman kedelai memiliki kandungan fitokimia yang sangat penting sehingga banyak digunakan dalam industri makanan sebagai suplemen dan termasuk dalam formulasi obat. Jenis penelitian adalah penelitian deskriptif yang dilakukan dengan metode in silico melalui pendekatan molecular docking. Metabolit yang digunakan adalah genistein dan daidzein terhadap protein target ESR 2 (PDB ID: 1QKM). Hasil docking menunjukkan bahwa nilai binding affinity metabolit genistein, daidzein, dan native ligand adalah -9.7 kcal/mol. Nilai RMSD yang didapatkan dari LigRMSD adalah 0.40 dengan visualisasi yang sangat mirip antara ligan uji sebelum dan sesudah docking. Kesimpulan dari penelitian ini adalah metabolit genistein dan daidzein diprediksi memiliki kemampuan untuk meningkatkan ekspresi ESR2 dalam tubuh manusia.

Kata kunci: Glycine max, genistein, daidzein, ESR2, molecular docking

Pendahuluan

Estrogen diketahui memiliki peran penting di dalam tubuh, seperti mengatur proses fisiologis dan patologis dalam sistem reproduksi, kardiovaskular, kerangka, endokrin, saraf, dan kekebalan tubuh (Tang et al.). Dalam menjalankan fungsinya, estrogen mengikat dan mengaktifkan reseptor utama estrogen, sehingga dikenal dengan estrogen reseptor (Mulyati, 2019). Estrogen bekerja hanya pada sel yang mengandung reseptor estrogen. Terdapat dua reseptor estrogen, yaitu estrogen reseptor alfa ($ER\alpha$) dan estrogen reseptor beta ($ER\beta$) (Aryan). Kedua reseptor tersebut memiliki perbedaan dalam pola ekspresinya.

$ER\alpha$ dikode oleh gen estrogen receptor 1 (*ESR1*) dan $ER\beta$ dikode oleh gen estrogen receptor 2 (*ESR2*). Reseptor ini diekspresikan pada berbagai titik di dalam tubuh. Protein $ER\beta$ ekspresinya terdapat dalam ginjal, otak, tulang, jantung, paru-paru, mukosa usus, prostat, dan sel endotel. Jika suatu reseptor berikatan dengan estrogen, maka akan terjadi perubahan formasi reseptor yang memungkinkan terjadinya ikatan koaktivator dan mengaktifkan faktor transkripsi. Aktivasi transkripsi gen akan mengarahkan sintesis protein tertentu yang kemudian mempengaruhi berbagai fungsi sel tergantung macamnya dan tergetnya. Secara patologis, $ER\alpha$ bisa didapatkan pada sel kanker endometrium, payudara, stroma ovarium, dan hipotalamus.

$ER\beta$ diekspresikan dalam sel epitel payudara normal serta di berbagai jaringan lain seperti rahim, ovarium, prostat dan otak, dan sel kanker payudara (Dalal et al., 2022). Selain pada sel normal, $ER\beta$ banyak dipelajari dalam berbagai model in vivo dan in vitro pada kasus kanker payudara. Penelitian menunjukkan kontribusi $ER\beta$ dalam menghambat perkembangan tumor kanker payudara dan potensi perannya sebagai penekan tumor. Dalam model sel, $ER\beta$ telah ditemukan untuk meningkatkan respon terhadap tamoxifen dan agonis selektif $ER\beta$ mengurangi pensinyalan anti-apoptosis (Ruddy et al., 2014; Pons et al., 2015). Aktivasi $ER\beta$ meningkatkan autophagy sel dan reactive oxygen species (ROS) (Razandi et al., 2013 dan Song et al., 2019). Sebaliknya, $ER\beta$ telah ditemukan menurunkan respon terhadap agen sitotoksik seperti cisplatin, paclitaxel dan doxorubicin (Pons et al., 2015).

Salah satu titik tangkap pengobatan kanker khususnya kanker payudara adalah dengan menghambat aktivitas estrogen pada estrogen reseptor alfa ($ER\alpha$). Pada kasus kanker payudara, $ER\alpha$ berikatan dengan estrogen dan berproliferasi secara abnormal (Pons et al., 2015). Salah satu tumbuhan yang diduga mempunyai potensi untuk meningkatkan ekspresi $ER\beta$ adalah tanaman kedelai (*Glycine max*). Tanaman kedelai memiliki kandungan fitokimia yang sangat penting sehingga banyak digunakan dalam industri makanan sebagai suplemen dan termasuk dalam formulasi obat. Baru-baru ini, penggunaan kedelai telah banyak dipelajari untuk pencegahan dan pengobatan berbagai penyakit kronis (Uyar et al., 2014). Meskipun telah terdapat beberapa penelitian yang menganalisis potensi tanaman kedelai sebagai agen anti-kanker, akan tetapi belum diketahui mekanisme pasti yang terlibat dalam proses ini. Selain itu, banyaknya metabolit yang terdapat pada tanaman kedelai juga memerlukan analisis lebih lanjut tentang potensi dari masing-masing metabolit tersebut.

Eksplorasi manfaat dari senyawa aktif tumbuhan dapat dilakukan dengan penelitian laboratorium. Penelitian yang dilakukan oleh Ichsyani et al (2017) mengungkap manfaat antivirus dari curcumin terhadap virus dengue. Rahma dan Ahda (2021) melaporkan potensi ekstrak kayu manis terhadap jumlah spermatozoa mencit jantan yang terpapar radikal bebas. Namun, penelitian di laboratorium memerlukan waktu dan biaya yang besar.

Penelitian in silico akhir-akhir ini banyak dilakukan dalam banyak bidang kajian. Putri et al (2019) melakukan kajian bioinformatika terhadap gen pengkodean enzim pada biosintesis karotenoid galur *Manihot esculenta*. Selain itu, desain primer terhadap deteksi bakteri patogen pada air isi ulang juga dilakukan (Achyar, Putri, et al., 2021; Achyar, Atifah, et al., 2021). Selain itu, penelitian in silico merupakan salah satu solusi untuk mengembangkan penelitian mengenai eksplorasi senyawa antibakteri terhadap kasus-kasus infeksi yang jarang ditemui, seperti melioidosis. Pendekatan ini banyak digunakan dalam studi yang memprediksi interaksi obat dengan patogen. Dengan kemajuan teknologi, pendekatan in silico mampu mencari berbagai senyawa yang diinginkan dari database dengan metode molecular docking (Yap, 2019). Penelitian yang dilakukan oleh Rajagopal et al (2020) menunjukkan bahwa docking mampu memprediksi ikatan senyawa aktif Curcumin dengan menargetkan enzim tertentu pada virus SARS CoV-2. Selanjutnya, studi docking juga berhasil dilakukan untuk menargetkan protein tertentu dari virus dengue (Shimu et al., 2022).

Bahan dan Metode

Jenis penelitian adalah penelitian deskriptif yang dilakukan dengan metode *in silico* melalui pendekatan *molecular docking*.

Ligan dan Protein

Preparasi ligan dimulai dengan mencari potensial metabolit menggunakan webserver KnapSack (<http://www.knapsackfamily.com/KNAPSAcK/>). Pencarian metabolit dilakukan dengan menggunakan nama latin tumbuhan yang digunakan untuk penelitian (*Glycine max*). Setelah muncul semua metabolit yang terkandung di dalam tumbuhan, dipilih ligan terbaik dari tumbuhan tersebut. Selanjutnya, preparasi ligan dilakukan dengan mencari informasi ligan pada PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Ligan di-*download* dari PubChem dalam bentuk 3D dengan format .sdf.

Protein target yang digunakan pada penelitian ini adalah protein ESR2 (PDB ID:1QKM). Protein tersebut di-*download* dengan format .pdb pada RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>). Preparasi protein dilakukan dengan menggunakan *software* Pymol dengan menghilangkan molekul air dan menambah atom hidrogen. Lalu, protein dan ligan disimpan dalam file terpisah dengan format .pdb (Anggini et al., 2022).

Molecular Docking

Prediksi interaksi antara ligan dan reseptor dilakukan dengan menggunakan *software* Pyrx. Sebelum melakukan *docking*, energi ligan di-*minimize* terlebih dahulu. Pada proses *docking*, *native ligand* yang awalnya menyatu dengan protein target harus dilepas terlebih dahulu. Hal ini bertujuan untuk mengidentifikasi posisi sisi aktif yang selanjutnya dapat dijadikan posisi *docking* untuk ligan-ligan lainnya. *Docking* dilakukan pada sisi aktif sesuai posisi *native ligand* yaitu pada grid box (X:22.424, Y:8.277, Z:114.438). Setelah mendapatkan hasil *docking*, dipilih *binding affinity* yang terendah.

Analisis RMSD

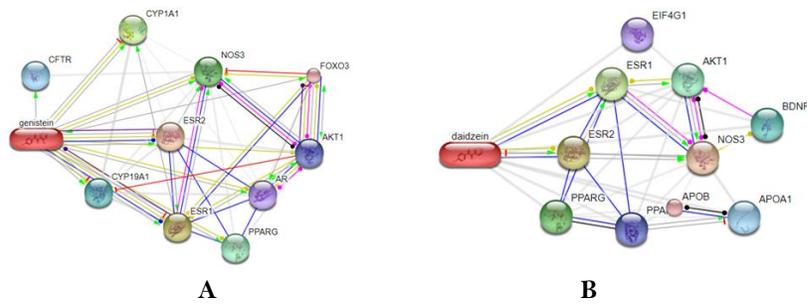
Analisis *root mean square deviation* (RMDS) dengan menggunakan webserver LigRMSD (<https://ligrmsd.appsbio.ualca.cl/>). Analisis ini dilakukan dengan melihat nilai RMSD antara *native ligand* protein dan ligan hasil *docking*.

Hasil dan Pembahasan

Ligan dan Protein

Berdasarkan pencarian pada web server Knapsack, diperoleh 347 metabolit yang terkandung dalam tumbuhan *Glycine max*. Dari hasil tersebut, dipilih ligan genistein dan daidzein untuk dianalisis lebih lanjut. Knapsack adalah database yang memuat informasi hubungan antara spesies dan metabolit (Shinbo et al., n.d.). Penelusuran ini dilakukan untuk memudahkan peneliti dalam mengidentifikasi ragam metabolit yang dikandung oleh suatu tanaman.

Penelusuran protein target memiliki hubungan dengan metabolit yang telah dipilih. Peneliti menggunakan web server Stitch. Hasil penelusuran menunjukkan bahwa genistein memiliki kemampuan mengaktivasi, mengikat, menghambat, mengkatalisis, dan mengekspresikan ESR2. Daidzein memiliki kemampuan mengaktivasi dan mengikat ESR2. Hubungan antara metabolit (genistein dan daidzein) terhadap ESR2 dapat dilihat pada Gambar 1.

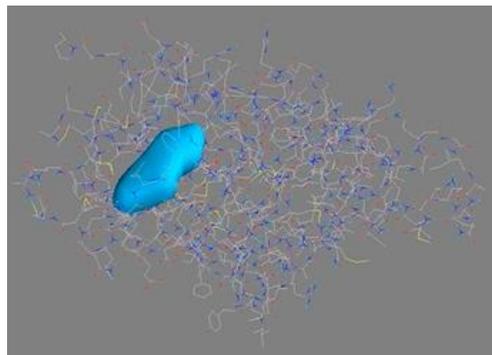


Gambar 1. Interaksi Ligan dan Protein pada Stitch. A) Ikatan Antara Genistein dan ESR2 dan B) Ikatan Antara Daidzein dan ESR2. Garis biru menunjukkan terjadinya ikatan antara ligan (genestein dan daidzein) terhadap protein (ESR2).

Penelusuran Stitch dilakukan dengan memasukkan metabolit dan organisme pada kotak penelusuran. Hal ini bertujuan untuk mendapatkan informasi hubungan metabolit dan organisme tersebut. Pengetahuan tentang interaksi antara protein dan metabolit sangat penting untuk memahami fungsi molekuler dan seluler. Stictch mengintegrasikan informasi tentang interaksi dari jalur metabolisme, struktur kristal, eksperimen pengikatan, dan hubungan obat-target. Informasi yang disimpulkan dari efek fenotipik, penambangan teks, dan kesamaan struktur kimia digunakan untuk memprediksi hubungan antar bahan kimia dan protein terkait sehingga memudahkan dalam pemilihan protein target (Kuhn et al., 2008).

Protein target yang digunakan memiliki PDB ID 1QKM. Pemilihan protein ini didasarkan pada resolusinya yang rendah dan *native ligand* yang menempel berupa genistein. Protein target diambil dari Protein Data Bank (PDB). Uniprot memberi beragam informasi terkait protein yang akan digunakan. Parameter pemilihan protein adalah resolusi yang dimilikinya. Semakin rendah resolusi, kualitas protein semakin bagus. Hal ini berhubungan dengan kristalografi sinar-X protein. Resolusi difraksi kristal protein berkorelasi baik dengan jumlah sinar-X yang dapat diamati pada pembuatan struktur yang berhubungan dengan kesalahan koordinat protein (Berjanskii et al., 2012).

Proses *molecular docking* dilakukan pada sisi aktif yang diketahui dari posisi *native ligand* yang terletak pada protein. Visualisasi protein target dan native ligand dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Posisi *native ligand* pada Protein Target. Panah merah (protein target) dan panah hitam (*native ligand*).

Molecular Docking

Berdasarkan hasil molcecular docking, didapatkan nilai *binding affinity*. Nilai *binding affinity* dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai *binding affinity*

Metabolit	<i>Binding affinity</i> (kcal/mol)
Genistein	-9.7
Daidzein	-9.7
<i>Native ligand</i>	-9.7

Dari nilai *binding affinity*, metabolit genistein dan daidzein memiliki nilai yang sama yaitu -9.7 kcal/mol. Nilai tersebut juga sama dengan nilai yang dihasilkan pada *native ligand*. Nilai yang dihasilkan sangat rendah yang menunjukkan bahwa adanya ikatan yang cukup kuat antara metabolit dan protein. *Native ligand* dapat dijadikan tolak ukur dalam menganalisis nilai *binding affinity* karena kemampuannya dalam mengikat protein target yang telah diuji pada penelitian sebelumnya (Rajagopal et al., 2020). Hal ini menunjukkan bahwa ada kemungkinan kedua metabolit mampu mengobati ketidaknormalan ekspresi dari ESR2 pada proses lebih lanjut.

Analisis RMSD

Setelah mendapatkan hasil *docking*, diperlukan analisis RMSD untuk mengetahui kemiripan dan posisi native ligand yang melekat pada protein dan ligan yang dihasilkan pada proses *docking*. Nilai RMSD yang didapatkan dari LigRMSD adalah 0.40 dengan posisi visualisasi dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Posisi kemiripan genistein (*native ligand*) sebelum dan sesudah proses *docking*.

Dari visualisasi, dapat diketahui bahwa kemiripan ligan antara sebelum dan sesudah *docking* sangat tinggi. Namun, pada beberapa posisi, terdapat sedikit perbedaan sehingga menyebabkan nilai RMSD tidak 0. Namun, hal ini masih sangat wajar. Nilai RMSD dikatakan baik jika $< 2 \text{ \AA}$. Semakin besar penyimpangan dari nilai, semakin besar kesalahan dalam prediksi ligan interaksi dengan makromolekul. Nilai RMSD terbaik adalah mendekati 0 \AA (Listiyani et al., 2018).

Kesimpulan dari penelitian ini adalah metabolit genistein dan daidzein diprediksi memiliki kemampuan untuk meningkatkan ekspresi ESR2 dalam tubuh manusia.

Daftar Pustaka

- Achyar, A., Atifah, Y., dan Putri, D. H. (2021). In silico study of developing a method for detecting pathogenic bacteria in refillable drinking water samples. *Journal of Physics: Conference Series*, 1940(1), 012061.
- Achyar, A., Putri, A. I., Putri, D. H., Ahda, Y. (2021). Primer design, in silico PCR and optimum annealing temperature for Escherichia coli detection in refillable drinking water samples. *Tropical Genetics*, 1(2), 52–60.
- Anggini, P. W., Amanina, S. A., Asyura, S. R., Dion, R. (2022). In silico Study of Essential Oil of Bambusa vulgaris Leaves as an Anti Beta-lactamase Compound. *Molecular and Cellular Biomedical Sciences*, 6(3), 147. <https://doi.org/10.21705/mcbs.v6i3.278>
- Aryan, L., Younessi, D., Zargari, M., Banerjee, S., Agopian, J., Rahman, S., Bornha, R., Ruffenach, G., Umar, S., Eghbali, M. (2020). The Role of Estrogen Receptors in Cardiovascular Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4314. <https://doi.org/10.3390/ijms2112431>.

- Dalal, H., Dahlgren, M., Gladchuk, S., Brueffer, C., Gruvberger-Saal, S. K., dan Saal, L. H. (2022). Clinical associations of ESR2 (estrogen receptor beta) expression across thousands of primary breast tumors. *Scientific Reports*, 12(1), 4696. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08210-3>
- Ichsyani, M., Ridhanya, A., Risanti, M., Desti, H., Ceria, R., Putri, D. H., Sudiro, T. M., dan Dewi, B. E. (2017). Antiviral effects of *Curcuma longa* L. against dengue virus in vitro and in vivo. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 101, 012005. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/101/1/012005>
- Mulyati, B. (2019). Peran Genestein Pada Pengikatan Reseptor Estrogen α . *Jurnal Industri Elektro Dan Penerbangan*, 8(2).
- Pons, D. G., Torrens-Mas, M., Nadal-Serrano, M., Sastre-Serra, J., Roca, P., dan Oliver, J. (2015). The presence of Estrogen Receptor β modulates the response of breast cancer cells to therapeutic agents. *The International Journal of Biochemistry dan Cell Biology*, 66, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.07.014>
- Putri, D. H., Anika, M., dan Wahyuni, W. (2019). Bioinformatics study genes encoding enzymes involved in the biosynthesis of carotenoids line cassava (*Manihot esculenta*). *Eksakta: Berkala Ilmiah Bidang MIPA (E-ISSN: 2549-7464)*, 20(1), 10–16.
- Rahma, M., dan Ahda, Y. (2021). Pengaruh Pemberian Ekstrak Kayu Manis (*Cinnamomum Burmanii*) Terhadap Jumlah Spermatazoa Pada Mencit Jantan (*Mus Musculus L.*). *Serambi Biologi*, 6(1).
- Rajagopal, K., Varakumar, P., Baliwada, A., dan Byran, G. (2020). Activity of phytochemical constituents of *Curcuma longa* (turmeric) and *Andrographis paniculata* against coronavirus (COVID-19): an in silico approach. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00126-x>
- Ruddy, S. C., Lau, R., Cabrita, M. A., McGregor, C., McKay, B. C., Murphy, L. C., Wright, J. S., Durst, T., dan Pratt, M. A. C. (2014). Preferential Estrogen Receptor β Ligands Reduce Bcl-2 Expression in Hormone-Resistant Breast Cancer Cells to Increase Autophagy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(7), 1882–1893. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-1066>
- Shimu, Mst. S. S., Mahmud, S., Tallei, T. E., Sami, S. A., Adam, A. A., Acharjee, U. K., Paul, G. K., Emran, T. bin, Zaman, S., Uddin, Md. S., Saleh, Md. A., Alshehri, S., Ghoneim, M. M., Alruwali, M., Obaidullah, A. J., Jui, N. R., Kim, J., dan Kim, B. (2022). Phytochemical Compound Screening to Identify Novel Small Molecules against Dengue Virus: A Docking and Dynamics Study. *Molecules*, 27(3), 653. <https://doi.org/10.3390/molecules27030653>
- Shinbo, Y., Nakamura, Y., Altaf-Ul-Amin, M., Asahi, H., Kurokawa, K., Arita, M., Saito, K., Ohta, D., Shibata, D., dan Kanaya, S. (n.d.). KNApSACk: A Comprehensive Species-Metabolite Relationship Database. In *Plant Metabolomics* (pp. 165–181). Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/3-540-29782-0_13
- Tang, Z.-R., Zhang, R., Lian, Z.-X., Deng, S.-L., dan Yu, K. (2019). Estrogen-Receptor Expression and Function in Female Reproductive Disease. *Cells*, 8(10), 1123. <https://doi.org/10.3390/cells8101123>
- Uyar, B., Sivrikoz, O. N., Ozdemir, U., Dasbasi, T., dan Sacar, H. (2014). Histological investigation of the effect of soybean (*Glycine max*) extracts on the collagen layer and estrogen receptors in the skin of female rats. *Clinics*, 69(12), 854–861. [https://doi.org/10.6061/clinics/2014\(12\)11](https://doi.org/10.6061/clinics/2014(12)11)
- Yap, B. K. , L. C. Y. , C. S. B. , K. E. E. , H. M. , dan W. H. A. (2019). In Silico Identification of Novel Inhibitors. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*. , 761–779.