

AFINITAS *LUTEIN* DARI EKSTRAK BUNGA MARIGOLD SEBAGAI POTENSI TERAPI KANKER TIROID PADA PROTEIN PPARG, RXRS, DAN MAP2K2 MELALUI DOCKING SENYAWA

Rizki^{1*}, Rifki Arief Munandar², Navtalia¹, Rizky Januardi³, Paskal Pratama³, Herlan Herdiawan⁴, Diki¹

¹Program Studi Biologi, Universitas Terbuka, Tangerang, Banten, Indonesia

²Program Studi Teknik Informatika, Universitas Nusa Putra, Sukabumi, Jawa Barat, Indonesia

³Program Studi Teknologi Pangan, Universitas Terbuka, Tangerang, Banten, Indonesia

⁴Penelitian dan Pengembangan PT. Sari Alam Sukabumi, Sukabumi, Jawa Barat, Indonesia

*Penulis korespondensi: rizkiart3@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi ekstraksi *Lutein* dari bunga marigold (*Tagetes erecta* L.) menggunakan metode dekokta dan mengevaluasi aktivitas antikankernya melalui studi *docking* senyawa. Bunga marigold diekstrak menggunakan metode dekokta sebanyak tujuh kali pada suhu 90°C, menghasilkan ekstrak serbuk dengan kadar *Lutein* rata-rata 2,42%. Kandungan *Lutein* dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 446 nm. Aktivitas antikanker *Lutein* dievaluasi melalui *docking* senyawa menggunakan perangkat lunak AutoDock Vina. Hasil *docking* menunjukkan bahwa *Lutein* memiliki afinitas tinggi terhadap protein-protein yang terkait dengan kanker tiroid, seperti MAP2K2, RXRA, RXRB, RXRG, dan PPARG, dengan nilai binding affinity yang rendah, menandakan ikatan yang kuat dan akurat. Studi ini menunjukkan potensi *Lutein* sebagai agen antikanker tiroid, namun penelitian lebih lanjut diperlukan untuk memvalidasi mekanisme *Lutein* melalui studi *in silico*, *in vitro* dan *in vivo*.

Kata kunci: *Tagetes erecta* L., dekok, *docking* senyawa, Autodock vina, Spectrophotometer uv-vis.

1 PENDAHULUAN

Bunga Marigold (*Tagetes erecta* L.) mengandung 57 senyawa bioaktif salah satunya sebagai sumber *Lutein* (Burlec, 2021), sebuah karotenoid yang tidak hanya penting untuk kesehatan mata tetapi juga memiliki potensi sebagai agen antikanker. *Lutein* banyak diteliti karena kemampuannya untuk berinteraksi dengan berbagai protein dalam tubuh yang terlibat dalam patogenesis. Menurut penelitian terbaru oleh Rizki *et al.* (2023), *Lutein* menunjukkan kemampuan berinteraksi dengan protein TRIM24, yang penting dalam pengaturan proliferasi sel kanker. Lebih lanjut, penelitian oleh Rozanowska *et al.* (2024) menunjukkan bahwa *Lutein* efektif dalam menangkal radikal kation yang merusak sel retinoid yang menandakan potensi protektifnya terhadap sel kanker.

Pada penelitian ini berfokus pada optimalisasi metode ekstraksi *Lutein* pada bunga marigold dengan metode dekokta menggunakan pelarut air, serta evaluasi aktivitasnya melalui studi *docking* senyawa. Metode dekokta ini dipilih berdasarkan efisiensi ekstraksinya dalam mendapatkan *Lutein* yang murni dan aktif. Selain itu, *docking* senyawa dilakukan untuk memprediksi interaksi *Lutein* dengan protein tubuh yang berhubungan dengan kanker tiroid. Dalam hal ini, database KEGG Pathway digunakan untuk menentukan fungsi terapeutik protein yang berinteraksi dengan *Lutein*.

Untuk mengidentifikasi potensi antikanker *Lutein*, analisis interaksi protein dilakukan menggunakan database STRING (<https://string-db.org/>), yang memungkinkan visualisasi jaringan interaksi protein dan mengidentifikasi hubungan antara *Lutein* dan protein-protein terkait kanker. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengonfirmasi mekanisme kerja *Lutein* secara *in vitro* dan *in vivo*, serta untuk mengembangkan metode ekstraksi yang lebih efisien dan aplikatif.

2 METODE

2.1 Penelusuran Senyawa Aktif Dan Protein Target

Penelusuran literatur tentang senyawa aktif pada bunga Marigold di website <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Selanjutnya Identifikasi target protein senyawa *Lutein* Canonical SMILES di web NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Kemudian, mencari literatur yang berhubungan dengan protein target dan senyawa *Lutein*.

Protein yang berpotensi berinteraksi dengan senyawa aktif tersebut didapatkan kemudian mencari fungsinya di website <https://www.uniprot.org/> dan penjelasannya sesuai jurnal yang telah dirangkum website tersebut. Jurnal tersebut dapat diakses di website NCBI sub bagian PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> atau di <https://europepmc.org/>.

Pencarian fail protein data bank (pdb) Protein Target melalui website <https://alphafold.ebi.ac.uk/>. Lalu Penentuan fungsi target protein dan hubungannya dengan penyakit melalui tabel KEGG *Pathway* yang dapat diakses pada website <https://string-db.org/>. Selain itu struktur 2 dimensi (2D) dari senyawa aktif dan sifatnya dapat dicari di website NCBI dan <https://www.drugbank.com/>, sedangkan struktur 2D atau 3D dan sifat protein target dalam tubuh tersedia di website <https://www.rcsb.org/>. Fungsi terapeutik dipelajari dengan menelusuri KEGG *Pathway* di website KEGG *Database* (genome.jp).

2.2 Ekstraksi Bunga Marigold Metode Dekokta

Ekstraksi senyawa aktif *Lutein* menggunakan dasar metode yang terdapat pada Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat (Depkes RI, 2000). Bunga marigold yang digunakan dalam percobaan ini diperoleh dari perkebunan bunga di Kec. Megamendung, Kabupaten Bogor, Jawa barat. Bunga kemudian diambil bagian petalnya saja lalu dikeringkan. Setelah kering diekstraksi menggunakan metode dekokta sebanyak 7 kali. Evaporasi ekstrak cair dengan pengkondisian suhu 90°C dan tekanan -15 cmhg hingga sekental kecap, kemudian diberi filler maltodekstrin dan keringkan pada suhu 80°C.

2.3 Penetapan Kadar *Lutein* Metode Spectrophotometer uv-vis

Alat dan Bahan. Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah spatula, *beaker glass*, neraca analitik, cawan petri, erlenmeyer, gelas ukur, corong gelas, kertas saring, labu ukur, pipet volumetrik, tabung reaksi, Sentrifugal, spektrofotometer UV-Vis, pipet tetes. Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah standar *Lutein* yang diperoleh dari Xi'an Day Natural.inc ekstrak serbuk bunga marigold, ethanol 96% diperoleh dari Laboratorium Research and Development PT Sari Alam Sukabumi, chloroform diperoleh dari Merck.

Metode Uji. Uji serapan panjang gelombang (λ) maksimum diantara 485 - 490 nm menggunakan standar *Lutein* dengan kadar 5,11%, buat deret standar larutan *Lutein* dengan konsentrasi 0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04% diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil dari pengukuran absorbansi inilah yang kemudian digunakan untuk membuat kurva standar *Lutein*. Sampel uji ditimbang 0,4 gram dalam labu ukur 10 ml, dilarutkan dengan 10 ml campuran kloroform : etanol (9 : 1) v/v kemudian ditarakan. Lalu disentrifugasi selama 5 menit, kecepatan 4000 RPM. Selanjutnya supernatan dipipet dan disaring menggunakan kertas saring whatmann, Selanjutnya larutan yang telah selesai disaring

dilakukan analisis nilai serapannya menggunakan *Spektrofotometri UV-Vis* dengan λ Maxs 446 nm.

Sampel yang telah diukur nilai serapannya, selanjutnya ditentukan konsentrasi senyawa *Lutein* dalam sampel berdasarkan persamaan regresi dari kurva baku kalibrasi *Lutein*. Senyawa *Lutein* pada sampel ekstrak bunga marigold bisa dihitung menggunakan persamaan:

$$\%Kadar\ Lutein = \frac{Kadar\ Lutein\ (g)}{Bobot\ sampel\ (g)} \times 100\% \quad (1)$$

2.4 Prediksi dan Docking Senyawa *Lutein* dengan Protein Tubuh

Pada proses *docking* senyawa, digunakan laptop dengan spesifikasi sebagai berikut : *Hardware* 1: prosesor AMD Ryzen 9 9500HX with Radeon Graphic (16 CPUs) ~3,3 GHz, memori 32 GB DDR4, kartu grafis NVIDIA GeForce RTX 3060 Laptop GPU (Approx Total Memory 22000 MB, penyimpanan SSD 2 TB, sistem operasi Windows 10 Home 64-bit (10.0 Build 19045). *Software* yang digunakan meliputi PyRx 0.8 yang secara default sudah terintegrasi dengan vina untuk simulasi *docking*, EduPyMOL versi 1.7.4.5 untuk visualisasi struktur molekul.

Langkah *docking* : Persiapan Canonical SMILES *Lutein* (NCBI) → Identifikasi target protein senyawa *Lutein* (*Swiss Target Prediction* dan *Superpred*) → Penentuan fungsi target protein dan hubungannya dengan penyakit melalui tabel *KEGG Pathway* (*String-db*) → Pemodelan Struktur 3D Protein Target dan validasi hasilnya (*Alpha Fold Protein Structure Database*) → *Docking* senyawa *Lutein* dan Protein Tubuh (*PyRx - Autodock Vina*) → Visualisasi dan validasi 3 dan 2 dimensi struktur serta ikatan molekul hasil *docking* (*Discovery Studio 2021 Client*).

3 HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Ekstrak Bunga *Tagetes erecta L.*

Bunga Marigold (*Tagetes erecta L.*) adalah tanaman hias yang dikenal dengan ciri khas diameter bunga antara 6 hingga 8,5 cm. Pertumbuhannya optimal terjadi pada suhu 18–23°C dan kelembaban 40–70% di ketinggian 800 mdpl. Dalam konteks budidaya, umur petik bunga Marigold tercatat sekitar 40–45 Hari Setelah Tanam (HST) bunga Marigold didapatkan dari perkebunan yang terletak di Kecamatan Megamendung wilayah kabupaten Bogor Selatan.



Gambar 1. Perkebunan Bunga Marigold



Gambar 2. Bunga Marigold

Giling kasar bunga kering Marigold sebanyak 11 kg lalu di ekstrak dengan perbandingan pelarut (1:13) b/v dengan suhu 100°C selama 1 jam. Pada proses ekstraksi dalam 1 jam setiap 10 menit ekstrak cair di uji TDS (*Total Dissolved Solid*) menggunakan TDS meter, setelah selesai ekstrak cair disaring menggunakan mesh 200, lalu ekstraksi dilakukan sebanyak 7 kali. Ekstrak cair di evaporasi dengan suhu 90°C dan tekanan -15 cmhg selama 24 jam. Ekstrak kental diformulasi dengan 25 kg maltodextrin, diaduk hingga homogen. Lalu dikeringkan

dalam oven pada suhu 90°C selama 24 jam. Setelah selesai proses pengeringan produk digiling lalu diayak menggunakan mesh 80.



Gambar 3. Proses Ekstraksi



Gambar 4. Proses Evaporasi



Gambar 5. Proses Pengeringan

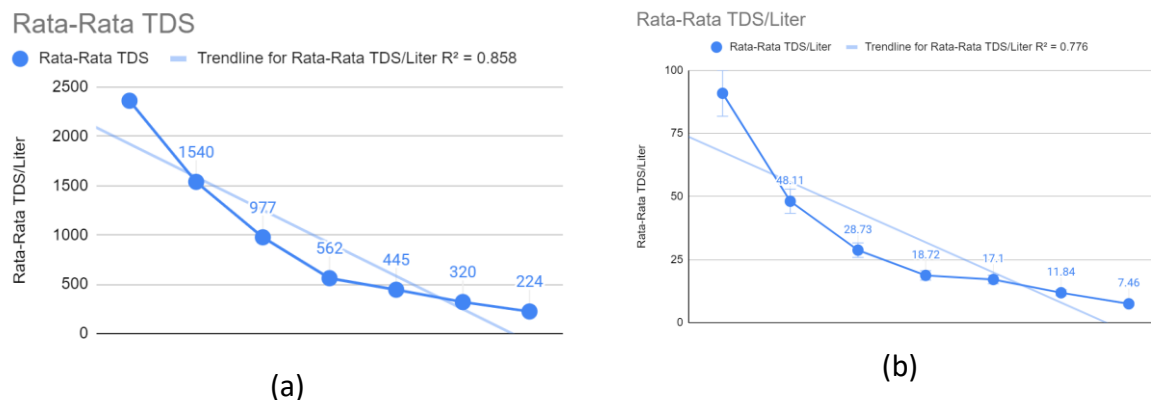


Gambar 6. Ekstrak Serbuk Bunga Marigold

Hasil TDS pada ekstrak cair bunga marigold disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil TDS pada ekstrak cair bunga marigold

Parameter	Ekstraksi 1	Ekstraksi 2	Ekstraksi 3	Ekstraksi 4	Ekstraksi 5	Ekstraksi 6	Ekstraksi 7
TDS	2130	1425	1037	612	446	326	233
(ppm)	2200	1542	993	576	426	301	232
	2640	1510	982	535	415	300	218
	2330	1572	971	550	424	330	216
	2329	1561	951	541	471	336	222
	2550	1628	927	555	485	325	221
Rata-Rata TDS	2363	1540	977	562	445	320	224
Qty Ekstrak (L)	26	32	34	30	26	27	30
Rata-Rata TDS/Liter	90,89	48.11	28.73	18.72	17.10	11.84	7.46



Gambar 7. Kurva regresi rata - rata TDS pada saat ekstraksi (a) dan rerata TDS/Liter larutan ekstrak

Pengujian TDS ini menjadi parameter dalam memaksimalkan proses ekstraksi, pada tahap ekstraksi ke 7 hasil TDS menunjukkan 224 ppm dan ekstraksi dihentikan. Hasil ekstraksi bunga marigold dengan pelarut air disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil ekstraksi bunga marigold dengan pelarut air

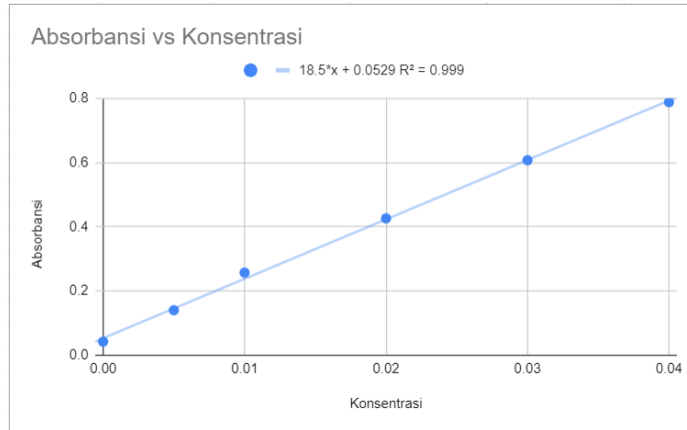
Bahan baku (Kg)	Eks. Cair (L)	Eks. Kental (L)	Eks. Serbuk (Kg)
11	205	18	25

Pada proses ekstraksi simplisia bunga marigold menggunakan metode maserasi, menggunakan bahan baku sebanyak 11 kg dan diekstraksi menggunakan pelarut air, menghasilkan bobot ekstrak sebanyak 25 kg.

3.2 Pengujian Kadar *Lutein*

Untuk tahap analisis lesitin hasil penelitian, langkah awal yaitu pembuatan larutan standar lesitin sebagai kurva standar, pembuatan larutan deret dengan konsentrasi 0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04% dan deret dengan konsentrasi 0.04% dijadikan larutan standar dan dicari serapan λ *Maxs* pada rentang panjang gelombang 485 - 490 nm. Nilai absorbansi tertinggi diperoleh pada panjang gelombang 446 nm dengan nilai absorbansi sebesar 0,765.

Kemudian larutan deret yang telah dibuat dianalisis menggunakan Spektrofotometri dengan λ *Maxs* 446 nm. diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 446 nm, diperoleh nilai absorbansinya yaitu 0,140; 0,257; 0,426; 0,607 dan 0,788. Hasil dari pengukuran absorbansi inilah yang kemudian digunakan untuk membuat kurva standar lesitin. Diperoleh persamaan garis untuk kurva standar *Lutein* $y = 18,5x - 0,0529$.



Gambar 8. Kurva regresi linier deret larutan standar *Lutein*

Dari Gambar 8 yang disajikan diperoleh kurva regresi linier diketahui persamaan regresi liniernya $y = 18,5x + 0,0529$ dengan nilai $R^2 = 0,999$. Secara umum jika R^2 mendekati 1 maka variasi data direpresentasikan dengan baik.

Tabel 3. Kadar *Lutein* pada ekstrak marigold

Bobot sampel (g)	Kadar <i>Lutein</i> (g)	Kadar <i>Lutein</i> (%)	Rata-rata (%) \pm RSD (%)
0,4039	0,1928	2,44	2,42 \pm 0,874
0,4039	0,1902	2,41	

Kadar *Lutein* pada ekstrak serbuk bunga marigold dianalisa dengan membagi hasil bobot kadar *Lutein* dengan bobot sampel dihitung menggunakan persamaan 1. Hasil analisa kadar *Lutein* yang disajikan pada Tabel 3, diperoleh rata-rata kadar *Lutein* sebesar 2,42% dengan simpangan baku 0,8747%.

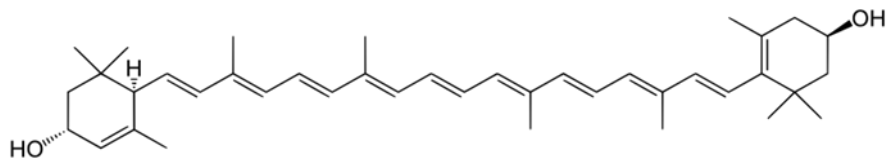
3.3 Prediksi Fungsi Terapeutik Senyawa *Lutein*

Tabel 4. Struktur *Lutein*

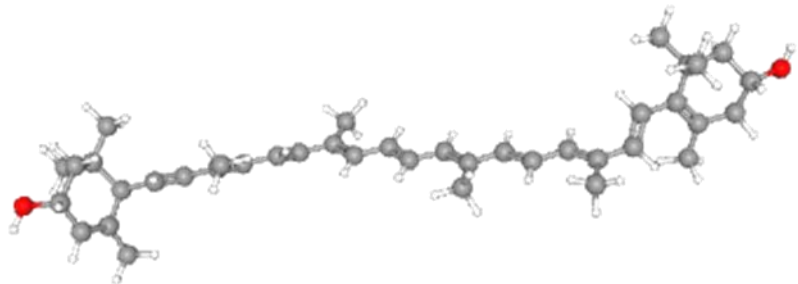
Canonical Smiles

CC1=C(C(CC(C1)O)(C)C)C=CC(=CC=CC(=CC=CC=C(C)C=CC=C(C)C)C=CC2C(=CC(CC2(C)C)O)C)C

Gambar 9. Struktur 2
Dimensi



Gambar 10. Struktur 3
Dimensi



Cellular Component (Gene Ontology)				
GO-term	description	count in network	strength	false discovery rate
GO:0000118	Histone deacetylase complex	7 of 80	1.27	0.00033
GO:0101002	ficolin-1-rich granule	6 of 185	0.84	0.0365
GO:0005667	Transcription regulator complex	11 of 517	0.66	0.0069
GO:0030141	Secretory granule	14 of 873	0.54	0.0108
GO:0005654	Nucleoplasm	41 of 4169	0.32	0.00039
(more ...)				

Reference publications (PubMed)				
publication	(year) title	count in network	strength	false discovery rate
PMID:23948281	(2013) The expression of histone deacetylase 4 is associate...	6 of 6	2.33	5.37e-07
PMID:25060069	(2014) Inhibition and mechanism of HDAC8 revisited.	5 of 5	2.33	7.76e-06
PMID:8824156	(1996) Molecular evolution of the N-formyl peptide and C5a ...	4 of 4	2.33	0.00016
PMID:31216674	(2019) A Tiny Change Makes a Big Difference in the Anti-Par...	4 of 4	2.33	0.00016
PMID:25070421	(2014) Evaluation of class I HDAC isoform selectivity of larg...	4 of 4	2.33	0.00016
(more ...)				

Local network cluster (STRING)				
cluster	description	count in network	strength	false discovery rate
CL:19302	Formyl peptide receptors bind formyl peptides and many ot...	3 of 5	2.11	0.0245
CL:31769	Dipeptidyl-peptidase activity, and Meprin A complex	3 of 12	1.73	0.0245
CL:18783	Blood clotting cascade, and Purpura	4 of 24	1.55	0.0245
CL:18731	Hemostasis, and Dissolution of Fibrin Clot	5 of 50	1.33	0.0245
CL:18728	Complement and coagulation cascades, and Positive regula...	6 of 109	1.07	0.0245

KEGG Pathways				
pathway	description	count in network	strength	false discovery rate
hsa05216	Thyroid cancer	4 of 37	1.36	0.0010
hsa00220	Arginine biosynthesis	2 of 21	1.31	0.0348
hsa04920	Adipocytokine signaling pathway	6 of 68	1.28	7.44e-05
hsa04977	Vitamin digestion and absorption	2 of 24	1.25	0.0417
hsa05030	Cocaine addiction	4 of 49	1.24	0.0021
(more ...)				

Reactome Pathways				
pathway	description	count in network	strength	false discovery rate
HSA-9632974	NR1H2 & NR1H3 regulate gene expression linked to glucone...	2 of 5	1.93	0.0202
HSA-9031528	NR1H2 & NR1H3 regulate gene expression linked to triglyce...	2 of 5	1.93	0.0202
HSA-9031525	NR1H2 & NR1H3 regulate gene expression to limit cholester...	2 of 5	1.93	0.0202
HSA-444473	Formyl peptide receptors bind formyl peptides and many ot...	3 of 8	1.9	0.0011
HSA-9029558	NR1H2 & NR1H3 regulate gene expression linked to lipogen...	3 of 9	1.85	0.0014
(more ...)				

Gambar 11. Analisis *String*-db Interaksi Protein Tubuh Hasil Prediksi Superpred

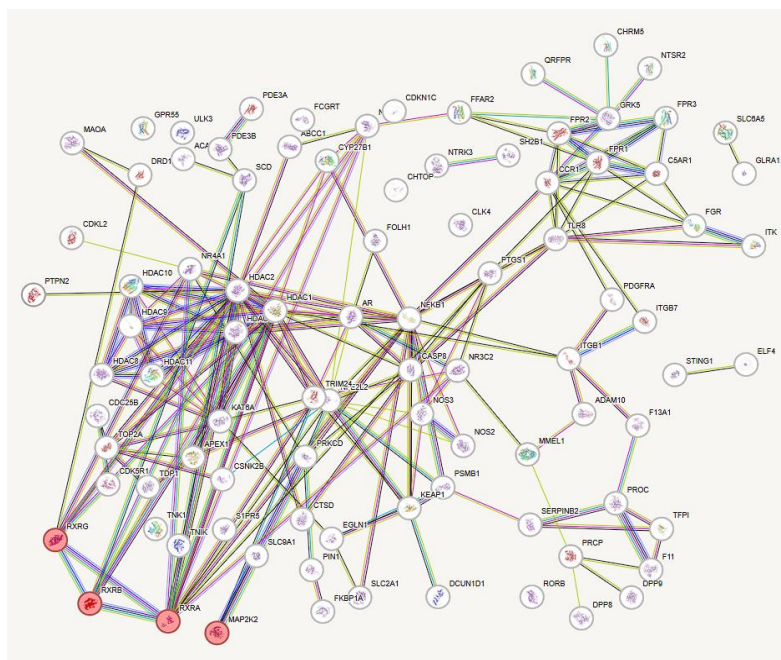
Pada gambar di atas terlihat terdapat tabel yang berisi KEGG *Pathways*, kolom *Strength* menunjukkan kekuatan interaksi protein tubuh tersebut dengan sesama proteinnya. Terlihat pada *Thyroid cancer* memiliki nilai tertinggi yaitu 1,36 daripada yang lainnya dan *false discovery rate* (tingkat kesalahan dalam jaringan) paling rendah yaitu 0,001.

Cellular Component (Gene Ontology)				
GO-term	description	count in network	strength	false discovery rate
GO:0097444	Spine apparatus	2 of 3	2.21	0.0168
GO:0097443	Sorting endosome	2 of 5	1.99	0.0261
GO:0099056	Integral component of presynaptic membrane	6 of 75	1.29	0.00049
GO:0032589	Neuron projection membrane	4 of 59	1.22	0.0152
GO:0042734	Presynaptic membrane	8 of 146	1.12	0.00015
(more ...)				
Reference publications (PubMed)				
publication	(year) title	count in network	strength	false discovery rate
PMID:29869299	(2018) Investigation of hormone receptor expression and its...	6 of 6	2.39	3.38e-08
PMID:26851083	(2016) Improved prediction of drug-target interactions using...	6 of 6	2.39	3.38e-08
PMID:20665621	(2010) Emerging roles of prostanoids in T cell-mediated im...	6 of 6	2.39	3.38e-08
PMID:14607267	(2003) Prostanoids in immunity: roles revealed by mice defi...	6 of 6	2.39	3.38e-08
PMID:37418975	(2023) Network pharmacology and topological analysis on t...	5 of 5	2.39	8.99e-07
(more ...)				
Local network cluster (STRING)				
cluster	description	count in network	strength	false discovery rate
CL:10015	NR1H2 & NR1H3 regulate gene expression to limit cholester...	4 of 6	2.21	2.05e-05
CL:10013	Negative regulation of cholesterol storage, and Retinoid X re...	6 of 11	2.12	3.05e-08
CL:20851	Mixed, incl. Post-traumatic stress disorder, and Myoma	3 of 6	2.08	0.0014
CL:9992	SREBP-SCAP-Insig complex, and Coenzyme A binding	2 of 5	1.99	0.0393
CL:23962	Opioid peptide, and Opioid receptor	2 of 5	1.99	0.0393
(more ...)				
KEGG Pathways				
pathway	description	count in network	strength	false discovery rate
hsa05216	Thyroid cancer	4 of 37	1.42	0.00038
hsa04710	Circadian rhythm	3 of 30	1.39	0.0026
hsa00100	Steroid biosynthesis	2 of 20	1.39	0.0171
hsa03320	PPAR signaling pathway	7 of 75	1.36	4.67e-06
hsa04923	Regulation of lipolysis in adipocytes	5 of 54	1.35	9.58e-05
(more ...)				
Reactome Pathways				
pathway	description	count in network	strength	false discovery rate
HSA-9026290	Biosynthesis of DPAn-3-derived maresins	2 of 2	2.39	0.0043
HSA-9026286	Biosynthesis of DPAn-3-derived protectins and resolvins	2 of 2	2.39	0.0043
HSA-9025106	Biosynthesis of DPAn-6 SPMs	2 of 2	2.39	0.0043
HSA-391908	Prostanoid ligand receptors	7 of 9	2.28	4.69e-11
HSA-9025094	Biosynthesis of DPAn-3 SPMs	3 of 4	2.26	0.00019

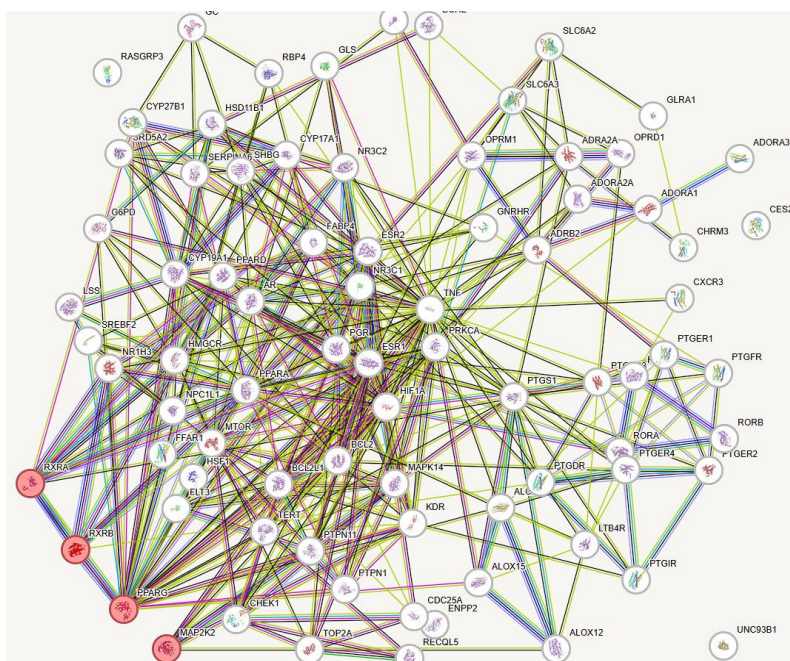
Gambar 12. Analisis *String*-db Interaksi Protein Tubuh Hasil Prediksi *Swiss Target Prediction*

Hasil yang sama pada hasil prediksi *Swiss Target Prediction* yaitu adanya jaringan *Thyroid cancer* pada jalur *KEGG Pathway*. Nilai yang *Strength* dan *False Discovery Rate* juga paling tinggi diantara yang lainnya dengan angka berturut - turut 1,42 dan 0,00038. Dengan demikian *Lutein* memiliki kemungkinan sebagai obat kanker tiroid.

Setelah diamati jalur tersebut mencakup 5 protein : *Retinoic acid receptor RXR-alpha* (RXRA), *Retinoic acid receptor RXR-beta* (RXRB), *Retinoic acid receptor RXR-gamma* (RXRG) *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPARG) dan *Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2* (MAP2K2). Pada *string*-db hasil prediksi *Swiss Target Prediction* dan Superpred memiliki kesamaan pada protein RXRA, RXRB dan MAP2K2. Ditunjukkan pada gambar berikut dengan protein target yang bersinggungan dengan kanker tiroid terdapat di sebelah kiri-bawah dan berwarna merah:



Gambar 13. Jaringan hasil analisis *String-db* prediksi *Swiss Target Prediction*



Gambar 14. Jaringan hasil analisis *String-db* prediksi *Superpred*

Penelitian yang dilakukan oleh Namba *et al.* (1990), diketahui bahwa kanker tiroid umumnya disebabkan oleh mutasi yang dibawa oleh gen BRAF V600E, mutasi RAS, perpaduan gen RET, atau perpaduan gen PAX8/PPARG. dalam hal ini, BRAF V600E adalah penyebab mutasi terbesar yang dapat menyebabkan kanker tiroid, namun hal ini ditemukan pada 40-45% pasien dari penderita *papillary thyroid carcinomas* (PTC) pada penderita kanker tiroid jenis lain, yaitu *follicular thyroid carcinomas* (FTC) ditemukan adanya 30-35% pasien yang penyebab mutasinya adalah PPARG/PAX8. Penggabungan gen PAX8/PPARG menghasilkan produksi protein fusi PAX8/PPARG (PPFP), yang ditemukan pada sekitar sepertiga *follicular thyroid carcinomas* (FTC) serta beberapa *follicular-variant papillary*

thyroid carcinomas. Bukti *in vitro* dan *in vivo* menunjukkan bahwa PFP adalah onkoprotein. Meskipun mekanisme kerja spesifik masih belum ditentukan, PFP dianggap bertindak sebagai penghambat dominan-negatif dari PPAR γ tipe liar dan/atau sebagai aktivator transkripsional unik dari subset yang responsif terhadap PPAR γ dan responsif terhadap PAX8.

Penelitian yang dilakukan oleh Asya *et al.* (2022), diketahui bahwa ekspresi berlebih PPAR γ terdeteksi dengan *Immunohistochemistry* (IHC) pada *follicular adenoma* (FA) dan pada beberapa varian papillary thyroid carcinomas (PTC), termasuk varian folikuler, klasik, padat, onkosit, dan mirip Warthin. Ekspresi berlebih PPAR γ pada PTC ditemukan berhubungan dengan berkurangnya invasi limfovaskular, berkurangnya invasi kapsul tiroid, dan berkurangnya metastasis kelenjar getah bening.

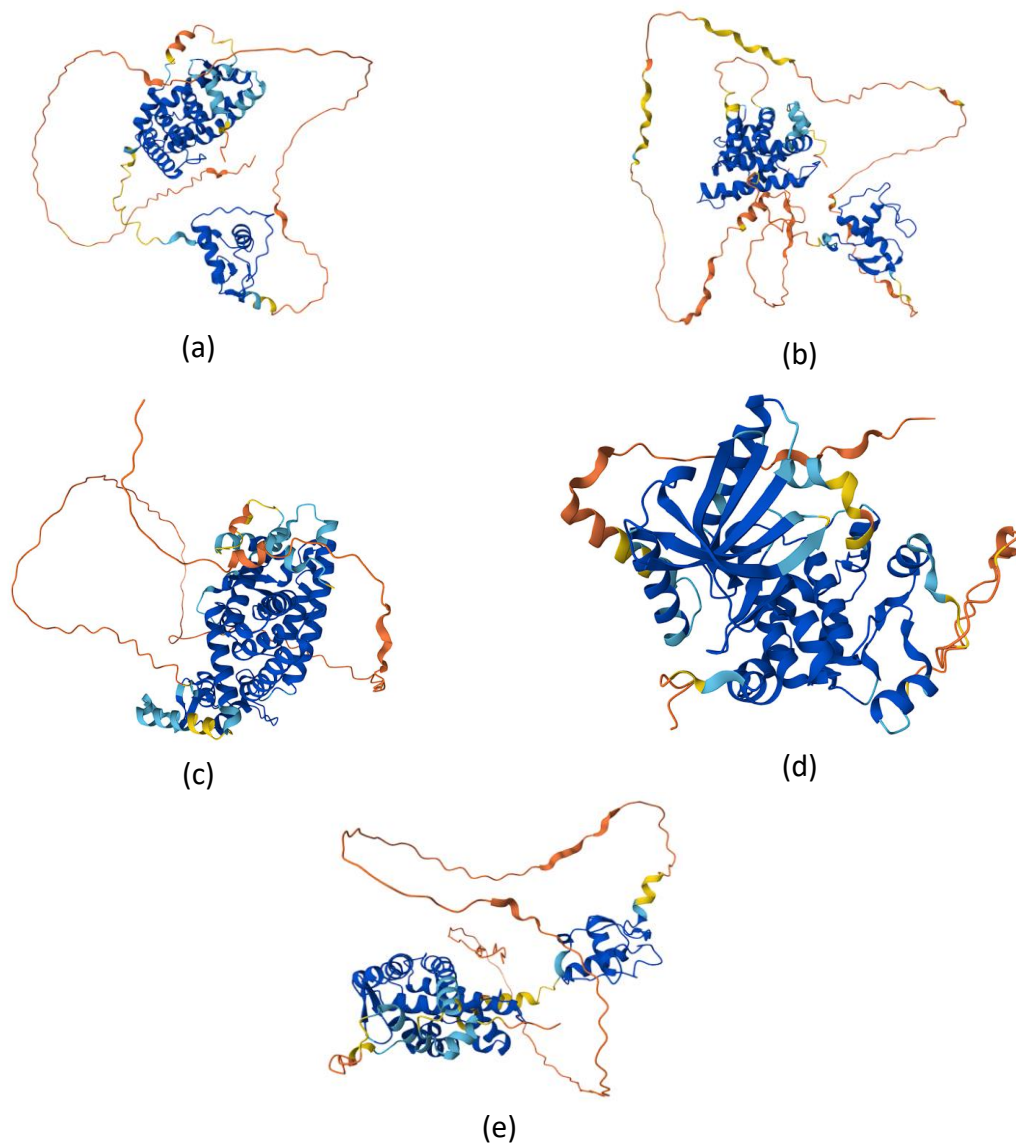
Penelitian oleh Takiyama *et al.* (2004), mengatakan bahwa RXR juga mempengaruhi pertumbuhan sel kanker tiroid. Hal ini disebabkan oleh RXR yang merupakan faktor transkripsi ligan induksi yang termasuk dalam reseptor hormon inti, dan RXR dapat melakukan heterodimerisasi dengan reseptor hormon tiroid (TR), RAR, reseptor vitamin D3, dan reseptor teraktivasi proliferasi peroksisom (PPAR), dan dengan reseptor lainnya. Dengan demikian RXR memainkan peran sentral dalam mengatur sejumlah jalur pensinyalan. Dikarenakan RXR sangat penting untuk berfungsinya TR dan PPAR γ , RXR juga dapat berkontribusi pada perilaku khusus pada penderita PTC atau FTC. Selain itu, RXR secara fungsional dalam garis sel dan sampel jaringan karsinoma tiroid manusia, dipengaruhi oleh penurunan ekspresi spesifik RXR- β mRNA yang dapat diamati pada sel karsinoma tiroid anaplastik (ATC) serta sampel karsinoma tiroid manusia. Di sebagian besar sistem sel ganas epitel, retinoid ditemukan menghambat sintesis DNA. Oleh karena itu, berkurangnya ekspresi RXR pada tumor tiroid manusia dapat mengganggu penghambatan sintesis DNA oleh retinoid dan dengan demikian dapat berkontribusi pada perkembangan karsinoma tiroid.

Hsiao dan Nikiforov (2014) mengatakan bahwa, Patogenesis molekuler dari sebagian besar kanker tiroid melibatkan disregulasi jalur pensinyalan mitogen-activated protein kinase (MAPK) dan fosfatidilinositol-3 kinase (PI3K)/AKT. Jalur MAPK sering diaktifkan pada kanker tiroid melalui mutasi titik pada gen BRAF dan RAS serta penyusunan ulang RET/PTC dan TRK. Mutasi titik pada BRAF ditemukan pada sekitar 45% kanker tiroid papiler. BRAF adalah serin-treonin kinase yang, setelah diaktifkan oleh RAS, mengaktifkan MEK dan mengarah pada aktivasi efektor hilir jalur MAPK. Di hampir semua kasus (98-99% kasus) mutasi titik pengaktifan BRAF melibatkan kodon 600 dan menghasilkan mutasi V600E, dan pada 1-2% kasus mutasi BRAF lainnya seperti mutasi K601E, penyisipan dalam bingkai kecil atau penghapusan, atau penataan ulang BRAF dapat terjadi. Gen RAS (HRAS, KRAS, dan NRAS) adalah protein G yang memberi sinyal pada jalur MAPK dan PI3K/AKT. Mutasi titik pada gen RAS biasanya terjadi pada kodon 12, 13, dan 61, dan ditemukan pada 40-50% FTC dan 10-20% PTC. PTC yang bermutasi RAS biasanya merupakan varian folikuler. Mutasi RAS juga terlihat pada 20-40% adenoma folikuler. Mutasi NRAS, HRAS, dan KRAS ditemukan pada tumor tiroid turunan sel folikuler, sedangkan mutasi pada HRAS dan KRAS juga terjadi pada kanker tiroid meduler.

Gen RET adalah reseptor tirosin kinase yang diekspresikan pada sel C tiroid, namun tidak pada sel folikel. Gen RET dapat diaktifkan melalui fusi dengan berbagai mitra yang mendorong ekspresi bagian 3' gen RET yang mengkode domain tirosin kinase reseptor, dan memberikan motif dimerisasi untuk mengarah pada aktivasi konstitutif RET kinase. Tipe penataan ulang yang paling umum adalah RET/PTC1 (dibentuk melalui fusi RET dengan gen CCDC6) dan RET/PTC3 (dibentuk melalui fusi RET dengan gen NCOA4). Penataan ulang RET/PTC1 dan RET/PTC3 ditemukan pada 10-20% PTC, dan insidennya semakin menurun. Penataan ulang ini ditemukan pada frekuensi yang lebih tinggi pada anak-anak/dewasa muda dan pada pasien dengan riwayat paparan radiasi. Selain penataan ulang yang melibatkan RET yang ditemukan

pada tumor tiroid papiler, gen RET umumnya ditemukan bermutasi pada karsinoma tiroid meduler, baik pada kasus familial maupun sporadis.

Dengan demikian, hal ini menyatakan bahwa kanker tiroid dapat disebabkan oleh berbagai gen yang mempengaruhinya, diantaranya adalah kombinasi dari PPARG dengan RXRA, RXRB, atau RXRG dapat mengatur ekspresi gen yang terlibat dalam proliferasi, diferensiasi, dan apoptosis. Disregulasi dalam jalur ini dapat menyebabkan pertumbuhan sel yang tidak terkontrol atau dalam kaitannya dengan *Crosstalk* antara jalur PPAR-RXR dan jalur MAPK (melalui MAP2K2) yang dapat mempengaruhi respon sel terhadap faktor pertumbuhan dan sinyal lingkungan, mempengaruhi progresi kanker dan/atau Mutasi pada jalur pensinyalan MAP2K2 atau perubahan ekspresi pada PPARG, RXRA, RXRB, dan RXRG yang dapat mengganggu keseimbangan normal antara proliferasi dan apoptosis, yang berkontribusi pada inisiasi dan progresi kanker tiroid.



Gambar 15. Struktur 3D protein : (a) RXRA, (b) RXRB, (c) PPARG, (d) MAP2K2 dan (e) RXRG

3.5 Docking Senyawa *Lutein* dan Protein Tubuh

Hasil *Docking* senyawa dari PyRx dan Autodock vina adalah fail dalam .pdb sehingga perlu ditampilkan secara 3D oleh aplikasi Pymol dan *Discovery Studio 2021*. Ikatan pada Senyawa *Lutein* dan Protein Tubuh ditandai dengan garis putus - putus. Visualisasi dan validasi ikatan menggunakan *Discovery Studio Client 2021*.

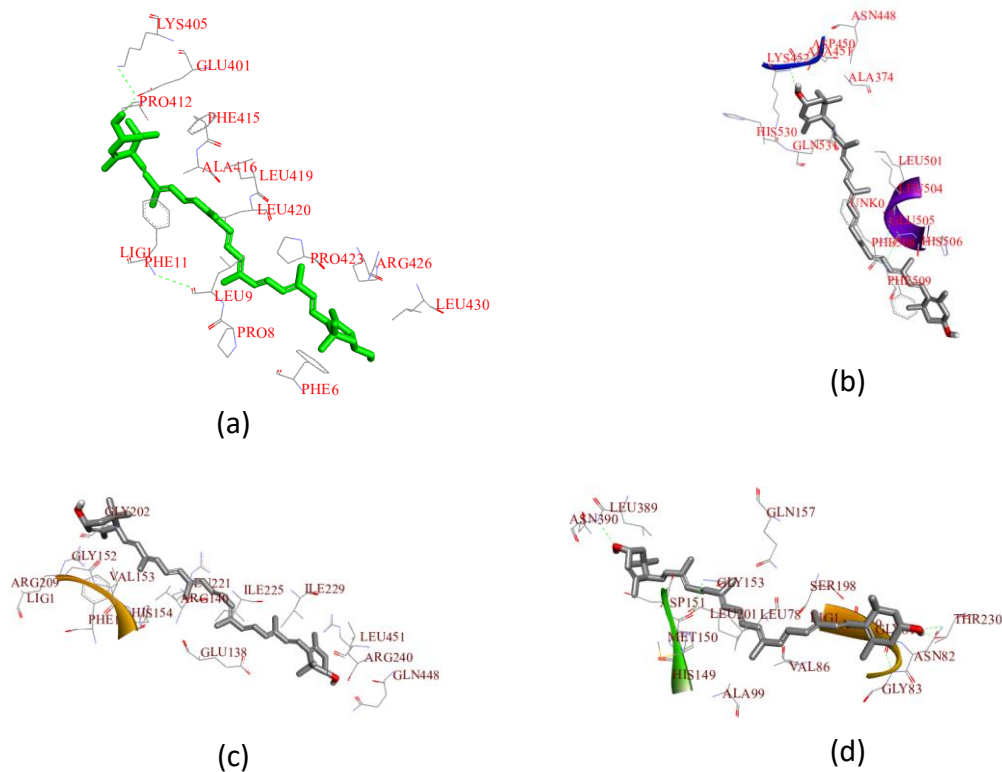
Docking molekuler menggunakan autodock vina akan menampilkan data penting ketika proses telah selesai, diantaranya Binding Affinity, RMSD/ub dan RMSD/lb. Binding Affinity menunjukkan seberapa kuat ikatan antara protein target dengan ligand, semakin rendah nilai tersebut maka semakin tinggi afinitasnya.

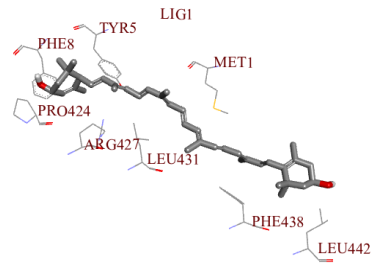
Pada RMSD ub atau lb (*Root Mean Square Deviation upper bound* atau *lower bound*) menunjukkan kemiripan posisi antara posisi dan orientasi molekul ligand dengan ikatannya bersama protein tubuh. $\text{RMSD} < 3,00 \text{ \AA}$ mengindikasikan *docking* yang baik dan akurat.

Tabel 5. Angka Penting Hasil *Docking* Protein Tubuh dengan Senyawa *Lutein*

Nama Protein	Binding Affinity	RMSD/ub	RMSD/lb
RXRA	-8,8	0,0	0,0
RXRB	-7,0	0,0	0,0
RXRG	-8,4	0,0	0,0
PPARG	-7,8	0,0	0,0
MAP2K2	-9,7	0,0	0,0

Visualisasi Ikatan 3D *Discovery Studio Visualizer*:

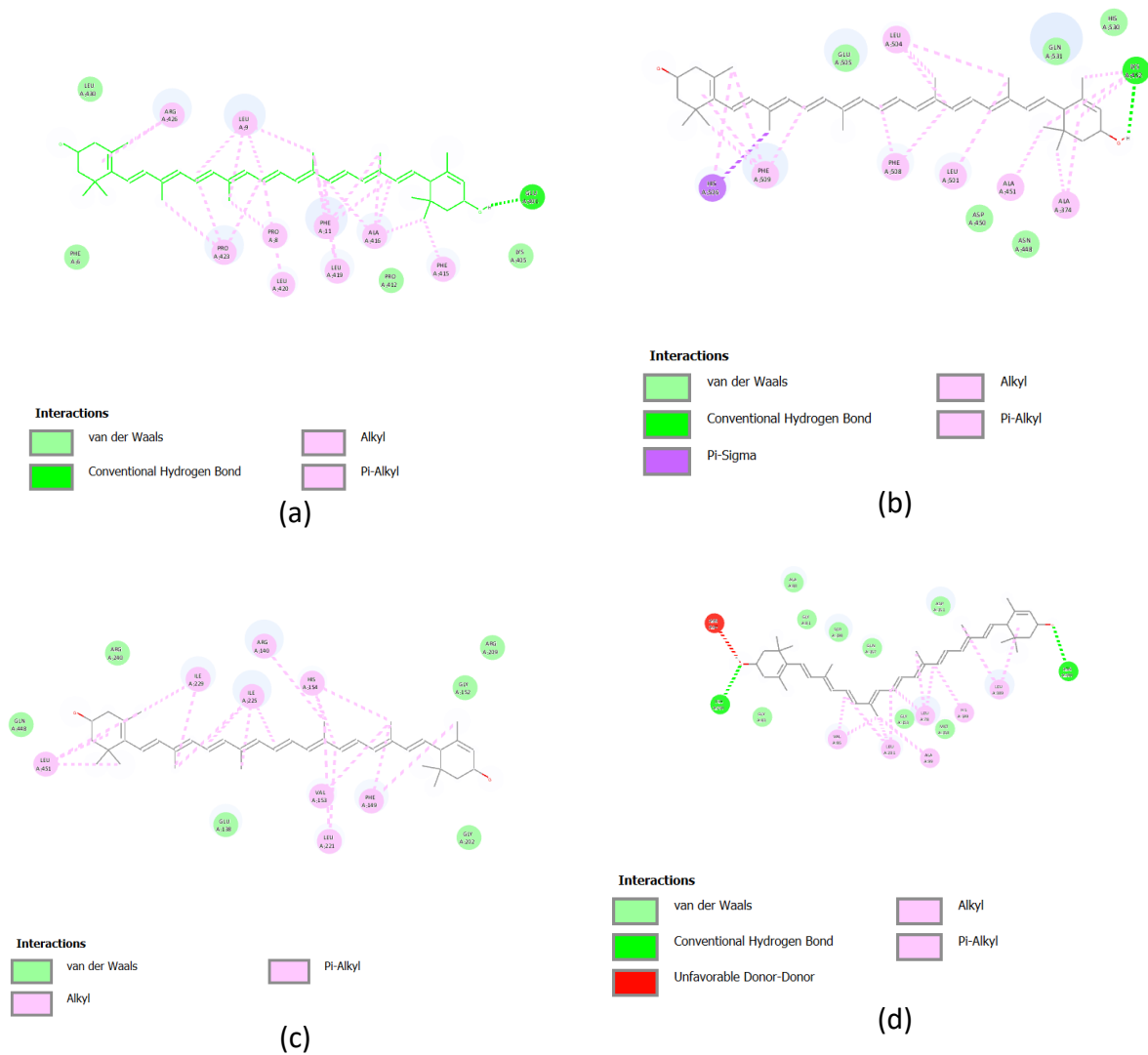


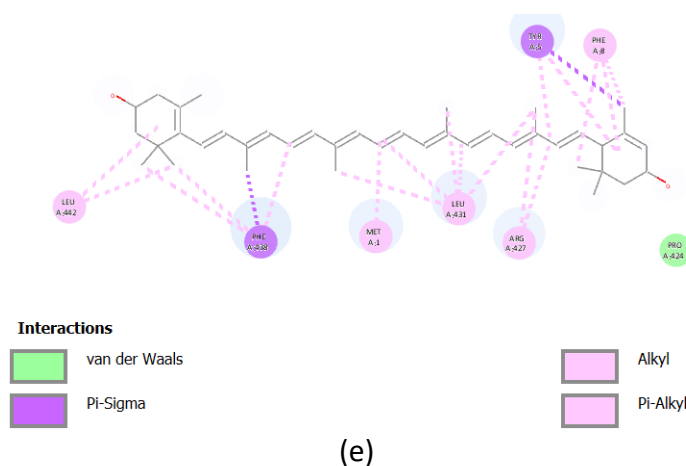


(e)

Gambar 16. Struktur 3D *Docking* antara *Lutein* dengan : (a) RXRA, (b) RXRB, (c) PPAR γ , (d) MAP2K2 dan (e) RXRG

Visualisasi 2 Dimensi Discovery Studio Visualizer :





Gambar 17. Struktur 3D *Docking* antara *Lutein* dengan: (a) RXRA, (b) RXRB, (c) PPARG, (d) MAP2K2 dan (e) RXRG

Hasil *docking* senyawa yang diperlihatkan oleh Discovery Studio Visualizer mencakup setidaknya 5 ikatan utama : Ikatan Hidrogen, gaya Van Der Waals, Pi-Sigma, Pi-Alkyl dan Alkyl. Pada ikatan MAP2K2 dan *Lutein* terlihat ada “Unfavorable donor-donor”. Apabila dilihat dari ikatannya maka RXRA, RXRB dan MAP2K2 memiliki ikatan paling kuat adengan *Lutein*, terutama MAP2K2 karena 2 kutub H pada *Lutein* semua berikatan dengan protein tersebut. Namun untuk PPARG dan RXRG tetap memiliki ikatan Alkyl dan Sigma yang berkombinasi dengan ikatan Pi disertai dengan gaya Van Der Waals.

4 KESIMPULAN

Ekstraksi bunga Marigold (*Tagetes erecta*) dari Kecamatan Megamendung, Kabupaten Bogor Selatan sebanyak 11 kg menghasilkan produk akhir seberat 25 kg dengan menggunakan ekspipien Maltodekstrin. Proses ekstraksi dilakukan menggunakan metode dekokta pada suhu 90°C sebanyak tujuh kali. Rerata *Total Dissolved Solids* (TDS) per liter yang dihasilkan dari ekstraksi pertama hingga ketujuh berturut-turut adalah 90,89; 48,11; 28,73; 18,72; 17,10; 11,84; dan 7,46. Ekstraksi dihentikan pada proses ketujuh karena perbedaan TDS terakhir terlalu rendah dibandingkan dengan ekstraksi pertama. Setelah melalui proses pengeringan, kadar *Lutein* dalam ekstrak kering dianalisis dan dibandingkan dengan produk dari Xi'an Day Natural.inc menggunakan metode spektrofotometer *UV-Vis*. Hasilnya menunjukkan bahwa kadar rata-rata *Lutein* yang diperoleh adalah sebesar 2,42%.

Interaksi *Lutein* di dalam tubuh diprediksi menggunakan Swiss Target Prediction dan Superpred setelah diketahui Canonical SMILESnya yang didapatkan dari website NCBI. Hasil prediksi interaksi dengan protein di dalam tubuh menunjukkan *Lutein* berikatan dengan protein RXRA, RXRB, RXRG, PPARG dan MAP2K2. Menurut jaringan KEGG, protein - protein tersebut berkaitan dengan kanker tiroid.

Lutein diketahui berikatan secara Hidrogen Konvensional, Pi-Sigma, Alkyl, Pi-Alkyl dan dipengaruhi gaya Van Der Waals serta terdapat juga Unfavorable Donor. *Docking* senyawa telah menunjukkan bahwa *Lutein* berinteraksi dengan protein tubuh yang memiliki nilai Root Mean Square Deviation (RMSD) sebesar 0,0 dan Binding Affinity sebesar -9,7 hingga -7,0, yang berarti prediksi ikatan akurat dan kuat. Namun, pada penelitian ini belum diketahui mekanisme *Lutein* pada kanker tiroid secara langsung sehingga diperlukan penelitian lanjutan seperti validasi *in silico* lanjutan, studi *in vitro* hingga *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

Asya, O., Yumuşakhuylu, A. C., Bağcı, P., Kaya, H., Gönen, A., Gündoğdu, Y., Muradov, T.,

- Şahin, A., & Oysu, Ç. (2022). Relationship of PPARG overexpression with prognostic parameters in papillary thyroid carcinoma. *Acta otorhinolaryngologica Italica : organo ufficiale della Societa italiana di otorinolaringologia e chirurgia cervico-facciale*, 42(1), 34–40. <https://doi.org/10.14639/0392-100X-N1034>
- Bietz, S., Urbaczek, S., Schulz, B., Rarey, M. (2014). Protoss: a holistic approach to predict tautomers and protonation states in protein-ligand complexes. *Journal of Cheminformatics*, 6:12.
- Bietz, S.; Rarey, M. (2016). SIENA: Efficient Compilation of Selective Protein Binding Site Ensembles. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 56 (1), pp 248–259.
- Bietz, S.; Rarey, M. (2015). ASCONA: Rapid Detection and Alignment of Protein Binding Site Conformations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 55 (8), 1747-1756.
- BIOVIA, Dassault Systèmes, BIOVIA Client, 2021.1.0, San Diego: Dassault Systèmes, 2021.
- Burlec, A. F., Pecio, Ł., Kozachok, S., Mircea, C., Corciovă, A., Vereştiuc, L., Cioancă, O., Oleszek, W., & Hăncianu, M. (2021). Phytochemical Profile, Antioxidant Activity, and Cytotoxicity Assessment of *Tagetes erecta* L. Flowers. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(5), 1201. <https://doi.org/10.3390/molecules26051201>
- Diedrich, K.; Graef, J.; Schöning-Stierand, K.; Rarey, M. (2020). GeoMine: interactive pattern mining of protein-ligand interfaces in the Protein Data Bank. *Bioinformatics*, 37(3), 424-425.
- Diedrich, K.; Krause, B.; Berg, O.; Rarey, M. (2023). PoseEdit: enhanced ligand binding mode communication by interactive 2D diagrams. *J Comput Aided Mol Des* 2023, doi: doi.org/10.1007/s10822-023-00522-4
- Fährrolfes, R.; Bietz, S.; Flachsenberg, F.; Meyder, A.; Nittinger, E.; Otto, T.; Volkamer, A.; Rarey, M. (2017). ProteinsPlus: a web portal for structure analysis of macromolecules. *Nucleic Acids Research*, 45:W337-W343.
- Flachsenberg, F.; Meyder, A.; Penner, P.; Sommer, K.; Rarey, M. (2021). A Consistent Scheme for Gradient-Based Optimization of Protein-Ligand Poses. *J. Chem. Inf. Model.*, doi: 10.1021/acs.jcim.0c01095.
- Graef, J.; Ehrt, C.; Diedrich, K.; Poppinga, M.; Ritter, N.; Rarey, M. (2021). Searching Geometric Patterns in Protein Binding Sites and Their Application to Data Mining in Protein Kinase Structures. *Journal of Chemical Information and Modeling*, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01046>.
- Graef, J.; Ehrt, C.; Rarey, M. (2023). Binding Site Detection Remastered: Enabling Fast, Robust, and Reliable Binding Site Detection and Descriptor Calculation with DoGSite3. *J. Chem. Inf. Model.*, 63, 10, 3128–3137, doi: 10.1021/acs.jcim.3c00336
- Hilbig, M.; Urbaczek, S.; Groth, I.; Heuser, S.; Rarey, M. (2013). MONA–Interactive manipulation of molecule collections. *Journal of cheminformatics*, 5(1), 38.
- Hilbig, M.; Rarey, M. (2015). MONA 2: a light cheminformatics platform for interactive compound library processing. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 55 (10), 2071-2078.
- Hsiao, S. J., & Nikiforov, Y. E. (2014). Molecular approaches to thyroid cancer diagnosis. *Endocrine-related cancer*, 21(5), T301–T313. <https://doi.org/10.1530/ERC-14-0166>
- Inhester, T.; Bietz, S.; Hilbig, M.; Schmidt, R.; Rarey, M. (2017). Index-Based Searching of Interaction Patterns in Large Collections of Protein-Ligand Interfaces. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 57, 2, 148-158.
- Jumper, J *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* (2021).
- Varadi, M *et al.* AlphaFold Protein Structure Database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences. *Nucleic Acids Research* (2024).
- Kanehisa, M. and Goto, S.; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 28, 27-30 (2000). [pubmed] [doi]

- Kanehisa, M; Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein Sci.* 28, 1947-1951 (2019) [pubmed] [doi]
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Kawashima, M. and Ishiguro-Watanabe, M.; KEGG for taxonomy-based analysis of *pathways* and genomes. *Nucleic Acids Res.* 51, D587-D592 (2023). [pubmed] [doi]
- Lippert, T., Rarey, M. (2009). Fast automated placement of polar hydrogen atoms in protein-ligand complexes. *Journal of Cheminformatics*, 1:13.
- Meyder, A.; Nittinger, E.; Lange, G.; Klein, R.; Rarey, M. (2017). Estimating Electron Density Support for Individual Atoms and Molecular Fragments in X-ray Structures. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 57(10): 2437–2447.
- Meyder, A.; Kampen, S.; Sieg, J.; Fährrolfes, R.; Friedrich, N.-O.; Flachsenberg, F.; Rarey, M. (2018). StructureProfiler: An all-in-one Tool for 3D Protein Structure Profiling. *Bioinformatics*, 35(5): 874-876.
- Namba, H., Rubin, S. A., & Fagin, J. A. (1990). Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.), 4(10), 1474–1479. <https://doi.org/10.1210/mend-4-10-1474>
- Nittinger, E.; Flachsenberg, F.; Bietz, S.; Lange, G.; Klein, R.; Rarey, M.(2018). Placement of Water Molecules in Protein Structures: From Large-Scale Evaluations to Single-Case Examples. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 58 (8), pp 1625-1637.
- O. Trott, A. J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of *docking* with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *Journal of Computational Chemistry* 31 (2010) 455-461, DOI 10.1002/jcc.21334
- Pletzer-Zelgert, J.; Ehrt, C.; Fender, I.; Griewel, A.; Flachsenberg, F.; Klebe, G.; Rarey, M. (2023). LifeSoaks: a tool for analyzing solvent channels in protein crystals and obstacles for soaking experiments. *Acta Cryst.* 2023, doi: doi.org/10.1107/S205979832300582X
- Raman, P., & Koenig, R. J. (2014). Pax-8-PPAR- γ fusion protein in thyroid carcinoma. *Nature reviews. Endocrinology*, 10(10), 616–623. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.115>
- Rizki, R., Navtalia, N., Untsa, N. N., Diki, D., & Munandar, R. A. (2023). Prediksi Interaksi Senyawa Aktif Bunga Marigold *Tagetes Erecta L.* Dengan Protein Tubuh Dan Penentuan Prosedur Ekstraksi. In *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi " SainTek"* (Vol. 1, No. 1, pp. 275-287).
- Rozanowska, M., Edge, R., Land, E. J., Navaratnam, S., Sarna, T., & Truscott, T. G. (2023). Scavenging of Cation Radicals of the Visual Cycle Retinoids by *Lutein*, Zeaxanthin, Taurine, and Melanin. *International journal of molecular sciences*, 25(1), 506. <https://doi.org/10.3390/ijms25010506>
- Singh, A., Ham, J., Po, J. W., Niles, N., Roberts, T., & Lee, C. S. (2021). The Genomic Landscape of Thyroid Cancer Tumourigenesis and Implications for Immunotherapy. *Cells*, 10(5), 1082. <https://doi.org/10.3390/cells1005108>
- Schöning-Stierand, K.; Diedrich, K.; Fährrolfes, R.; Flachsenberg, F.; Meyder, A.; Nittinger, E.; Steinegger, R.; Rarey, M. (2020). ProteinsPlus: interactive analysis of protein–ligand binding interfaces. *Nucleic Acids Research*, 48:W48-W53.
- Schöning-Stierand, K.; Diedrich, K.; Ehrt, C.; Flachsenberg, F.; Graef, J.; Sieg, J.; Penner, P.; Poppinga, M.; Ungethüm, A.; Rarey, M. (2022). ProteinsPlus: a comprehensive collection of web-based molecular modeling tools. *Nucleic Acids Research*, 50:W611-W615.
- Stierand, K.; Maass, P. C.; Rarey, M. (2010). Drawing the PDB - Protein-Ligand Complexes in two Dimensions. *Medicinal Chemistry Letters*, 1 (9) 540-545.
- Takiyama, Y., Miyokawa, N., Sugawara, A., Kato, S., Ito, K., Sato, K., Oikawa, K., Kobayashi, H., Kimura, S., & Tateno, M. (2004). Decreased expression of retinoid X receptor isoforms in human thyroid carcinomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 89(11), 5851–5861. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-032036>

- Volkamer, A.; Kuhn, D.; Grombacher, D.; Rippmann, F.; Rarey, M.. Combining global and local measures for structure-based druggability predictions. *J. Chem. Inf. Model.* 2012,52,360-372.
- Xu, B., O'Donnell, M., O'Donnell, J., Yu, J., Zhang, Y., Sartor, M. A., & Koenig, R. J. (2016). Adipogenic Differentiation of Thyroid Cancer Cells Through the Pax8-PPAR γ Fusion Protein Is Regulated by Thyroid Transcription Factor 1 (TTF-1). *The Journal of biological chemistry*, 291(37), 19274–19286. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.740324>
- Zhang, Y., Yu, J., Lee, C., Xu, B., Sartor, M. A., & Koenig, R. J. (2015). Genomic binding and regulation of gene expression by the thyroid carcinoma-associated PAX8-PPARG fusion protein. *Oncotarget*, 6(38), 40418–40432. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6340>