

**VIRTUAL SCREENING SENYAWA AKTIVATOR POTENSIAL ENZIM
SIRTUIN-3 TERKAIT KANKER ORAL DARI ENSIKLOPEDI TANAMAN
OBAT INDONESIA DENGAN METODE MOLECULAR DOCKING PLANTS**
*Virtual Screening of the Compounds for Potential Enzyme Activator of Sirtuin-3 for
Oral Cancer from Indonesian Herbal Medicines Encyclopedia with Molecular
Docking PLANTS Method*

Pharmacy Study Programme, Faculty of Medicine and Health Science
Muhammadiyah University of Yogyakarta
Mala Hikmawan Primana*, Hari Widada
hikmawanasura@gmail.com

ABSTRACT

Oral cancer is a kind of head and neck cancers, that is developed from mouth or orofaring and commonly caused by Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC). The purpose of this research is to find the marker compound that contained in Indonesian herbal medicines as the anticancer agents by computational method.

The method of this research was in silico, that was a molecular docking by using PLANTS software. The marker compound were taken from the Indonesian Herbal Pharmacopoeia 2008 and 2011 edition, four groups of marker compound were used for molecular docking, those were (i) alkaloids, (ii) flavonoids, (iii) fenolics, (iv) terpenoids and the essential oils. Meanwhile the standard compound for comparison were (1S)-6-Chloro-2,3,4,9-Tetrahydro-1H-Carbazole-1-Carboxamide (OCZ) the native ligand of Sirtuin-3, Resveratrol and Oroxylin A. In this research, the analysis was conducted by comparing the docking score of the marker compound to the standard and visualizing the molecular docking by using Visual Molecular Dynamics (VMD).

The results of this research showed that there were several marker compounds that potentially can be used for anticancer agents, those were shogaol (fenolics) with docking score -105.703, piperin (alkaloids) -90.1175, filantine (flavonoids) with docking score -89.7129, and xanthorizol (terpenoids) with docking score -86.2055. The docking score of the standard compounds were OCZ = -90.7912, Resveratrol = -78.2063, and Oroxylin A = -70.5626. The results of visualization showed that the marker compounds and the standard compounds were bonded with the same residue, that was threonine 227. Based on the results of the molecular docking of the marker compounds from each groups could be predicted as the oral anticancer agents by activating Sirtuin-3 enzyme.

Keywords: Oral cancer, Sirtuin-3, In silico, Marker compound

INTISARI

Kanker rongga mulut merupakan bagian dari kanker kepala dan leher, yang berkembang di setiap tempat dari rongga mulut atau orofaring yang pada umumnya disebabkan oleh *Oral Squamous Cell Carcinoma* (OSCC). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menemukan senyawa *marker* dari tumbuhan obat khas Indonesia sebagai agen yang berpotensi untuk antikanker secara komputasi.

Metode yang digunakan adalah metode *in silico*, yaitu dengan melakukan *molecular docking* menggunakan perangkat lunak PLANTS. Senyawa *marker* didapatkan dari Farmakope Herbal Indonesia edisi 2008 dan 2011, kemudian senyawa *marker* dikelompokkan menjadi 4 kelompok, yaitu (i) alkaloid, (ii) flavonoid, (iii) fenolik, (iv) terpenoid dan minyak atsiri, dengan senyawa pembanding yaitu *(1S)-6-Chloro-2,3,4,9-Tetrahydro-1H-Carbazole-1-Carboxamide* (OCZ) yang merupakan ligan asli protein *Sirtuin-3* yang diuji, Resveratrol dan Oroxylin A. Analisis hasil penelitian ini berupa perbandingan skor penambatan dari masing-masing golongan senyawa yang diuji dan hasil visualisasi menggunakan aplikasi *Visual Molecular Dynamics* (VMD).

Hasil penelitian ini menunjukkan beberapa senyawa dari masing-masing golongan senyawa *marker* berpotensi baik sebagai agen antikanker, yaitu shogaol (fenolik) dengan skor penambatan -105.703, piperin (alkaloid) dengan skor -90.1175, filantin (flavonoid) dengan skor -89.7129, dan xanthorizol (terpenoid) dengan skor -86.2055. Skor senyawa pembanding OCZ -90.7912, Resveratrol -78.2063, Oroxylin A -70.5626. Hasil visualisasi menunjukkan bahwa senyawa uji dan senyawa pembanding melekat pada residu yang sama, yaitu threonin ke-227. Dari hasil penambatan molekul senyawa *marker* dari masing-masing golongan dapat diprediksikan berpotensi sebagai senyawa antikanker oral dengan cara aktivasi enzim *Sirtuin-3*.

Kata kunci: Kanker oral, *Sirtuin-3*, *In silico*, Senyawa *marker*

PENDAHULUAN

Kanker atau tumor ganas adalah pertumbuhan sel/jaringan yang tidak terkendali, terus tumbuh atau bertambah dan tidak dapat mati (Depkes RI, 2013). Di Indonesia, kanker merupakan penyakit paling mematikan ke-5 dan mengalami peningkatan secara bermakna (Depkes RI, 2010). Salah satu jenis kanker yang berbahaya adalah kanker oral (kanker rongga mulut) yang meliputi bibir dan mukosa bibir, lidah, palatum, gingiva, dasar mulut dan mukosa pipi. Kasus kanker rongga mulut di Indonesia berkisar antara 3-4% dari seluruh kanker yang terjadi (Soeksmanto *et al.*, 2010). Angka kematiannya 2-3% dari seluruh kematian akibat keganasan (Sirait, 2013).

Secara genetik, terdapat dua macam gen yang paling berperan dalam karsinogenesis, yaitu *oncogenes* dan *tumor suppressor genes*. *Oncogenes* diketahui berkembang dari sel normal dan bisa aktif karena terjadi perubahan genetik yang disebabkan oleh agen karsinogen seperti radiasi, bahan-bahan kimiawi, dan virus (mutasi somatik). Sedangkan *tumor suppressor genes* adalah kelompok gen yang bersifat mengatur ulang sel, menghambat pertumbuhan kelainan sel dan menghambat proliferasi. Kelompok *tumor suppressor genes* ini adalah *tumor suppressor* dengan kode APC, p53, BRCA1, dan BRCA2 (Dipiro *et al.*, 2008).

Sirtuin adalah kelompok protein bebas *Nicotinamide Adenine Dinucleotide* (NAD) *deasetilase* dan/atau *Adenosine Diphosphate* (ADP) *ribosiltransferase* yang berperan dalam

metabolisme dan respon terhadap stres, *Sirtuin* berperan dalam produksi energi, oksidasi lemak dalam tubuh dan bersifat sebagai supresor pada tumor (Finley *et al.*, 2011). Saat ini *Sirtuin* diketahui memiliki 7 macam polimer dan ditemukan pada tempat yang berbeda yaitu nukleus, sitosol, mitokondria dan nukleolus. *Sirtuin* 1-7 memiliki aktivitas enzimatik dan proses intraseluler seperti metabolisme, antipenuaan (*antiaging*), kanker dan respon pada stress (Villalba *and* Alcain, 2012).

Salah satu polimer *Sirtuin* yang paling berperan dalam supresi kanker adalah *Sirtuin-3*. Secara *in vitro* regulasi *Sirtuin-3* bersifat menghambat pertumbuhan dan proliferasi sel *Oral Squamous Cell Carcinoma* (OSCC), meningkatkan sensitivitas sel OSCC terhadap radiasi dan terapi dengan menggunakan *Cisplatin* (Alhazzi *et al.*, 2011). Fakta tersebut dapat dijadikan referensi dalam pengembangan obat antikanker.

Penelitian dan pengembangan obat bertujuan untuk mengembangkan agen terapi baru. Pada umumnya pengembangan obat dilakukan melalui studi farmakokinetik dan penelitian proses metabolisme obat yang melibatkan metode *in vivo* dan *in vitro*, sehingga pengembangan obat membutuhkan waktu sekitar 15 tahun (Lin *and* Lu, 1997). Untuk membantu penelitian dan pengembangan obat-obatan dengan waktu dan biaya yang efisien, saat ini berkembang metode baru yang melibatkan studi kimia komputasi sebagai langkah awal untuk melakukan skrining terhadap senyawa tertentu. Pengembangan senyawa obat baru

khususnya obat kanker dapat dilakukan dengan metode komputasi yaitu *molecular docking*. *Molecular docking* adalah metode untuk memprediksi aktivitas struktur senyawa atau *ligan* dengan kompleks protein secara *In silico* atau *virtual screening* (VS) (Kroemer, 2007). *Molecular Docking Protein-Ligands ANT-System* (PLANTS) merupakan salah satu aplikasi yang dapat digunakan untuk melakukan *Docking Ligan-Protein* (Purnomo, 2013).

Penelitian ini bertujuan untuk menemukan agen antikanker oral dengan menggunakan metode penambatan molekul (*molecular docking*). Hasil penelitian ini akan dinyatakan dalam skor penambatan dan digambarkan secara *virtual* 3D dengan menggunakan aplikasi YASARA dan *Visual Molecular Dynamics* (VMD).

METODE PENELITIAN

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksploratif dengan metode *in silico* senyawa *marker* dari ensiklopedi tanaman obat Indonesia (Farmakope Herbal Indonesia) terhadap *Sirtuin-3* (4BVB) menggunakan aplikasi *molecular docking* PLANTS di Laboratorium penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

Penyiapan Senyawa Marker

Senyawa *marker* tumbuhan obat dikoleksi dari Farmakope Herbal 2008 dan 2011. Senyawa *marker* dibuat dalam bentuk berkas (*file*) dengan menggunakan aplikasi *ChemDraw* 2010

pada system operasi *Windows*. Senyawa *marker* disimpan dengan format “.*cdx*”.

Penyiapan Protein Uji

Protein yang akan digunakan sebagai reseptor uji diunduh dari situs resmi *protein data bank* (www.rcsb.org) dalam format “.*pdb*”. Pada situs tersebut disediakan berbagai macam protein *Sirtuin* dalam bentuk *virtual*, sehingga dilakukan pengumpulan seluruh macam berkas protein *Sirtuin* kemudian dilakukan seleksi terhadap berkas-berkas protein tersebut.

Instalasi Sistem Operasi Linux dan Aplikasi Pendukung

Instalasi sistem operasi Linux dilakukan karena aplikasi yang dibutuhkan untuk melakukan penambatan molekul pada umumnya hanya dapat dioperasikan pada Linux. Sistem operasi yang diinstal adalah *Linux Mint 16 Cinnamon 32-bit*.

Setelah instalasi Linux, dilakukan instalasi aplikasi pendukung seperti YASARA untuk preparasi protein uji dan ligan asli, *Marvin Sketch* untuk preparasi ligan atau yang akan diuji, PLANTS untuk melakukan penambatan molekul dan VMD untuk visualisasi hasil penambatan (*docking*) dalam bentuk *virtual* 3D.

Seleksi dan Validasi Protein Berdasarkan RMSD

Preparasi Protein Uji dan Ligan Asli

Preparasi protein uji dan ligan asli menggunakan aplikasi YASARA. Protein uji dalam bentuk *virtual* dengan format “.*pdb*” dibuka, residu yang dianggap sebagai pengganggu seperti

senyawa H₂O dihilangkan. Ligan asli dari protein dihilangkan, karena posisi dari ligan tersebut yang akan digunakan untuk tempat uji senyawa yang lain pada saat dilakukan proses penambatan molekul (*molecular docking*). Dilakukan penambahan atom hidrogen pada masing-masing residu pada protein tersebut dengan tujuan untuk optimasi nilai penambatan (*docking*) yang dihasilkan. Protein yang sudah dipreparasi disimpan dalam format “.mol2”, karena aplikasi PLANTS hanya dapat menjalankan berkas dengan format “.mol2”.

Preparasi ligan asli dari protein uji dilakukan dengan cara membuka berkas protein pada halaman YASARA yang baru. Setelah itu semua residu dihapus kecuali residu ligan aslinya. Atom hidrogen ditambahkan pada ligan asli tersebut. Berkas ligan asli disimpan dalam format “.mol2”.

Preparasi Ligand

Preparasi ligan menggunakan aplikasi *Marvin Sketch*. Pada uji validasi, berkas ligan yang akan dipreparasi adalah ligan asli yang telah dibuat dari YASARA. Berkas ligan dibuka kemudian diatur dalam bentuk 2D dengan cara menekan tombol “CTRL + 2” pada *Marvin Sketch*, tujuannya untuk konformasi ligan yang dipreparasi dapat mudah dibentuk secara optimal. Ligan yang sudah dibentuk dikondisikan pada pH 7,4 agar sesuai dengan kondisi pH cairan tubuh manusia dan disimpan dalam format “.mrv”.

Berkas “.mrv” yang sudah dibuat dibuka kembali pada halaman baru *Marvin Sketch*, setelah itu dilakukan

pembuatan konformasi ligan yang akan diuji sebanyak 10 macam konformasi. Berkas konformasi ligan disimpan dalam format “.mol2”.

Menjalankan Proses Penambatan Molekul

Menjalankan aplikasi PLANTS harus menggunakan terminal pada Linux. Setelah berkas protein, ligan asli (*native ligand*) dan ligan yang akan diuji sudah disiapkan, dilakukan penyiapan berkas pendukung untuk PLANTS, yaitu berkas *plantsconfig*. Berkas *plantsconfig* ini digunakan sebagai wadah untuk menampung berkas protein, ligan asli dan ligan untuk dijalankan oleh aplikasi PLANTS.

Proses Validasi Protein

Setelah didapatkan skor penambatan, berkas konformasi nilai ligan yang paling rendah diambil dari *folder Results*, berkas dengan nilai paling minimum yang dipilih karena menandakan konformasi tersebut membutuhkan energi paling minimum untuk berikatan pada reseptornya dengan afinitas yang paling baik. Setelah itu dilakukan validasi metode *molecular docking* dengan cara menghitung nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD). RMSD adalah parameter yang umumnya digunakan untuk mengevaluasi kemiripan dua buah struktur berdasarkan perbedaan jarak atom yang sejenis.

Untuk mengukur nilai RMSD, digunakan aplikasi YASARA. Cara mengukur RMSD dengan YASARA adalah dengan membuka berkas ligan asli kemudian ditindih dengan berkas

konformasi terbaik dari hasil penambatan. Kemudian dengan menjalankan fungsi “*Analyze > RMSD of..*” pada YASARA bisa didapatkan nilai RMSD dari ikatan protein dengan ligan aslinya tersebut. Protein dengan nilai RMSD lebih dari 2,00Å dianggap tidak valid dan tidak bisa digunakan untuk melakukan penambatan dengan ligan lain, karena jarak ikatannya akan tidak optimal, protein dengan RMSD kurang dari 2,00Å yang akan digunakan sebagai protein uji untuk melakukan uji penambatan molekul (*molecular docking*) PLANTS.

Uji In Silico Senyawa Marker

Setelah didapatkan protein dengan nilai RMSD kurang dari 2,00Å, dapat dilakukan uji *in silico* pada senyawa-senyawa *marker*. Senyawa *marker* yang sudah dibuat dengan menggunakan ChemDraw 2010 pada system operasi Windows dipreparasi dengan menggunakan aplikasi Marvin Sketch pada system operasi Linux Mint 16 Cinnamon, dan tahap pengerjaannya sama seperti pengukuran RMSD.

Setelah semua senyawa *marker* diuji secara *in silico*, selanjutnya dilakukan *terhadap* senyawa pembandingnya yaitu Resveratrol dan Oroxylin A.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penambatan molekul (*molecular docking*) merupakan penelitian dengan metode komputasi yang bertujuan untuk mendeteksi interaksi suatu ligan dengan suatu reseptor. Hasil dari penambatan molekul ini adalah berupa skor penambatan dan hasil visualisasi secara

virtual 3D. Skor penambatan yang dianggap baik adalah skor yang nilainya lebih kecil, karena menggambarkan senyawa yang diuji secara penambatan molekul tersebut akan melekat dengan sangat baik dengan reseptornya dan tidak membutuhkan banyak energi untuk berikatan. Setelah didapatkan skor penambatan yang baik, dilakukan visualisasi dengan menggunakan aplikasi VMD. Aplikasi VMD akan menunjukkan bentuk ikatan dari suatu senyawa dengan reseptornya secara 3D. Aplikasi VMD juga dapat digunakan untuk mendeteksi bentuk ikatan dan jarak dari struktur yang diuji dengan reseptornya.

Proses Seleksi Protein Target





Sebelum dilakukan uji penambatan molekul pada senyawa *marker*, dilakukan seleksi protein yang akan digunakan sebagai reseptor. Protein yang digunakan berupa berkas (*file*) dalam format “.pdb”. Berkas protein diunduh pada situs www.rcsb.org. Pada penelitian ini protein yang diunduh adalah beberapa protein *Sirtuin* dengan kode protein yang bervariasi, dan didapatkan 17 jenis protein *Sirtuin-3*. Contoh protein *Sirtuin-3* dapat dilihat pada Gambar.1. Dalam Gambar.1, terdapat 4 contoh protein *Sirtuin-3* dengan kode pencarian pada *protein data bank*, ligan asli dan nilai RMSD nya. Tujuan dilakukannya seleksi protein adalah untuk mendapatkan protein target yang paling baik untuk dijadikan sebagai reseptor penambatan molekul berdasarkan hasil dari validasi, agar hasil dari penambatan molekul lebih optimal dan dapat dianggap valid. Validasi

protein dilakukan dengan cara perhitungan nilai RMSD dengan menggunakan aplikasi YASARA.

Protein dengan ligan asli OCZ ((1*S*)-6-Chloro-2,3,4,9-Tetrahydro-1*H*-Carbazole-1-Carboxamide)

menunjukkan nilai RMSD kurang dari 2.00 Å, sedangkan protein *Sirtuin-3* dengan ligan asli BVB ($C_{14}H_{11}BrO_2$ 5-[(*E*)-2-(4-bromophenyl)ethenyl]benzene-1,3-diol) menunjukkan nilai RMSD lebih besar dari 2.00 Å

Tabel 1. Kode dan Struktur Protein Sirtuin-3

Kode Protein	Ligan Asli	Struktur	RMSD
4BVB	OCZ ((1 <i>S</i>)-6-Chloro-2,3,4,9-Tetrahydro-1 <i>H</i> -Carbazole-1-Carboxamide)		0.2170 Å
4BV3	OCZ ((1 <i>S</i>)-6-Chloro-2,3,4,9-Tetrahydro-1 <i>H</i> -Carbazole-1-Carboxamide)		0.2370 Å
4BVH	OCZ ((1 <i>S</i>)-6-Chloro-2,3,4,9-Tetrahydro-1 <i>H</i> -Carbazole-1-Carboxamide)		1.8826 Å
4C78	BVB ($C_{14}H_{11}BrO_2$ 5-[(<i>E</i>)-2-(4-bromophenyl)ethenyl]benzene-1,3-diol)		4.7674 Å

Preparasi Protein dan Ligan Asli (Native Ligand)

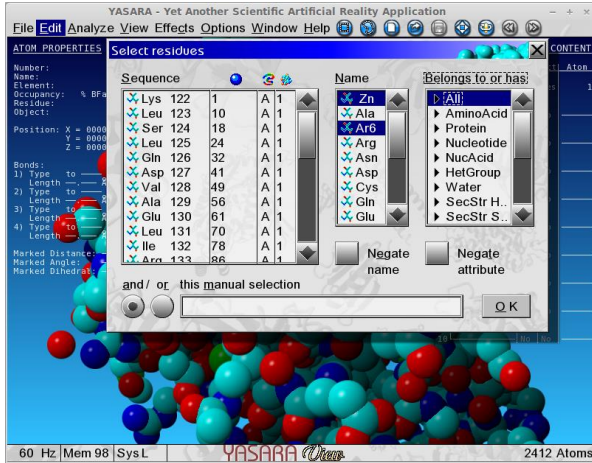
Setelah berkas protein diunduh, dilakukan preparasi berkas protein dengan menggunakan aplikasi YASARA. Tahap ini merupakan tahap awal untuk melakukan penambatan molekul. Pada umumnya terdapat

banyak molekul dengan komponen residu yang sama pada berkas protein, sehingga beberapa molekul yang terdapat pada berkas protein dihapus dan diambil 1 molekul saja. Setelah itu residu yang dianggap sebagai residu pengganggu (senyawa air dan senyawa detergen) dan senyawa ligan asli dihapus, tujuannya untuk menghindari

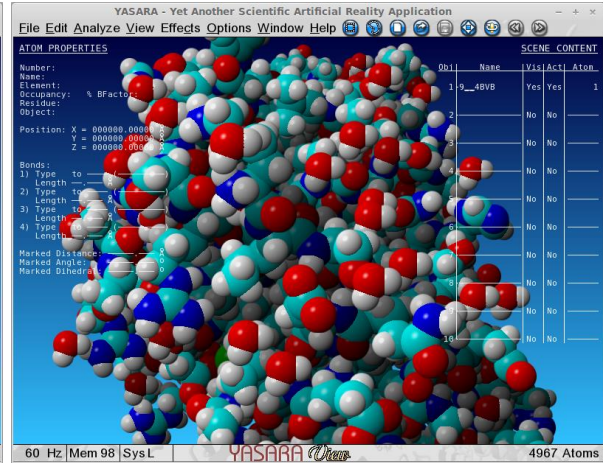
kemungkinan ligan yang akan diuji melekat pada senyawa pengganggu tersebut seperti pada Gambar 1 (A).

Kemudian dilakukan optimasi protein dengan cara penambahan atom hidrogen pada seluruh komponen protein

seperti pada Gambar 1 (B) untuk mendapatkan skor penambatan yang lebih optimal. Berkas protein disimpan dalam format “*protein.mol2*” agar dapat dijalankan dengan menggunakan aplikasi PLANTS.

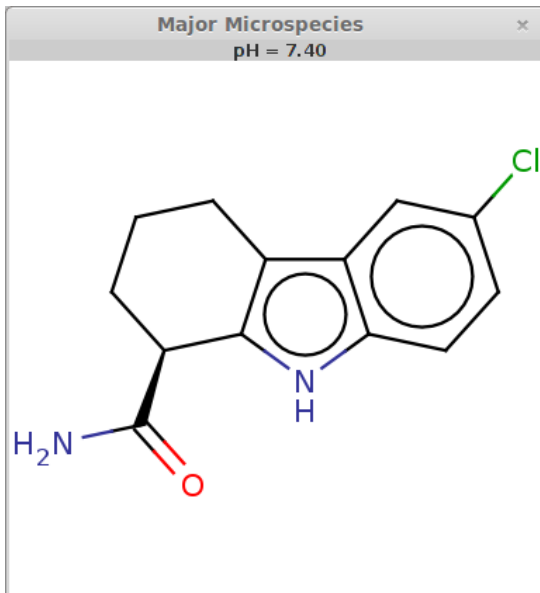


(A)

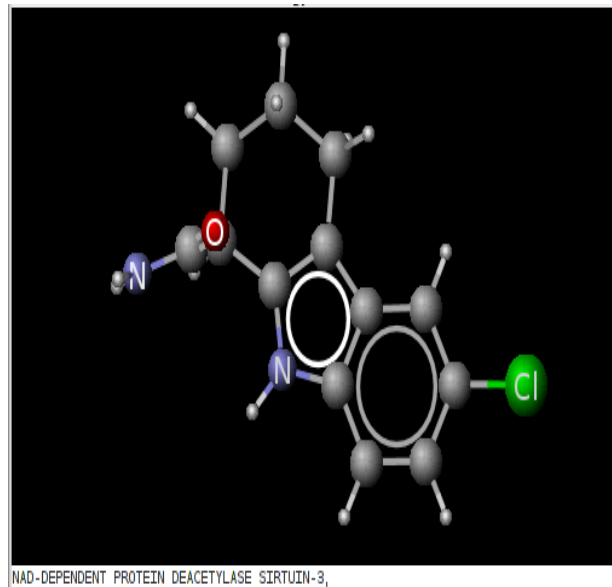


(B)

Gambar 1. (A). Penghapusan Residu Pengganggu (B). Penambahan Atom Hidrogen



(A)



(B)

Gambar 2. (A). Ligan OCZ 2D (B). Ligan OCZ 3D

Senyawa ligan asli diambil dari berkas protein dengan menggunakan aplikasi YASARA dengan cara menghapus seluruh komponen protein dan menyisakan senyawa ligan aslinya, dan dilakukan penambahan atom hydrogen pada senyawa ligan asli untuk optimasi. Senyawa ligan asli disimpan dengan format “*ref_ligand.mol2*”. Senyawa ligan asli dikonversi menjadi berkas ligan dengan menggunakan aplikasi *Marvin sketch* seperti pada Gambar 2 (A) dan dikonversi lagi menjadi bentuk konformasi seperti pada Gambar 2 (B), kemudian disimpan dengan format *ligand.mol2*. Senyawa ligan asli berfungsi sebagai pembandingan dan syarat untuk melakukan validasi nilai RMSD.

Validasi Protein Uji

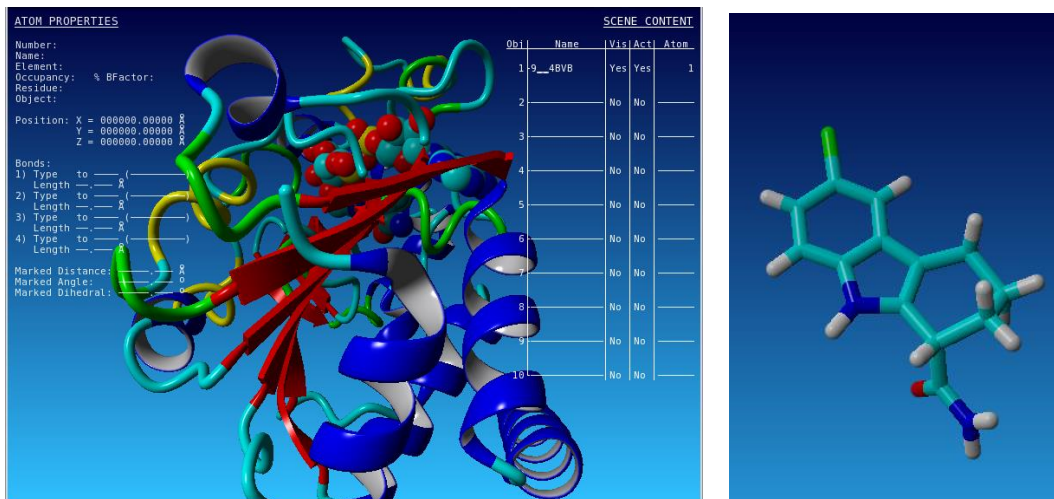
Validasi adalah suatu tahapan untuk memperoleh gambaran apakah metode atau model yang digunakan dalam suatu penelitian telah sesuai. Dalam metode penambatan molekul, validasi dilakukan dengan cara perhitungan nilai RMSD. *Root Mean Square Deviation* (RMSD) adalah parameter yang umumnya digunakan untuk menilai tingkat kesalahan atau linieritas dari sebuah senyawa yang akan diuji dengan suatu senyawa yang dijadikan sebagai standar. Semakin kecil nilai RMSD, maka dianggap tingkat kesalahannya lebih sedikit. Sehingga nilai RMSD < 2.00 Å dianggap nilai standar pengukuran validasi.

Setelah dilakukan validasi RMSD pada beberapa macam protein sirtuin-3 yang sudah diunduh pada situs

protein data bank, didapatkan protein dengan nilai RMSD yang valid (kurang dari 2.00 Å), yaitu protein dengan kode 4BVB {Gambar 3 (A)}. Protein 4BVB merupakan protein sirtuin-3 dalam bentuk yang stabil yang terdiri dari dua domain, yaitu domain besar dan domain kecil yang mengikat atom-atom *zinc* (Zn) dan memiliki sebuah ligan asli dengan kode OCZ atau dalam nama IUPAC-nya adalah *(1S)-6-Chloro-2,3,4,9-Tetrahydro-1H-Carbazole-1-Carboxamide* {Gambar 3 (B)}.

Nilai RMSD protein 4BVB dikatakan valid karena setelah dilakukan proses penambatan molekul dengan menggunakan aplikasi PLANTS dan validasi dengan menggunakan aplikasi YASARA didapatkan skor yang baik dan nilai RMSD kurang dari 2.00 Å.

Untuk mengukur nilai RMSD dari suatu protein, sebelumnya harus dilakukan uji penambatan molekul dengan menggunakan ligan asli dari protein yang akan digunakan, dan akan dihasilkan skor penambatan ligan asli dari protein tersebut. Skor penambatan ligan asli protein 4BVB yang paling baik ada pada *entry* 6 dengan nilai -90.7912. Berkas ligan dengan skor paling baik kemudian digunakan untuk uji nilai RMSD dengan menggunakan aplikasi YASARA dan didapatkan nilai RMSD 0.2179 Å (Gambar 4), sehingga nilai RMSD dianggap valid dan protein 4BVB dapat digunakan sebagai media untuk uji penambatan molekul dengan menggunakan senyawa *marker* tumbuhan obat khas Indonesia yang sudah dikumpulkan dari Farmakope Herbal Indonesia (FHI).



(A) (B)
Gambar 3. (A). Protein 4BVV (B). Ligan Asli Protein 4BVV

60 Hz	Mem 98	Sys L	YASARA View	34 Atoms
WARNING - Calculating RMSD between different atoms 16 'CAK' and 33 'C12'				
WARNING - Calculating RMSD between different residues 'OCZ 1395' and 'non 0'				
WARNING - Calculating RMSD between different atoms 17 'CAL' and 34 'C13'				
WARNING - Calculating RMSD between different residues 'OCZ 1395' and 'non 0'				
Molecule _ and Molecule _ have 0.2170 A RMSD				

Gambar 4. Nilai RMSD Protein 4BVV

Preparasi Ligan Uji

Preparasi ligan uji dilakukan dengan cara menggambarkan struktur ligan (senyawa *marker*) yang akan diuji dengan menggunakan aplikasi *ChemDraw*. Jumlah senyawa *marker* yang didapatkan dari Farmakope Herbal Indonesia (FHI) edisi 2008 dan 2011 sebanyak 63 senyawa. Senyawa *marker* ini dipilih dari tumbuhan yang mudah ditemukan di seluruh wilayah Indonesia dan lazim digunakan sebagai bahan baku obat tradisional. Kemudian senyawa yang sudah digambar dibuka dengan menggunakan aplikasi *Marvin Sketch*. Senyawa yang akan diuji dikondisikan pada pH 7.4 agar sesuai dengan pH darah pada manusia dan kemudian dikonversi dalam bentuk konformasi. Konformasi yang dibuat untuk uji penambatan molekul adalah 10 konformasi dengan

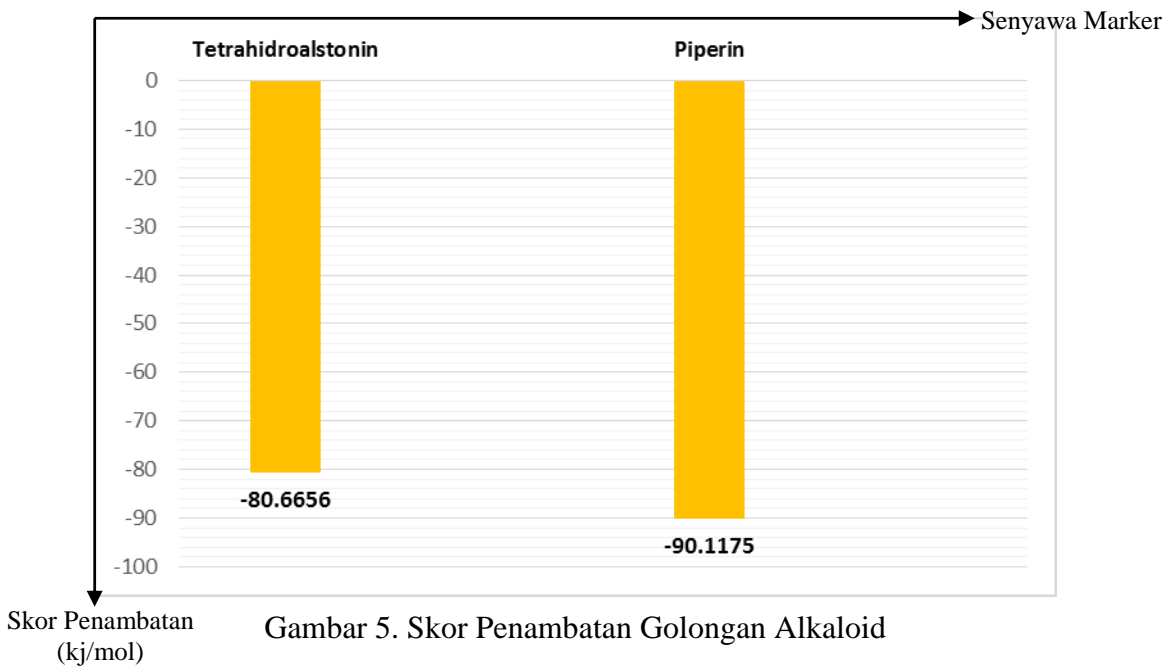
energi yang bervariasi. Perbedaan energi dari masing-masing konformasi terjadi karena perubahan rotasi atom secara acak dan membentuk formasi ligan yang paling optimal dengan jumlah energi terbaik. Setelah itu berkas ligan disimpan dengan format “*ligand.mol2*”.

Penambatan Molekul Senyawa *Marker*

Senyawa *marker* yang diuji secara garis besar terdiri dari 4 macam golongan senyawa *marker*, yaitu flavonoid, terpenoid, fenolik dan alkaloid. Jumlah senyawa *marker* yang didapat dari Farmakope Herbal Indonesia adalah 63 senyawa seperti yang diperlihatkan pada lampiran 5. Masing-masing senyawa uji dioptimasi menggunakan aplikasi *Marvin Sketch*

sehingga didapatkan 10 bentuk konformasi dari masing-masing

senyawa *marker* dalam bentuk terbaiknya.



Gambar 5. Skor Penambatan Golongan Alkaloid

Golongan Alkaloid

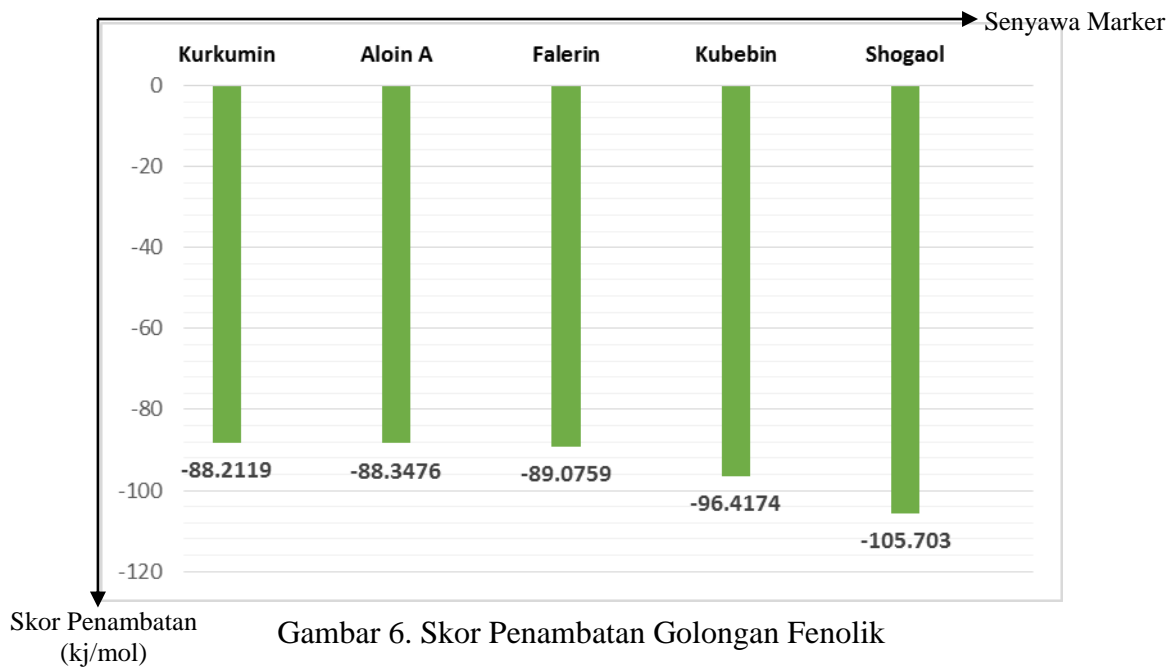
Dari 63 senyawa *marker* yang ada pada farmakope herbal Indonesia, ditemukan 2 jenis senyawa golongan alkaloid yaitu Piperin dari tanaman *Piperis retrifractum* (cabe jawa) dan Tetrahydroalstonin dari tanaman *Alstonia scholaridis* (pule). Gambar 5 menunjukkan skor penambatan senyawa *marker* golongan alkaloid. Skor penambatan terbaik yang didapatkan dari kedua senyawa golongan alkaloid tersebut adalah -90.1175, yaitu pada senyawa piperin.

Skor penambatan yang dihasilkan senyawa piperin dianggap baik, karena menunjukkan nilai yang tidak jauh berbeda dengan skor penambatan ligan asli protein 4BVB. Sehingga dari hasil penambatan, dapat diperkirakan Piperin berpotensi sebagai senyawa anti kanker yang bekerja dengan cara aktivasi protein *Sirtuin-3*.

Dari penelitian yang dilakukan oleh Khurana (2014), Piperin terbukti memiliki aktivitas sebagai agen yang bersifat antiproliferatif terhadap sel SCC4, yaitu sel penyebab kanker pada kanker otak dan leher. Piperin juga terbukti dapat menginduksi apoptosis gen *marker* (BAD dan Tp53) dan menurunkan regulasi anti-apoptosis gen *marker* BCL2.

Golongan Fenolik

Jumlah senyawa golongan fenolik yang ditemukan dalam farmakope herbal Indonesia adalah 9 jenis senyawa. Pada Gambar 16 disajikan skor penambatan dari 5 senyawa terbaik golongan fenolik untuk mewakili senyawa golongan fenolik. Skor penambatan yang paling baik pada golongan fenolik adalah senyawa Shogaol pada tumbuhan *Zingiber officinalis* (jahe), yaitu -105.703.

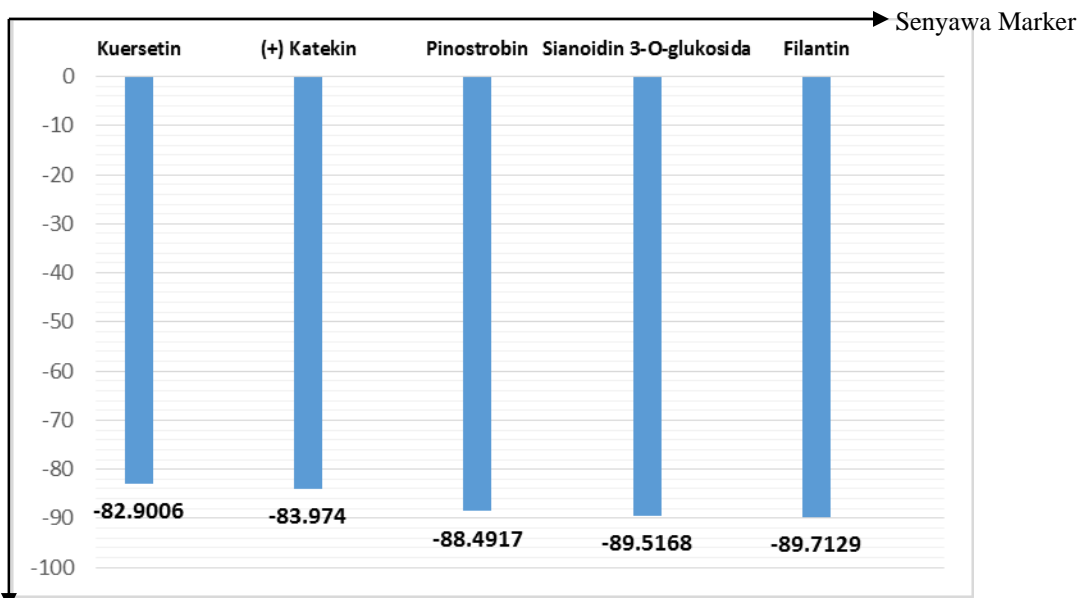


Gambar 6. Skor Penambatan Golongan Fenolik

Skor penambatan yang dihasilkan senyawa Shogaol menunjukkan nilai yang sangat baik, karena nilainya lebih rendah dari skor penambatan ligan asli protein 4BVB. Senyawa Shogaol dapat diperkirakan akan melekat sangat baik dengan reseptornya, karena tidak akan membutuhkan banyak energi untuk melekat. Sehingga senyawa Shogaol kemungkinan bersifat sebagai antikanker dengan cara aktivasi *Sirtuin-3*. Menurut Ghosh (2011) dalam studi farmakognosinya, tumbuhan jahe (*Zingiber officinalis*) yang mengandung beberapa senyawa fitokimia yang salah satunya adalah Shogaol yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan dan antikanker usus (*colon cancer*). Terbukti bahwa ekstrak jahe menunjukkan efek antitumor pada sel-sel kanker usus besar dengan cara menekan pertumbuhannya, mengurangi sintesis DNA dan merangsang apoptosis.

Golongan Flavonoid

Sebagian besar senyawa yang ada pada Farmakope Herbal Indonesia adalah senyawa flavonoid, karena faktanya senyawa flavonoid merupakan golongan senyawa yang ketersediaannya paling melimpah. Dari hasil penambatan molekul, rata-rata skor penambatan yang dihasilkan senyawa flavonoid tidak lebih tinggi dari senyawa golongan alkaloid dan fenolik, yaitu berkisar antara -82 hingga -89. Gambar 7 menunjukkan skor penambatan 5 senyawa flavonoid yang terbaik untuk mewakili semua senyawa golongan flavonoid yang didapatkan dari Farmakope Herbal Indonesia. Skor penambatan terbaik dihasilkan oleh senyawa Filantin dari tumbuhan meniran (*Phyllanthus niruri*), yaitu -89.7129.



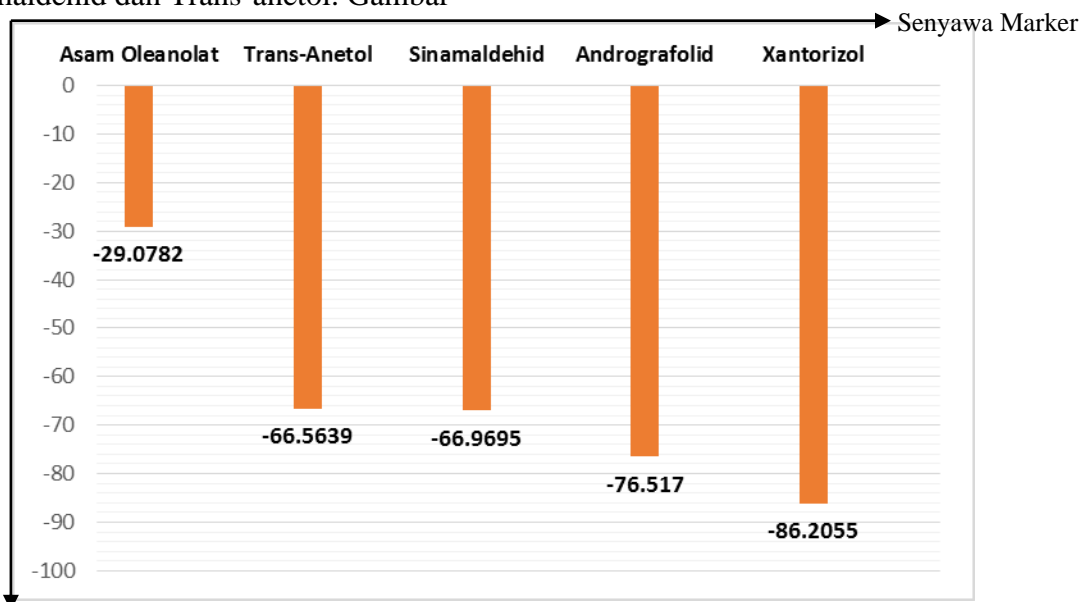
Skor Penambatan
(kJ/mol)

Gambar 7. Skor Penambatan Golongan Flavonoid

Golongan Terpenoid dan Minyak Atsiri

Dalam Farmakope Herbal Indonesia terdapat 3 tanaman yang mengandung senyawa *marker* dari golongan senyawa terpenoid seperti Xantorizol, Andrografolid dan asam oleanolat. Selain itu terdapat senyawa *marker* golongan minyak atsiri seperti Sinamaldehyd dan Trans-anetol. Gambar

8 menunjukkan skor penambatan senyawa golongan terpenoid dan minyak atsiri. Skor penambatan yang paling baik ditunjukkan oleh Xantorizol dalam tumbuhan temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*), yaitu -86.2055. Dapat diperkirakan Xantorizol juga memiliki aktivitas sebagai antikanker dengan cara aktivasi protein *Sirtuin-3*.



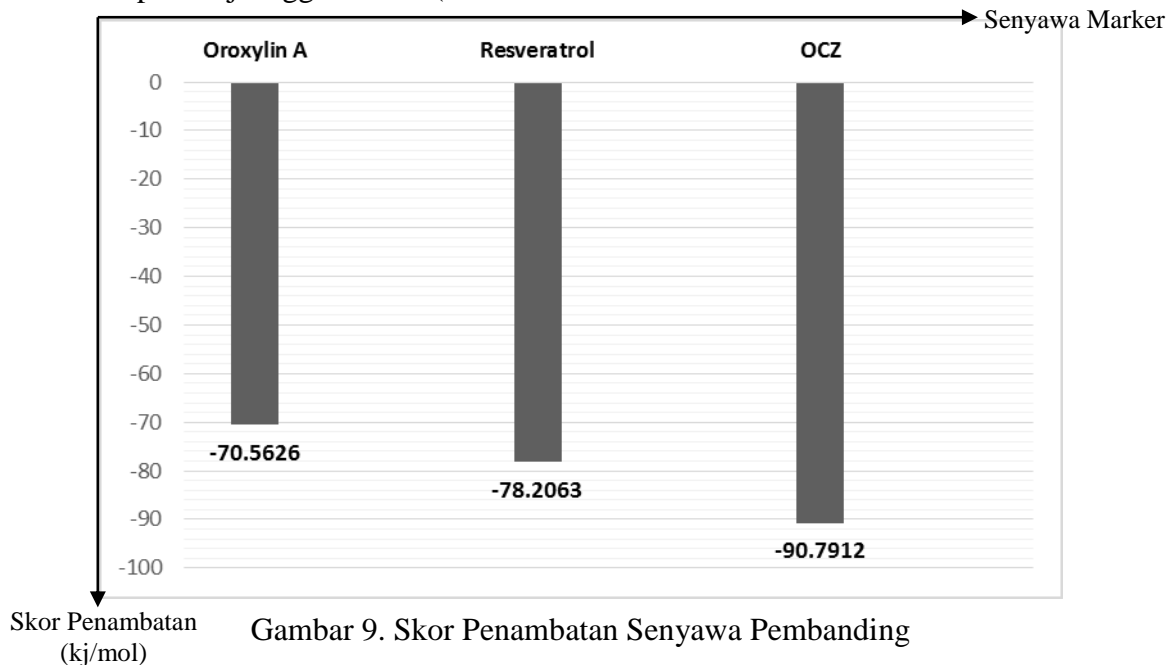
Skor Penambatan
(kJ/mol)

Gambar 8. Skor Penambatan Golongan Terpenoid Dan Minyak Atsiri

Penambatan Molekul Senyawa Pembanding

Senyawa pembanding yang digunakan adalah ligan asli yang terdapat dalam protein 4BVB yaitu OCZ ((1S)-6-Chloro-2,3,4,9-Tetrahydro-1H-Carbazole-1-Carboxamide), senyawa Resveratrol pada biji anggur merah (*Vitis*

vinifera) dan Oroxylin A pada tumbuhan obat tradisional Cina *Scutellaria baicalensis Georgi*. Skor penambatan dari ligan asli protein 4BVB adalah -90.7912 sedangkan nilai terbaik pada Resveratrol yaitu -78.2063 dan oroxylin A dengan skor -70.5626.



Gambar 9. Skor Penambatan Senyawa Pembanding

Dari perbandingan skor penambatan senyawa pembanding, skor penambatan yang paling baik ditunjukkan pada ligan asli protein 4BVB. OCZ diduga merupakan senyawa turunan nikotinamid. Namun mekanisme nikotinamid sebagai aktivator *Sirtuin-3* masih belum diketahui secara pasti. Dari beberapa literatur juga disebutkan nikotinamid diduga bekerja sebagai inhibitor *Sirtuin* (Gertz *et al.*, 2013).

Resveratrol umumnya terkandung dalam biji anggur merah terbukti mempunyai efek sebagai aktivator *Sirtuin-3* dan dapat memberikan keuntungan pada terapi natural, termasuk untuk proteksi jantung, anti

inflamasi, anti karsinogenik, mencegah obesitas dan membantu perawatan dan pembentukan sel baru (Chen *et al.*, 2014). Berdasarkan hasil dari studi *in vitro* yang dilakukan oleh Hwang *et al* (2007), Resveratrol dapat memicu apoptosis kanker pada sel kanker kolon yang melibatkan aktivasi AMPK dan generasi *Reactive Oxygen Species* (ROS).

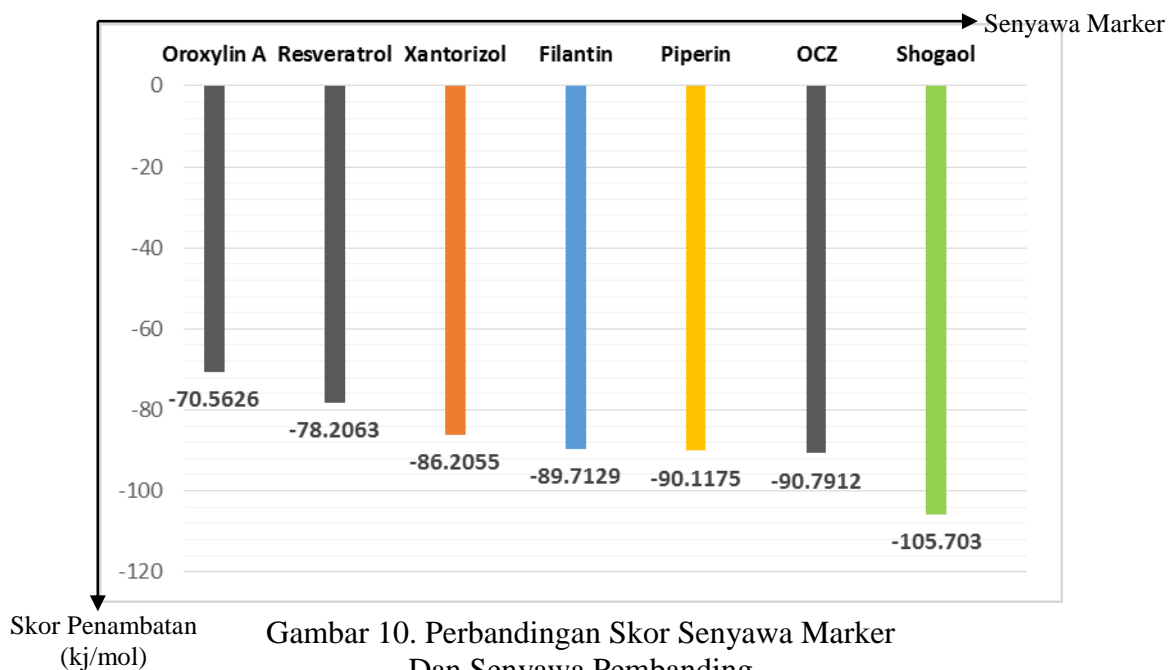
Oroxylin A adalah senyawa yang diketahui terdapat pada tumbuhan obat tradisional Cina *Scutellaria baicalensis Georgi*, diketahui berpotensi sebagai agen anti kanker. Oroxylin A bekerja dengan cara menghambat glikolisis dan ikatan HK II dengan mitokondria pada sel karsinoma kanker payudara manusia terkait dengan *Sirtuin-3*, Oroxylin A

juga dapat meningkatkan kadar *Sirtuin-3* pada mitokondria (Chen *et al.*, 2014). Secara molekuler Oroxylin A dapat meningkatkan jumlah *Sirtuin-3* pada sel MCF-7 dan mitokondria, peningkatan jumlah *Sirtuin-3* akan menghambat glikolisis pada sel A549 dan akan menghambat ikatan HK II dari mitokondria, karena kebanyakan sel kanker menunjukkan peningkatan ikatan HK II pada mitokondria (Wei *et al.*, 2013).

Perbandingan Antar Senyawa Terbaik dari Masing-Masing Golongan

Dari hasil perbandingan skor penambatan, skor dari perwakilan 1 senyawa *marker* dari masing-masing

golongan senyawa rata-rata lebih baik dibandingkan dengan senyawa pembanding (Gambar 10). Skor penambatan yang paling baik dihasilkan dari senyawa golongan fenolik dan alkaloid, yaitu Shogaol dalam tumbuhan *Zingiber officinalis* dan Piperin dalam tumbuhan *Piperis retrofracti*. Beberapa senyawa *marker* tersebut dapat menghasilkan skor penambatan yang baik karena diperkirakan senyawa-senyawa tersebut memiliki beberapa gugus dan bentuk struktur yang mirip dengan ligan asli dari protein 4BVB. Sehingga dapat dikatakan senyawa Shogaol, Piperin, Filantin dan Xantorizol berpotensi sebagai senyawa antikanker.



Gambar 10. Perbandingan Skor Senyawa Marker Dan Senyawa Pembanding

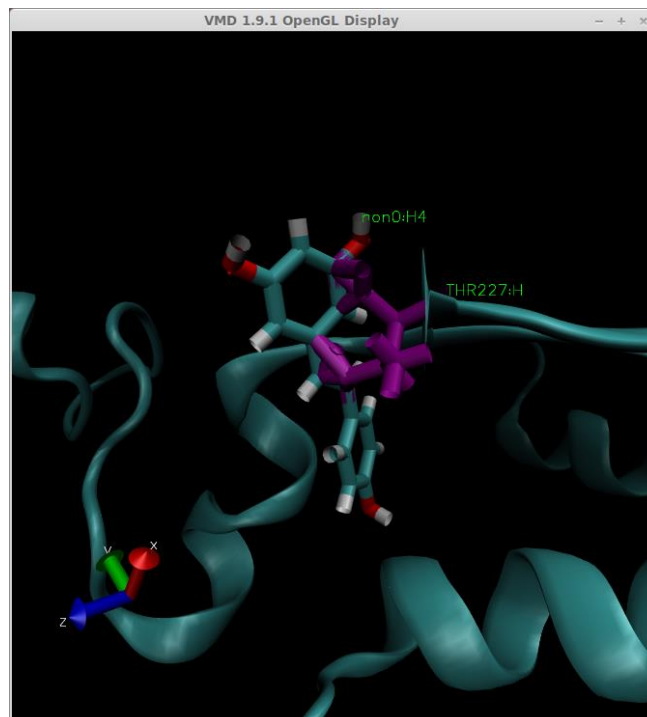
Visualisasi Hasil Penambatan Menggunakan Aplikasi VMD

Setelah didapatkan skor penambatan dari masing-masing senyawa uji, dilakukan penggabungan protein uji (protein 4BVB) dengan masing-masing konformasi terbaik senyawa uji yang sudah di-*docking* dengan menggunakan aplikasi YASARA dan dikonversi menjadi berkas (*file*) dengan format “.*pdb*”, tujuannya untuk mempermudah skринing dengan menggunakan aplikasi *Molecule Viewer* seperti *Visual Molecule Dynamics* (VMD).

VMD adalah aplikasi yang umumnya digunakan untuk visualisasi suatu protein atau suatu senyawa secara virtual 3D. Dengan menggunakan aplikasi VMD, dapat dilakukan

visualisasi protein yang sudah digabungkan dengan senyawa uji dengan setelah dilakukan penambatan molekul. Jika senyawa melekat pada residu yang sesuai, hasil penambatan molekul dianggap valid.

Visualisasi dengan VMD menunjukkan hasil penambatan molekul senyawa pembanding dan senyawa *marker* melekat pada residu threonine ke-227 (THR 227) pada *Sirtuin-3* seperti yang terlihat pada Gambar 11. Hasil uji penambatan molekul dianggap valid karena semua senyawa uji melekat pada residu yang sama. Dari hasil visualisasi, dapat diperkirakan target reseptor yang paling baik untuk aktivasi *Sirtuin-3* adalah pada residu threonine.



Gambar 11. Visualisasi Hasil Penambatan Molekul Resveratrol

Pembahasan Penelitian

Beberapa studi *in vivo* dan *in vitro* telah berhasil membuktikan beberapa jenis senyawa yang dapat bekerja sebagai antikanker melalui proses aktivasi protein *Sirtuin-3*. Jenis senyawa yang mempunyai aktivitas tersebut adalah senyawa Resveratrol yang terkandung dalam biji dan kulit anggur merah dan Oroxylin A yang terdapat pada tumbuhan obat tradisional Cina *Scutellaria baicalensis Georgi*. Diduga masih banyak jenis senyawa lain yang terdapat pada berbagai jenis tumbuhan obat di Indonesia yang mempunyai potensi sebagai antikanker dengan cara mengaktivasi protein *Sirtuin-3*.

Skrining awal terhadap senyawa-senyawa yang terdapat pada beberapa jenis tumbuhan obat dapat dilakukan secara cepat dan efisien dengan menggunakan metode komputasi, yaitu dengan menggunakan aplikasi GOLD, Autodock, Molegro, PLANTS dan beberapa aplikasi pendukung.

Hasil skrining senyawa dengan menggunakan aplikasi PLANTS berupa skor penambatan. Skor penambatan menggambarkan kekuatan ikatan senyawa tertentu terhadap reseptornya. Menurut Korb (2006), skor penambatan dari aplikasi PLANTS yang dianggap baik adalah skor penambatan dengan nilai yang lebih kecil, jika nilai skor nya semakin kecil, maka dapat diasumsikan senyawa tersebut membutuhkan energi yang lebih sedikit untuk berikatan dengan reseptor targetnya.

Golongan senyawa *marker* yang didapatkan untuk uji penambatan molekul adalah senyawa golongan

alkaloid, fenolik, flavonoid dan terpenoid. Dan dari hasil visualisasi secara 3D dengan menggunakan aplikasi VMD, diperkirakan ikatan ligan-reseptor yang terjadi antara senyawa pembanding dan senyawa uji setelah dilakukan penambatan molekul adalah ikatan Dipol-Dipol.

Ikatan Dipol-Dipol terjadi akibat adanya perbedaan keelektronegatifan antara 2 atom polar yang berikatan. Dapat dilihat ikatan antara senyawa pembanding dan perwakilan senyawa uji terbaik dengan asam amino Threonin pada residu reseptor, diperkirakan terjadi ikatan antara gugus karbonil pada Threonin berikatan dengan atom karbon ke-1 dan karbon ke-7 (C-1 dan C-7) pada Resveratrol dengan masing-masing jarak ikatan sekitar 0.90 Å dan 1.29 Å. Pada senyawa Oroxylin A, gugus karbonil Threonin mengikat pada atom karbon ke-9 (C-9) pada senyawa Oroxylin A dengan jarak 1.20 Å. Pada senyawa ligan asli (OCZ), gugus karbonil Threonin melekat pada atom karbon ke-9 (C-9) dengan jarak 1.66 Å.

Hasil visualisasi ikatan ligan-reseptor pada senyawa uji dengan skor terbaik dari masing-masing golongan menunjukkan hasil yang tidak jauh berbeda dengan hasil visualisasi dari senyawa pembanding, yaitu terjadinya ikatan Dipol-Dipol antara gugus karbonil pada asam amino Threonin dengan atom karbon pada senyawa uji.

Pada senyawa Piperin, gugus karbonil asam amino Threonin mengikat pada atom karbon ke-11 (C-11) dengan jarak 0.58 Å. Pada senyawa Shogaol, gugus karbonil asam amino Threonin melekat pada atom karbon ke-11 (C-11)

dengan jarak 1.43 Å. Pada senyawa Filantin, gugus karbonil asam amino Threonin melekat pada atom karbon ke-12 (C-12) dengan jarak 0.55 Å. Dan pada senyawa Xantorizol, gugus karbonil asam amino Threonin melekat pada atom karbon ke-8 (C-8) dengan jarak 1.74 Å. Dari hasil visualisasi ini, dapat diperkirakan mekanisme aktivasi Sirtuin-3 terjadi akibat adanya ikatan Dipol-Dipol antara asam amino Threonin dengan gugus karbon pada senyawa uji dan senyawa pembanding.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian *in silico* yang dilakukan pada senyawa *marker* tanaman obat yang terdapat pada Farmakope Herbal Indonesia terhadap protein *Sirtuin-3* (4BVB), dapat disimpulkan bahwa:

1. Terdapat beberapa senyawa *marker* dari golongan alkaloid, fenolik, flavonoid dan terpenoid yang terkandung dalam tumbuhan obat khas Indonesia yang terdaftar dalam Farmakope Herbal Indonesia berpotensi sebagai senyawa anti kanker oral, yaitu dengan cara aktivasi protein *Sirtuin-3*.
2. Senyawa yang berpotensi sebagai agen anti kanker oral adalah senyawa Shogaol dari tanaman jahe (*Zingiberis officinalis*); senyawa Piperin dari tanaman cabe jawa (*Piperis retrofractum*); senyawa Filantin dari tumbuhan meniran (*Phyllanthus niruri*); dan senyawa Xantorizol dari tanaman temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*).

3. Skor penambatan dari senyawa yang diuji lebih baik daripada skor penambatan senyawa pembanding, yaitu : Shogaol = -105.7203; Piperin = -90.1175; Filantin = -89.7129; Xantorizol = -86.2055; OCZ = -90.7912; Resveratrol = -78.2063; dan Oroxylin A = -70.5626.

DAFTAR PUSTAKA

- Alhazzi, T.Y., Kamarajan, P., MS, N.J., Huang, J.-Y., Verdin, E., D'Silva, N.J., Kapila, Y.L., 2011. Sirtuin-3 (SIRT-3), a Novel Potential Therapeutic Target for Oral Cancer. American Cancer Society.
- Andreadis, C., Vahtsevanos K., Sidiras T., Thomaidis I., Antoniadis K., Mouratidou D., 2003. 5-Fluorouracil and Cisplatin in the Treatment of Advanced Oral Cancer. *Oral Oncol.* 2003 Jun;39(4):380-5.
- Chen, Y., Fu, L., Wen, X., Wang, X., Liu, J., Cheng, Y., Huang, J., 2014. Sirtuin-3 (SIRT3), a therapeutic target with oncogenic and tumor-suppressive function in cancer.
- Constantini, S., Sharma, A., Raucci, R., Constantini, M., Autiero, I., Colonna, G., 2013. Genealogy of an ancient protein family: the Sirtuins, a family of disordered members. *BMC Evolutionary Biology* 2013, 13:60.
- Correa, G.F., Zapparoli, A., 2012. Herb Extract Ephedra Sinica Effect on Dipsogenesis is Dose-Dependent in Rats. *Adv. Stud. Biol.* 4.
- Dipiro, J.T., Talbert, R.L., Yee, G.C., Matzke, G.R., Wells, B.G., Posey, L.M., 2008. *Pharmacotherapy: A*

- Pathophysiologic Approach, 7th ed.
- Finley, L.W.S., Haas, W., Desquiret-Dumas, V., Wallace, D.C., Procaccio, V., Gygi, S.P., Haigis, M.C., 2011. Succinate Dehydrogenase Is a Direct Target of Sirtuin 3 Deacetylase Activity.
- Gertz, M., Fischer, F., Nguyen, G.T.T., Lakshminarasimhan, M., Schutkowski, M., Weyand, M., Steegborn, C., 2013. Ex-527 inhibits Sirtuins by exploiting their unique NAD⁺-dependent deacetylation mechanism. *Planegg-Martinsried*.
- Gertz, M., Nguyen, G.T.T., Fischer, F., Suenkel, B., Schlicker, C., Franzel, B., Tomaschewski, J., Aladini, F., Becker, C., Wolters, D., Steegborn, C., 2012. A Molecular Mechanism for Direct Sirtuin Activation by Resveratrol.
- Ghosh, A.K., Banerjee, S., Mullick, H.I., Banerjee, J., 2011. Zingiber Officinale: A Natural Gold. *Int. J. Pharma Bio Sci.* 2.
- Gregoire, V., Lefebvre, J.-L., Licitra, L., Felip, E., 2010. Squamous cell carcinoma of the head and neck: EHNS–ESMO–ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 21.
- Hwang, J., Kwak, D., Lin, S., Kim, H., Kim, Y., Park, O., 2007. Resveratrol induces apoptosis in chemoresistant cancer cells via modulation of AMPK signaling pathway. *Ann NY Acad Sci* 1095, 441–448.
- Khurana, N., Singh, R., Singh, A., Tripathi, V., 2014. Piperine Induces Down Regulation Of BCL2 And Up Regulation Of Bad In Smokeless Tobacco Induced Human Oral Squamous Cell Carcinoma (SCC4). *Int. J. Bio-Technol. Res. IJBTR* 4.
- Kitchen, D.B., Decornez, H., Furr, J.R., Bajorath, J., 2004. Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications. Department of Computer-Aided Drug Discovery, Albany *Molecular Research, Inc.* (AMRI), 21 Corporate Circle, Albany, New York 12212-5098.
- Korb, O., Stutzel, T., Exner, T.E., 2006. PLANTS: Application of Ant Colony Optimization to Structure-Based Drug Design. LNCS 4150, pp. 247–258, 2006.
- Kroemer, R.T., 2007. Structure-Based Drug Design: Docking and Scoring. *Current Protein and Peptide Science*, 2007, 8, 312-328.
- Kumar, S., Bawa, S., Gupta, H., 2009. Biological Activities of Quinoline Derivatives.
- Lieu, N.D., 2012. Classification of Alkaloids. URL <http://www.epharmacognosy.com/2012/07/classification-of-alkaloids.html> (accessed 5.20.14).
- Lin, J.H., Lu, A.Y.H., 1997. Role of Pharmacokinetics and Metabolism in Drugs Discovery and Development. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutic*.
- Merksamer, P.I., Liu, Y., He, W., Hirschey, M.D., Chen, D., Verdin,

- E., 2013.
The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link.
- Motiejunas, D., Wade, R., 2006. Structural, Energetics, and Dynamic Aspects of Ligand-Receptor Interactions.
- Nassar, Z., Aisha, A., Majid, A.A., 2011. The Pharmacological Properties Of Terpenoids From Sandoricum Koetjape.
- Nogueiras, R., Habegger, K.M., Chaudhary, N., Finan, B., Banks, A.S., Dietrich, M.O., Horvath, T.L., Sinclair, D.A., Pfluger, P.T., Tschop, M.A., 2012. Sirtuin-1 and Sirtuin-3: Physiological Modulators of Metabolism.
- Petersen, P.E., 2008. Oral cancer prevention and control – *The approach of the World Health Organization*. Elsevier.
- Petrucci, R.H., 1987. Kimia Dasar – Prinsip dan Terapan Modern, 4th ed, 1. Erlangga, Bogor.
- Purnomo, H., 2013. Kimia Komputasi untuk Farmasi dan Ilmu Terkait. Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Saunders, L.R., Verdin, E., 2007. Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Nat. Publ. Group*.
- Sirait, A.M., 2013. Faktor Risiko Tumor/Kanker Rongga Mulut dan Tenggorokan di Indonesia. Pusat Teknologi Intervensi Kesehatan Masyarakat, Balitbangkes, Kementerian Kesehatan RI.
- Soeksmanto, S., H. Wijaya, P. Simanjuntak, 2010. Anticancer Activity Test for Extracts of Sarang Semut Plant (*Myrmecodya pendens*) to HeLa and MCM-B2 Cells. *Pakistan Journal of Biological Sciences*.
- Sudiono, J., 2007. Pemeriksaan Patologi untuk Diagnosis Neoplasma Mulut. Penerbit Buku Kedokteran Gigi EGC.
- Tapas, A., Sakarkar, D., Kakde, R., 2008. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, September 2008; 7 (3): 1089-1099.
- Tsantoulis, P.K., Kastrinakis, N.G., Tourvas, A.D., Laskaris, G., Gorgoulis, V.G., 2006. *Advances in the Biology of Oral Cancer*. Elsevier.
- Villalba, J.M., Alcain, F.J., 2012. Sirtuin Activators and Inhibitors. *Biofactors*. 2012 September ; 38(5): 349–359. doi:10.1002/biof.1032.
- Vyas, V., Jain, A., Jain, A., Gupta, A., 2008. Virtual Screening: A Fast Tool for Drug Design. *Sci Pharm*.
- Waszkowycz, B., Perkins, T.D.J., Sykes, R.A., Li, J., 2001. Large-scale virtual screening for discovering leads in the postgenomic era. *IBM Syst. J.* 40.
- Wei, L., Zhou, Y., Dai, Q., Qiao, C., Zhao, L., Hui, H., Lu, N., Guo, Q.-L., 2013. Oroxilin A induces dissociation of hexokinase II from the mitochondria and inhibits glycolysis by SIRT3-mediated deacetylation of cyclophilin D in breast carcinoma. *Macmillan Publ. Ltd.* doi:10.1038

Young, J.E., Zhao, X., Carey, E.E.,
Welti, R., Yang, S.-S., Wang, W.,
2005. Phytochemical Phenolics in
Organically Grown Vegetables.
*Molecular Nutrition & Food
Research* 49, 1136–1142.