BAB II

LANDASAN TEORI

A. Tinjauan Pustaka

1. Kanker

Kanker adalah penyakit kompleks dengan pertumbuhan sel-sel abnormal yang tidak terkendali dan dapat bermestatasis ke bagian tubuh yang lain bahkan menyebabkan kematian. Penyebab munculnya penyakit kanker sendiri adalah faktor genetik, faktor karsinogen (zat kimia, radiasi, virus, hormon, iritasi kronis), dan faktor perilaku atau gaya hidup (merokok, pola makan tidak sehat, alkohol, dan kurangnya aktivitas fisik). Namun, kecenderungan kematian yang disebabkan oleh kanker adalah perilaku dan pola makan, yaitu sebanyak lebih dari 30 persen. Di antaranya adalah indeks massa tubuh yang tinggi, kurangnya konsumsi buah dan sayur, kurangnya aktivitas fisik, pemakaian rokok, dan minum minuman beralkohol. Khususnya faktor rokok, sekitar 70 persen penyebab kematian di dunia diakibatkan karena pengonsumsian rokok (Rahayuwati et al., 2020).

Kanker merupakan penyakit seluler yang bersifat laten dan diawali dengan suatu proses karsinogenesis. Proses terjadinya kanker dapat berlangsung sampai puluhan tahun. Karsinogenesis atau proses terjadinya kanker dari sel normal, terbagi dalam beberapa tahap yaitu inisiasi, promosi, konversi, dan progresi. Tiga tahap pertama terjadi dari sel normal yang berubah menjadi sel kanker, dan tahap terakhir terjadi setelah sel kanker terbentuk. Karsinogenesis diawali dengan proses inisiasi pada sel oleh

senyawa karsinogenik dan dengan adanya agen pemacu pertumbuhan (promoter), baik intra maupun ekstra seluler, sel akan membentuk massa tumor (fase promosi). Jika pada fase promosi ini perubahan genetik berlangsung terus, pertumbuhan sel semakin tidak terkontrol (fase progresi). Sel kanker bersifat agresif dan memiliki kemampuan invasif (menyusup dan merusak jaringan di dekatnya) dan metastasis (menyebar ke jaringan lainnya melalui sistem pembuluh darah dan limpa) sehingga karena patogenesis tersebut maka kanker dinyatakan juga sebagai penyakit seluler (Widiyastuti et al., 2019).

2. Antikanker

Antikanker merupakan suatu senyawa yang digunakan untuk membunuh atau menghambat mekanisme proliferasi sel kanker (Shinta & Surarso, 2016). Dari sudut pandang ilmiah, eksplorasi tanaman obat yang berpotensi sebagai antikanker akan bermanfaat dalam mengatasi masalah kanker karena banyak ditemukan ekstrak dan fraksi tanaman yang telah lama digunakan sebagai antikanker alami. Beberapa tanaman yang diprediksi memiliki kemampuan untuk meningkatkan kinerja sistem imun dalam melawan sel kanker antara lain sebagai berikut:

a. Mangrove Api-api (*Avicennia marina*)

Mangrove api-api merupakan salah satu tumbuhan mangrove yang termasuk ke dalam genus *Avicenniaceae.* Api-api banyak ditemukan di ekosistem mangrove yang terletak paling luar atau dekat dengan lautan. Hidup ditanah berlumpur agak lembek atau dangkal, dengan substrat

berpasir, sedikit bahan organik dan kadar garam tinggi. *A.marina* mempunyai akar napas, tumbuh dengan tegak, serta memiliki banyak cabang (Afzal et al., 2011). *A.marina* tumbuh sebagai semak atau pohon yang tingginya mencapai 3 hingga 14 meter (Cerri et al., 2022).

1) Klasifikasi Tanaman

Gambar 1. Mangrove Api-api (*Avicennia marina*)
(Cerri et al., 2022)

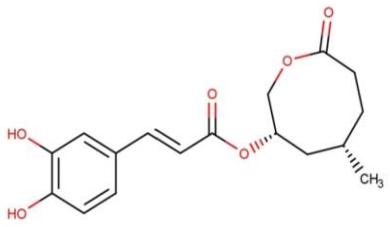
Kingdom : *Plantae*
Divisi : *Thacheophyta*
Kelas : *Magnoliopsida*
Ordo : *Lamiales*
Famili : *Acanthaceae*
Genus : *Avicennia*
Spesies : *A.marina*

2) Kandungan dan Khasiat

Penyelidikan kimia sebelumnya pada genus *Avicennia* telah menunjukkan adanya glukosida iridoid, turunan naftoquinon, flavonoid, dan diterpenoid (Yi et al., 2014). Penyelidikan kimia lebih

lanjut untuk metabolit bioaktif dari buah mangrove *A.marina* menyebabkan isolasi turunan asam kafeat baru yaitu *maricaffeolyide* dan *maricyclohexen.* Struktur isolat tersebut dijelaskan atas dasar analisis (D. Yan et al., 2015). Dilaporkan bahwa asam kafeat dapat diserap di usus dan membentuk interaksi selanjutnya dengan jaringan sasaran (Mirzaei et al., 2021; Sun et al., 2023). Asam kafeat digunakan sebagai donor *caffeoyl* baru dalam produksi ester alkil *caffeoyl*. Struktur lipid *caffeoyl* memiliki sifat antioksidan dan antikanker (Liu et al., 2020).

Yan *et al*. (2015), melaporkan bahwa molekul yang dikenal sebagai "*maricaffeolylide*" atau "minyak kuning" diidentifikasi sebagai $C_{17}H_{20}O_6$. Spektrum massa dan NMR digunakan untuk mengidentifikasi struktur umum *maricaffeolylide* kimia, yang memiliki dua pusat kiral dan lakton cincin beranggota 8 jenuh.



Gambar 2. Senyawa *Maricaffeolylide*

(D. Yan et al., 2015)

Metode baru untuk menilai antioksidan dalam kondisi fisiologis, yang berlawanan dengan uji aktivitas antioksidan kimiawi, adalah uji aktivitas antioksidan seluler (*cellular antioxidant*

assay/CAA), yang merupakan metode penilaian yang digunakan dalam senyawa *maricaffeolylide*. Senyawa *maricaffeolylide* menghasilkan CAA dengan nilai EC_{50} sebesar 24 ± 0,3 μm. Katekol dalam senyawa *maricaffeolylide* memiliki nilai EC_{50} yang sama dengan kontrol positif quercetin (EC_{50} = 11 ± 0,2 μm) (D. Yan et al., 2015).

b. Gingseng Wanita *(Angelica Sinensis)*

Angelica sinensis termasuk tanaman dari keluarga *Umbelliferae*. Tanaman ini telah digunakan tidak hanya sebagai makanan dan obat kesehatan di negara-negara Asia tetapi juga sebagai suplemen makanan dalam perawatan wanita di Eropa. Baik penelitian *in vitro* dan *vivo* telah menunjukkan bahwa *A.sinensis* menunjukkan berbagai aktivitas farmakologis, termasuk melindungi jantung, meningkatkan fungsi kekebalan tubuh, antiaritmia, antiatero sklerotik, dan mencegah kejadian infark miokard dengan menghambat peradangan otot polos dan trombosit. *A.sinensis* terkandung dalam formulasi khusus yang diresepkan untuk wanita di Cina sebagai obat untuk gejala menopause dan meningkatkan kesehatan mereka dengan memperkuat organ tubuh dan menyehatkan darah. Selain itu, *A.sinensis* sebagian besar terkenal karena penggunaannya dalam pengobatan berbagai kondisi ginekologi yang umumnya tidak mudah diobati dengan terapi konvensional, yang menyebabkannya disebut "ginseng wanita" (Wei et al., 2016).

1) Klasifikasi Tanaman Gingseng Wanita *(Angelica Sinensis)*

Gambar 3. Gingseng wanita (Angelica sinensis)

(Wei et al., 2016)

Kingdom : *Plantae*

Divisi : *Magnoliopsida*

Ordo : *Apiales*

Famili : *Apiaceae*

Genus : *Angelica*

Spesies : *Angelica sinensis* (Wei et al., 2016).

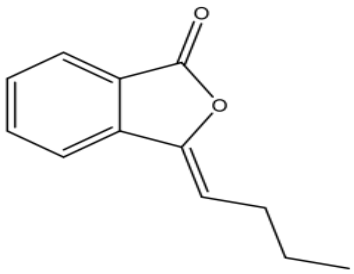
2) Kandungan dan Khasiat

Penelitian telah menunjukkan bahwa *A.sinensis* mengandung flavonoid, asam amino, elemen jejak, vitamin dan minyak atsiri, yang jumlahnya sekitar 0,4-0,7% dari kandungan total. Asam organik Phthalides, asam organik dan polisakarida adalah komponen kimia utama yang terkait dengan bioaktivitas dan sifat farmakologi *A.sinensis* (Wei et al., 2016).

Phthalides muncul sebagai padatan putih dan dianggap sebagai benzo lakton paling sederhana. *N-Butylidenephthalide*, sebuah phthalide, diekstraksi dari *Angelica sinensis* L. *N-butylidenephthalide*

menghambat berbagai pertumbuhan sel kanker dengan memodulasi jalur pensinyalan apoptosis intrinsik (Banerjee et al., 2023).

N-butylidenephthalide, diisolasi dari ekstrak kloroform *A.sinensis*, menginduksi apoptosis yang bergantung pada p53 pada manusia glioblastoma multiforme (DBTRG-05MG) dan tikus glioblastoma multiforme (RG2) tu mors dengan memfosforilasi p53, menghambat aktivitas MDM2, dan meningkatkan ekspresi BAX. Mereka mendemonstrasikan ini menggunakan uji MTT, dalam Deteksi Kematian Sel Situ, analisis Western blot, dan pewarnaan imunohistokimia. p53 ditemukan pada tingkat tertinggi setelah 12 jam pengobatan. *N-butylidenephthalide* juga menunjukkan penghambatan proliferasi sel kanker dan efek anti tumor terhadap garis sel adenokarsinoma paru-paru manusia (Wei et al., 2009), sel kanker kolorektal (Chang et al., 2020), dan glioblastoma multiforme. Senyawa antikanker lainnya, DN dari *Angelica gigas*, meningkatkan ekspresi p53 dan PUMA, protein target p53 yang terlibat dalam apoptosis (Banerjee et al., 2023).



Gambar 4. *n-Butylidenepthalide*

(Banerjee et al., 2023)

c. Ki Sampang (*Flindersin*)

Melicope denhamii merupakan salah satu spesies dari famili *Rutaceae*. Tumbuhan ini dikenal dengan nama ‘Ki Sampang’. Genus Melicope terdiri dari 280 spesies yang penyebarannya ditemukan di Asia, Afrika, Australia dan Polynesia (Saputri et al., 2018). Marga Melicope memiliki trikoma sederhana, tipe perbungaan malai yang tumbuh di bagian aksilar, infrafoliar atau di batang, dan benang sari yang berjumlah 4–8 (Surya et al., 2018).

1) Klasifikasi Tanaman

Gambar 5. Ki Sampang **(***Melicope denhamii)*

(George et al., 2017)

Kingdom : *Plantae*

Divisi : *Magnoliophyta*

Kelas : *Magnoliopsida*

Ordo : *Sapindales*

Famili : *Rutaceae*

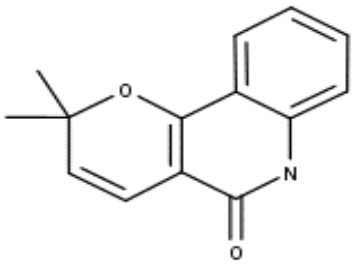
Genus : *Melicope*

Spesies : *Melicope denhamii* (Surya et al., 2018).

2) Kandungan dan Khasiat

Melicope denhamii menghasilkan senyawa alkaloid, flavonoid, kumarin dan memperlihatkan aktivitas antikanker, antifungal dan antioksidan. Dalam rangka penelitian fitokimia senyawa alkaloid dari *Melicope denhamii* tumbuhan endemik Indonesia, dilaporkan penemuan dua senyawa alkaloid kuinolin terisoprenilasi yakni *N-metilflindersin* dan *flindersin* dari daun *M.denhamii* (Saputri et al., 2018).

Flindersin berwujud padatan kuning muda dengan titik leleh t1 197-199°C. Spektrum massa senyawa tersebut memperlihatkan ion kuasi molekul positif [M+H] + pada m/z 229,1180 yang sesuai dengan rumus molekul $C_{14}H_{13}NO_2$. Uji aktivitas antikanker senyawa *flindersin* terhadap sel murin leukemia P-388 memperlihatkan nilai konsentrasi daya hambat IC_{50} adalah 21,06 ± 0,85 dan 4,86 ± 0,30 μg/ml. Senyawa *flindersin* dikategorikan memiliki keaktifan moderat. Senyawa ini mengalami demetilasi dan meningkatkan aktivitas antikanker (Saputri et al., 2018).



Gambar 6. *Flindersin*

(Banerjee et al., 2023)

d. Huangqi (*Astragalus membranaceus Moench)*

Huangqi, akar kering dari *Astragalus membranaceus*, di Cina adalah salah satu obat herbal paling populer di seluruh dunia. *Astragalus membranaceus* adalah tanaman tahunan tahunan, tinggi 50-150cm, dengan akar lurus, panjang, silindris, berukuran 20-50 cm (Thorne Research et al., 2003). Tanaman ini berasal dari berasal dari Mongolia, Korea, dan bagian utara dan timur Cina. Huangqi memiliki habitat di tanah berpasir kering, semak-semak gunung, stepa, padang rumput, semak xerofit, hutan jenis konifera, sabuk pegunungan di ketinggian 800 - 2000 meter ((Banerjee et al., 2023).

1) Klasifikasi Tanaman

Gambar 7. Huangqi **(***Astragalus membranaceus)*

(Banerjee et al., 2023)

Kingdom : *Plantae*

Divisi : *Magnoliophyta*

Kelas : *Magnoliopsida*

Ordo : *Fabales*

Famili : *Fabaceae*

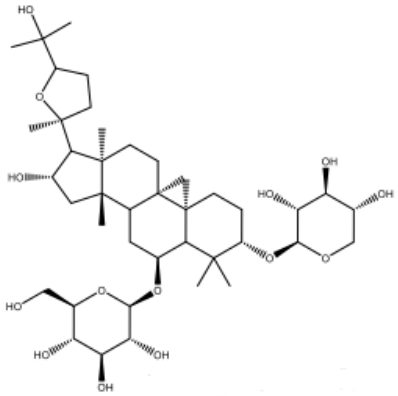
Genus : *Astragalus*

Spesies : *Astragalus membranazeus* (Block & Mead, 2003).

2) Kandungan dan Khasiat

Astragalus membranaceus adalah salah satu obat herbal tradisional Tiongkok yang paling banyak digunakan. Ini digunakan sebagai stimulan kekebalan tubuh, tonik, antioksidan, hepatoprotektor, diuretik, antidiabetes, antikanker, dan ekspektoran. Akar *astragalus* (*Astragalus membranaceus* Moench), ramuan adaptogenik, memiliki peran penting dalam pengobatan herbal tradisional Tiongkok (Block & Mead, 2003). Sebuah turunan saponin yang diekstrak dari *Astragalus membranaceus Moench* adalah *Astragaloside IV*, menghambat proliferasi dan metastasis pada berbagai sel kanker (CHEN et al., 2021).

Astragaloside IV (AS-IV) menghambat invasi sel kanker payudara melalui modulasi jalur pensinyalan RAC1/MAPK yang dimediasi oleh Vav3. Vav3 adalah faktor kunci untuk aktivasi MAPK, yang menghasilkan pembentukan koloni, perubahan morfologi, dan motilitas sel. Selain itu, aktivitas MAPK yang menurun akibat Vav3 berdampak pada migrasi sel. Diharapkan dengan menghambat jalur yang berhubungan dengan MAPK akan mengurangi risiko metastasis, yang merupakan faktor utama kematian akibat kanker (Banerjee et al., 2023).



Gambar 8. *Astragaloside IV*

(Banerjee et al., 2023)

e. Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb*)

Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb*) adalah salah satu tumbuhan obat keluarga *Zingiberaceae* yang banyak tumbuh dan digunakan sebagai bahan baku obat tradisional di Indonesia. Tumbuhan temulawak secara empiris banyak digunakan sebagai obat tunggal maupun campuran. Terdapat lebih dari dari 50 resep obat tradisional menggunakan temulawak. Eksistensi temulawak sebagai tumbuhan obat telah lama diakui, terutama dikalangan masyarakat Jawa. Rimpang temulawak merupakan bahan pembuatan obat tradisional yang paling utama. Khasiat temulawak sebagai upaya pemelihara kesehatan, disamping sebagai upaya peningkatan kesehatan atau pengobatan penyakit. Temulawak sebagai obat atau bahan obat tradisional akan menjadi tumpuan harapan bagi pengembangan obat tradisional Indonesia sebagai sediaan fitoterapi yang kegunaan dan keamanan dapat dipertanggungjawabkan (Rosidi et al., 2017)

1) Klasifikasi Tanaman Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb*)

Gambar 9. Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb*)

(Rosidi et al., 2017)

Divisi : *Spermatophyta*

Kelas : *Monocotyledonae*

Ordo : *Zingiberales*

Keluarga : *Zingiberaceae*

Genus : *Curcuma*

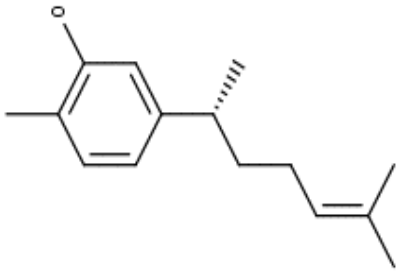
Spesies : *Curcuma xanthorrhiza Roxb* (Syamsudin et al., 2019).

2) Kandungan dan Khasiat

Temulawak memiliki banyak kandungan metabolit sekunder yang bermanfaat bagi kesehatan. Senyawa aktif yang dilaporkan bertanggungjawab pada aktivitas biologis temulawak adalah *curcuminoid, α-curcumene, ar-turmerone,* dan *xanthorrhizol* (Widyastuti et al., 2020).

Xanthorrhizol merupakan senyawa sesquiterpenoid yang berasal dari rimpang *Curcuma xanthorrhiza*, memiliki sifat anti mikroba, anti inflamasi, anti hiperglikemik dan sifat antikanker.

Dilaporkan bahwa XNT menginduksi apoptosis pada kanker hati (HepG2) kanker serviks (HeLa), sel kanker payudara (MCF-7) dan sel kanker lainnya melalui jalur yang terkait dengan upregulated p53, protein pro-apoptosis Bax, dan pelepasan sitokrom C mito chondrial. Xanthorrhizol meningkatkan kadar p53 dan Bax tetapi tidak anti-apoptosis Bcl-2 dalam sel HeLa dan menginduksi apoptosis pada sel kanker payudara (MCF-7) dengan memodulasi kadar protein p53, Bcl-2 dan PARP-1. Ismail dkk. mengevaluasi keberadaan apoptosis XNT dengan pewarnaan Hoechst 33.258, mengamati fragmentasi DNA di bawah mikroskop fluoresen, dan menghitung persentase sel apoptosis menggunakan uji dUTP nick end-labelling (TUNEL) yang dimediasi TdT, analisis Western blot, dan immunostaining (Banerjee et al., 2023).



Gambar 10. *Xanthorrhizol*

(Banerjee et al., 2023)

3. Apoptosis PD-1

a. Apoptosis

Apoptosis merupakan suatu kematian sel yang terprogram. Proses apoptosis melibatkan banyak penyakit, karena apoptosis dapat merusak sel sehingga proses apoptosis dapat melenyapkan sel yang tidak terkontrol

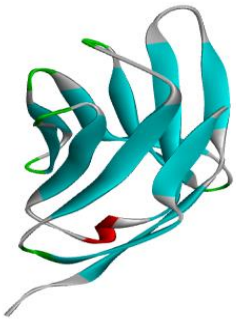
serta dapat menimbulkan proliferasi (kanker/tumor) (Purwaningsih, 2014). Pada umumnya apoptosis bertujuan mempertahankan jumlah sel pada jaringan yang memerlukan keseimbangan antara pembelahan atau proliferasi sel dan kematian sel. Fungsi apoptosis pada sel normal adalah menyesuaikan jumlah sel jaringan tertentu pada pembentukan jaringan fungsional masing-masing dan untuk mengeliminasi sel-sel yang tidak diperlukan seperti sel tumor dan penyebaran sel yang terinfeksi (Wulandari, 2011).

Apoptosis merupakan mekanisme kematian sel yang terpogram, aktif, dan sangat selektif yang memungkinkan pembuangan atau pembersihan selyang berlebihan atau banyak megalami kerusakan (A, Maimun Zulhaidah, n.d.). Penyebab patologis diantaranya obat anti kanker, kematian sel CD-4 dalam *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS), virus yang memicu kematian sel seperti hepatitis B atau C, radiasi, hipoksia, degenerasi sel seperti Alzheimer dan Parkinson, serta kematian sel akibat infark miokardium (Sari, 2018).

b. PD-1

PD-1 adalah reseptor permukaan sel yang termasuk dalam superfamili imunoglobulin CD28, yang biasanya diekspresikan pada sel T teraktivasi, Treg, sel B teraktivasi, sel NK, dan monosit. PD-1 adalah pos pemeriksaan kekebalan yang memainkan peran penting dalam mengatur sistem kekebalan dengan membatasi aktivitas sel-T di perifer selama respons inflamasi (Wang et al., 2017). Pada manusia, PD-1

ditranskripsikan oleh gen pdcd1. Sebagai reseptor, PD-1 memiliki dua ligan yaitu PD-L1 (B7-H1) dan PD-L2 (B7-DC) yang ekspresikan di permukaan sel tumor. Ketika PD-1 berikatan dengan ligan-ligannya, ia akan menginduksi terjadinya apoptosis sel T efektor dan sel T regulatori (Treg) (Khoiruddin et al., 2019).



Gambar 11. *Programmed Cell Death 1*

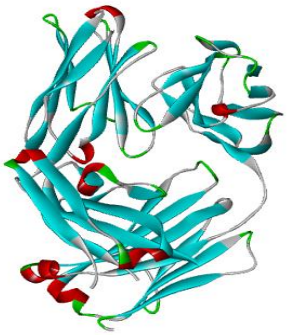
Sumber: Protein Data bank

Sel tumor sering menggunakan jalur PD-1-PD-L1/2 untuk menghindari serangan sel imun. Blokade jalur ini terbukti memulihkan dan meningkatkan respons imun antitumor. Pada pasien kanker, PD-1 biasanya sangat diekspresikan pada sel T dan menyebabkan supresi imun terkait tumor (Wang et al., 2017).

4. *Nivolumab*

Nivolumab adalah mAb anti-PD-1 yang direkayasa secara genetik, dikembangkan dengan mengimunisasi tikus transgenik untuk lokus imunoglobin manusia dengan sel ovarium hamster China rekombinan yang mengekspresikan protein fusi PD-1 dan PD/manusia IgGI Fc manusia. *Nivolumab* mengandung mutasi daerah engsel (S228P), mutasi S228P

mengurangi pertukaran Fc dengan molekul serum IgG4 untuk meningkatkan stabilitas dan mengurangi variabilitas terapeutik. *Nivolumab* mengikat PD-1 dengan afinitas tinggi (KD = 2,6 nmol/L dengan analisis Scatchard ke sel T manusia yang diaktifkan secara poliklonal), memblokir interaksinya dengan PD-L1 dan PD-L2, dan merangsang respons memori terhadap T spesifik antigen tumor proliferasi sel (Guo et al., 2017).



Gambar 12. *Nivolumab*

Sumber: Protein Data bank

Dosis *nivolumab* yang dianjurkan adalah 3,0 mg/kg diberikan secara intravena selama 60 menit setiap 2 minggu sampai perkembangan penyakit atau toksisitas yang tidak dapat diterima. *Nivolumab* memiliki farmakokinetik linier (PK), dengan peningkatan proporsi dosis pada konsentrasi maksimum (Cmax) dan area di bawah kurva konsentrasi-waktu (AUC). Berdasarkan studi Brahmer et al, waktu rata-rata untuk konsentrasi puncak *nivolumab* adalah 1-4 jam setelah dimulainya infus, dan waktu paruh serum (t 1/2) adalah 12 hari (0,3, 1,0 atau 3,0 mg /kg) sampai 20 hari (10,0 mg/kg). Farmakodinamik (PD) *nivolumab* dievaluasi sesuai dengan penempatan reseptor PD-1 pada sel CD3 + T yang bersirkulasi. Hunian PD-1 tampaknya

tidak tergantung dosis, dengan rata-rata hunian puncak 85% pada 4-24 jam dan rata-rata hunian dataran tinggi 72% yang diamati pada 57 hari dan seterusnya. Selain itu, rata-rata tingkat okupansi reseptor PD-1 dengan pengobatan *nivolumab* adalah 64%-70% untuk 65 pasien dengan melanoma dalam sel mononuklear darah perifer (PBMC), yang diobati dengan satu siklus *nivolumab* dengan dosis 0,1 hingga 10,0 mg/kg setiap 2 minggu. Semua data ini mengindikasikan *nivolumab* memiliki afinitas tinggi untuk PD-1 (Guo et al., 2017).

Efek samping *nivolumab* yang paling umum terjadi bila digunakan meliputi: merasa lelah, ruam, nyeri pada otot, tulang dan persendian, kulit yang gatal, diare, mual, kelemahan, batuk, muntah, sesak napas, sembelit, nafsu makan menurun, sakit punggung, infeksi saluran pernapasan atas, demam, sakit kepala, nyeri daerah perut (perut) dan Infeksi saluran kemih (Opdivo, 2022).

5. *Molecular Docking*

a. Studi *in silico*

Upaya pengembangan obat yang telah ada dapat dilakukan dengan rancangan obat. Rancangan obat bertujuan untuk mendapatkan obat baru dengan aktivitas yang lebih baik dan mempunyai toksisitas yang lebih rendah dengan melalui modifikasi struktur. Pemanfaatan media komputasi belakangan ini menjadi pilihan yang baik dan signifikan. Komputasi mempunyai standarisasi/kemampuan yang kian meningkat secara teratur dan merupakan peluang besar dalam pengembangan

simulasi dan kalkulasi untuk mendesain obat. Metode *in silico* telah menemukan momentum yang nyata pada kimia komputasi dalam pemodelan molekul (desain obat) terbaru (Masriany et al., 2022).

Salah satu metode *in silico* yang banyak digunakan adalah *molecular docking*, ini adalah metode komputasi yang digunakan untuk memprediksi interaksi dua molekul menghasilkan model yang mengikat. Dalam banyak aplikasi penemuan obat *docking* dilakukan antara molekul kecil dan makromolekul, misalnya *docking* protein-ligan. Saat ini *docking* juga diterapkan untuk memprediksi mode pengikatan antara dua makromolekul, misalnya *docking* protein dengan protein. Metode *in silico* memiliki keunggulan, diantaranya dapat mengurangi penggunaan alat dan bahan yang berlebihan serta dapat menghemat dalam pembiayaan percobaan. Kerugian dari metode *in silico* yaitu karena adanya fleksibilitas protein dan konformasi molekul maka dapat menghalangi prediksi yang akurat (Dona et al., 2019).

Uji *in silico* dilakukan dengan melakukan *molecular docking* kandidat senyawa obat dengan reseptor yang dipilih. *Docking* adalah suatu upaya untuk menselaraskan antara ligan yang merupakan molekul kecil ke dalam sel target yang merupakan molekul protein yang besar dengan mempertahatikan sifat keduanya. Dengan *molecular docking* dapat diketahui gambaran aktivitas senyawa tanpa perlu melakukan sintesis senyawa terlebih dahulu (Farida Suhud, 2015).

Uji *in silico* menghasilkan nilai energi ikatan atau *Rerank Score* (RS). Energi ikatan menunjukkan jumlah energi yang dibutuhkan untuk membentuk ikatan antara ligan dengan reseptor. Semakin kecil energi ikatan berarti semakin stabil ikatan tersebut. Semakin stabil ikatan ligan dengan reseptor maka dapat diprediksikan bahwa aktivitasnya juga semakin besar (Kesuma et al., 2018).

b. *Molecular Docking*

Molecular docking adalah prosedur komputasional yang dapat digunakan untuk memprediksi ikatan kimia dari makromolekul (reseptor) dengan sebuah molekul kecil (ligan) secara efisien menggunakan strukturnya melalui simulasi *moleculer docking* (Ulya, 2022). Model pengikatan ligan di tentukan tidak hanya menurut reseptor dan bentuk ligan tetapi juga tergantung pada interaksi antar molekul reseptor-ligan, yang semuanya memungkinkan pembentukan skor *docking*, sehingga mendekati afinitas pengikatan (Carbone et al., 2022). Metode yang menggunakan proses penambatan molekuler yang akurat dapat memberikan keuntungan dalam memangkas waktu, energi, serta biaya yang dibutuhkan dibandingkan dengan metode konvensional. Dengan dilakukannya *docking* dapat diketahui gambaran aktivitas senyawa tanpa perlu melakukan sintesis senyawa terlebih dahulu (Ulya, 2022).

c. Interaksi Obat-Reseptor

Hasil ikatan molekuler dapat dianalisis dengan energi bebas, ikatan hidrogen, dan kesamaan residu asam amino untuk setiap ligan uji

yang dapat divisualisasikan. Jenis-jenis ikatan kimia yang terlibat dalam interaksi obat-reseptor antara lain ikatan kovalen, ikatan hidrogen, ikatan ionik, ikatan ionik dan dipol-dipol, ikatan *van der Waal's*, ikatan hidrofobik, dan transfer muatan (Siswandono, 2016).

a) Ikatan kovalen

Ikatan kovalen terbentuk bila ada dua atom saling menggunakan sepasang elektron secara bersama-sama. Ikatan kovalen merupakan ikatan kimia yang paling kuat dengan rata-rata kekuatan ikatan 100 kkal/mol. Dengan kekuatan ikatan yang tinggi ini, pada suhu normal ikatan bersifat ireversibel dan hanya dapat pecah bila ada pengaruh katalisator enzim tertentu. Interaksi obat-reseptor melalui ikatan kovalen menghasilkan kompleks yang cukup stabil, dan sifat ini dapat digunakan untuk tujuan pengobatan tertentu (Siswandono, 2016).

b) Ikatan ion

Ikatan ion adalah ikatan yang dihasilkan oleh daya tarik menarik elektrostatik antara ion-ion yang muatannya berlawanan. Kekuatan tarik menarik akan makin berkurang bila jarak antar ion makin jauh dan pengurangan tersebut berbanding terbalik dengan jaraknya. Kekuatan ikatan ion sebesar 5 kkal/mol (Siswandono, 2016).

c) Interaksi ion-dipol dan dipol-dipol

Adanya perbedaan keelektronegatifan atom C dengan atom yang lain, seperti O dan N, akan membentuk distribusi elektron tidak simetrik atau dipol, yang mampu membentuk ikatan dengan ion atau dipol lain, baik yang mempunyai daerah kerapatan elektron tinggi maupun yang rendah (Siswandono, 2016). Kekuatan ikatan ion-dipol dan dipol-dipol sebesar1-7 kkal/mol (Siswandono, 2016).

d) Ikatan hidrogen

Ikatan hidrogen adalah suatu ikatan antara atom H yang mempunyai muatan positif parsial dengan atom lain yang bersifat elektronegatif dan mempunyai sepasang elektron bebas dengan oktet lengkap, seperti O, N dan F. Atom yang bermuatan positif parsial dapat berinteraksi dengan atom negatif parsial dari molekul atau atom lain yang berbeda ikatan kovalennya dalam satu molekul. Kekuatan ikatan hidrogen sekitar 1-7 kkal/mol (Siswandono, 2016).

Ikatan hidrogen ada dua yaitu ikatan hidrogen intramolekul, ikatan hidrogen yang terjadi dalam satu molekul dan ikatan hidrogen intermolekul, ikatan hidrogen yang terjadi antar molekul-molekul. Kekuatan ikatan hidrogen intermolekul lebih lemah dibanding ikatan intramolekul. Ikatan hidrogen dapat mempengaruhi sifat-sifat kimia fisika senyawa seperti titik didih, titik lebur, kelarutan dalam air, kemampuan pembentukan kelat dan keasaman. Perubahan sifat-sifat tersebut berpengaruh terhadap aktivitas biologis obat (Adriani, 2018).

e) Ikatan *van der waal's*

Ikatan *Van der waal's* merupakan kekuatan tarik menarik antar molekul atau atom yang tidak bermuatan, dan letaknya berdekatan atau jaraknya ± 4-6. Ikatan ini terjadi karena sifat kepolarisasian molekul atau atom. Kekuatan ikatan *Van der waal's* sebesar 0,5 kkal/mol (Siswandono, 2016).

f) Ikatan hidrofob

Ikatan hidrofob merupakan salah satu kekuatan penting pada proses penggabungan daerah non polar molekul obat dengan daerah non polar reseptor biologis. Daerah non polar molekul obat yang tidak larut dalam air dan molekul-molekul air disekelilingnya, akan bergabung melalui ikatan hidrogen membentuk struktur *quasi-crystalline* (icebergs) (Siswandono, 2016).

6. Sumber Informasi Database

Keberadaan database merupakan syarat utama dalam perancangan obat berbasis komputer. Database merupakan himpunan kelompok data yang saling berhubungan yang diorganisasikan sedemikian rupa sehingga dapat dimanfaatkan kembali dengan cepat dan mudah (English et al., 2020).

Protein Data Bank (RCSB PDB, http://www.rcsb.org) menyediakan akses ke struktur 3D dari makromolekul biologis seperti protein dan asam nukleat serta merupakan salah satu sumber daya terkemuka dalam biologi dan biomedis di seluruh dunia. Molekul-molekul tersebut adalah molekul yang ditemukan pada semua organisme termasuk manusia, bakteri, hewan

dan tanaman. PDB mengembangkan deposisi, anotasi, kueri, alat analisis, visualisasi, dan sumber daya pendidikan dengan menggunakan arsip PDB. Arsip PDB adalah satu-satunya *repository global* dari koordinat atom 3D (Rose et al., 2015).

1. Perangkat Lunak

1. *Autodock Tools*

Autodock adalah perangkat lunak yang digunakan untuk melakukan proses *molecular docking* dan skrining baik pada senyawa kecil ataupun makromolekul seperti reseptor. *Autodock* dirancang untuk mengatasi masalah seperti: *docking* molekul kecil, merancang molekul mirip obat menjadi makromolekul biologis dengan struktur yang diketahui. Hal ini dijalankan, diimplementasikan dan diuji dengan bermacam-macam kumpulan protein-ligan. Software ini diharapkan untuk diselenggarakan secara konsisten (Masriany et al., 2022).

Autodock dirancang untuk menjadi alat penghubung sistem komputasi. Mekanisme kerjanya menerima file reseptor dan ligan kemudian memprediksi interaksi reseptor dan ligan. Biasanya, pengguna memulai dengan reseptor dari kristalografi atau spektroskopi NMR, serta ligan yang dihasilkan dari string SMILES atau bisa juga dengan metode lain (Fakih et al., 2021).

2. *Autodock Vina*

Autodock Vina merupakan salah satu aplikasi yang memiliki perandalam melakukan *molecular docking* dan virtual screening senyawa.

Penggunaan *Autodock Vina* telah luas digunakan untuk berbagai keperluan dengan tujuan akhir melakukan prediksi konformasi ikatan maupun afinitas senyawa ligan dengan targetnya dalam hal ini reseptor. Penjelasan sebelumnya dapat memberikan gambaran bahwa *Autodock Vina* sangat bermanfaat di bidang farmasi dalam upaya pengembangan obat baru dengan visualisasi aktifitas senyawa terduga berkhasiat obat. Kemampuan yang dimiliki oleh *Autodock Vina* merupakan pengembangan dari *Autodock* sehingga dari penampilan maupun visualisasi senyawa memiliki kemiripan. Namun, *Autodock Vina* sebagai aplikasi pengembangan memiliki keunggulan tersendiri yang terletak pada pemetaan struktur menggunakan *Autogrid* secara cepat dan otomatis untuk menghemat waktu penambatan senyawa terhadap target (Jasmine, 2021).

3. *Pyrx Autodock*

Pyrx Autodock merupakan salah satu aplikasi yang memiliki peran dalam melakukan *molecular docking* dan *virtual screening* senyawa. Penggunaan *Pyrx Autodock* telah luas digunakan untuk berbagai keperluan dengan tujuan akhir melakukan prediksi konformasi ikatan maupun afinitas senyawa ligan dengan targetnya dalam hal ini reseptor. Penjelasan sebelumnya dapat memberikan gambaran bahwa *Pyrx Autodock* sangat bermanfaat di bidang farmasi dalam upaya pengembangan obat baru dengan visualisasi aktifitas senyawa terduga berkhasiat obat. Kemampuan yang dimiliki oleh *Pyrx* merupakan pengembangan dari *Autodock* sehingga dari penampilan maupun visualisasi senyawa memiliki

kemiripan. Namun, *Pyrx Autodock* sebagai aplikasi pengembangan memiliki keunggulan tersendiri yang terletak pada pemetaan struktur menggunakan *Autogrid* secara cepat dan otomatis untuk menghemat waktu penambatan senyawa terhadap target (Jasmine, 2021).

4. HDOCK *Server*

HDOCK *Server* merupakan *website* dari algoritme *docking* yang dapat digunakan sebagai media *docking* protein-protein dan protein-DNA/RNA. Kelebihan dari HDOCK *Server* yaitu proses *docking* berlangsung cepat dan memakan waktu sekitar 10-20 menit untuk proses *docking*. Selain itu, HDOCK *Server* menggunakan fungsi penilaian intrinsik untuk *docking*. *Docking* sepenuhnya otomatis dan hasilnya disajikan secara interaktif kepada pengguna melalui halaman website dan melalui notifikasi email jika disediakan email yang valid (Y. Yan et al., 2017).

5. *Discovery Studio*

Visualisasi dengan software *Discovery Studio* bertujuan untuk mengetahui interaksi yang terjadi antara ligan dan protein. *Discovery Studio* dapat menampilkan interaksi ligan yang terjadi serta residu asam amino apa saja yang terlibat dalam proses pengikatan antara ligan dan protein. Kelebihan dari *Discovery Studio* adalah dapat menampilkan hasil interaksi dalam bentuk 3D maupun 2D. Interaksi yang dapat ditampilkan yaitu ikatan hidrogen, ikatan antara C-H, dan lain-lain. Interaksi-interaksi

tersebut berperan dalam hal pengikatan antara ligan dengan reseptor (Yahmin et al., 2019).

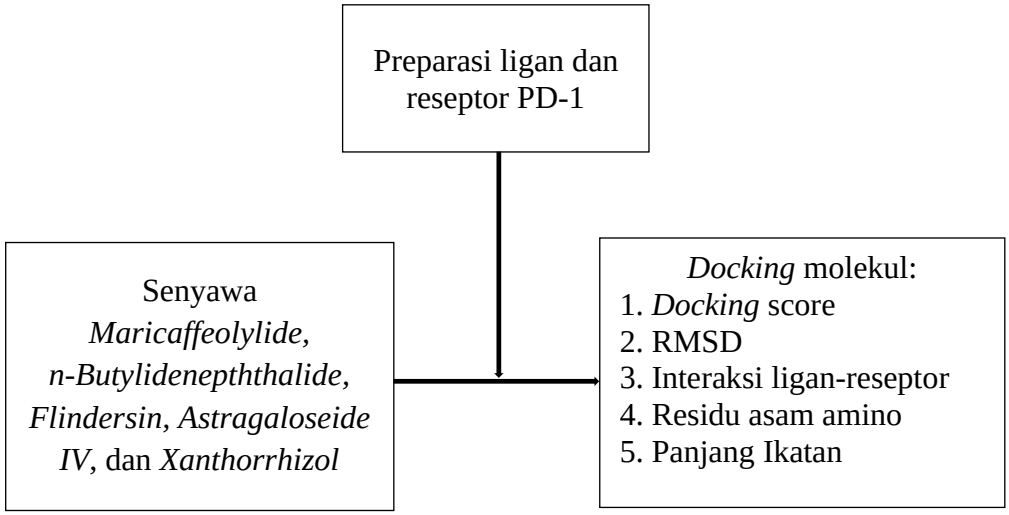
6. *Pymol*

Pymol merupakan suatu program yang digunakan untuk memeriksa molekul tiga dimensi atau dengan kata lain menggambarkan struktur kimia secara tiga dimensi. Selain itu, *pymol* juga mampu menyajikan tampilan struktur dalam beberapa warna dari suatu molekul kecil maupun makromoekul termasuk struktur protein, asam nukleat (RNA, DNA, Trna), molekul penuntun obat inhibitor, metabolit dan ligan lain seperti garam organik (Nengsih, 2022).

7. *Lipinski's Rule of Five*

Lipinski's Rule of Five adalah softwere yang dapat digunakan untuk menentukan sifat fisikokimia ligan untuk menentukan karakter hidrofobik/hidrofilik suatu senyawa melalui membran sel oleh difusi pasif. Aturan ini disebut "*Lipinski's Rule of Five*". Syarat yang harus dipenuhi oleh suatu ligan berdasarkan aturan Lipinski's adalah berat molekul lebih kecil dari 500 Da, nilai LogP lebih kecil dari 5, ikatan hidrogen akseptor sebanyak sepuluh, ikatan hidrogen donor sebanyak 5. Refraksi molar (*Molar Refractivity*) adalah ukuran polarisasi total suatu zat dalam cm^3/mol yang tergantung pada suhu, indeks bias dan tekanan. Rentang *Molar Refractivity* yaitu 42,24 sampai dengan 231 cm3/mol (Putra et al., 2020).

B. Kerangka Pemikiran



Gambar 13. Kerangka Pemikiran

Metabolit sekunder dari tanaman herbal yang berpotensi sebagai antikanker dilakukan *docking molecular* terhadap reseptor PD-1. Proses *docking* tersebut divalidasi dengan senyawa *nivolumab* melalui analisis parameter energi bebas (ΔG) dan visualisasi interaksi terhadap reseptor. Hasil *docking* metabolit sekunder tanaman herbal tersebut dilakukan analisis parameter energi bebas dan visualisasi terhadap reseptor.

Pada penelitian ini, senyawa *n-Butylidenepththalide, flindersin, astragaloseide IV,* dan *xanthorrhizol* disiapkan dengan mengunduh pada aplikasi *pubchem* (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/), sementara senyawa *maricaffeolylide* digambar melalui perangkat lunak *Marvin Sketch*. Senyawa uji kemudian dipreparasi melalui *Discovery Studio* serta dianalisa *Lipinski's Rule of Five* (https://www.scfbioiitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp).

Protein yang digunakan dalam memprediksi energi ikatan molekul yaitu reseptor PD-1 dan senyawa kimia yang digunakan sebagai pembanding inhibitor PD-1 yaitu nivolumab dengan kode 5WT9 diunduh melalui *website Protein Data Bank* (https://www.rscb.org) dan dipreparasi melalui *Discovery Studio*. Setelah itu, dilakukan *molecular docking* dan divalidasi melalui *website* HDOCK *Server* (http://hdock.phys.hust.edu.cn/), serta dianalisa melalui perangkat lunak *Pymol* dengan parameter *docking* score, RMSD *(Root Mean Aquare Deviaton)*, interksi ligan-reseptor, residu asam amino, dan panjang ikatan.

C. Hipotesis

1. Senyawa aktif *maricaffeolylide, n-Butylidenepththalide, flindersin, astragaloseide IV,* dan *xanthorrhizol* yang diprediksi sebagai antikanker dapat dilakukan penambatan molekul terhadap reseptor PD-1.
2. Adanya interaksi yang terjadi antara senyawa aktif *maricaffeolylide, n-Butylidenepththalide, flindersin, astragaloseide IV,* dan *xanthorrhizol* yang diprediksi sebagai antikanker terhadap reseptor PD-1.