

BAB II

LANDASAN TEORI

A. Tinjauan Pustaka

1. Imunoterapi

Suatu bentuk pengobatan yang disebut imunoterapi meningkatkan kemampuan sistem kekebalan tubuh untuk bekerja lebih efektif dalam melawan penyakit seperti kanker. Melalui imunoterapi, sel kanker dikenali dengan lebih baik oleh sistem kekebalan tubuh, dan reaksi sistem kekebalan tubuh terhadap sel kanker diperkuat, sehingga pertumbuhan sel ganas dapat ditunda atau bahkan dicegah (Putra Barus & Sanjaya, 2020).

a. Kelebihan Imunoterapi

Menurut Putra Barus & Sanjaya (2020), imunoterapi dipilih sebagai penanganan kanker dengan berbagai alasan berikut ini:

1. Lebih efektif dibandingkan pengobatan kanker lainnya, seperti radiasi atau kemoterapi, terutama pada kanker kulit.
2. Membantu efektivitas pengobatan lain yang sedang dilakukan. Contohnya, kinerja kemoterapi bisa lebih baik saat pasien juga menjalani imunoterapi.
3. Efek samping lebih kecil dibandingkan pengobatan lain, karena imunoterapi membuat sistem imun hanya menyerang sel kanker secara spesifik.
4. Dapat meminimalkan kanker muncul kembali, karena pengobatan ini memicu imunomemori, yaitu kemampuan sistem imun untuk

mengingat sel kanker, sehingga akan segera diserang bila muncul kembali.

b. Blokade *immune checkpoint inhibitor*

Terapi blokade *immune checkpoint inhibitor* adalah salah satu imunoterapi yang paling banyak dipelajari. *Inhibitor* memblokir transmisi sinyal penghambatan, merangsang aktivasi limfosit T sitotoksik (CTL) dan menginduksi efek antitumor limfosit T. Sel T yang diaktifkan adalah mediator utama dari fungsi efek imun, mereka mengekspresikan beberapa reseptor penghambat seperti LAG-3 (*Lymphocytes Activation Gene 3*) dan CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte Associated Protein 4*) (Ong *et al.*, 2018; Shan *et al.*, 2020).

1. Reseptor LAG-3

Lymphocyte Activation Gene 3 Protein (LAG-3) secara negatif mengatur limfosit T dengan mengikat domain ekstraseluler dari ligan, sehingga menghindari autoimunitas yang disebabkan oleh aktivasi sel T yang berlebihan. Sebagai bagian dari *immune checkpoint inhibitor*, LAG-3 adalah molekul penghambat dengan berbagai efek biologis pada fungsi sel T. LAG-3 diekspresikan secara luas dalam berbagai jenis limfosit yang menyusup ke dalam tumor (TIL) dan berpartisipasi dalam mekanisme pelarian kekebalan tubuh tumor. Oleh karena itu, LAG-3 dapat digunakan sebagai indikator prognosis tumor dan target terapi tumor. Hal ini menjelaskan pentingnya kemajuan penelitian LAG-3 dalam imunoterapi (Shan *et al.*, 2020).

Reseptor LAG-3 mengatur respons imun sel T dalam tiga cara: Pertama, secara langsung menghambat proliferasi dan aktivasi sel T melalui regulasi negatif sel T. Kedua, dapat mempromosikan fungsi penghambatan Tregs, dan respons sel T kemudian dapat dihambat secara tidak langsung. Ketiga, dapat mencegah aktivasi sel T dengan mengatur fungsi APC (Shan *et al.*, 2020).

Reseptor ini juga dikenal sebagai CD223, homolog dari CD4. Mirip dengan CD4, satu-satunya ligan yang diketahui untuk LAG-3 adalah molekul MHC kelas II. Seperti CTLA-4 dan PD-1, LAG-3 juga penting untuk meredam respon kekebalan sel T yang terlihat. LAG-3 secara khusus menghambat CD8+ fungsi sel T efektor dan dapat meningkatkan aktivitas penekan Tregs (Ong *et al.*, 2018).

2. Anti LAG-3

BMS-986016 (*relatlimab*) adalah mAb anti LAG-3 pertama yang dikembangkan dan saat ini sedang dievaluasi dalam berbagai uji klinis termasuk tumor padat juga serta keganasan hematologi. Uji coba fase I/IIa awal percobaan *relatlimab* berusaha untuk menyelidiki kemanjuran obat sendiri atau dalam kombinasi dengan *nivolumab* pada pasien dengan penyakit lanjut (Puhr & Ilhan-Mutlu, 2019).

Konsep lebih lanjut dari uji klinis yang menguji rejimen anti-LAG-3 lainnya diperkenalkan dan datanya diharapkan akan dipublikasikan dalam beberapa tahun ke depan. Sejauh ini, *relatlimab* mewakili satu-satunya obat, yang mencapai uji coba fase III dan

beberapa pendekatan fase II. Beberapa obat lain termasuk MK-4280, Sym022, TSR-033, REGN3767, MGD013, FS118, INCAGN02385 dan EOC202 sedang dalam pengujian fase I awal (Puhr & Ilhan-Mutlu, 2019).

3. Reseptor CTLA-4

Salah satu reseptor limfosit T, *Cytotoxic T Lymphocyte Associated Protein 4* (CTLA-4), dapat dikontrol untuk mengurangi kanker. Reseptor tersebut bersifat penghambat dan berfungsi sebagai *immune checkpoint* (Tiemann *et al.*, 2021). CTLA-4 merupakan reseptor yang dimiliki oleh limfosit T untuk menghambat kerja dari limfosit T (Destiawan *et al.*, 2021).

Menurut Sobhani *et al.*, (2021), kanker menggunakan reseptor CTLA-4 untuk tumbuh sehingga CTLA-4 akan berikatan dengan CD80 dan CD86 di dalam *antigen-presenting cell* (APC), yang mengakibatkan terjadinya immunosupresi dan membatasi aktivitas sel T. Ekspresi CTLA-4 yang dihambat atau ditekan pada sel T akan membatasi interaksi antara CTLA-4 dengan CD80 dan CD86, sehingga mengurangi kemampuan sistem kekebalan tubuh untuk menekan pertumbuhan kanker. Respons imun sel T aktif akan meningkat karena penurunan respons immunosupresif, yang akan menghentikan perkembangan tumor dan kanker (Destiawan *et al.*, 2021; Sugawara *et al.*, 2021).

4. Anti CTLA-4

Salah satu imunoterapi yang digunakan adalah antibodi anti CTLA-4 untuk menghambat pertumbuhan tumor dan kanker. Obat untuk terapi tersebut salah satunya adalah *ipilimumab*, obat anti CTLA-4 yang pertama dikembangkan dengan mengikat CTLA-4 dan menghambat interaksi CTLA-4 dengan ligannya dan telah disetujui oleh US FDA (Biorad, 2015; Destiawan *et al.*, 2021; Lawrenti, 2018). *Ipilimumab* dapat digunakan sendiri atau dikombinasikan dengan terapi tambahan untuk kanker paru non-sel kecil, karsinoma sel ginjal, dan kanker kolorektal, selain sebagai terapi tambahan untuk pasien melanoma (Jacob *et al.*, 2021).

Sebuah mAb pesaing terhadap CTLA-4, *tremelimumab*, sedang dikembangkan oleh Pfizer pada saat yang sama dengan *ipilimumab*. Meskipun sedang diselidiki dalam beberapa uji coba untuk kanker paru-paru non-sel kecil, melanoma dan mesothelioma, *tremelimumab* gagal memenuhi titik akhir dan saat ini tidak disetujui FDA. Perbedaan utama antara kedua antibodi tersebut adalah isotipe, *Ipilimumab* adalah IgG1 sedangkan *tremelimumab* adalah IgG2. *Ipilimumab* lebih mampu mengaktifkan FcR sehingga kemanjuran klinisnya lebih unggul dibandingkan dengan *tremelimumab* karena bukti terbaru menunjukkan bahwa *ipilimumab* tidak menguras Treg (Jacob *et al.*, 2021).

Organisasi FDA memantau efek samping untuk pasien yang menerima *immune checkpoint inhibitor* sebagai tambahan dari semua obat. Hingga 30 September 2020, terdapat 22.451 efek samping yang dilaporkan untuk *ipilimumab*. Efek samping paling parah yang dilaporkan ke basis data FDA adalah miokarditis, pneumonitis, hipofisitis, dan hepatitis (Jacob *et al.*, 2021).

2. Kanker

Kanker didefinisikan sebagai penyakit yang berkembang dari pembentukan sel-sel tubuh dengan karakteristik yang menyimpang yang disebabkan oleh perubahan *deoxiribonucleid* (DNA), yang mengakibatkan sel kehilangan fungsi normalnya. Sistem pembuluh darah, organ-organ penting lainnya, dan sel-sel tubuh yang normal akan menimbulkan gejala yang berbeda sebagai akibat dari proliferasi sel kanker yang cepat. Tanda dan gejala kanker dapat ditentukan oleh jenis kanker, lokasi kanker ditemukan pada tubuh, seberapa parah kanker, dan berapa usia kanker tersebut. Fungsi organ secara bertahap dapat memburuk dan akhirnya berhenti berfungsi jika sel kanker telah bermetastasis dan menyerang organ tubuh lainnya (Hartini *et al.*, 2020).

a. Terapi Kanker

Pengobatan kanker dapat dilakukan melalui pembedahan, terapi radiasi, kemoterapi, dan terapi target namun, banyak terjadi kekambuhan saat terapi (Robot *et al.*, 2021). Kemoterapi, obat untuk menghancurkan

sel kanker, adalah salah satu terapi yang diberikan kepada pasien kanker (Hermanto *et al.*, 2020).

b. Kerugian Terapi Kanker

Kemoterapi dapat mengganggu fungsi dan reproduksi sel yang ditujukan untuk penyembuhan, pengaturan, dan tujuan paliatif karena obat bersifat sitotoksik, yang merupakan istilah medis untuk "berbahaya bagi sel". Efek samping fisiologis kemoterapi meliputi kelelahan, kelesuan, rambut rontok, masalah pencernaan dan gigi termasuk mual dan mukositis mulut, masalah sumsum tulang belakang, infertilitas, masalah menstruasi, menopause, dan masalah pada organ lainnya. Stres dan kekhawatiran yang berkembang secara psikologis sejak saat diagnosis hingga pengobatan, perawatan paliatif, dan bahkan selama masa penyembuhan atau pemulihan dapat mengakibatkan keinginan untuk mati (Hermanto *et al.*, 2020).

Strategi global sudah harus dirancang untuk skrining dan merawat pasien, pendanaan yang lebih baik untuk mempromosikan penelitian ilmiah melawan kanker, dan upaya kolaboratif untuk membuat perawatan kanker lebih efisien dan berkelanjutan. Khususnya, beberapa teknologi baru, yang dapat merevolusi perawatan kanker (Mattiuzzi & Lippi, 2019).

3. Senyawa Aktif Tanaman Herbal

Tanaman obat secara tradisional telah digunakan untuk mengobati penyakit, meringankan gejala, dan memperpanjang harapan hidup. Selain itu, karena sumbernya yang alami, efek sampingnya mungkin lebih sedikit jika dibandingkan dengan obat antikanker yang ada saat ini. Biasanya terdapat satu atau lebih bahan aktif yang bertanggung jawab untuk mengobati atau mencegah kanker (Banerjee *et al.*, 2023).

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

Avicennia marina adalah pohon yang dinamai menurut nama dokter terkenal Avicenna atau Ibnu Sina dan tumbuh lebih dari 10 m. Tanaman ini umumnya dikenal sebagai mangrove api-api yang merupakan spesies mangrove paling banyak tersebar di Kawasan Indo-Pasifik Barat. Tanaman ini adalah mangrove yang sangat tahan terhadap tekanan lingkungan dan dapat berkembang di bawah kondisi lingkungan yang tidak ramah serta toleran terhadap garam, dapat mentolerir salinitas air laut dua kali lipat serta mungkin satu-satunya spesies dengan adaptasi morfologis, biologis, ekologis, dan fisiologis yang sangat maju terhadap variasi kondisi lingkungan (Eldohaji *et al.*, 2020). *Avicennia marina* dapat ditemukan di pesisir Cilacap beserta tanaman mangrove lainnya. Segara Anakan Cilacap didominasi oleh spesies *Rhizophora spp.*, *Avicennia spp.*, dan *Nypa frutican* (Hilmi *et al.*, 2021).

1) Klasifikasi Tanaman Mangrove Api-Api (*Avicennia marina*)



Gambar 1. *Avicennia marina* (Eldohaji *et al.*, 2020)

Kingdom : *Plantae*
Divisi : *Thacheophyta*
Kelas : *Magnoliopsida*
Ordo : *Lamiales*
Famili : *Acanthaceae*
Genus : *Avicennia*
Spesies : *Avicennia marina* (Fauziyana, 2021).

2) Kandungan dan Khasiat

Demikian pula, tanaman *Avicennia marina* yang telah digunakan secara tradisional dalam pengobatan tradisional (Bibi *et al.*, 2019). *Avicennia marina* merupakan tanaman berharga dengan banyak senyawa aktif yang menunjukkan aktivitas farmakologis (Okla *et al.*, 2019). Tanaman *A. marina* mengandung metabolit sekunder berupa glukosida iridoid, turunan naphthoquinone, flavonoid, dan diterpenoid (Yi *et al.*, 2014). Berbagai aktivitas farmakologis dari tanaman *A.*

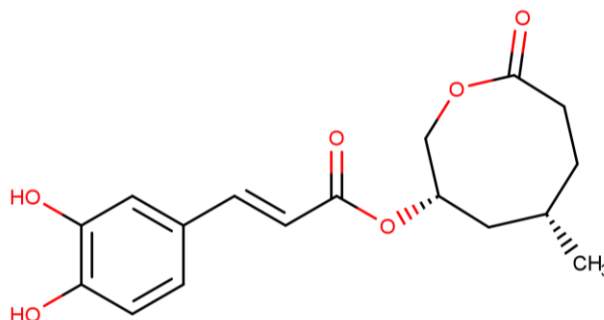
marina telah dilaporkan termasuk antidiabetes, antikanker, antimikroba dan banyak lainnya (Eldohaji *et al.*, 2020).

Senyawa *maricaffeolylide* dari buah tanaman mangrove api-api yang merupakan turunan asam kafeat memiliki aktivitas seperti antioksidan, penangkal radikal bebas, dan antikanker. (S. Sun & Hu, 2017; D. Yan *et al.*, 2015). Dilaporkan bahwa asam kafeat dapat diserap di usus dan membentuk interaksi selanjutnya dengan jaringan sasaran (Mirzaei *et al.*, 2021; R. Sun *et al.*, 2023). Asam kafeat digunakan sebagai donor *caffeoyl* baru dalam produksi ester alkil *caffeoyl*. Struktur lipid *caffeoyl* memiliki sifat antioksidan dan antikanker (Wang *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 *maricaffeolylide* kimia, yang memiliki dua pusat kiral dan lakton cincin beranggota 8 jenuh. Dalam uji aktivitas antioksidan seluler (*cellular antioxidant assay/CAA*), senyawa *maricaffeolylide* menghasilkan CAA dengan nilai EC_{50} sebesar $24 \pm 0,3$ μ m. Katekol dalam senyawa *maricaffeolylide* memiliki nilai EC_{50} yang sama dengan kontrol positif *quercetin* ($EC_{50} = 11 \pm 0,2$ μ m).

Hasil penelitian Ulya (2022), *maricaffeolylide* berhasil dilakukan penambatan molekul secara *in silico* terhadap reseptor *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF- α) dengan *docking score* sebesar -6,1

kkal/mol dan memiliki kemiripan interaksi dengan ligan sebenarnya, TNF- α . Kemiripan interaksi tersebut terdapat pada beberapa residu asam amino antara lain *Gln C:25*, *Gln C:47*; *Ser C: 133*; *Glu C:135*; *Pro C:139*; *Leu C:26*; *Ile C:136*; *Asn C:46*; dan *Ala C:134*.



Gambar 2. Struktur *maricaffeoyl chloride*

b. Ginseng Wanita (*Angelica sinensis* L.)

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. Penelitian *in vitro* dan *in vivo* telah menunjukkan bahwa *A. sinensis* menunjukkan berbagai aktivitas farmakologis. Di Cina, *A. sinensis* terkandung dalam formulasi khusus yang diresepkan untuk wanita sebagai obat untuk gejala menopause dan meningkatkan kesehatan mereka dengan memperkuat organ tubuh dan menyehatkan darah. Selain itu, *A. sinensis* terkenal karena penggunaannya dalam pengobatan berbagai kondisi ginekologi tidak mudah dengan terapi konvensional, sehingga disebut "ginseng wanita" (Wei *et al.*, 2016).

1) Klasifikasi Tanaman Angelica (*Angelica sinensis* L.)



Gambar 3. *Angelica sinensis* (Wei *et al.*, 2016)

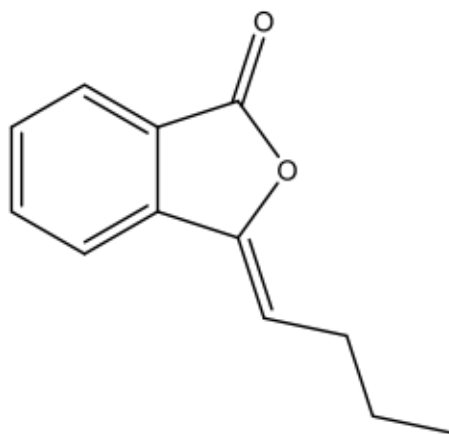
Kingdom : *Plantae*
Divisi : *Magnoliophyta*
Kelas : *Magnoliopsida*
Ordo : *Apiales*
Famili : *Apiaceae*
Genus : *Angelica*
Spesies : *Angelica sinensis* (Wei *et al.*, 2016).

2) Kandungan dan Khasiat

Penelitian telah menunjukkan bahwa *Angelica 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).

N-butylidenephthalide, sebuah phthalide padatan putih dan dianggap sebagai benzo lakton paling sederhana, diekstraksi dari *Angelica sinensis* L. *N-butylidenephthalide* menghambat berbagai pertumbuhan sel kanker dengan memodulasi jalur pensinyalan apoptosis intrinsik (Banerjee *et al.*, 2023).

N-butylidenephthalide 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. *N-butylidenephthalide* juga menunjukkan penghambatan proliferasi sel kanker dan efek anti tumor terhadap garis sel adenokarsinoma paru-paru manusia, sel kanker kolorektal, dan glioblastoma multiforme (Banerjee *et al.*, 2023; Chang *et al.*, 2020).



Gambar 4. Struktur *N-butylidenephthalide* (Banerjee *et al.*, 2023)

c. Ki Sampang (*Melicope denhamii*)

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). *Melicope* memiliki trikoma sederhana, tipe perbungaan malai yang tumbuh di bagian aksilar, infrafoliar atau di batang, dan benang sari yang berjumlah 4 – 8 (Irsyam & Chikmawati, 2018).

1) Klasifikasi Tanaman Ki Sampang (*Melicope denhamii*)



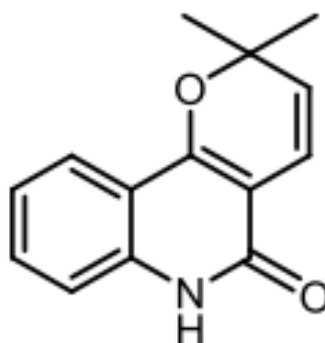
Gambar 5. *Melicope denhamii* (George *et al.*, 2017)

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i>
Ordo	: <i>Sapindales</i>
Famili	: <i>Rutaceae</i>
Genus	: <i>Melicope</i>
Spesies	: <i>Melicope denhamii</i> (Irsyam & Chikmawati, 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).

Flindersine berwujud padatan kuning muda dengan titik leleh t_l 197 - 199°C. Spektrum massa senyawa tersebut memperlihatkan ion kuasi molekul positif [M+H]⁺ pada m/z 229,1180 yang sesuai dengan rumus molekul C₁₄H₁₃NO₂. Uji aktivitas antikanker senyawa *flindersine* terhadap sel murin leukemia P-388 memperlihatkan nilai konsentrasi daya hambat IC₅₀ adalah 21,06 ± 0,85 dan 4,86 ± 0,30 µg/ml. Senyawa *flindersine* dikategorikan memiliki keaktifan moderat. Senyawa ini mengalami demetilasi dan meningkatkan aktivitas antikanker (Saputri *et al.*, 2018).



Gambar 6. Struktur *Flindersine* (Saputri *et al.*, 2018)

d. Huangqi (*Astragalus membranaceus*)

Huangqi, akar kering dari *Astragalus membranaceus*, di Cina adalah salah satu obat herbal paling populer di seluruh dunia (Fu *et al.*, 2014). Tanaman ini berasal dari Mongolia, Korea, dan bagian utara dan timur Cina. Huangqi memiliki habitat di tanah berpasir kering, semak-semak gunung, stepa, padang rumput, xerofit, hutan jenis konifera, sabuk pegunungan di ketinggian 800 - 2000 meter (Banerjee *et al.*, 2023)

1) Klasifikasi Tanaman Huangqi (*Astragalus membranaceus*)



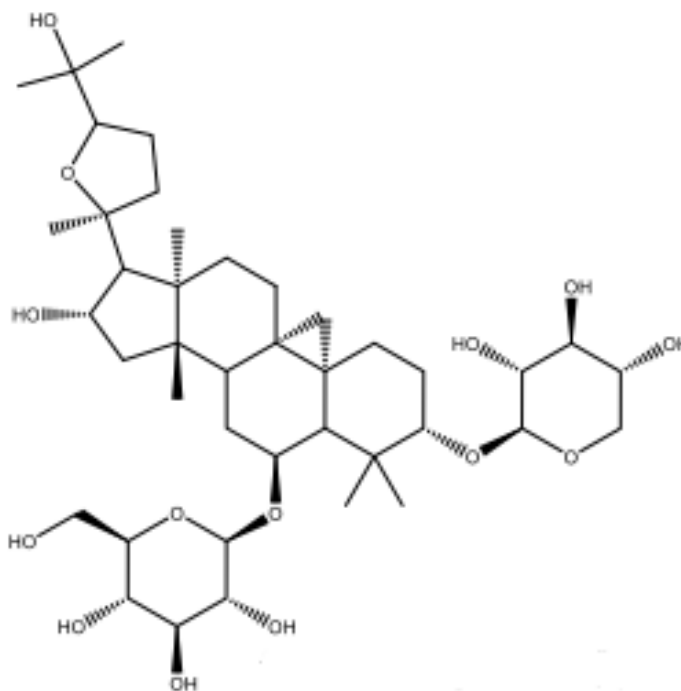
Gambar 7. *Astragalus membranaceus* (Banerjee *et al.*, 2023)

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i>
Ordo	: <i>Fabales</i>
Famili	: <i>Fabaceae</i>
Genus	: <i>Astragalus</i>
Spesies	: <i>Astragalus membranaceus</i> (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 (Fu *et al.*, 2014). Akar *astragalus* (*Astragalus membranaceus*), ramuan adaptogenik, memiliki peran penting dalam pengobatan herbal tradisional Tiongkok (Block & Mead, 2003). Sebuah turunan saponin yang diekstrak dari *Astragalus membranaceus* 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. Struktur *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. Eksistensi temulawak sebagai tumbuhan obat telah lama diakui, terutama dikalangan masyarakat Jawa. 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. *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. (Syamsudin *et al.*, 2019)

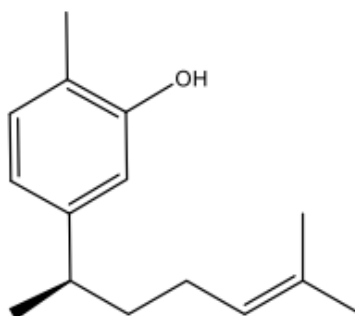
Kingdom : *Plantae*
Divisi : *Spermatophyta*
Kelas : *Monocotyledonae*
Ordo : *Zingiberales*
Famili : *Zingiberaceae*
Genus : *Curcuma*
Spesies : *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. (Syamsudin *et al.*, 2019).

2) Kandungan dan Khasiat

Temulawak memiliki banyak kandungan metabolit sekunder yang bermanfaat bagi kesehatan. Senyawa aktif yang dilaporkan bertanggung jawab 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 *xanthorrhizol* 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 mitokondrial (Banerjee *et al.*, 2023).



Gambar 10. Struktur *Xanthorrhizol* (Banerjee *et al.*, 2023)

4. Analisis *In Silico*

Pengurangan penggunaan hewan percobaan dan kemampuan untuk memvisualisasikan mekanisme kerja senyawa kandidat obat terhadap target adalah dua manfaat dari metode *in silico*, yang merupakan salah satu teknik yang digunakan untuk mengungkap senyawa yang dapat digunakan sebagai kandidat obat (Mirza, 2019). Fleksibilitas protein dan konformasi molekuler, yang dapat menghalangi prediksi yang tepat, membuat metode *in silico* berbeda (Dona *et al.*, 2019).

Senyawa yang lebih baik didapat dari penggunaan teknik *in silico* sebelum diuji secara *in vitro* atau *in vivo* (Dana *et al.*, 2020). Teknik ini sangat penting untuk katalisis homogen dan membantu dalam interpretasi temuan penelitian, interpretasi interaksi antara obat dan target reseptor, dan prediksi

aktivitas katalitik dan selektivitas. Metode ini juga digunakan untuk visualisasi dari molekul sederhana tiga dimensi (3D) yang dapat dengan mudah dilakukan atau bahkan digabungkan dengan *real time* (Foscato & Jensen, 2020). Analisis *in silico* dilakukan untuk memprediksi aktivitas molekul dengan sel target yang dipilih melalui *molecular docking*.

a. *Molecular Docking*

Molecular docking atau penambatan molekul adalah obat berbasis struktur metode desain yang menyimulasikan interaksi molekuler dan memprediksi interaksi dan afinitas antara reseptor dan ligan. Dalam beberapa tahun terakhir, teknologi ini telah banyak digunakan dalam bidang penelitian desain obat (Fan *et al.*, 2019).

Dengan menggunakan energi ikatan, *docking* memposisikan dan menyelaraskan molekul kecil (ligan) di dalam sel target, khususnya makromolekul (protein). Temuan dari analisis energi ikatan mengukur energi yang dibutuhkan untuk membentuk ikatan antara ligan dan reseptor. Ikatan akan semakin stabil jika energi ikatan semakin rendah. Dapat diasumsikan bahwa aktivitas akan meningkat seiring dengan seberapa stabil interaksi ligan dengan reseptor. Dalam bidang kedokteran, *docking* sangat penting untuk menciptakan, meningkatkan, dan menemukan obat (Amanda, 2021; Kesuma *et al.*, 2018).

b. Sumber Informasi *Database*

Database adalah sistem yang dirancang untuk mengatur, menyimpan, dan mengambil data dengan mudah dari sekumpulan data terstruktur untuk satu atau beberapa aplikasi dalam bentuk digital (Ramadhan & Mukhaiyar, 2020). *Database* yang digunakan dalam *molecular docking* adalah *Protein Data Bank* (PDB) yang telah berfungsi sejak 1971 sebagai gudang informasi global tentang struktur 3D protein, asam nukleat, dan senyawa kompleks. Akses terbuka untuk data struktur PDB berperan penting dalam penelitian dan pendidikan lintas alam, biomedis, dan ilmu teknik dengan memungkinkan wawasan fungsi biologi berdasarkan bentuk atau struktur 3D (Feng *et al.*, 2021).

PubChem adalah repositori publik untuk informasi tentang zat kimia dan aktivitas biologisnya, diluncurkan pada tahun 2004 sebagai komponen dari Perpustakaan Molekuler Inisiatif Peta Jalan dari Institut Kesehatan Nasional AS (NIH). Selama 11 tahun terakhir, *PubChem* telah berkembang menjadi sistem yang cukup besar, berfungsi sebagai sumber informasi kimia untuk penelitian ilmiah komunitas. *PubChem* terdiri dari tiga yang saling terkait basis data, zat, senyawa, dan bioassay. Basis data substansi berisi informasi kimia yang disimpan oleh kontributor data individu ke *PubChem*, dan basis data Senyawa menyimpan struktur kimia unik yang diekstrak dari basis data substansi. Data aktivitas biologis zat kimia yang diuji dalam percobaan pengujian terkandung dalam basis data bioassay (Kim *et al.*, 2016).

c. Program *Server* dan *Software*

1) Program *Marvin Sketch*

Marvin sketch adalah program editor kimia tingkat lanjut untuk menggambar struktur, pertanyaan, dan reaksi kimia. Program ini memiliki daftar fitur pengeditan yang kaya (dan terus bertambah), sadarkan bahan kimia, dan dapat memanggil plugin kalkulasi berbasis struktur *ChemAxon* untuk struktur di kanvas. *Marvin sketch* dengan pengeditan seperti fungsi gambar kimia yang mudah diakses, banyak pintasan; pengeditan yang mudah dalam 2D dan 3D; pembersihan struktur 2D dan 3D; templat struktur yang telah ditentukan sebelumnya dan templat khusus yang ditentukan pengguna; grup yang disingkat; berbagai jenis file didukung; salin dan tempel di antara editor kimia yang berbeda; fitur seret & jatuhkan; fitur kueri tingkat lanjut; menangani polimer dan biomolekul; gaya yang dapat disesuaikan yang dapat ditentukan pengguna; menggambar dan memformat bentuk, panah, dan kotak teks; dokumen multi-halaman dan dukungan pencetakan; dan lain-lain (Chemaxon, 1998).

2) Program *HDOCK*

Salah satu fungsi dasar dari *server HDOCK* adalah untuk memprediksi antarmuka interaksi dari dua protein. Salah satu bagian penting dari *server HDOCK* adalah bahwa ia mendukung *input* urutan asam amino dan secara otomatis dapat menggabungkan informasi eksperimental yang tersedia tentang interaksi antara dua protein. Oleh

karena itu, *HDOCK* dapat digunakan untuk mempelajari mekanisme molekuler interaksi protein-protein melalui struktur kompleks yang diprediksi dari protein yang terlibat, terutama ketika beberapa informasi biologis tentang pengikatan tersedia (Y. Yan *et al.*, 2020).

3) Program *PyRx-Virtual Screening Tools*

Program *PyRx* adalah perangkat lunak penyaringan virtual untuk penemuan obat komputasi yang dapat digunakan untuk menyaring pustaka senyawa terhadap target obat potensial. *PyRx* memungkinkan ahli kimia obat untuk menjalankan skrining virtual dari platform apa pun dan membantu pengguna dalam setiap langkah proses, mulai dari persiapan data hingga pengiriman pekerjaan dan analisis hasil. Meskipun benar bahwa tidak ada tombol ajaib dalam proses penemuan obat, *PyRx* menyertakan *docking wizard* dengan antarmuka pengguna yang mudah digunakan yang menjadikannya alat yang berharga untuk desain obat berbantuan komputer. *PyRx* juga menyertakan fungsionalitas seperti *spreadsheet* kimia dan mesin visualisasi yang kuat yang sangat penting untuk desain obat berbasis struktur (Dallakyan & Olson, 2015).

Autodock Vina di dalam *PyRx* berpartisipasi dalam penambatan dan penyaringan molekul virtual senyawa, antisipasi konformasi ikatan dan afinitas molekul ligan dengan targetnya, dalam hal ini reseptor. Kemampuan *autodock vina* yang merupakan pengembangan dari *autodock*, terdapat kesamaan dalam tampilan dan

penayangan senyawa. Namun, *autodock vina* memiliki keunggulan dalam memetakan struktur dengan cepat dan otomatis menggunakan *autogrid* untuk mengurangi waktu penambatan senyawa terhadap target (Jasmine, 2021).

4) Program *PyMOL*

Program *PyMOL* adalah sistem visualisasi molekuler sumber terbuka sistem yang dibuat oleh Warren Lyford DeLano. *PyMOL* dapat menghasilkan tampilan dan gambar makromolekul berkualitas tinggi dalam representasi yang berbeda termasuk pita, kartun, titik, permukaan, bola, tongkat, dan garis. Saat ini, *PyMOL* adalah salah satu alat visualisasi makromolekul yang paling banyak digunakan (Yuan *et al.*, 2017).

5) Program *Discovery Studio Visualizer*

Tujuan dari *Discovery Studio Visualizer* adalah untuk memahami dan menggambarkan interaksi yang terjadi antara ligan dan protein, serta residu asam amino mana yang terlibat dalam proses pengikatan. Program ini memiliki manfaat untuk menampilkan hasil interaksi dalam format 3D dan 2D. Program ini dapat menunjukkan interaksi seperti ikatan hidrogen dan ikatan C-H. Interaksi ini penting dalam hal pengikatan ligan-reseptor (Yahmin *et al.*, 2019).

d. Validasi Metode *Docking*

1) Validasi *Gridbox*

Validasi dengan menggunakan *gridbox* antara ligan dan protein dilakukan setiap algoritma *docking*. Proses *docking* perlu membuat *gridbox* untuk menentukan nilai koordinat pusat serta besaran *gridbox* tempat interaksi ligan dan protein, sehingga *gridbox* harus menutupi semua ligan dan reseptor. Nilai dimensi dan pusat massa diperoleh dari hasil pembuatan *gridbox* yang dioptimasi. Penentuan *gridbox* perlu dilakukan untuk mengetahui titik koordinat pada *binding site* dari suatu protein sehingga dapat menjadi acuan saat melakukan proses simulasi *docking* senyawa uji pada nantinya (Meily *et al.*, 2021; Purwanto *et al.*, 2021).

2) Validasi *Root Mean Square Deviation*

Pada proses validasi *docking*, yang dilihat adalah nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*). RMSD merupakan parameter yang menggambarkan seberapa besar perubahan interaksi protein-ligan pada struktur kristal sebelum dan sesudah di *docking* untuk mengetahui nilai penyimpangannya. Metode *docking* dikatakan valid apabila nilai $RMSD \leq 2\text{\AA}$, yang artinya parameter *docking* yang digunakan telah valid sehingga metode *docking* dapat digunakan untuk *docking* senyawa uji (Sari *et al.*, 2020).

e. Analisis Metode *Docking*

1) Analisis *Lipinski's Rule of Five*

Dengan menganalisis karakteristik fisikokimia molekul ketika melintasi membran sel tubuh, analisis *Lipinski's Rule of Five* dapat mengindikasikan apakah suatu senyawa dapat diserap oleh tubuh atau tidak. Situs *Lipinski's Rule of Five* (<https://www.scfbioiitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp>) merupakan *website* yang digunakan untuk menganalisis senyawa uji (Amanda, 2021).

Syarat *Lipinski's Rule of Five* mengharuskan senyawa ligan memiliki berat molekul kurang dari 500 Da, ikatan donor hidrogen minimal lima, ikatan akseptor hidrogen minimal sepuluh, nilai logP minimal lima, dan refraktivitas molar minimal 40 hingga 130 (Amanda, 2021). Mengingat syarat tersebut, ligan dengan berat molekul kurang dari 500 Da akan lebih mudah memasuki membran sel dibandingkan ligan dengan berat molekul lebih dari 500 Da. Ligan dengan nilai logP < 5 lebih efisien daripada ligan dengan nilai logP > 5 karena ligan dengan nilai logP > 5 akan lebih mudah berdifusi ke seluruh tubuh dan masuk ke dalam membran sel pada lapisan lipid bilayer, meningkatkan toksisitas dan menurunkan sensitivitas ligan terhadap protein target (Adriani, 2018).

2) Analisis *Docking Score*

Docking score adalah nilai energi bebas (ΔG_{bind}) yang mana semakin rendah nilainya menandakan semakin stabil interaksi antara ligan dan reseptor sehingga afinitas ligan terhadap reseptor juga menjadi semakin lebih kuat. Jika semakin besar nilai afinitas ikatan, maka afinitas antara reseptor dengan ligan akan semakin rendah. Semakin kecil nilai *binding affinity*, maka afinitas antara reseptor dengan ligan semakin tinggi (Meily *et al.*, 2021; Purwanto *et al.*, 2021).

3) Analisis Interaksi Obat-Reseptor

Energi bebas, ikatan hidrogen, dan kemiripan residu asam amino dari ligan uji yang dapat dideteksi selama visualisasi digunakan untuk mempelajari penambatan molekul. Ikatan kovalen, ikatan hidrogen, ikatan ion, ikatan ion-dipol dan dipol-dipol, ikatan *van der Waal's*, ikatan hidrofobik, dan transfer muatan merupakan contoh ikatan kimia dalam interaksi ligan-reseptor (Siswandono, 2016):

a. Ikatan Kovalen

Dengan kekuatan ikatan rata-rata 100 kkal/mol, ikatan kovalen merupakan ikatan kimia terkuat dan tercipta ketika dua atom berbagi sepasang elektron. Interaksi kovalen obat-reseptor menghasilkan kompleks yang cukup stabil yang dapat dieksploitasi untuk tujuan terapeutik tertentu (Siswandono, 2016).

b. Ikatan Ion

Interaksi elektrostatik antara ion dengan muatan yang berlawanan membentuk ikatan ionik, merupakan jenis ikatan ion. Ketika ruang di antara ion-ion semakin besar, kekuatan tarik-menariknya juga akan semakin lemah, dan kehilangan kekuatannya berbanding terbalik dengan bertambahnya ruang. Ikatan ionik memiliki kekuatan 5 kkal/mol (Siswandono, 2016).

c. Interaksi Ion-dipol dan Dipol-dipol

Jika dibandingkan dengan atom lain, seperti O dan N, atom C memiliki keelektronegatifan yang lebih rendah, yang dapat menghasilkan distribusi elektron asimetris atau dipol yang dapat membentuk ikatan dengan ion atau dipol lain, baik yang memiliki daerah kerapatan elektron yang tinggi maupun yang rendah. Ikatan ion-dipol dan dipol-dipol memiliki kekuatan 1-7 kkal/mol (Siswandono, 2016).

d. Ikatan Hidrogen

Selain memiliki sepasang elektron bebas dengan oktet lengkap seperti O, N, dan F, ikatan hidrogen juga mengandung atom elektronegatif tambahan yang sebagian bermuatan positif. Interaksi antara atom bermuatan positif sebagian dan atom bermuatan negatif sebagian dari molekul lain atau antara atom dengan ikatan kovalen yang berbeda dalam molekul yang sama dimungkinkan. Sekitar 1-7

kkal/mol diperlukan untuk memutuskan ikatan hidrogen (Siswandono, 2016).

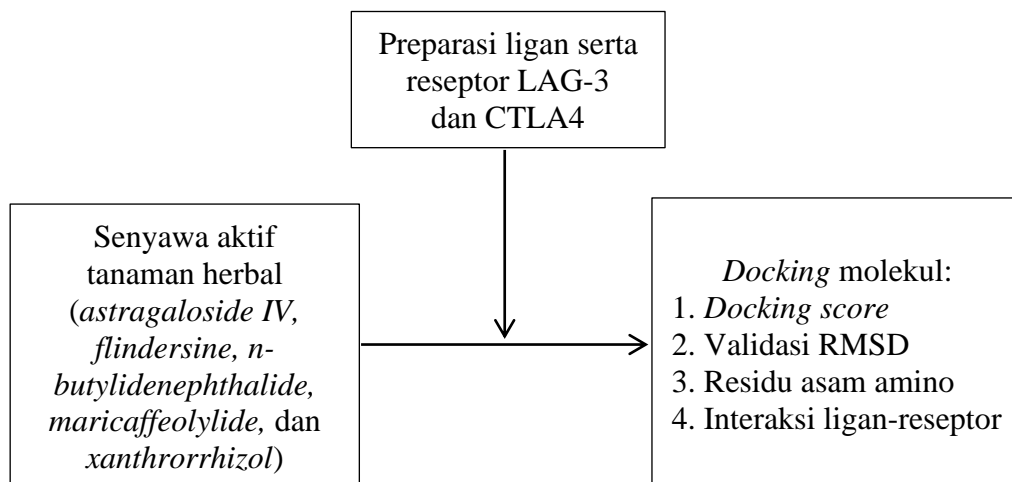
e. Ikatan *van der Waals*

Polarisasi molekul dan kekuatan tarik menarik antara molekul atau atom yang tidak bermuatan menyebabkan terbentuknya ikatan yang dikenal sebagai ikatan *van der Waals* di antara keduanya. Ikatan ini ditempatkan berdekatan satu sama lain atau hanya dipisahkan oleh jarak 4-6 nm. Nilai 0,5 kkal/mol adalah kekuatan ikatan *van der Waals* (Siswandono, 2016).

f. Ikatan Hidrofob

Dalam proses penggabungan bagian non-kutub molekul obat dengan daerah non-kutub reseptor biologis, ikatan hidrofobik memainkan peran penting. Ikatan hidrogen akan terbentuk antara molekul obat non polar yang tidak larut dalam air dengan molekul air di sekitarnya, sehingga terbentuk struktur *quasi-crystalline (icebergs)* (Siswandono, 2016).

B. Kerangka Pemikiran



Gambar 11. Kerangka Pemikiran

Penelitian ini dimulai dengan ligan senyawa uji *astragaloside IV*, *flindersine*, *n-butylidenephthalide*, dan *xanthorrhizol* yang diunduh melalui website *Pubchem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), sementara senyawa *maricaffeoylside* digambar melalui perangkat lunak *Marvin Sketch*. Kemudian pada senyawa uji dilakukan analisa *Lipinski's Rule of Five* melalui website (<https://www.scfbioiitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp>).

Reseptor CTLA-4 serta ligan pembanding *ipilimumab* dengan kode 6RP8 dan reseptor LAG-3 serta ligan pembanding *relatlimab* dengan kode 7UM3 diunduh melalui website *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>) dan dipreparasi melalui *Discovery Studio*. Setelah itu, dilakukan *molecular docking* dan divalidasi melalui server *HDOCK* untuk *docking* ligan protein-protein dan perangkat lunak *PyRx-Virtual Screening Tool* untuk *docking* ligan-reseptor serta dianalisa melalui perangkat lunak *Discovery Studio* dan *PyMOL* dengan

parameter *docking score*, RMSD (*Root Mean Square Deviation*), residu asam amino, dan interaksi ligan-reseptor.

C. Hipotesis

1. Senyawa aktif tanaman herbal (*astragaloside IV*, *flindersine*, *n-butylidenephthalide*, *maricaffeoylide*, dan *xanthorrhizol*) dapat dilakukan penambatan molekul dengan reseptor LAG-3 dan CTLA-4.
2. Terdapat interaksi antara senyawa aktif tanaman herbal (*astragaloside IV*, *flindersine*, *n-butylidenephthalide*, *maricaffeoylide*, dan *xanthorrhizol*) dengan reseptor