

**STUDI *IN SILICO* SENYAWA TURUNAN FLAVONOL
YANG BERPOTENSI SEBAGAI ANTIMELANOMA
MELALUI INHIBISI MIGRASI MAKROFAG**

LAPORAN TUGAS AKHIR

**MELINDA AFRILIYANA
13151024**



**SEKOLAH TINGGI FARMASI BANDUNG
PROGRAM STUDI STRATA I FARMASI
BANDUNG
2017**

**STUDI *IN SILICO* SENYAWA TURUNAN FLAVONOL
YANG BERPOTENSI SEBAGAI ANTIMELANOMA
MELALUI INHIBISI MIGRASI MAKROFAG**

LAPORAN TUGAS AKHIR

Diajukan untuk memenuhi persyaratan kelulusan
Program Strata Satu

MELINDA AFRILIYANA

13151024

Bandung, Agustus 2017

Menyetujui,

Pembimbing Utama,



Fransiska Kurniawan, M.Si.

Pembimbing Serta,



Deden Indra Dinata, M.Si., Apt.

Pedoman Penggunaan Skripsi

Skripsi yang tidak dipublikasikan terdaftar dan tersedia di Perpustakaan Sekolah Tinggi Farmasi Bandung, dan terbuka untuk umum.

Referensi kepustakaan diperkenankan dicatat, tetapi pengutipan atau peringkasan hanya dapat dilakukan seizin pengarang dan harus disertai dengan kebiasaan ilmiah untuk menyebutkan sumbernya.

Memperbanyak atau menerbitkan sebagian atau seluruh skripsi haruslah seizin Ketua Program Studi di lingkungan Sekolah Tinggi Farmasi Bandung.

Dipersembahkan kepada kedua orangtua tercinta, kakak, adik, dan kakak Juriah tersayang...

ABSTRAK
STUDI *IN SILICO* SENYAWA TURUNAN FLAVONOL
YANG BERPOTENSI SEBAGAI ANTIMELANOMA
MELALUI INHIBISI MIGRASI MAKROFAG

Oleh:
MELINDA AFRILIYANA
13151024

Melanoma merupakan keadaan pada saat melanosit menjadi ganas yang menyebabkan angka kematian sebesar 75% dari kematian akibat kanker kulit. Reseptor *Macrophage migration inhibitory factor* (MIF) merupakan target potensial yang terlibat dalam sel kanker melanoma karena dapat mempromosikan peradangan dan menghambat apoptosis sehingga menyebabkan metastasis dan angiogenesis sel kanker. Senyawa turunan flavonol merupakan senyawa bahan alam yang dapat menjadi imunostimulan dalam pengobatan melanoma yang dapat meningkatkan transkripsi IFN- γ dan TGF- β dalam menghambat MIF. Tujuan penelitian ini adalah mengkaji interaksi dua belas senyawa turunan flavonol terhadap reseptor MIF secara *in silico* dan prediksi toksisitasnya. Semua senyawa uji dioptimasi menggunakan perhitungan DFT kemudian dilakukan simulasi *docking* dan simulasi dinamika molekul serta prediksi toksisitas. Hasil simulasi *docking* menunjukkan bahwa senyawa robinetin memiliki afinitas paling baik dengan energi bebas ikatan dan nilai konstanta inhibisi berturut-turut sebesar $-5,92$ kkal/mol dan $45,49$ μ M. Hasil simulasi dinamika molekul menunjukkan interaksi senyawa robinetin dengan MIF tidak stabil, namun konformasi bisa dipertahankan pada RMSD $1,2\text{\AA}$. Senyawa robinetin memiliki nilai RMSF dengan fleksibilitas paling rendah dibandingkan senyawa lain yaitu $1,8\text{\AA}$, dan memiliki residu asam amino yang berperan penting sebagai sisi aktif reseptor MIF yaitu Ile64 dan Asn97. Dari data-data tersebut, dapat disimpulkan bahwa senyawa robinetin diduga dapat menghambat migrasi makrofag, akan tetapi hasil prediksi toksisitas menunjukkan sebagian besar senyawa turunan flavonol bersifat mutagenik pada *S. Typhimurium* galur S97, S102, dan m98.

Kata kunci: *docking*, dinamika molekul, flavonol, melanoma, MIF, prediksi toksisitas

ABSTRACT
STUDY *IN SILICO* OF POTENTIAL FLAVONOL DERIVATIVES
COMPOUNDS AS ANTIMELANOMA THROUGH THE
INHIBITION OF MACROPHAGE MIGRATION

By:
MELINDA AFRILIYANA
13151024

Melanoma is a condition where the malignancy happened in the melanocytes, which cause the 75% mortality of deaths due to skin cancer. The Macrophage migration inhibitory factor (MIF) receptor is a potential target that has been known in melanoma cancer cells. It can promote inflammation and inhibit apoptosis causing metastasis and angiogenesis of cancer cells. Flavonol derivatives can be an immunostimulant in the treatment of melanoma, which can increase transcription of IFN- γ and TGF- β through inhibition of MIF. The purpose of this study is to examine the interaction of twelve flavonol derivatives against MIF receptor using *in silico* study and their toxicity prediction. All compounds were optimized using DFT calculation followed by the molecular docking simulation, molecular dynamic simulations, and toxicity prediction. The results of docking simulation showed that the robinetin had the best affinity with the free binding energy and inhibition constant of -5.92 kcal/mol and 45.49 μ M, respectively. Molecular dynamics simulation results showed that the interaction of robinetin compounds with MIF was not stable, but conformation can be maintained on the RMSD 1.2 Å. The robinetin had the lowest RMSF value which was 1.8 Å, and the important residues in the MIF active site were Ile64 and Asn97. It can be concluded that robinetin was predicted to be an inhibitor of MIF, but the results of the toxicity prediction showed that most of flavonol derivatives compounds were classified as mutagenic on *S. Typhimurium* strain S97, S102, and m98.

Keywords: docking, flavonol, melanoma, MIF, molecular dynamic, toxicity prediction

Kata Pengantar

Alhamdulillah, puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT, karena berkat rahmat dan karunia-Nya lah penulis dapat menyelesaikan penyusunan laporan tugas akhir yang berjudul “STUDI *IN SILICO* SENYAWA TURUNAN FLAVONOL YANG BERPOTENSI SEBAGAI ANTIMELANOMA MELALUI INHIBISI MIGRASI MAKROFAG” serta berkat shalawat kepada Rasulullah SAW laporan tugas akhir ini dapat terselesaikan tepat pada waktu yang telah ditentukan walaupun tidak sedikit hambatan dan kesulitan yang dihadapi oleh penulis.

Dalam penulisan laporan tugas akhir ini penulis mendapatkan bimbingan, dorongan dan doa dari berbagai pihak, dengan segala kerendahan hati, perkenankanlah penulis mengucapkan terimakasih yang tak terhingga kepada yang terhormat :

- (1) Orang tua dan keluarga tercinta, yang telah memberikan dorongan, baik secara moril maupun material serta doa yang terus mengalir
- (2) Fransiska Kurniawan, M.Si. dan Deden Indra Dinata, M.Si., Apt. selaku dosen pembimbing utama dan pembimbing serta yang telah bersedia meluangkan waktu, pikiran dan perhatiannya untuk memberikan masukan dan bimbingan serta pengarahan dengan penuh kesabaran dan ketulusan kepada penulis selama penyusunan laporan tugas akhir ini
- (3) Seluruh dosen yang telah memberikan ilmu dan bimbingan selama perkuliahan di Sekolah Tinggi Farmasi Bandung yang telah memberikan bantuan selama perkuliahan

(4) Teman-teman Ekstensi Farmasi angkatan 2015 yang telah memberikan semangat dan motivasi kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan proposal ini dengan tepat waktu.

(5) Serta teman-teman Rubi Farmakokimia khususnya Kimia Medisinal yang telah memberikan banyak bantuan dalam penyelesaian laporan tugas akhir ini

Penulis menyadari bahwa laporan tugas akhir ini jauh dari kata sempurna karena keterbatasan pengetahuan dan kemampuan penulis. Untuk itu penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang sifatnya membangun hingga laporan tugas akhir ini akan menjadi lebih baik.

Bandung, Agustus 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK.....	i
ABSTRACT.....	ii
Kata Pengantar	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN	xii
Bab I Pendahuluan.....	1
I.1 Latar Belakang.....	1
I.2 Identifikasi Masalah	4
I.3 Tujuan Penelitian	4
I.4 Manfaat Penelitian.....	4
I.5 Waktu dan Tempat Penelitian	5
Bab II Tinjauan Pustaka.....	6
II.1 Kulit	6
II.2 Kanker Kulit	8
II.3 Melanoma.....	10
II.4 Reseptor MIF	18
II.5 Senyawa Uji	19
II.6 Protein Data Bank (PDB)	23
II.7 Optimasi Geometri	24
II.8 Density Functional Theory (DFT).....	24
II.9 Gaussian 09W	25
II.10 Validasi Metode Docking	26

II.11 Molekular Docking.....	26
II.12 Dinamika Molekuler (Molecular Dynamic).....	28
II.13 Ikatan Obat dengan Reseptor	28
II.14 Prediksi Toksisitas.....	30
Bab III Metodologi Penelitian.....	32
Bab IV Perangkat Keras, Perangkat Lunak dan Bahan.....	34
IV.1 Perangkat Keras, Perangkat Lunak.....	34
IV.2 Bahan.....	35
Bab V Prosedur Penelitian	39
V.1 Pencarian Struktur Reseptor MIF.....	39
V.2 Penentuan Parameter Sifat Fisikokimia Senyawa Uji.....	39
V.3 Optimasi Geometri Senyawa Uji.....	39
V.4 Validasi Parameter Docking	40
V.5 Visualisasi Interaksi Reseptor dan Ligan Alami	40
V.6 Docking Senyawa Uji Terhadap Reseptor MIF.....	40
V.7 Simulasi Dinamika Molekul Senyawa Uji Terbaik	41
V.8 Prediksi Toksisitas Senyawa Uji	42
Bab VI Hasil dan Pembahasan	43
VI.1 Hasil Penetapan Parameter Fisikokimia Senyawa Turunan Flavonol.....	43
VI.2 Optimasi Geometri Senyawa Turunan Flavonol	45
VI.3 Energi HOMO, LUMO, dan Selisih Energi.....	46
VI.4 Molecular Docking.....	48
VI.5 Dinamika Molekul.....	57
VI.6 Prediksi Toksisitas.....	74
Bab VII Kesimpulan dan Saran.....	89
VII.1 Kesimpulan	89

VII.2 Saran.....	90
DAFTAR PUSTAKA.....	91
Lampiran	101

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel VI.1 Struktur 2D Senyawa Turunan Flavonol	36
Tabel VI.2 Data Parameter Fisikokimia Senyawa Turunan Flavonol	43
Tabel VI.3 Hasil Optimasi Geometri Senyawa Turunan Flavonol ..	46
Tabel VI.4 Hasil Penetapan Energi HOMO, LUMO dan Selisih Energi	47
Tabel VI.5 Ikatan Hidrogen Ligan Alami ISO 66 dengan Reseptor MIF Setelah <i>Redocking</i>	50
Tabel VI.6 Hasil <i>Docking</i> Senyawa Turunan Flavonol	51
Tabel VI.7 Hasil Analisis Ikatan Hidrogen dan Residu Asam Amino yang Terlibat	53
Tabel VI.8 Hasil Analisis Interaksi Hidrofobik dan Residu Asam Amino yang Terlibat	55
Tabel VI.9 Senyawa Uji Yang Terpilih dan Akan Dilanjutkan ke Proses Dinamika Molekul	57
Tabel VI.10 Residu Asam Amino yang Mengalami Fluktuasi dan Fleksibilitas Rendah Pada Hasil RMSF	72
Tabel VI.11 Prediksi Toksisitas Terhadap Sistem Reproduksi (<i>Repro_Tox</i>)	75
Tabel VI.12 Prediksi Sensitifitas Kulit dan Pernapasan (<i>Sens_Skin</i> Dan <i>Sens_Resp</i>)	76
Tabel VI.13 Prediksi Dosis Maksimum Teraupetik yang Direkomendasikan (MRTD)	78
Tabel VI.14 Prediksi Toksisitas Endokrin	79
Tabel VI.15 Prediksi Karsinogenisitas dengan Model Hewan Uji ..	81
Tabel VI.16 Prediksi Mutagenisitas dengan AMES Test	82
Tabel VI.17 Prediksi Toksisitas Terhadap Jantung	85

Tabel VI.18 Prediksi Efek Samping Terhadap Hati Manusia	86
Tabel VI.19 Resiko Toksisitas dan Kode Toksisitas	87

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar II.1 Penampang anatomi kulit	6
Gambar II.2 <i>Superficial spreading melanoma</i>	11
Gambar II.3 <i>Nodular melanoma</i>	12
Gambar II.4 <i>Lentigo melanoma maligna</i>	13
Gambar II.5. <i>Acral lentigo melanoma</i>	13
Gambar II.6. Sublingual melanoma.....	14
Gambar II.7. Proses angiogenesis MIF.....	18
Gambar II.8. Struktur umum flavonoid	19
Gambar II.9. Jenis-jenis flavonoid.....	20
Gambar II.10. Struktur umum flavonol	22
Gambar IV.11 Struktur reseptor MIF dari kristalografi sinar-X sebelum dipisahkan dari air dan ligan	35
Gambar IV.12 Struktur reseptor MIF dari kristalografi sinar-X setelah dipisahkan dari air dan ligan.....	35
Gambar IV.13 Struktur ligan alami 1Q1 (ISO 66)	35
Gambar.VI.14. Hasil visualisasi tumpang tindih ligan alami ISO 66 dari struktur kristal sinar-X (hijau) dengan ligan hasil re-docking (ungu) dan interaksinya dengan reseptor MIF	50
Gambar.VI.15 Hasil RMSD senyawa fisetin selama waktu simulasi 10000 pikodetik	59
Gambar VI.16 Hasil RMSD senyawa galangin selama waktu simulasi 10000 pikodetik	60
Gambar VI.17 Hasil RMSD senyawa herbasetin selama waktu simulasi 10000 pikodetik	61
Gambar VI.18 Hasil RMSD senyawa kaempferida selama waktu simulasi 10000 pikodetik	62

Gambar VI.19 Hasil RMSD senyawa kaempferol selama waktu simulasi 10000 pikodetik	63
Gambar VI.20 Hasil RMSD senyawa ramnetin selama waktu simulasi 10000 pikodetik	64
Gambar VI.21 Hasil RMSD senyawa robinetin selama waktu simulasi 10000 pikodetik	65
Gambar VI.22 Hasil RMSF senyawa fisetin	67
Gambar VI.23 Hasil RMSF senyawa galangin	68
Gambar VI.24 Hasil RMSF senyawa herbasetin	68
Gambar VI. 25 Hasil RMSF senyawa kaempferida	69
Gambar VI.26 Hasil RMSF senyawa kaempferol	70
Gambar VI. 27 Hasil RMSF senyawa ramnetin	70
Gambar VI.28 Hasil RMSF senyawa robinetin	71

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Interaksi Senyawa Uji Turunan Flavonol	101
Lampiran 2 Residu yang Ada di Sisi Pengikatan yang Jaraknya Kurang Dari 4 Å Pada Tujuh Senyawa Uji Turunan Flavonol Terbaik Ketika Simulasi Dinamika Molekul	103
Lampiran 3 Visualisasi VMD Senyawa Terbaik Robinetin Hasil Simulasi Dinamika Molekul	121

Bab I Pendahuluan

I.1 Latar Belakang

Kanker merupakan penyakit dengan prevalensi cukup tinggi di dunia dan penyebab utama kematian, sebanyak 8,2 juta jiwa meninggal akibat kanker (WHO, 2014). Berdasarkan data profil mortalitas kanker (*Cancer Mortality Profile*) yang dirilis oleh (WHO, 2014) menyebutkan, angka kematian yang disebabkan oleh kanker di Indonesia mencapai 195.300 jiwa dengan prevalensi kematian terbanyak pada laki-laki sebanyak 103.100 jiwa dan perempuan mencapai 92.200 jiwa. Sel kanker dapat menyebar ke jaringan sekitar dan dapat berkoloni atau memperbanyak diri. Seiring dengan semakin meningkatnya jumlah penderita kanker dari tahun ke tahun, pengobatan kanker semakin berkembang.

Kanker kulit memiliki tiga tipe utama yaitu karsinoma sel basal, karsinoma sel skuamosa dan melanoma maligna. Walaupun jumlah insiden melanoma maligna lebih kecil dibanding karsinoma sel basal dan karsinoma sel skuamosa, angka kematian yang disebabkan cenderung lebih besar yaitu menyebabkan 75% kematian akibat kanker kulit. Melanoma merupakan keadaan terjadi keganasan pada melanosit, yaitu sel yang menghasilkan pigmen untuk perlindungan terhadap efek berbahaya sinar matahari. Keganasan terjadi akibat mutasi pada gen pengontrol proliferasi, diferensiasi, dan apoptosis sel tersebut. Kemudian terjadi angiogenesis akibat keadaan hipoksik dari sel yang telah mengalami keganasan dan akhirnya kanker dapat bermetastasis jauh (Marija, 2008).

Di Indonesia, angka kejadian kanker kulit tidak setinggi di negara-negara lain, menurut penelitian retrospektif di Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo (RSCM) Jakarta pada tahun 2000-2009 terdapat 261 kasus karsinoma sel basal, diikuti dengan 69 karsinoma sel skuamosa, dan 22 melanoma. Sedangkan penelitian di rumah sakit Dr. M. Djamil Padang, selama periode Januari 2012 - September 2014 terdapat karsinoma sel basal (76,9%) kemudian diikuti dengan karsinoma sel skuamosa (15,4%) pada urutan kedua lalu melanoma maligna (7,7%) (Satya, 2014).

Cara pengobatan kanker kulit yang berlaku selama ini (dengan pembedahan, radioterapi, dan kemoterapi) relatif mahal dan seringkali terdapat efek toksis yang bisa merusak fungsi dari beberapa organ vital manusia. Hal ini menjadi sebab dilakukan penelitian terhadap senyawa bahan alam sebagai alternatif terapi kanker.

Di alam banyak tumbuhan yang berkhasiat sebagai antioksidan untuk pengobatan kanker, salah satunya adalah senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid dikenal juga sebagai senyawa polifenolik. Senyawa ini banyak terkandung dalam sayur-sayuran dan buah-buahan. Efek antioksidan dari senyawa flavonoid diyakini mempunyai khasiat sebagai obat antikanker, obat sakit jantung koroner, dan sebagai obat untuk penyakit neurogeneratif (Michels, 2004). Flavonoid berperan dalam peningkatan proliferasi dan aktivasi sel timus (sel T) serta peningkatan interleukin-2 (IL-2) (Abbas, 2005).

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) merupakan target yang telah terlibat dalam sel kanker melanoma karena dapat

menyebabkan peradangan, proliferasi sel, menghambat apoptosis, mengatur migrasi dan aktivasi keadaan sel kekebalan, menyebabkan invasi/migrasi tumor, metastasis dan angiogenesis (Ioanou *et.al*, 2014).

Penelitian secara *in vivo* dan *in vitro* menunjukkan bahwa flavonoid jenis flavonol dapat menjadi imunostimulan dalam pengobatan melanoma, yang dapat memacu peningkatan IL-2 yang mampu menginduksi mitosis pada sel-sel timus sehingga meningkatkan transkripsi interferon- γ (IFN- γ) dan *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) (Parlinaningrum, 2014).

Penelitian secara *in vitro* pada senyawa kuersetin yang merupakan bagian dari senyawa golongan flavonol menunjukkan bahwa pada kultur sel melanoma manusia, kuersetin diketahui memiliki aktivitas penghambatan pertumbuhan sel yang ditunjukkan oleh nilai IC₅₀ yaitu 7 nM, (Piantelli, 1995).

Oleh sebab itu, perlu dilakukan penelitian terhadap senyawa golongan flavonol untuk mengkonfirmasi, mengevaluasi dan mempelajari mekanisme kerjanya sebagai antimelanoma melalui inhibisi MIF serta prediksi toksisitas dari senyawa turunan flavonol. Sehingga akan diketahui senyawa golongan flavonol yang menjadi pilihan dalam pengobatan melanoma dengan resiko efek samping yang minimum melalui penelitian secara *in silico*.

I.2 Identifikasi Masalah

- (1) Bagaimana interaksi dan afinitas struktur senyawa golongan flavonol dengan reseptor melalui inhibisi MIF untuk pengobatan melanoma ?
- (2) Apa ligan uji terbaik diantara senyawa golongan flavonol terhadap reseptor MIF yang berpotensi untuk dijadikan kandidat agen terapeutik melanoma ?
- (3) Bagaimana toksisitas dan keamanan senyawa golongan flavonol ?

I.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk:

- (1) Mengkaji interaksi dan afinitas struktur dari senyawa golongan flavonol terhadap reseptor MIF untuk pengobatan melanoma melalui simulasi *docking*.
- (2) Memprediksi kestabilan interaksi antara senyawa golongan flavonol (ligan) dengan reseptor MIF melalui simulasi dinamika molekul.
- (3) Memprediksi toksisitas dan keamanan senyawa golongan flavonol didalam tubuh.

I.4 Manfaat Penelitian

Memberikan informasi terapi baru yang potensial terhadap melanoma dengan mengetahui interaksi yang dapat ditimbulkan diantara senyawa golongan flavonol dengan aktifitasnya sebagai antimelanoma melalui inhibisi reseptor MIF, serta dapat memprediksikan toksisitas dari senyawa golongan flavonol.

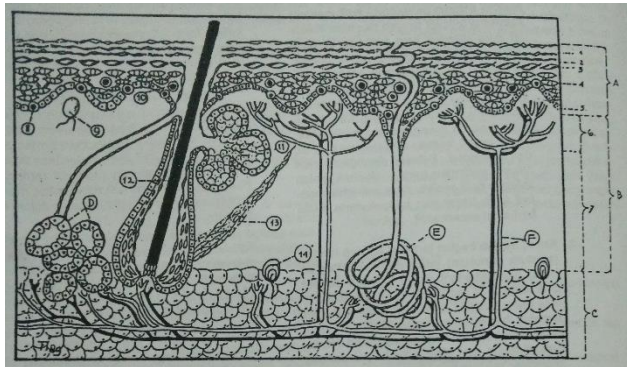
I.5 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan dari bulan Maret - Juni 2017 di Laboratorium Kimia Komputasi Sekolah Tinggi Farmasi Bandung, Jl. Soekarno Hatta No. 754 Cibiru Bandung.

Bab II Tinjauan Pustaka

II.1 Kulit

Kulit merupakan organ tubuh paling luar yang melindungi tubuh manusia dari lingkungan hidup sekitar. Seperti organ tubuh lain pada umumnya, kulit juga tersusun dari jutaan sel. Normalnya, sel-sel di dalam tubuh akan membelah lebih cepat pada masa pertumbuhan, sedangkan pada masa dewasa sel akan lebih banyak membelah untuk menggantikan sel-sel yang mati atau untuk memperbaiki kerusakan jaringan. Penampang dari anatomi kulit dapat dilihat pada gambar II.1 berikut ini:



Gambar II.1: Penampang anatomi kulit (Djuanda, 2005)

Pembagian kulit secara garis besar tersusun atas tiga lapisan utama yaitu :

(1) Lapisan epidermis atau kutikel

Tiga jenis utama dari sel di lapisan atas kulit (disebut epidermis) adalah:

(a) Sel skuamosa: Ini adalah sel datar di bagian luar epidermis yang terus menumpahkan sebagai bentuk yang baru

(b) Sel basal: Sel-sel ini di bagian bawah epidermis, yang disebut lapisan sel basal. Sel-sel ini terus membelah untuk membentuk sel-sel baru untuk menggantikan sel-sel skuamosa yang mengelupas dari permukaan kulit. Seperti sel-sel ini bergerak di epidermis, mereka mendapatkan tempat, akhirnya menjadi sel skuamosa.

(c) Melanosit: Ini adalah sel-sel yang dapat menjadi melanoma. Mereka membuat pigmen coklat yang disebut melanin, yang memberikan kulit warna coklat. Melanin melindungi lapisan lebih dalam dari kulit dari beberapa efek berbahaya dari matahari. Bagi kebanyakan orang, saat kulit terkena sinar matahari, melanosit membuat lebih dari pigmen, menyebabkan kulit menjadi berwarna gelap (America Cancer Society, 2016).

(2) Lapisan dermis (korium, kutis vera)

Lapisan dermis adalah lapisan di bawah epidermis yang jauh lebih tebal daripada epidermis. Lapisan ini terdiri atas lapisan elastik dan fibrosa padat dengan elemen-elemen selular dan folikel rambut. Secara garis besar dibagi menjadi dua bagian yakni: pars papilare yaitu bagian yang menonjol ke epidermis, berisi ujung serabut saraf dan pembuluh darah, dan pars retikulare bagian di bawahnya yang menonjol ke arah subkutan, bagian ini terdiri atas serabut-serabut penunjang misalnya serabut kolagen, elastik, dan retikulin (Djuanda, 2005).

(3) Lapisan subkutis

Lapisan subkutis adalah kelanjutan dermis, terdiri atas jaringan ikat longgar berisi sel-sel lemak di dalamnya (Hendaria, 2013).

II.2 Kanker Kulit

Kanker kulit adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh berubahnya sifat-sifat penyusun sel kulit yang normal menjadi ganas, sel-sel akan terus membelah menjadi bentuk yang abnormal secara tidak terkontrol akibat kerusakan DNA. Kanker kulit dapat diklasifikasikan dalam tiga tipe terbanyak yaitu karsinoma sel basal, karsinoma sel skuamosa, dan melanoma maligna.

(1) Karsinoma sel basal (Basaloma) adalah tipe kanker kulit terbanyak, bersifat lokal invasif, jarang bermetastasis namun tetap memiliki peluang untuk menjadi maligna karena dapat merusak dan menghancurkan jaringan sekitar. Karsinoma sel basal muncul akibat radiasi sinar ultraviolet, biasanya di bagian wajah. Karsinoma sel basal jarang menyebabkan kematian serta mudah diterapi dengan pembedahan maupun radiasi.

(2) Karsinoma sel skuamosa adalah tipe kedua terbanyak setelah karsinoma sel basal, berasal dari sel skuamosa pada lapisan epidermis kulit. Karsinoma sel skuamosa lebih sering bermetastasis dari karsinoma sel basal, namun angka metastasisnya tidak terlalu tinggi kecuali pada telinga, bibir, dan pasien immunosupresi.

(3) Melanoma maligna adalah tumor yang berasal dari melanosit, merupakan salah satu tumor yang paling ganas pada tubuh dengan resiko metastasis yang tinggi. Melanoma maligna dapat dibagi menjadi empat yaitu : *superficial spreading melanoma* (SSM), *nodular melanoma* (NM), *lentigo malignant melanoma*, dan *acral lentiginous melanoma* (ALM) (Hendaria, 2013).

Secara umum, kanker kulit memiliki banyak resiko yang potensial, antara lain :

- (1) Terpapar oleh radiasi sinar ultraviolet secara berlebihan (baik Ultraviolet A maupun Ultraviolet B).
- (2) Luka yang lama tidak sembuh (*chronic non-healing wounds*), khususnya luka bakar, diantaranya adalah Marjolin's Ulcer yang bisa berkembang menjadi karsinoma sel skuamosa.
- (3) Predisposisi genetik termasuk tahi lalat berukuran lebih besar dari 20 mm beresiko tinggi berkembang menjadi kanker (Hendaria, 2013).

Kanker kulit merupakan salah satu jenis kanker yang serius. Meskipun kasus kanker kulit seperti melanoma maligna tidak lazim di Indonesia, kanker ini tumbuh lebih cepat dari jenis kanker lainnya. Diagnosis dini kanker adalah penting karena kemungkinan untuk disembuhkan pada tahap awal sangat tinggi.

Metode standar untuk memastikan jenis kanker kulit adalah dengan melakukan tes klinis dan histopatologi dengan mengambil sampel dari kulit yang dicurigai sebagai jaringan kanker yang harus belajar di bawah mikroskop. Teknik lain adalah untuk menganalisis citra kanker kulit dengan menggunakan makroskopik dan dermatoscopic. Studi terbaru menunjukkan diagnosa dengan menggunakan teknik dermatoscopic memiliki tingkat akurasi 75% - 97%, sedangkan penggunaan mendiagnosa dengan menggunakan makroskopik memiliki tingkat akurasi 65% - 80% (Hendaria, 2013).

II.3 Melanoma

II.3.1 Definisi Melanoma

Melanoma merupakan keganasan kulit yang berasal dari sel-sel melanosit; sel-sel tersebut masih mampu membentuk melanin, sehingga pada umumnya melanoma berwarna coklat atau kehitaman. Beberapa melanoma yang sel-selnya tidak dapat membentuk melanin lagi tampak berwarna merah muda, atau bahkan putih (Tan dkk, 2015).

Melanoma bisa ditemukan di bagian mana saja di tubuh, paling sering di dada dan punggung pada pria, di tungkai bawah pada wanita. Lokasi lain yang sering adalah di wajah dan leher. Melanoma juga dapat ditemukan di mata, mulut, daerah genital, dan daerah anus, walaupun jarang. Kulit lebih gelap menurunkan risiko terkena melanoma, melanoma 20 kali lebih sering ditemukan pada kulit putih dibandingkan kulit gelap (Tan dkk, 2015).

Melanoma lebih jarang jika dibandingkan dengan karsinoma sel basal ataupun karsinoma sel skuamosa, tetapi lebih berbahaya karena lebih sering menyebabkan kematian (sekitar 75% dari semua kasus kanker kulit). Seperti halnya karsinoma sel basal dan karsinoma sel skuamosa, hasil terapi melanoma paling baik bila masih di stadium awal. Risiko metastasis melanoma lebih besar dibandingkan karsinoma sel basal dan karsinoma sel skuamosa. Risiko terkena melanoma meningkat sesuai dengan pertambahan usia, pada pria biasanya ditemukan di atas 40 tahun, sedangkan pada wanita di bawah 40 tahun (Tan dkk, 2015).

II.3.2 Klasifikasi Melanoma

Melanoma dapat diklasifikasikan menjadi 4 subtipe, yaitu:

(1) *Superficial spreading melanoma (SSM)*

SSM merupakan subtipe melanoma yang paling sering (70% kasus melanoma maligna), terutama pada orang kulit putih. Sering ditemukan pada usia di atas 40 tahun, lebih sering pada wanita dengan bagian di tungkai bawah. Pada pria biasanya SSM ditemukan di daerah punggung atas. SSM awalnya ditandai dengan perkembangan lambat (*radial growth phase*) sebelum menginvasi dermis (*vertical growth phase*). Lesi SSM biasanya dimulai dari bentuk papul dan selanjutnya bentuk nodus dan ulkus. Warna lesi SSM bervariasi tidak hanya coklat dan hitam, tetapi juga merah muda, biru, dan abu-abu. Lesi SSM bersifat asimetris dan batas tidak tegas. Pada umumnya SSM timbul pada kulit normal (*de novo*) dan asimtomatik.



Gambar II.2: Superficial spreading melanoma (Tan dkk, 2015)

(2) *Nodular melanoma (NM)*

NM merupakan jenis melanoma kedua terbanyak (15-30%) pada orang kulit putih. Lesi ini lebih agresif dibanding SSM. Predileksi di punggung atas untuk laki-laki, dan di tungkai bawah untuk wanita. Biasanya NM ditemukan pada usia pertengahan. Lesi NM dapat

berupa nodul, polipoid, atau pedunculated. Lesi berwarna biru atau hitam, dapat merah muda atau kemerahan. Pertumbuhan NM agresif mulai dalam beberapa minggu hingga bulan, dapat mengalami ulserasi dan mudah berdarah hanya karena trauma ringan. Lesi awal biasanya asimetris, batas tidak tegas dengan ukuran > 6 mm.



Gambar II.3: Nodular melanoma (Tan dkk, 2015)

(3) *Lentigo maligna melanoma* (LMM)

LMM merupakan subtype melanoma yang jarang, hanya sekitar 10-15% dari semua kasus melanoma. Ciri khas muncul pada daerah peparan kronis terhadap matahari terutama wajah, biasanya pada usia 70-80 tahun. LMM selalu dimulai dari bentuk *Lentigo Maligna in situ*. *Lentigo Maligna in situ* adalah tumor jinak intraepidermal yang pertumbuhannya lambat dalam 5-15 tahun, sebelum berubah menjadi bentuk invasif, yaitu LMM. *Lentigo Maligna in situ* diawali dengan makula pigmentasi yang meluas bertahap hingga diameternya mencapai beberapa sentimeter, tepi tidak teratur, dan tidak mengalami indurasi. Hanya 3-5% *Lentigo Maligna in situ* yang akan menjadi LMM. Makin besar ukuran lesi *Lentigo Maligna in situ*, risiko menjadi LMM juga makin besar.



Gambar II.4: Lentigo melanoma maligna (Tan dkk, 2015)

(4) *Acral lentiginous melanoma (ALM)*

ALM merupakan sub tipe melanoma yang jarang ditemukan pada orang kulit putih (sekitar 2-8%), sering ditemukan pada orang kulit hitam (60-72%) dan orang Asia (29-46%). Predileksi usia >65 tahun, di mana lebih sering pada laki-laki. ALM biasanya timbul di daerah tidak berambut, yaitu telapak kaki, telapak tangan, dan daerah subungual. Karena perkembangan ALM lambat, biasanya ditemukan jika sudah invasif. Awalnya ALM berupa lesi pigmentasi dengan tepi tidak beraturan dan tidak tegas, kemudian akan mengalami *vertical growth phase* yang ditandai dengan nodus yang berkembang menjadi ulkus (Gambar II.5). Apabila ALM terletak di matriks kuku, akan tampak garis pigmentasi memanjang pada kuku dan pigmen dapat meluas di atas *nail fold* (Gambar II.6) (Tan dkk, 2015).



Gambar II.5: Acral lentigo melanoma (Tan dkk, 2015)



Gambar II.6: Subungual melanoma (Tan dkk, 2015)

II.3.3 Patofisiologi Melanoma

Melanoma bisa berawal sebagai pertumbuhan kulit baru yang kecil dan berpigmen pada kulit yang normal dan paling sering tumbuh pada kulit yang terpapar sinar matahari, tetapi hampir separuh kasus tumbuh dari tahi lalat yang berpigmen. Melanoma mudah menyebar kebagian tubuh yang jauh (metastase), dimana akan terus tumbuh dan menghancurkan jaringan. Semakin sedikit pertumbuhan melanoma ke dalam kulit, maka semakin besar peluang untuk menyembuhkannya, jika melanoma telah tumbuh jauh ke dalam kulit akan lebih mungkin menyebar melalui pembuluh getah bening dan pembuluh darah dan bisa menyebabkan kematian dalam beberapa bulan atau tahun.

Perjalanan penyakit melanoma bervariasi dan tampaknya dipengaruhi oleh kekuatan pertahanan sistem kekebalan tubuh. Beberapa penderita yang keadaan kesehatannya baik bisa bertahan hidup selama bertahun-tahun meskipun melanomanya telah menyebar.

Melanoma memiliki dua fase pertumbuhan yaitu fase radial dan fase vertikal. Pertumbuhan fase radial menunjukkan kecenderungan awal dari suatu melanoma untuk tumbuh horizontal di dalam epidermis dan

lapisan dermis yang dangkal, seringkali ini terjadi untuk waktu yang lama. Selama fase pertumbuhan ini, sel-sel melanoma tidak memiliki kemampuan untuk bermetastasis, dan tidak ada bukti angiogenesis. Seiring berjalannya waktu, sebagian besar melanoma berlanjut ke fase pertumbuhan vertikal, di mana sel-sel ganas menyerang dermis yang lebih dalam dan mengembangkan kemampuan untuk bermetastasis.

Morfologi sel melanoma biasanya jauh lebih besar dari sel-sel nevus. Mereka berisi banyak inti dengan kontur tak beraturan, memiliki kromatin yang berkelompok. Di pinggiran membran nukleus dan nukleolus eosinofilik sering digambarkan sebagai "*cherry red*". Sel-sel ganas tumbuh dengan bentuk seperti sarang yang buruk atau sel-sel individual di semua tingkat epidermis dan dermal expansile, nodul seperti balon, ini merupakan fase pertumbuhan radial dan vertikal.

Melanoma dapat berkembang dari lesi yang jinak dan juga bisa dari pigmentasi nevus. Beberapa peneliti menyatakan bahwa sel-sel melanoma dibentuk dari sel-sel epidermal. Sel melanosit yang normal berada di lapisan basal kulit dan mukosa, proses keganasan mengubahnya sehingga dapat muncul pada nevus yang sudah ada, lesi-lesi melanosit.

Adanya rasa sakit biasanya merupakan perwujudan dari peningkatan stadium melanoma. Pada stadium awal jarang disertai rasa sakit, sehingga biasanya pasien baru datang ke dokter disaat stadium lanjut, dimana sudah terdapat metastase pada nodus limfa regional sehingga terjadi perdarahan (Bulcan, 2000).

II.3.4 Faktot Risiko Melanoma

Faktor risiko terpapar sinar matahari berlebihan dapat dihindari, sedangkan genetik, usia, atau jenis kelamin merupakan faktor risiko yang tidak dapat dihindari. Beberapa faktor risiko yang memudahkan seseorang terkena melanoma, di antaranya:

(1) Paparan sinar ultraviolet (UV)

Merupakan faktor risiko utama pada banyak kasus melanoma. Sinar UV bisa berasal dari matahari atau tanning beds. Sinar matahari merupakan sumber utama penghasil sinar UV, sehingga orang yang mendapatkan banyak paparan sinar matahari mempunyai risiko lebih besar menderita kanker kulit. Ada 3 jenis utama sinar UV, yaitu:

(a) Sinar UVA: Sinar ini dapat merusak DNA (DeoxyriboNucleic Acid) sel kulit bila terpapar terus-menerus dalam jangka lama dan berperan menimbulkan beberapa jenis kanker kulit

(b) Sinar UVB: Sinar UVB dapat secara langsung merusak DNA sel kulit; sumber utama sinar UVB adalah matahari yang menjadi penyebab terbanyak kanker kulit

(c) Sinar UVC: Sinar ini tidak dapat melewati atmosfer bumi, oleh karena itu tidak terkandung dalam pancaran sinar matahari. Sinar ini normalnya tidak menyebabkan kanker kulit

(2) *Melacynotic nevi* atau biasa disebut tahi lalat adalah salah satu tumor berpigmen yang sifatnya jinak. Biasanya baru mulai terlihat saat anak-anak dan remaja. *Melacynotic nevi* ini sebenarnya bukan masalah, tetapi jika jumlahnya banyak dan bentuknya irreguler atau ukurannya besar, kemungkinan menjadi melanoma lebih besar

(3) Kulit putih, rambut berwarna kuning atau merah

(4) Riwayat keluarga menderita melanoma

(5) Pernah menderita melanoma sebelumnya

- (6) Imunosupresi: Sistem imun dalam keadaan lemah atau sedang mendapat terapi obat yang menekan sistem imun
- (7) Jenis kelamin, sebelum usia 40 tahun melanoma banyak ditemukan pada wanita dan setelah usia 40 tahun melanoma banyak ditemukan pada pria
- (8) Genetik (mutasi gen CDKN2a) (Tan dkk, 2015).

Sinar UV dapat merusak DNA sel-sel kulit, terkadang merusak gen yang mengontrol pertumbuhan dan pembelahan sel, mengakibatkan terbentuknya sel-sel ganas. Para peneliti menemukan bahwa DNA rusak pada gen-gen penderita melanoma. Kerusakan DNA akibat sinar UV ini tidak diturunkan, namun karena sinar matahari itu sendiri (Tan dkk, 2015).

II.3.5 Tanda dan Gejala Melanoma

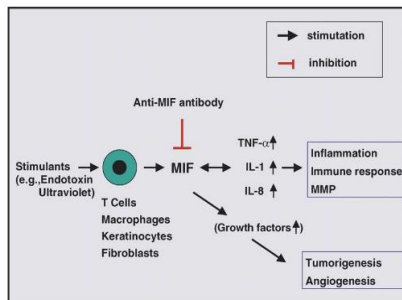
Gejala-gejala awal melanoma adalah perubahan bentuk atau warna tahi lalat yang ada. Pada tahap selanjutnya, tahi lalat mungkin gatal, memborok atau berdarah. Tanda-tanda awal dari melanoma meliputi :

- (1) Ketidakteraturan bentuk tahi lalat
- (2) Tepi kabur atau compang-camping
- (3) Perubahan dalam pigmentasi tahi lalat
- (4) Peningkatan ukuran dan bentuk tahi lalat
- (5) Gatal atau nyeri pada tahi lalat

Gejala kemudian meliputi: rasa sakit di mol, pembengkakan kelenjar getah bening, penurunan berat badan, batuk kronis, kulit abu-abu, kejang (Soumya, 2011).

II.4 Reseptor MIF

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) adalah sitokin proinflamasi yang telah terlibat dalam patogenesis penyakit inflamasi. MIF bertindak sebagai mediator inflamasi untuk merangsang ekspresi sitokin seperti TNF- α , IL-1, IL-6. MIF juga diperlukan untuk perkembangan embrio. Bukti baru yang berkembang telah menyoroiti peranan penting untuk Sitokin Proinflamasi ini di kanker, protein ini dinyatakan oleh berbagai kanker termasuk prostat, usus, hati dan paru-paru, dan sejumlah protumor. MIF menyebabkan pencegahan apoptosis p53 sehingga memfasilitasi transformasi ganas. Lebih lanjut lagi, protein ini memainkan peran kunci dalam proliferasi sel dan angiogenesis yang diperlukan untuk mempertahankan pertumbuhan tumor (Gambar II.7) (Shimizu, 2005).



Gambar II.7: Proses angiogenesis MIF (Shimizu, 2005)

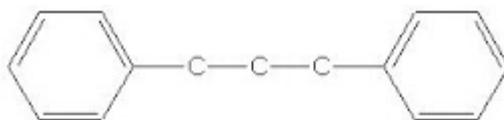
Menurut penelitian secara *in vitro* dan *in vivo*, MIF sekarang dilaporkan bahwa dalam pengaturan penyakit ganas, MIF merupakan mediator penting dari aktivasi alternatif makrofag. MIF-antagonisme mengurangi perkembangan tumor melanoma dan metastasis kolonisasi melanoma paru dengan cara penurunan anti-peradangan

dan, makrofag perifer, dan stroma tumor. Untuk itu diperlukan immunotherapeutic dengan menargetkan MIF pada pasien melanoma (Lasnik *et.al*, 2013).

II.5 Senyawa Uji

II.5.1 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman hijau, kecuali alga. Flavonoid tersusun dari dua cincin aromatis yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga dengan susunan C6-C3-C6, tiap bagian C6 merupakan cincin benzen yang terdistribusi dan dihubungkan oleh atom C3 yang merupakan rantai alifatik, seperti ditunjukkan pada Gambar II.8 (Markham, 1988):



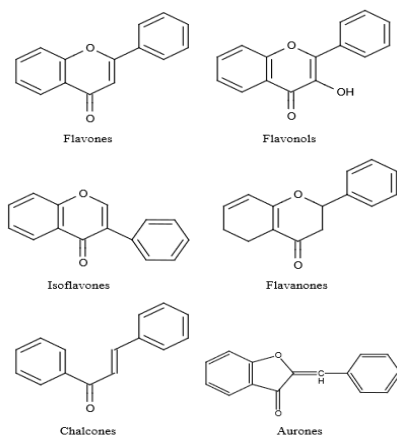
Gambar II.8: Struktur umum flavonoid (Markham, 1988)

Dalam tumbuhan flavonoid terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid yang mungkin terdapat dalam satu tumbuhan dalam bentuk kombinasi glikosida (Harbone, 1987). Aglikon flavonoid (yaitu flavonoid tanpa gula terikat) terdapat dalam berbagai bentuk struktur (Markham, 1988).

Golongan flavonoid dapat digambarkan sebagai deretan senyawa C6-C3-C6, artinya kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus C6 (cincin benzena) disambungkan oleh rantai alifatik tiga karbon. Kelas-kelas yang berlainan dalam golongan flavonoid dibedakan berdasarkan

cincin heterosiklik-oksigen tambahan dan gugus hidroksil yang tersebar menurut pola yang berlainan (Robinson, 1995).

Penggolongan flavonoid berdasarkan penambahan rantai oksigen dan perbedaan distribusi dari gugus hidroksil ditunjukkan pada gambar berikut.



Gambar II.9: Jenis-jenis flavonoid (Markham, 1988)

Flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang baik, menghambat banyak reaksi oksidasi, baik secara enzim maupun non enzim. Flavonoid bertindak sebagai penampung yang baik radikal hidroksi dan superoksida dengan demikian melindungi lipid membran terhadap reaksi yang merusak. Aktivitas antioksidannya dapat menjelaskan mengapa flavonoid tertentu merupakan komponen aktif tumbuhan yang digunakan secara tradisional untuk mengobati gangguan fungsi hati (Robinson, 1995).

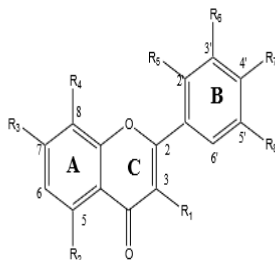
Flavonoid merupakan golongan terbesar senyawa fenol alam (Harbone, 1987). Flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil yang tak tersulih atau suatu gula, sehingga akan larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, dimetilsulfoksida, dimetilformamida, dan air. Adanya gula yang terikat pada flavonoid cenderung menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air dan dengan demikian campuran pelarut di atas dengan air merupakan pelarut yang lebih baik untuk glikosida. Sebaliknya, aglikon yang kurang polar seperti isoflavon, flavanon, dan flavon serta flavonol yang termetoksilasi cenderung lebih mudah larut dalam pelarut seperti eter dan kloroform (Markham, 1988). Analisa flavonoid lebih baik dengan memeriksa aglikon yang terdapat dalam ekstrak tumbuhan yang telah dihidrolisis sebelum memperhatikan kerumitan glikosida yang ada dalam ekstrak asal (Harbone, 1987).

Dalam tubuh manusia flavonoid berfungsi sebagai antioksidan sehingga sangat baik untuk pencegahan kanker. Golongan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan meliputi flavon, flavonol, isoflavon dan flavanon (Trilaksani, 2003).

II.5.2 Flavonol

Flavonol merupakan jenis flavonoid yang paling banyak ditemukan di sayur-sayuran. Di tanaman, kelompok senyawa ini biasanya berada dalam bentuk O-glikosida. Flavonol memiliki gugus hidroksi pada C3. Flavonol banyak terdapat pada bagian daun dan bagian luar dari tanaman, hanya sedikit sekali yang ditemukan pada bagian tanaman yang berada di bawah permukaan tanah. Flavonol terdiri atas

galangin, fisetin, kemferol, kemferida, robinetin, herbasetin, kuersetin, ramnetin, isoramnetin, mirisetin, kuersetagetin, gosipetin (Markham, 1988).



Gambar II.10: Penomoran struktur flavonol (Markham, 1988)

Flavonol merupakan salah satu senyawa golongan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan. Penelitian secara *in vivo* dan *in vitro* menunjukkan bahwa flavonoid jenis flavonol dapat menjadi imunostimulan dalam pengobatan melanoma, yang dapat memacu peningkatan IL-2 yang mampu menginduksi mitosis pada sel-sel timus sehingga meningkatkan transkripsi IFN- γ dan *transforming growth factor- β* (TGF- β) (Parlinaningrum, 2014).

Salah satu senyawa golongan flavonol yang telah banyak diteliti ialah kuersetin. Salah satunya penelitian yang dilakukan menggunakan benalu sebagai antikanker. Kuersetin merupakan kandungan utama dari benalu, kuersetin sebagai antioksidan, berdasarkan penelitian data aktivitas antioksidan senyawa golongan flavonol, kuersetin memiliki IC₅₀ sebesar 10,89 nM melalui penelitian analisis kuantitatif struktur aktivitas (HKSA) (Ray, 2012).

Kuersetin dapat mencegah terjadinya oksidasi pada fase inisiasi maupun propagasi. Pada tahap inisiasi kuersetin mampu menstabilkan radikal bebas yang dibentuk oleh senyawa karsinogen seperti radikal oksigen, peroksida dan superoksida, sedangkan pada tahap propagasi kuersetin mencegah autooksidasi, yaitu mencegah pembentukan radikal peroksida melalui pengikatan senyawa radikal secara cepat agar tidak berikatan dengan oksigen. Kuersetin juga berperan dalam menekan ekspresi mutan protein p53. Pada kondisi *wild type*, protein ini merupakan protein yang penting dalam kontrol siklus sel, yaitu dengan memacu sel untuk berhenti (*arrested*) atau apoptosis. Namun apabila terjadi mutasi maka protein ini menjadi sebuah penanda abnormalitas yaitu siklus memacu sel ke fase G2-M (penggandaan sel) dan apabila sel terus menerus pada fase ini maka akan terjadi proliferasi (pembelahan tak terkendali). Kuersetin dalam konsentrasi serum 248 μM dapat menekan ekspresi dari mutan protein p53 yang dibentuk oleh sel kanker payudara sampai tidak terdeteksi pada sel tersebut (Lamson *et.al*, 2000). Pada kultur sel melanoma manusia, Quersetin diketahui memiliki aktivitas penghambatan pertumbuhan sel yang ditunjukkan oleh nilai IC50 yaitu 7 nM (Piantelli,1995).

II.6 Protein Data Bank (PDB)

PDB dibentuk pada awal tahun 1970 untuk menyediakan gudang struktur tiga dimensi (3D) dari makromolekul biologi, terutama protein (sekitar 92% dari database), asam nukleat, atau kompleks antara protein dan asam nukleat. Database versi terbaru memiliki 9891 koresponden entri hingga 3039 protein yang berbeda (berdasarkan

nama protein sc-PDB) dan 5505 ligan yang berbeda (berdasarkan canonical SMILES strings) (Hoffmann *et.al*, 2014).

Model struktur protein yang dibuat dengan eksperimen kristalografi sinar X atau NMR disimpan dalam bentuk file data koordinat. Saat ini, model komputasi sudah tidak diterima lagi oleh. Lebih dari 87% entri data ditentukan dengan difraksi sinar X. Sekitar 12% struktur telah dikomputasi dengan pengukuran NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Beberapa ratus struktur dibangun dengan data mikroskop elektron (Hoffmann *et.al*, 2014).

II.7 Optimasi Geometri

Optimasi geometri bertujuan untuk menghitung energi minimum dari suatu molekul, hingga molekul tersebut mencapai konformasi paling stabil secara geometri dan konfigurasi struktur senyawa untuk berikatan dengan molekul lain (Levita, 2012). Proses optimasi harus dilakukan karena setiap bentuk geometri molekul mempunyai energi potensial sehingga perlu dilakukan optimasi geometri. Tujuan optimasi geometri adalah untuk menghitung energi struktur terendah, memperoleh struktur dengan gaya-gaya atomik dan konformasi struktur molekul tertentu sedemikian rupa sehingga mendekati struktur yang sebenarnya atau menggambarkan keadaan yang paling stabil terdapat di alam dengan energi minimal (Tahir dkk, 2004).

II.8 Density Functional Theory (DFT)

DFT merupakan metode yang umum digunakan dalam optimasi geometri khususnya untuk molekul yang relatif besar dan logan transisi. DFT merupakan suatu teori yang menggantikan fungsi

gelombang elektron dari banyak partikel dengan kerapatan elektron sebagai besaran dasarnya.

Metode DFT memerlukan suatu fungsi atau fungsional yang merupakan pendekatan dari beberapa teori dalam perhitungan komputasi. Beberapa fungsi yang sering digunakan dalam penelitian adalah B3LYP, B3PW91, BLYP, HFS, VWN, G96, P86, B96 dan B3P86. B3LYP dan B3PW91 disebut juga sebagai fungsi *Hybrid* karena merupakan hasil kombinasi perkiraan Hartree-Fock dengan pertukaran energi dan perkiraan DFT dengan pertukaran energi, semuanya dikombinasikan dalam fungsional yang meliputi korelasi elektron (Pongajow, 2013).

II.9 Gaussian 09W

Gaussian adalah sebuah program komputer untuk kimia komputasi awalnya dirilis pada tahun 1970 oleh John Pople dan kelompok riset di Carnegie-Mellon University sebagai Gaussian 70. Nama Gaussian berasal dari penggunaan orbital Gaussian oleh Pople untuk mempercepat perhitungan dibandingkan jika menggunakan tipe orbital Slater. Pilihan ini dibuat untuk meningkatkan kinerja pada kapasitas terbatas dari perangkat keras komputer untuk kalkulasi Hartree-Fock. Versi saat ini dari program Gaussian adalah Gaussian 09. Awalnya tersedia melalui Quantum Chemistry Program Exchange, kemudian berlisensi dari Carnegie Mellon University, dan sejak tahun 1987 telah dikembangkan dan dilisensi oleh Gaussian Inc (Frisch *et.al*, 2009).

II.10 Validasi Metode *Docking*

Validasi metode adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Validasi bertujuan untuk mendapatkan bukti bahwa perangkat lunak yang diprogram dalam suatu komputer dapat digunakan untuk simulasi *docking*. Validasi metode *docking* dilakukan dengan *redocking native ligand* pada *binding site*. Bahan yang digunakan untuk validasi biasanya ligan yang terdapat dalam struktur tiga dimensi hasil analisis sinar-x dari kristal ligan dan reseptornya. Penambatan kembali (*re-docking*) ligan pada situs pengikatan pada reseptor umumnya akan memberikan posing yang baik dengan nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) < 2.0 Angstrom (Yanuar, 2012).

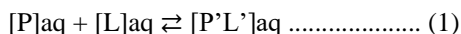
II.11 Molekular *Docking*

Salah satu metode yang digunakan untuk memprediksi struktur kompleks adalah *docking* molekuler. Pada metode ini, struktur kompleks diprediksi dengan *docking* satu struktur (biasanya yang lebih kecil) ke struktur yang lain. Metode ini terdiri atas dua tahap: sampling konformasi yang menghasilkan struktur kompleks beberapa kandidat dan penilaian yang menghargai struktur terdekat dengan kompleks asli dari yang non-native. Sampling algoritma yang biasa digunakan adalah fast-Fourier transform (FFT) dan Monte Carlo (Liu, 2006).

Molekular *docking* memiliki prinsip yang sederhana, yaitu menempatkan molekul ligan ke situs pengikatan reseptor atau

makromolekul biologis lainnya, mengoptimalkan orientasi relatif dan konformasi untuk ligan berinteraksi dengan reseptor, dan menghitung afinitas ikatan antara ligan dan reseptor menggunakan metode komputasi yang sesuai. Ada banyak faktor yang berpengaruh dalam penetapan pose ikatan ligan dengan reseptor, seperti interaksi antar komponen (ikatan hidrogen, elektrostatik, dan interaksi hidrofobik) dan fleksibilitas dari ligan dan reseptor.

Memprediksi afinitas ikatan antara ligan dengan reseptor merupakan hal yang penting dalam docking, dan biasanya secara serentak dilakukan ketika simulasi docking sedang berjalan. Di bawah kondisi yang setimbang, reaksi nonkovalen yang reversibel antara protein reseptor (P) dan ligan (L) dalam cairan dapat dinyatakan sebagai berikut:



Ikatan reseptor-ligan ditentukan dengan variasi dari energi bebas pada proses pengikatan

$$\Delta G = -RT \ln K_A = K_i^{-1} = \frac{[P][L]}{[P'L']} \dots\dots\dots (2)$$

Dimana T adalah temperatur absolut, R adalah konstanta gas molar (8,3145 J/mol K), K_A adalah konstanta ikatan, dan K_i adalah konstanta disosiasi dari interaksi ligan-protein (Fu, 2012). *Docking* molekuler secara luas digunakan untuk memprediksi kompleks protein-ligan dan untuk skrining pustaka secara luas untuk molekul yang akan memodulasi aktivitas reseptor biologis (Coleman *et.al*, 2013).

II.12 Dinamika Molekuler (*Molecular Dynamic*)

Dinamika molekuler merupakan suatu metode simulasi dengan media komputer yang memungkinkan untuk merepresentasikan interaksi molekul-molekul atom dalam jangka waktu tertentu. Teknik ini berdasarkan pada persamaan hukum Newton dan hukum mekanika klasik. Dinamika molekuler mensimulasikan molekul-molekul yang saling menarik dan mendorong dan menabrak satu sama lain. Simulasi dinamika molekuler memberikan informasi statik dan dinamik pada skala atomik, seperti posisi dan kecepatan. Informasi ini lalu dapat diolah menjadi informasi pada skala makroskopis seperti tekanan, suhu dan lain-lain. Dinamika molekuler bersifat deterministik. Jika keadaan suatu materi diketahui pada waktu tertentu, maka keadaan materi tersebut pada waktu berbeda dapat ditentukan dengan sempurna. Simulasi dinamika molekuler dapat dilakukan menggunakan program seperti Amber dan Gromacs (Farkhani, 2012).

Simulasi dinamika molekuler digunakan untuk memperoleh informasi mengenai pergerakan suatu perubahan konformasi struktur suatu protein maupun makromolekul biologis lainnya tiap satuan waktu. Melalui simulasi dinamika molekuler ini pula, informasi kinetika dan termodinamika suatu protein dapat ditelusuri (Farkhani, 2012).

II.13 Ikatan Obat dengan Reseptor

Ketika obat berinteraksi dengan reseptor, beberapa gaya tarik-menarik dipercaya bertanggung jawab pada awal interaksi. Senyawa yang berikatan dengan makromolekul reseptor memiliki afinitas pada reseptor dan dapat diklasifikasikan sebagai agonis atau antagonis.

Senyawa yang memiliki afinitas inilah yang disebut sebagai ligan. Agonis merupakan senyawa yang memiliki afinitas pada reseptor dan mampu membentuk respon biologi. Kemampuan untuk membuat respon disebut efikasi, atau aktivitas intrinsik. Obat-obat yang mampu berinteraksi dengan reseptor namun tanpa memberikan respon diklasifikasikan sebagai antagonis. Obat-obat kelas ini memiliki afinitas, namun minim aktivitas intrinsik. Afinitas senyawa pada reseptor bergantung pada karakteristik 3 dimensinya, seperti ukurannya, orientasi stereokimia dari gugus fungsinya, serta sifat fisika dan elektrokimianya (misal interaksi ionik dan dipol) (Levita, 2012).

(1) Ikatan kovalen

Ikatan terkuat yang terlibat dalam interaksi obat-reseptor adalah ikatan kovalen, dimana dua atom, satu atom dari ligan dan satu atom dari reseptor, saling berbagi pasangan elektron. Karena kekuatan ikatan yang signifikan (50-150 kkal/mol), ikatan kovalen sering kali bersifat irreversibel, hal ini menyebabkan destruksi melalui endositosis dan destruksi kimia. Perbaikan fungsi sel akibat destruksi, membutuhkan sintesis reseptor baru.

(2) Ikatan ionik

Ketika dua ion yang berbeda muatannya saling tarik-menarik melalui gaya elektrostatik, terbentuklah ikatan ionik. Kekuatan ikatan ionik berkisar antara 5-10 kkal/mol, dan berkurang secara proporsional terhadap kuadrat jarak antara dua atom. Kemampuan obat untuk mengikat reseptor melalui interaksi ionik sehingga menambah secara signifikan sebagai molekul obat berdifusi lebih dekat dengan reseptor. Tidak seperti ikatan kovalen, ikatan ionik tidak cukup kuat untuk mencegah disosiasi kompleks obat-reseptor.

(3) Ikatan hidrogen

Hidrogen terhubung via ikatan kovalen dengan atom yang memiliki elektronegativitas yang kuat, seperti oksigen, nitrogen, atau sulfur, membentuk muatan relatif positif dan akan berikatan dengan atom lain yang memiliki muatan relatif negatif, hal ini disebut dengan ikatan hidrogen. Molekul air yang berlaku sebagai dipol elektronik (hidrogen secara relatif positif karena terikat elektron oleh oksigen) dengan mudah berikatan dengan molekul air yang lain melalui ikatan hidrogen. Pada 2 hingga 5 kkal/mol, ikatan hidrogen tunggal pada umumnya lemah dan tidak memungkinkan untuk mendukung interaksi obat-reseptor, namun ketika banyak ikatan hidrogen terbentuk diantara obat-reseptor, interaksinya semakin banyak yang stabil.

(4) Ikatan hidrofobik

Ikatan hidrofobik antara senyawa organik nonpolar dapat berkontribusi pada gaya ikatan yang menarik ligan pada reseptor. Gaya pada ikatan ini sangat lemah (0,5-1 kkal/mol). Ikatan ini biasanya disebut juga dengan gaya van der Waals atau gaya London, membutuhkan dua molekul nonpolar yang saling berdekatan.

II.14 Prediksi Toksisitas

Dalam desain suatu obat, penentuan sifat toksikologi dalam suatu sediaan obat perlu dilakukan. Hal ini bertujuan untuk memprediksi efek yang merugikan bagi suatu spesies makhluk hidup. Studi dengan menggunakan hewan memiliki banyak keterbatasan seperti misalnya waktu dan dana yang dibutuhkan terlalu besar, terbatasnya laboratorium yang memadai dan mampu untuk melakukan studi tersebut serta adanya masalah tentang etika dalam penggunaan hewan

sebagai bahan uji. Untuk membantu keterbatasan tersebut telah dikembangkan metode penentuan sifat toksikologi dengan menggunakan software (Zubaidi, 2012).

Komputasi toksikologi merupakan suatu penerapan metode biologi komputasi untuk menilai resiko bahan kimia merugikan kesehatan bagi manusia dan lingkungan hidup. Toksikologi komputasi, merupakan suatu ilmu terapan, memanfaatkan kemajuan terbaru dalam teknologi matematika, biologi, kimia, dan komputer. Mengintegrasikan semua ilmu ini kedalam model komputasi berbasis biologi digunakan dalam penelitian untuk menyelidiki numerik, baik farmakokinetik dan farmakodinamik, dampak dari paparan bahan kimia lingkungan di masyarakat. Prediksi toksisitas biasanya digunakan pada eksperimen tertentu yang tidak mungkin dilakukan misalnya karena bahaya bahan-bahan yang dapat mengakibatkan kanker pada manusia (Muster, 2008).

Penentuan sifat toksikologi ini dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak ADMET Predictor. ADMET Predictor adalah sebuah program aplikasi komputer yang memungkinkan peneliti untuk cepat memperkirakan sifat dari struktur kimia obat terbaru yang memberikan gambaran tentang proses ADMET di dalam tubuh yang dikenal dalam istilah dunia MET di dalam tubuh yang di kenal dalam istilah dunia farmasi ADME dan toksisitas dari suatu struktur kimia obat terbaru (Dearden, 2006).

Bab III Metodologi Penelitian

Studi interaksi dan prediksi afinitas senyawa golongan flavonol terhadap reseptor MIF dilakukan dengan metode komputasi. Tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi preparasi senyawa uji, preparasi makromolekul reseptor, simulasi *molecular docking*, dinamika molekul, dan prediksi toksisitas senyawa uji.

Langkah pertama yang dilakukan pada penelitian ini adalah dengan menyiapkan struktur 2D dan 3D dari 12 senyawa turunan flavonol yang akan digunakan sebagai senyawa uji dengan menggunakan perangkat lunak ChemDraw® Ultra v12.02. Kemudian dilanjutkan untuk penetapan parameter sifat fisikokimianya seperti koefisien partisi (C Log P), refraktivitas molar (MR), dan bobot molekul (BM). Kemudian 12 senyawa turunan flavonol di optimasi geometri menggunakan perangkat lunak Gaussian09 dengan metode *Density Functional Theory* (DFT) dengan basis set 6-31G.

Langkah kedua yang dilakukan pada penelitian ini adalah preparasi struktur 3D reseptor MIF yang diperoleh dari protein data bank dengan kode PDB ID 4K9G dari laman (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4k9g>). Pada reseptor MIF terdapat ligan alami yaitu ISO 66 (C₁₂ H₁₂ F N O₃), sehingga perlu dilakukan pemisahan antara reseptor dan ligan alaminya menggunakan *Discovery Studio Visualizer 2016*.

Langkah ketiga yang dilakukan pada penelitian ini adalah proses *molecular docking*. Pada proses ini terlebih dahulu dilakukan validasi metode *molecular docking* dengan proses re-docking, hasil re-*docking* reseptor MIF dan ligan alami akan dibandingkan dan dihitung nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) nya. Tahap validasi metode docking dilakukan untuk mengetahui apakah protokol *docking* dapat dijalankan atau tidak dengan melihat besar nilai RMSD. Setelah dinyatakan valid masing-masing senyawa uji di *docking* menggunakan parameter yang sudah tervalidasi tersebut dan kemudian dianalisis nilai energi bebas ikatannya (ΔG) serta dipelajari interaksi ligan-reseptor.

Hasil terbaik dari *docking* akan digunakan untuk metode selanjutnya, yaitu metode dinamika molekul. Simulasi dinamika molekul digunakan untuk memperoleh informasi mengenai pergerakan suatu perubahan konformasi struktur suatu protein maupun makromolekul biologis lainnya tiap satuan waktu serta dilakukan untuk memperoleh data kestabilan interaksi reseptor-ligan dari waktu ke waktu dan juga mensimulasikan interaksi keduanya pada kondisi tubuh. Kemudian dilakukan prediksi toksisitas untuk mengetahui toksisitas senyawa uji.