

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

II.1. Kanker Payudara

II.1.1. Pengertian Kanker Payudara

Kanker adalah kelompok penyakit yang ditandai dengan pertumbuhan sel yang tidak normal, tumbuh sangat cepat dan diluar kendali. Kondisi ini dapat terus berkembang ke jaringan tubuh normal yang akan menekan jaringan tubuh normal dan akan mempengaruhi fungsi tubuh (Wiliyanarti, 2021).

Kanker payudara, terkadang disebut sebagai *carcinoma mammae*, adalah proliferasi sel yang tidak terkendali di jaringan payudara. Jaringan payudara meliputi kelenjar susu (kelenjar pembuat air susu), saluran kelenjar (saluran air susu), dan jaringan penunjang payudara. Ada dua jenis kanker payudara yang paling umum yaitu karsinoma duktal dan karsinoma *lobular* (Ketut & Kartika, 2022).

Kasus kanker payudara menepati jumlah kasus kanker terbanyak dari seluruh kasus kanker. Kanker payudara adalah jenis kanker yang sering menyerang perempuan di Indonesia. Kanker ini berkontribusi besar mencapai 30% sebagai jenis kanker yang paling banyak diderita masyarakat Indonesia, dibandingkan kanker leher rahim atau kanker serviks yang telah berkontribusi hingga 24% kasus (Kemenkes RI, 2022).

II.1.2. Etiologi dan Faktor Resiko Kanker Payudara

Tidak adanya data yang dapat menjelaskan penyebab spesifik kanker payudara, namun ada berbagai faktor yang dapat terlibat pada kanker payudara yaitu faktor hormonal, riwayat kanker payudara dalam keluarga yang kuat (faktor genetik), dan gaya hidup. Faktor resiko terkena kanker payudara meningkat dua kali lipat pada wanita yang memiliki keluarga dengan riwayat kanker payudara. Hormon estrogen yang dihasilkan oleh ovarium menjadi faktor hormonal dalam kanker payudara, karna hal tersebut perempuan 100 kali lebih beresiko terhadap kanker payudara dibandingkan pria. Selanjutnya gaya hidup yang tidak sehat dengan asupan alkohol berlebihan, obesitas dapat meningkatkan resiko kanker payudara (Ketut & Kartika, 2022).

II.1.3. Patofisiologi

Kanker payudara berasal dari jaringan epitel dan sering terjadi pada saluran susu. Pertumbuhan kanker payudara dimulai dengan hiperplasia seluler, dimana sel-sel atipikal berkembang. Sel-sel ini kemudian berkembang menjadi karsinoma in situ dan menyerang stroma.

Kanker payudara membutuhkan waktu sekitar 7 tahun bagi satu sel kanker untuk berkembang menjadi massa yang cukup besar (berdiameter sekitar 1 cm). Pada ukuran ini, sekitar seperempat kanker payudara sudah bermetastasis (Karlina & Hafshah, 2019).

Umumnya penderita menyadari jika sel kanker sudah tumbuh dan teraba oleh penderita. Tingkatan lanjut kanker payudara meliputi kulit cekung, retraksi atau deviasi puting susu dan nyeri. Jika penyakit telah berkembang lanjut, dapat pecahnya benjolan-benjolan pada kulit yang inflamasi (Ketut & Kartika, 2022).

Pada 1-2% pasien kanker payudara mengembangkan tumor agresif yang dikenal sebagai "karsinoma inflamasi" yang gejalanya menyerupai infeksi payudara akut. Kulit yang merah dan terasa panas dan tidak enak. Kanker ini menargetkan jaringan limfatik dan kulit (Wiliyanarti, 2021). Melalui kelenjar getah bening dan aliran darah, sel kanker payudara bermetastasis dan menyebar langsung ke jaringan sekitarnya (Ikhtiarudin *et al.*, 2022).

Meskipun mekanisme yang tepat dari karsinoma metastatik tidak dapat ditetapkan, para ahli telah menunjukkan bahwa ukuran tumor berkorelasi dengan kejadian metastatik, yaitu semakin sedikit kejadian metastatik, semakin kecil ukuran tumor (Saputra Liambo *et al.*, 2022).

Tabel 2. 1 Patofisiologis Kanker Payudara
(Y. S. Sun *et al.*, 2017)

	TIPE KANKER PAYUDARA		
	Subtipe	Hormon Yang Terlibat	Keterangan
Teori Sel Induk	Basal (Triple Negative)	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	Semua subtipe tumor berasal dari sel progenitor atau sel punca yang sama.
	Luminal	ER ⁺ , PR ⁺ , HER2 ⁻	
	HER2 <i>enriched</i>	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺	
Teori Stokastik	Basal (Triple Negative)	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	Setiap subtipe tumor dimulai dari satu jenis (sel induk, sel progenitor, atau sel terdiferensiasi).
	Luminal	ER ⁺ , PR ⁺ , HER2 ⁻	
	HER2 <i>enriched</i>	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺	

Dari Tabel 2.1 Teori sel induk kanker dan teori stokastik adalah dua hipotesis spekulatif tentang asal dan perkembangan kanker payudara. Teori sel induk kanker menyatakan bahwa semua subtipe tumor berasal dari sel progenitor. Sel progenitor ialah sel yang belum mengalami diferensiasi, dapat berploriferasi dan berpotensi memperbarui diri. Mutasi genetik maupun epigenetik yang terjadi didalam sel progenitor akan menyebabkan berbagai fenotipe tumor. Sedangkan setiap subtipe tumor berasal dari satu jenis sel (sel punca, sel progenitor, atau sel yang berkembang), menurut hipotesis stokastik. Jika sel tersebut bermutasi akan memicu transformasi sel menjadi sel tumor. Banyak data yang mendukung kedua teori tersebut, namun

tidak ada yang dapat sepenuhnya menjelaskan asal usul kanker payudara manusia (Y. S. Sun *et al.*, 2017).

II.1.4. Epidemiologi Kanker Payudara

Globocan sejak tahun 2021, menyatakan kasus kanker payudara telah melebihi kanker paru yang sebelumnya merupakan kanker terbanyak selama 2 dekade terbanyak di dunia. Data globocan juga menyatakan 12% dari total kasus kanker tiap tahun adalah kasus kanker payudara. Sebanyak 2,3 juta kasus baru kanker payudara dilaporkan setiap tahunnya (Globocan, 2021).

Karena tingginya angka kematian akibat kanker, kanker masih menjadi beban kesehatan masyarakat di Indonesia dan negara lain (Swantara *et al.*, 2019). Menurut Swatara dkk. (2019), terdapat 100 kasus baru kanker per 100.000 penduduk di Indonesia setiap tahunnya. Kanker payudara adalah penyebab utama kematian terkait kanker pada wanita di seluruh dunia karena tingkat kematiannya yang tinggi (Sporikova *et al.*, 2018).

Angka kejadian kanker pada perempuan Indonesia tertinggi pada kanker payudara dengan angka kasus sebesar 42,1 per 100.000 penduduk dengan rata-rata kasus kematian 17 dari 100.000 penduduk. Data yang di keluarkan oleh Globocan pada tahun 2020 menyatakan jumlah kasus kanker payudara mencapai 68.858 kasus (16,6%) dari total 396.914 kasus baru kanker di Indonesia (GLOBOCAN, 2022; Globocan, 2021). Sementara itu, untuk jumlah kematiannya mencapai lebih dari 22 ribu jiwa kasus. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia di tahun 2022 menyatakan kanker payudara menempati urutan pertama dengan jumlah kasus kanker terbanyak dibandingkan dengan kanker lainnya, serta menjadi salah satu penyumbang kematian pertama akibat kanker (Kemenkes RI, 2022).

II.2. Reseptor Estrogen Alfa

Reseptor estrogen- α (ER- α) adalah salah satu biomarker paling penting yang dapat membedakan subpopulasi yang berbeda secara biologis antara sel kanker dan sel normal. Individu yang mengekspresikan ER α secara berlebihan mengembangkan proses sel payudara hiperproliferatif yang dikenal sebagai kanker payudara ER+. Kanker payudara dengan ER+ terjadi pada hampir 80% kasus kanker payudara (Pinhel *et al.*, 2012).

Estrogen berperan penting dalam perkembangan, diferensiasi dan fungsi sistem reproduksi. Estrogen akan memasuki sel yang mengandung reseptor estrogen yang akan merespon. Ada dua reseptor estrogen yang dikenal dalam tubuh, reseptor estrogen alfa (ER- α) dan reseptor estrogen beta (ER- β). Reseptor estrogen yang berikatan dengan hormon estrogen akan

membuat reseptor mengalami perubahan konformasi yang mengikat koaktivator dan mengaktifkan faktor transkripsi. Transkripsi gen akan mengarah pada sintesis protein tertentu, yang kemudian mempengaruhi fungsi sel tergantung jenis dan targetnya. (Saputra Liambo et al., 2022). ER- α ditemukan pada sel kanker payudara, kanker endometrium, stroma ovarium dan hipotalamus.

Reseptor estrogen yang berikatan dengan estrogen akan membuat kompleks aktif sehingga dapat mempengaruhi transkrip gen yang mengatur proliferasi sel (Oktaviani *et al.*, 2019). Salah satu fokus terapi pengobatan kanker payudara adalah memblokir aksi estrogen pada reseptor estrogen alfa (ER- α). ER- α memainkan peran penting dalam perkembangan kanker payudara, bertindak sebagai faktor transkripsi yang diinduksi ligan, dan dapat digunakan untuk menentukan pertumbuhan, kelangsungan hidup, dan diferensiasi sel kanker payudara (Anggorowati, 2013).

Reseptor estrogen alfa bekerja sebagai *ligand-inducible transcription factor* yang berperan penting dalam menentukan pertumbuhan, survival, serta diferensiasi sel kanker payudara (Anggorowati, 2013). Dalam kasus kanker payudara, ER- α berikatan dengan estrogen dan berkembang secara tidak normal (Saputra Liambo et al., 2022). ER- α memiliki tiga situs pengikatan spesifik, ligan yang disebut domain pengikat ligan (AF-2), faktor pertumbuhan (AF-1) dan DNA (domain pengikat DNA). Ligan yang berikatan dengan reseptor estrogen dan bersaing dengan estrogen disebut modulator reseptor estrogen selektif (SERM). SERM dapat bekerja sebagai antagonis ataupun agonis tergantung pada lokasi reseptor di jaringan target. Hal tersebut dikarenakan pada jaringan yang berbeda, RE- α akan memiliki konformasi yang berbeda pula (Pinhel *et al.*, 2012).

Salah satu tujuan terapeutik dalam penatalaksanaan kanker payudara ER+ adalah ER-inhibition. Tamoxifen yang berfungsi langsung sebagai ER-antagonis merupakan salah satu ER-inhibitor yang terkenal dan digunakan dalam pengobatan (Yamamoto-Ibusuki *et al.*, 2015). Tamoxifen terus menjadi strategi pengobatan lini pertama untuk kanker payudara ER+ saat ini, meskipun ada upaya untuk meningkatkan kemanjuran terapi ER+ melalui pengembangan antagonis ER baru. Tamoxifen mampu membuat sel kanker mengalami apoptosis (Liu, *et al.*, 2014).

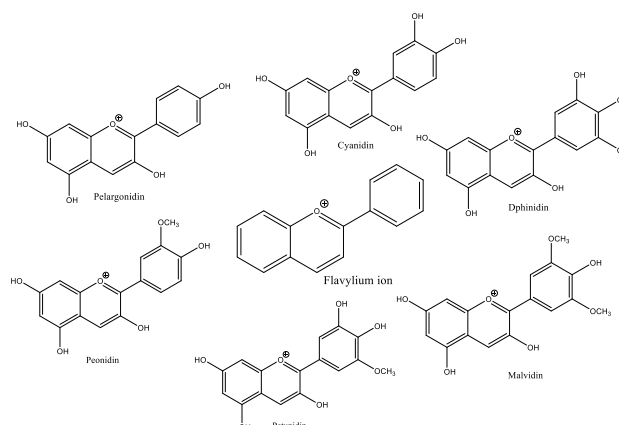
II.3. Antosianin

Antosianin adalah bagian dari metabolit sekunder flavonoid yang tersebar luas di alam. Antosianidin adalah aglikon dari antosianin yang dibentuk oleh hidrolisis asam. Antosianin merupakan flavonoid yang memiliki sifat larut dalam air. Senyawa kelompok antosianin memiliki berbagai efek farmakologis, seperti pencegahan penyakit kardiovaskular, aktivitas

antitumor, antioksidan dan antiproliferasi dan pengendalian obesitas (Prasetyawati *et al.*, 2021). Aktivitas antiproliferasi dari antosianin diduga memiliki interaksi dengan ER- α . Antosianin tersebar luas di berbagai bunga, buah, daun, umbi, kulit batang dan kulit buah, kacang-kacangan dan biji-bijian. Penelitian sebelumnya terhadap ekstrak etanol beras hitam telah menunjukkan potensi sebagai agen antikanker pada payudara. Ekstrak etanol beras hitam (*Oryza sativa L. Indica*) terdapat senyawa antosianin yang memiliki efek sitotoksik terhadap kanker (Abidin, 2017).

II.3.1. Struktur dan Karakteristik Antosianin

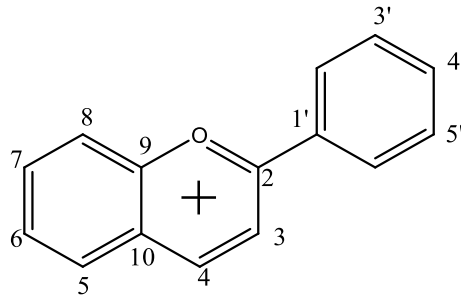
Antosianin adalah senyawa yang termasuk dalam kelompok senyawa flavonoid. Struktur umumnya ditandai oleh dua cincin benzena aromatik yang terhubung oleh tiga atom karbon untuk membentuk sebuah cincin (Prasetyawati *et al.*, 2021). Antosianin adalah senyawa golongan flavonoid yang bermuatan dan berikatan dengan satu atau lebih gugus gula, sedangkan antosianidin merupakan aglikon dari antosianin. Struktur dasar antosianin terdiri dari 2-phenylbenzopyrylium atau flavylium dengan beberapa gugus hidroksi dan metoksi (Nurtiana, 2019).



Gambar 2. 1 Antosianin

Ada perbedaan utama antara jenis-jenis antosianin yakni dilihat dari banyaknya gugus hidroksil dan gula yang terikat pada struktur molekul atau tempat pengikatan. Gugus gula dari antosianin berbeda-beda, tetapi kebanyakan berupa glukosa, rhamnosa, galaktosa maupun arabinosa (Priska *et al.*, 2018). Gugus gula ini dapat berbentuk mono ataupun disakarida serta dapat diasilasi dengan asam fenolat atau alifatik (Nurtiana, 2019). Umumnya antosianin datang dalam enam bentuk antosianidin, yaitu peonidin (Pn), cyanidin (Cy), petunidin (Pt), pelargonidin (Pg), malvidin (Mv) dan delphinidin (Dp) (Khoo *et al.*, 2017). Penyebarannya antosianin ini di alam mencapai 50% cyanidin, 12% Pelargonidin, 12% peonidin, 12% delphinidin, 10% petunidin dan 7% malvidin. Kemudian diikuti ke 4 kelompok glikosida antosianidin, yaitu 3-monosida, 3-

biosida, 3,5-diglikosida dan 3-glikosida. Bentuk antosianin terbesar yang ditemukan adalah cyanidin-3-glikosida (Ifadah *et al.*, 2021).



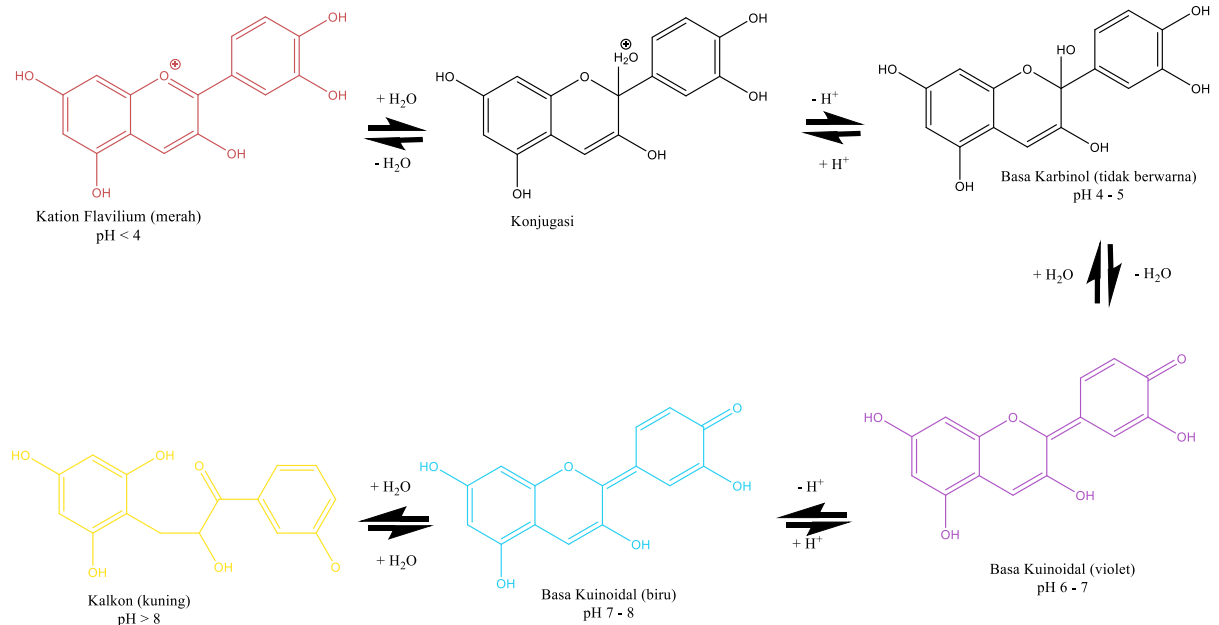
Gambar 2. 2 Struktur Umum Antosianin

Faktor-faktor yang mempengaruhi kestabilan antosianin antara lain perubahan struktur spesifik antosianin (glikosilasi, asilasi dengan asam alifatik atau aromatik), pH, suhu, cahaya, adanya ion logam, oksigen, kandungan gula, enzim dan Pengaruh Sulfur Oksida (Priska *et al.*, 2018).

Kestabilan dan warna yang dihasilkan oleh antosianin dipengaruhi oleh substitusi gugus kimia pada struktur dasar antosianin. Penambahan gugus glikosidik maupun peningkatan jumlah gugus hidroksil bebas pada cincin akan menyebabkan perubahan warna menjadi biru dan relatif tidak stabil. Sedangkan penambahan gugus metoksi atau metilasi akan membuat warna menjadi merah dengan tingkat kestabilan yang relatif stabil (Le *et al.*, 2019).

Kopigmentasi merupakan salah satu cara untuk menjaga kestabilan antosianin. Kopigmentasi dapat terjadi dengan adanya logam atau trivalen seperti magnesium (Mg^{2+}) dan aluminium (Al^{3+}) yang membentuk kompleks dengan antosianin membentuk warna biru. Bentuk kompleks ini menyebabkan antosianin lebih stabil. Ada dua jenis mekanisme dalam reaksi kopigmentasi. Pertama, terjadi reaksi intramolekul melalui ikatan kovalen pada gugus antosianin glikon dengan asam organik, senyawa aromatik atau flavonoid, atau kombinasi dari ketiganya. Mekanisme lain adalah reaksi intramolekul di mana ikatan hidrofobik lemah terbentuk antara flavonoid dan antosianin (Fatimah *et al.*, 2015).

Gambar 2.3 menunjukkan kesetimbangan antosianin terhadap pH dengan mekanisme pertukaran informasi antosianin. nilai pH yang semakin tinggi akan membuat warna antosianin berubah menjadi tidak berwarna. Pigmen antosianin yang terkandung dalam daun jati muda secara konsisten mengekspresikan warna merah pada pH 3, kuning pada pH 1, jingga pada pH 5 dan pH 7 (Fatimah *et al.*, 2015).



Gambar 2. 3 Keseimbangan Antosianin

Keseimbangan antosianin juga dapat terpengaruhi oleh temperatur. Suhu yang meningkat akan mengakibatkan keseimbangan antosianin cenderung menjadi bentuk yang tidak berwarna yakni basa karbinol maupun kalkon (Le *et al.*, 2019). Dalam kerusakan ini terjadi dalam dua tahapan, tahap pertama menghasilkan aglikon tidak stabil yang terbentuk akibat adanya hidrolisis pada ikatan glikosida antosianin. Tahap selanjutnya, cincin aglikon akan terbuka akan terbentuk gugus karbinol dan kalkon. Jika adanya oksidator dalam proses degradasi senyawa berwarna (Khoo *et al.*, 2017).

Cahaya juga mempengaruhi mendegradasi pigmen warna antosianin yang membentuk kalkon tidak berwarna. Reaksi fitokimia atau fotooksidasi dapat terjadi yang dipicu energi yang dikeluarkan oleh cahaya hingga dapat membuka cincin antosianin. Jika paparan yang terjadi lebih lama memicu terjadinya degradasi lanjutan yang akan membentuk senyawa turunan lain seperti 2,4,6-trihidroksibenzaldehid atau asam benzoate tersubstitusi (Priska *et al.*, 2018).

II.3.2. Sumber Antosianin

Antosianin tersebar luas di bunga, buah, kulit buah, daun, umbi-umbian, kulit batang, kacang-kacangan dan biji-bijian. Buah beri, yang ditandai dengan warna merah-ungu, biasanya kaya akan antosianin. Blueberry, atau blueberry Eropa, buah berwarna ungu, memiliki kandungan antosianin tertinggi dari semua buah beri. 33 jenis antosianin terdeteksi dalam buah birch matang, di mana delphinidin merupakan senyawa antosianin yang dominan.

Selain itu, delphinidin juga merupakan senyawa antosianin yang dominan terdapat pada buah tomitomi. Buah tomi-tomi biasanya berwarna ungu, buah ini banyak terdapat pada hutan di Maluku (Priska *et al.*, 2018).

Tabel 2. 2 Sumber Antosianin
(Priska *et al.*, 2018)

Produk	Total kandungan Antosianin(mg/Kg)	Produk	Total kandungan Antosianin(mg/Kg)
Anggur merah tanpa biji	138,1	Bunga Pukul Empat	9770
Beras hitam utuh	3222,3	Daun bayam merah	132,76
Beras merah	25,6 – 70,6	Daun Caladium	57
Bilberry	18600 - 33970	Kacang panjang	14
Buah senggani	383,8	Kubis merah	11110 - 17800
Buah tomi-tomi	1038,9	Kulit buah jentri	238,7
Bunga rosella ungu	5787,5 – 8838,7	Kulit buah naga	104,58
Bunga Sepatu	7390	Kulit secang	23400
Bunga Mawar	9250	Mangga apel	105
Mangga Khirsapati	115	Strawberry	444
Mulberry	650	Ubi ungu	618,5
Rasberry	459		

Kandungan total antosianin pada bunga dapat dipengaruhi oleh jenis antosianin yang dominan, sinar matahari, iklim dan tanah, seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2. 2 Aneka bunga seperti rosella, mawar, kembang sepatu dan bunga pukul empat mengandung pelargonidin dan sianin. Pelargonidin berperan dalam pengepresian warna jingga, jingga-merah, dan ungu, sedangkan sianin berperan dalam pembentukan warna merah-jingga, ungu, violet, atau biru-merah (Prasetiawati *et al.*, 2021). Selain itu penelitian sebelumnya menunjukkan buah senggani (*Melastoma malabathricum* Auct. Non Linn) menghasilkan total antosianin tertinggi dengan menggunakan pelarut etanol 80% dalam proses ekstraksinya (Priska *et al.*, 2018).

II.3.3. Aktivitas antikarsinogenik antosianin pada tahap perkembangan kanker

Beberapa penelitian menyebutkan bahwa antosianin mempunyai beragam manfaat untuk kesehatan. Antosianin mempunyai efek farmakologis sebagai antitumor, antikanker dan antiproliferatif (Prasetiawati *et al.*, 2021).

Pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa antosianin sebagai antikanker dalam tubuh, seperti malvidin yang menunjukkan aktivitas antikanker signifikan pada kanker kolorektal. Dengan mekanisme menginduksi apoptosis, penghentian siklus sel, dan penghambatan migrasi sel. Malvidin secara langsung mencegah ataupun membloking fase G1/G0 dan G2/M dengan cara penghambatan poliferasi pada sel kanker usus besar, dengan mekanisme tersebut malvidin

mampu menghambat metasis sel kanker (Xu *et al.*, 2018). Tidak hanya itu cyanidin mampu berinteraksi dengan DNA akan membentuk kompleks cyanidin-DNA yang lebih stabil sehingga diperkirakan mampu mencegah kerusakan oksidatif DNA (Ifadah *et al.*, 2021).

Pertumbuhan sel kanker dapat dihambat oleh antosianidin melalui penargetan RTK (misalnya EGFR, PDGFR dan VEGF/VEGFR). Aktivitas anti-karsinogenik antosianin salah terjadi beberapa jalur. Antosianin dapat menginduksi apoptosis sel tumor, Menghambat invasi dan metastasis tumor, Menghambat angiogenesis. sel yang berubah menjadi ganas menunjukkan pertumbuhan yang tidak terkendali, dan proliferasinya yang berlebihan menyebabkan pembentukan tumor (Yetojeviy-Simin *et al.*, 2015). Menghambat proliferasi sel, karakteristik sel kanker yang signifikan adalah siklus selnya yang tidak terkendali, yang menyebabkan pembelahan dan proliferasi terus menerus (Lee *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2016a). Antosianin secara selektif dapat menghambat proliferasi sel kanker tetapi memiliki sedikit pengaruh terhadap proliferasi sel normal (Malik *et al.*, 2003). Manifestasi utama penghambatan pertumbuhan dan proliferasi sel kanker oleh anthocyanins dirangkum dari tiga aspek di bawah ini (Ying-Yu Cui *et al.*, 2017).

Penelitian abidin (2017) adanya penurunan CA 15-3 serum pada tikus putih yang diterapi ekstrak etanol beras hitam, menunjukkan adanya potensi sebagai antikanker payudara. Pada kanker payudara protein CA 15-3 akan meningkat, glikoprotein CA 15-3 merupakan hasil ekspresi sel epitel kelenjar payudara (Abidin, 2017). Ekstrak etanol beras hitam (*Oryza sativa L. Indica*) mengandung senyawa antosianin yang mempunyai efek sitotoksik terhadap kanker (Fajar & Arlin, 2017). Dalam penelitian lainya Ekstrak antosianin beras hitam dilaporkan dapat menghambat sel kanker liver (Chen, Nagao, Itani, & Irifune, 2012).

Dalam penelitian lainya, ekstrak biji anggur yang kaya akan *proanthocyanidins* telah digunakan dalam uji klinis fase I untuk mempelajari efek sampingnya dan dosis terbaik untuk mencegah kanker payudara pada wanita pascamenopause (40-75 tahun) yang berisiko kanker payudara. Dalam uji pada tikus yang menerima transplantasi garis sel kanker payudara manusia MDA-MB-453, pertumbuhan kanker dan pembentukan pembuluh darahnya jelas dihambat oleh pemberian oral ekstrak kaya antosianin dari kulit beras hitam (100 mg/kg1 dalam diet) (Chang *et al.*, 2010).

Antosianin memiliki afinitas tinggi untuk BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*), dan di antara anthocyanin yang ditentukan, tujuh jenis (malvidin, petunidin, malvidin-3- galactoside, malvidin, cyaniding-3-galactoside, peonidin-3-glucoside dan C-3-G) adalah substrat potensial dari BCRP, 12 jenis (cyanidin, peonidin, cyaniding-3,5-diglucoside, malvidin, pelargonidin,

delphinidin, petunidin, delphinidin-3-glucoside, cyanidin-3-rutinoside, malvidin-3-glucoside, pelargonidin-3,5-diglucoside dan malvidin-3-galactoside) adalah inhibitor BCRP dan tiga jenis (malvidin, malvidin-3-galactoside dan petunidin) menunjukkan aktivitas biologis ganda (Ying-Yu Cui et al., 2017).

II.4. Penambatan Molekul

Penambatan molekul atau *Molecular Docking* adalah salah satu metode pengujian *in silico* dengan kimia komputasi, dapat secara efektif memprediksi pengikatan mikromolekul non-kovalen (protein target) ke molekul kecil (ligan). Metode ini sering digunakan dalam penemuan dan pengembangan obat baru yang lebih efektif. *Docking* berperan dalam memprediksi interaksi pengikatan antara molekul kecil (ligan) dengan afinitas terbaik dan reseptor target (Pratama et al., 2017).

Keuntungan dari docking molekuler adalah mampu digunakan dalam memprediksi aktivitas suatu senyawa yang belum disintesis. Dengan hal tersebut dapat menghindari pemborosan waktu dan uang dalam langkah sintesis senyawa yang tidak memiliki aktivitas yang diharapkan. Oleh karena itu, dengan memprediksi mekanisme interaksi ligan-reseptor, penambatan molekul menjadi metode yang lebih efektif untuk desain senyawa (Pratama et al., 2017).

II.4.1. Metode Penambatan Molekul

Setiap metode dalam penambatan molekul mempunyai algoritmanya tersendiri. Tujuan metode ini adalah untuk mengidentifikasi dan mendapatkan bentuk kompleks (protein-protein atau protein-target) yang paling ideal dan stabil. Dalam pencarian konformasi hal yang perlu diperhatikan ialah, fleksibilitas dari reseptor dan ligan. Saat pencarian konformasi, hal yang perlu diperhatikan adalah fleksibilitas dari reseptor dan ligan. Dalam hal ini, protein dalam keadaan kaku dengan ligan bebas mengeksplor konformasinya. Penambatan molekul dengan mengacu pada fleksibilitas reseptor-ligan diklasifikasikan menjadi 3 yakni Rigid Docking (bersifat kaku), semi-fleksible docking (bersifat semi fleksible) serta fleksible docking (bersifat fleksible) (Syahputra et al., 2014).

II.4.2. Druglikeness

Perancangan molekul obat dan modifikasi senyawa dapat dioptimalkan dengan meningkatkan *druglikeness* / kemiripan dengan obat. Suatu senyawa yang *druglikeness* dapat dilihat dari sifat molekul seperti fleksibilitas molekul, distribusi elektronik, ukuran, stabilitas metabolik, bioavailabilitas, afinitas terhadap protein, toksisitas, dan reaktivitas. Teori *druglikeness* di sempurnakan dari waktu ke waktu. *Lipinski Rule of Five* merupakan prinsip panduan efektif

dalam design obat (Wei *et al.*, 2020). Dari hal tersebut, aturan ‘*Lipinski Rule of Five*’ sangat diperhatikan dalam perancangan sebuah obat baru. Aturan ini antara lain sebagai berikut :

- a. Berat molekul < 500.
- b. Memiliki gugus donor hidrogen tidak lebih dari 5.
- c. Memiliki gugus akseptor hidrogen tidak lebih dari 10.
- d. Nilai logP tidak lebih dari 5 (Jyoti Sen *et al.*, 2021)

Saat mendesain molekul obat, beberapa aspek penting harus dipertimbangkan, seperti kemampuan molekul obat untuk dapat melintasi membran biologis hingga berinteraksi dengan reseptor target dan menimbulkan efek farmakologis. Berat molekul memainkan peran penting dalam desain obat, semakin rendah nilai berat molekul, semakin mudah mediator dapat memasuki organ biologis. Aturan Lipinski menyatakan berat molekul senyawa yang digunakan untuk membuat obat < 500 g/mol. Semakin tinggi berat molekul senyawa, semakin sulit senyawa tersebut menembus membran biologis (Jyoti Sen *et al.*, 2021).

Peranan parameter LogP digunakan untuk melihat sifat fisikokimia yang akan menentukan sifat suatu ligan bersifat hidrofilik ataupun hidrofobik. Semakin tinggi nilai logP, semakin lipofilik atau larut dalam lemak ligan, yang memfasilitasi penetrasi ligan ke dalam membran biologis yang berinteraksi dengan reseptor target. Namun, jika nilai logP lebih tinggi, maka ligan tersebut sangat lipofilik dan ligan tetap berada di lapisan membran dikarenakan sebagian besar penyusun tubuh manusia adalah air. Hal ini menyebabkan ligan tidak dapat berinteraksi dengan reseptor target (H. Sun *et al.*, 2016).

Parameter donor hidrogen dan akseptor hidrogen menginterpretasikan besaran kapasitas ikatan hidrogen, yang berbanding lurus dengan besarnya energi yang dibutuhkan untuk proses penyerapan. Dengan demikian kemampuannya untuk menembus membran biologis diharapkan bertahan relatif lama (Rachmania *et al.*, 2018).

II.4.3. Parameter Docking

Penambatan molekul bertujuan untuk memprediksi afinitas ikatan dan mengidentifikasi ikatan. Dalam penambatan molekul nilai energi bebas ikatan (ΔG) dan konstanta inhibisi (K_i) digunakan untuk interpretasi hasil *docking*, dalam persamaan berikut :

$$\Delta G = -RT \ln K_i$$

Keterangan :

- ΔG : Eenergi Afinitas atau perubahan energi bebas ikatan
 R : Konstanta ideal gas (1,98.6 kal/molK)

T : Suhu (298°K)

Ki : Konstanta Inhibisi

a. Energi Bebas Ikatan (ΔG)

Energi bebas ikatan menunjukkan kestabilan ligan dengan reseptor. Nilai ΔG yang besar menunjukkan tidak stabilnya ikatan yang terbentuk. Sebaliknya semakin negatif nilai ΔG mengartikan kestabilan yang baik, sehingga ikatan yang terbentuk akan semakin kuat (Syahputra *et al.*, 2014).

b. Konstanta Inhibisi (K_i)

Dalam analisis *docking* konstanta inhibisi (K_i) berkaitan dengan afinitas pengikatan. Afinitas pengikatan ialah kemampuan suatu obat untuk berikatan dengan reseptor. Semakin kecil nilai konstanta inhibisi (K_i) menunjukkan afinitas ligan yang semakin tinggi (Wei *et al.*, 2020).

c. Interaksi Intermolekuler

Interaksi ikatan intermolekular yang terjadi dapat dilihat dari ikatan yang mungkin terbentuk, seperti ikatan hidrogen, interaksi van der Waals, ikatan ionik dan ikatan hidrofobik. Parameter ini dapat membantu melihat hubungan struktur dengan aktivitas. Pada ikatan hidrogen dapat terbentuk meskipun jarak antara ligan dengan reseptor cukup jauh, hal tersebut membuat ikatan hidrogen lebih kuat dibandingkan interaksi van der Waals. Ikatan van der Waals merupakan interaksi yang lemah timbul antara gugus hidrofobik seperti cincin aromatik serta gugus alkil. Hal ini timbul karena terjadi fluktuasi acak dalam densitas elektron sehingga membentuk daerah yang kaya elektron ataupun sebaliknya membentuk daerah yang sedikit elektron (Wei *et al.*, 2020).

Ikatan hidrofobik merupakan interaksi antara molekul non-polar yang tidak mengandung ion dan memiliki momen dipol atau terhidrasi. Molekul ini disebut hidrofobik karena tidak dapat larut atau hampir tidak larut dalam air. Sedangkan ikatan ionik merupakan ikatan yang terbentuk antara gugus-gugus bermuatan yang berlawanan. Beberapa interaksi obat dengan target maupun interaksi alami tubuh melalui ikatan ion (H. Sun *et al.*, 2016).

II.5. Dinamika Molekul

Simulasi dinamika Molekul ialah metode *in silico* yang menggunakan media komputer untuk memberikan gambaran interaksi molekul atom dalam jangka waktu tertentu. Dalam metode ini menggunakan prinsip persamaan hukum newton serta hukum mekanika klasik (Astuti & Mutiara, 2011). Tujuan dari simulasi ini adalah pengamatan kestabilan interaksi antara ligan

dengan reseptor target yang disimulasikan dengan kondisi keadaan mendekati fisiologis tubuh pada rentang waktu tertentu (Mardiana & Ruswanto, 2016).

Dinamika molekul bersifat deterministic, jika keadaan materi diketahui pada waktu tertentu, keadaan materi pada waktu yang berbeda dapat ditentukan dengan sempurna. Simulasi dinamika molekul telah membantu banyak penelitian untuk memahami sifat biomolekul seperti DNA, RNA dan protein yang terikat dengan regulasi dan interaksi antarmolekul. Simulasi molekuler memungkinkan pengamatan sifat molekul yang sulit diuji (Yusuf, 2015).

Simulasi dinamika molekul ini menghasilkan informasi statis dan dinamis pada tingkat atom seperti posisi dan kecepatan. Metode ini mensimulasikan molekul yang menarik, mendorong, ataupun bertabrakan satu sama lain. Dinamika molekul dapat disimulasikan dengan menggunakan perangkat lunak AMBER dan Gromac pada komputer yang menjalankan sistem operasi Linux (Zubair *et al.*, 2020).

II.5.1. Parameter Dinamika Molekul

Hasil dari simulasi dinamika molekul dapat diinterpretasikan dalam beberapa parameter simulasi yang meliputi:

1. *Root Mean Square Deviantion (RMSD)*

Setelah menjalankan simulasi dinamika molekul, pendekatan RMSD dilakukan untuk membandingkan variasi struktur makromolekul hasil simulasi. Metode ini memperlihatkan perubahan konformasi yang terjadi selama simulasi. Parameter ini merupakan parameter kemiripan berdasarkan perbandingan jarak atom pada senyawa sejenis. RMSD berperan dalam menunjukkan dan menentukan pelipatan protein (Singh *et al.*, 2021).

2. *Root Mean Square Fluctuation (RMSF)*

RMSF merupakan ukuran perpindahan/fluktuasi atom maupun residu yang ada dalam makromolekul. parameter RMSF digunakan untuk identifikasi fluktuasi pada masing masing residu, yang memberikan gambaran residu asam amino. Kestabilan yang baik ditunjukkan oleh nilai RMSF yang rendah (Singh *et al.*, 2021).

3. *Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area (MMGBSA)*

MMGBSA yakni parameter berbasis medan gaya percepatan yang menghitung energi bebas pengikatan. Parameter MMGBSA menggunakan persamaan poisson baltzmann, dalam pemanfaatannya MMGBSA telah banyak digunakan dalam kalkulasi energi bebas (M. T.

Setiawan dan Yanuar, 2018). Parameter ini berguna dalam memperkirakan nilai ΔG , dan nilai K_i (Ylilauri & Pentikäinen, 2013).

II.5.2. Tahapan Simulasi Dinamika Molekul

Simulasi dinamika molekul dilakukan dengan perangkat lunak AMBER versi 18 dengan tahapan simulasi dinamika molekul sebagai berikut:

1. Persiapan berkas, meliputi persiapan berkas protein target dan berkas ligan. Ligan yang digunakan adalah senyawa dengan klaster terbaik dari hasil *docking* ligan dengan target (D.A. Case *et al.*, 2020).
2. Tahap topologi dan koordinat, dilakukan dengan menggunakan berkas ligan, target, kompleks ligan-target dalam suasana vakum dan pelarut air. Tahap ini membuat susunan atom suatu molekul tidak mengalami perubahan selama simulasi dinamika molekul berlangsung (D.A. Case *et al.*, 2020).
3. Solvasi, tahap yang mendeskripsikan elektrostatis stabilitas lingkungan air, dan interaksi antar molekul. Permodelan air digunakan bertujuan untuk menyesuaikan kondisi fisiologis tubuh, karena air merupakan unsur penyusun tubuh terbesar (Sneha & Priya Doss, 2016).
4. Netralisasi, muatan dari interaksi antar medan gaya ligan-protein target dihitung terlebih dahulu sebelum melakukan simulasi dinamika molekul. Sistem ligan dan protein target diharuskan netral, sehingga perlu penambahan ion Na^+ jika sistem bermuatan negatif dan penambahan Cl^- jika sistem bermuatan positif. Penetralkan sistem ligan-protein target dilakukan dengan modul *LeaP*. Molekul air TIP3P ditambahkan terhadap sistem kompleks yang bermuatan netral sebagai pelarut yang merupakan tahap solvasi modul *LeaP* agar mekanisme sistem biologis dapat dipresentasikan.
5. Minimisasi energi, tahap ini dilakukan bertujuan untuk menghilangkan tumbukan dan kontak sterik yang merugikan hasil dari tahap solvasi. Minimisasi terdiri dari tiga tahapan menggunakan modul sander. Tahap pertama, molekul air direlaksasi pada tempat dimana protein tertahan. Tahap pertama ini dilakukan dengan 1000 tahap minimisasi melalui model algoritma *steepest descent*. tahap kedua, tulang punggung struktur protein ditahan sehingga kontak atau tumbukan yang tidak diinginkan antar rantai samping residu asam amino penyusun dapat dihilangkan. Kemudian minimisasi ketiga dilakukan dengan memberikan *harmonic restrain* pada ikatan *backbone* (kerangka utama protein).

6. tahap pemanasan (*heating*), tahap ini dilakukan secara bertahap mencapai suhu fisiologis tubuh ($36,85^{\circ}\text{C}/310^{\circ}\text{K}$) (Muchtaridi *et al.* 2019).
7. Tahap Ekuilibrasi, perlakuan untuk menstabilkan suhu, volume maupun tekanan pada sistem, sehingga sistem mencapai keadaan konstan sebelum menjalani simulasi dinamika molekul. Perlakuan ekuilibrasi sebanyak 6 tahapan, adapun empat parameter yang dapat diamati setelah perlakuan ekuilibrasi dilakukan. Parameter tersebut meliputi temperatur, berat jenis, energi potensial dan RMSD (D.A. Case *et al.*, 2020).
8. Selama produksi, pemeriksaan suhu, berat jenis, energi potensial, dan RMSD telah diselesaikan sebelumnya. parameter ini digunakan untuk menilai apakah sistem siap untuk proses produksi atau tidak. Prosedur produksi lintasan, yang merupakan tahap terakhir dari simulasi dinamika molekul, dilakukan dalam keadaan NPT (suhu dan tekanan konstan) (D.A. Case *et al.*, 2020).