

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Kanker

Kanker adalah suatu penyakit yang ditandai dengan pertumbuhan sel yang berlebihan yang disebabkan karena ketidakseimbangan pertumbuhan sel, pembelahan sel dan apoptosis. Bisa mengenai organ apa saja di dalam tubuh manusia. Kanker berawal dari kerusakan materi genetik DNA (*Deoxyribo Nucleic Acid*). Satu sel saja yang mengalami kerusakan genetik sudah mampu menghasilkan sel kanker atau neoplasma, sehingga kanker juga disebut penyakit seluler. Kerusakan atau mutasi genetika yang dapat menyebabkan kanker dapat terjadi karena faktor dalam (endogen) seperti kesalahan replikasi pada saat sel-sel digantikan oleh sel baru, kesalahan genetik yang disebabkan oleh keturunan. Kanker juga dapat disebabkan karena faktor dari luar (eksogen) seperti akibat virus, infeksi berkelanjutan, polusi udara, radiasi, dan bahan-bahan kimia (Chisholm-Burns, dkk., 2016).

II.2 Kanker Kolon

Kanker kolon merupakan kanker yang tumbuh di sistem pencernaan. Kanker kolon merupakan kanker yang tumbuh di usus besar. Kanker kolon berasal dari polip adenoma pada usus dan penumpukan tinja akibat konstipasi yang terlalu lama (Watson dan Collins, 2011).

II.2.1 Epidemiologi dan Etiologi Kanker Kolon

Kanker kolon lebih sering terjadi di kawasan industri seperti Amerika Utara dan Eropa, sedangkan tingkat terendah terlihat di

daerah yang kurang berkembang, hal ini menunjukkan bahwa faktor lingkungan dan makanan mempengaruhi perkembangan kanker kolon. Selain faktor lingkungan, kanker kolon berkembang lebih sering pada keluarga tertentu. Insiden kanker kolon pada pria sekitar 1,5 kali lebih besar daripada wanita. Usia dengan resiko tertinggi terkena kanker kolon adalah umur lebih dari 65 tahun (Chisholm-Burns, dkk., 2016).

II.2.2 Faktor Resiko Kanker Kolon

Selain umur, diet, faktor lingkungan, penyakit radang usus, dan genetik dapat meningkatkan faktor terkena kanker kolon. Diet tinggi lemak dan rendah serat dapat meningkatkan resiko kanker kolon (Chisholm-Burns, dkk., 2016). Efek perlindungan dari serat dapat meurunkan penyerapan karsinogen di usus, mengurangi waktu transit usus, atau pengurangan asupan lemak yang terkait dengan diet serat tinggi. Makanan dengan kadar serat tinggi antara lain sayuran, buah, gandum dan sereal (Park, dkk., 2005).

II.2.3 Patofisiologi

Perkembangan neoplasma kolorektal merupakan multistep dari beberapa perubahan genetik dari epitelium usus yang normal yang menyebabkan pertumbuhan sel, proliferasi, dan perkembangan tumor yang tidak teratur. Perkembangan tumor ini mencerminkan akumulasi mutasi dalam epitel kolon yang memberikan pertumbuhan selektif terhadap sel kanker. Pengaktifan mutasi onkogen, mutasi gen supresor tumor, dan cacat pada DNA merupakan hal yang dapat menyebabkan perubahan genetik (Chisholm-Burns, dkk., 2016).

II.2.4 Cyclin-Dependent Kinase 2 (CDK2)

Cyclin-dependent kinases (CDKs) termasuk keluarga dari 16 serin/treonin yang merupakan regulator utama dari siklus sel mamalia. Aktivitas yang menyimpang dari CDKs adalah ciri khas dari banyak kanker pada manusia. Laju aktivitas kinase pada CDK2 dan CDK1 dapat memproduksi apoptosis sel kanker pada sel normal. Penghambatan CDK2/CDK1 memiliki potensi sebagai antikanker agent dengan jendela terapi yang baik (Fischmann, dkk., 2008). Bentuk kristal dari CDK2 yang terdapat pada [pdb.org](https://www.rcsb.org/structure/2R3J) mengandung inhibitor heterosiklik pirazolopirimidin dan imidazopirimidin rantai bisiklik (3-bromo-5-phenyl-N-(pyridin-3-ylmethyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-amine) ([pdb.org](https://www.rcsb.org/structure/2R3J), kode: 2R3J).

II.3.5 Terapi Farmakologi

Agen spesifik yang digunakan untuk kanker kolon adalah 5-Fluorourasil. Obat ini bekerja dengan menghambat pirimidin pada formasi DNA timidin. 5-fluorourasil umumnya digunakan pada pengobatan adjuvant dan metastatik kanker kolon dan rektum. leucovorin biasa digunakan dengan 5-fluorourasil. leucovorin dapat meningkatkan afinitas dari 5-fluorourasil ke timidin sintase, dengan demikian dapat meningkatkan aktifitas farmakologi dari 5-fluorourasil (Chisholm-Burns, dkk., 2016).

II.3 Virtual Screening

Virtual screening (VS) merupakan penggunaan komputasi berkinerja tinggi untuk menganalisis *database* senyawa kimia untuk mengidentifikasi kandidat obat yang berpotensi memiliki efek terapi. *Virtual Screening* disebut juga penapisan *in silico*, metode komputasi

dengan performa yang tinggi untuk menganalisa suatu set database dari senyawa kimia untuk mengidentifikasi kandidat senyawa obat. Keunggulan dari metode ini ialah mengefisienkan waktu penelitian dibandingkan dengan screening secara farmakologi (Sottriffer, dkk., 2011).

II.3.1 Konsep *Druglikeness* dan *Leadlikeness*

Lipinski mengenalkan aturan yaitu “*rule of five*” dimana aturan ini menjelaskan bahwa ada empat parameter yang harus terkait secara global dengan kelarutan dan permeabilitas, yaitu berat molekul, Log P, jumlah ikatan hidrogen donor dan jumlah ikatan hidrogen akseptor. Parameter ini mewakili sifat fisikokimia dari suatu senyawa kimia. Penyerapan atau permeabilitas yang buruk terjadi bila: ada lebih dari 5 ikatan hidrogen donor (dinyatakan dengan jumlah dari OH dan NH), berat molekul lebih dari 500, Log P lebih dari 5 (atau Mlog P lebih dari 4,15), ada lebih dari 10 ikatan hidrogen akseptor (dinyatakan dengan jumlah dari N dan O), jika dua parameter berada di luar kriteria, maka senyawa tersebut memiliki penyerapan dan permeabilitas yang buruk (Lipinski, dkk., 2012). Kriteria *druglikeness* dan *leadlikeness* dapat dilihat pada Tabel II.1

Tabel II.1 Kriteria *Druglikeness* dan *Leadlikeness*

Sifat	<i>Leadlikeness</i>	<i>Druglikeness</i>
Berat Molekul	≤ 350	≤ 500
Lipofilisitas (cLog P)	$\leq 3,0$	$\leq 5,0$
Donor <i>H-bond</i> (jumlah NH dan OH)	≤ 3	≤ 5
Akseptor H-bond (jumlah N dan O)	≤ 8	≤ 10
<i>Polar Surface Area</i> (PSA)	$\leq 120 \text{\AA}^2$	$\leq 150 \text{\AA}^2$
Jumlah ikatan yang dapat berotasi	≤ 8	≤ 10

II.3.2 Model Farmakofor

Konsep Farmakofor pertamakali diperkenalkan oleh Ehrlich, yang didefinisikan farmakofore sebagai kerangka molekul yang berperan dalam aktivitas biologi obat. Skrining berbasis farmakofor adalah metode skrining virtual yang digunakan untuk mengevaluasi jutaan senyawa secara otomatis oleh program komputer. Ada berbagai aplikasi untuk skrining virtual. Hal ini bisa digunakan untuk mendapatkan senyawa pemimpin (*lead compound*) yang dapat disintesis dari *database* untuk pengembangan obat, atau untuk memprediksi aktivitas biologis baru atau efek samping obat yang ada (Sottriffer, dkk., 2011).

Pharmacophore modelling memberikan fungsi seleksi yang baik dalam *virtual screening* ketika struktur proteinnya tidak diketahui. Seleksi dengan farmakofor juga memberikan hasil yang lebih cepat dibandingkan dengan pendekatan *docking* dan mengalami proses reduksi yang lebih cepat jika jumlah senyawanya cukup banyak dibandingkan dengan simulasi *docking*. *Pharmacophore modelling* juga sering digunakan pada tahapan molekular dari studi molekular HKSA (Vyas, 2008).

II.3.3 Penambatan Molekul

Penambatan molekul (*Molecular Docking*) adalah prosedur komputasi yang digunakan untuk memprediksi ikatan nonkovalen dari makromolekul (reseptor) dan molekul kecil (ligand). Prediksi ikatan antara molekul kecil dan protein sangat penting karena dapat digunakan untuk menyaring molekul mirip obat untuk mendapatkan petunjuk mengenai pengembangan obat lebih lanjut (Trott dan Olson, 2009).

II.3.4 Perangkat Lunak *LigandScout*

LigandScout merupakan perangkat lunak komputer yang digunakan untuk membuat model farmakofor tiga dimensi (3D) dari data struktural makromolekul-ligan, atau dari *training* dan *test set* molekul organik. Menggabungkan beberapa fitur kimia 3D (seperti ikatan hidrogen donor, ikatan hidrogen akseptor, daerah lipofilik, kelompok kimia yang diionkan secara positif dan negatif) untuk menggambarkan interaksi molekul kecil (ligan) dan tempat pengikatan pada makromolekul (Wolber dan Langer, 2005).

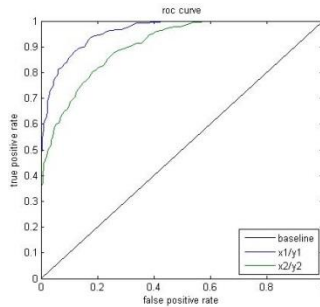
LigandScout 4.0 membuat struktur farmakofor berdasarkan data struktur yang kompleks, dan mengikuti analisis farmakofor yang canggih dan mengatur seleksi farmakofor dengan baik untuk dijadikan target spesifik. Menggunakan aturan presisi farmakofor berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dengan menggunakan metode *pharmacophore modelling*. *LigandScout* 4.0 menyediakan rentang yang besar dari definisi fitur kimia yang termasuk pembawa ikatan hydrogen, kelompok muatan, interaksi struktur aromatic yang mudah terionisasi. Keuntungan dari farmakofor secara 3D ini yaitu mendukung berbagai macam fitur peratom sampai dengan ukuran yang lebih luas dalam model tunggal. Pendekatan ini memungkinkan untuk menampilkan adanya 2 ikatan akseptor hydrogen dan 1 fitur donor hydrogen pada satu atom (Wolber and Langer, 2005).

II.3.5 Validasi dan Parameter *LigandScout* 4.0

Validasi model farmakofor dengan *LigandScout* 4.0 adalah dengan melihat nilai AUC, EF, *Sensitivitas* (Se), *Spesifisitas* (Sp), *Accuracy* (ACC), *Yield of actives* (Ya), *Goodness of Hit-list* (GH) yang memenuhi standar dari hasil rasio antara *active set compound* dan *decoy set compound* yang ditampilkan dalam tampilan kurva ROC. Kurva ROC yang ideal dapat divisualisasikan sebagai garis lurus horizontal kearah sudut kanan atas dimana semua senyawa aktif dan inaktif diambil, yang sesuai dengan spesifisitas dan sensitifitasnya. Dari hasil kurva ROC akan menghasilkan model farmakofor yang baik yang selanjutnya dapat dilanjutkan dalam proses skrining dengan database senyawa uji ini (Braga dan Andrade, 2013).

Tabel II.2 Fitur-Fitur *LigandScout* 4.0

No	Ikon Fitur	Fitur Farmakofoor
1		<i>Hydrogen Bond Donor</i> (Ikatan Donor Hydrogen)
2		<i>Hydrogen Bond Acceptor</i> (Ikatan Akseptor Hidrogen)
3		<i>Positive Ionizable Area</i> (Area Ionisasi Positif)
4		<i>Negative Ionizable Area</i> (Area Ionisasi Negatif)
5		<i>Hydrophobic Interactions</i> (Interaksi Hidrofobik)
6		<i>Aromatic Ring</i> (Cincin Aromatik)
7		<i>Iron Binding Location</i> (Lokasi Ikatan Besi)
8		<i>Zinc Binding Location</i> (Lokasi Ikatan Seng)
9		<i>Magnesium Binding Location</i> (Lokasi Ikatan Magnesium)
10		<i>Excluded Volume</i>



Gambar II.1 Kurva ROC

1) Sensitivitas (Se)

Sensitivitas adalah ukuran untuk usia persen-senyawa yang benar-benar aktif dipilih selama pemutaran. Hal ini didefinisikan sebagai rasio dari senyawa yang diambil benar positif atau true positif (TP) untuk semua senyawa aktif dalam database, yang merupakan jumlah dari TP dan jumlah senyawa negatif palsu atau false negative (FN). Nilai sensitivitas dapat berkisar dari 0 ke 1, di mana $Se = 0$ berarti bahwa pencarian tidak menemukan salah satu aktif dalam database dan $Se = 1$ berarti bahwa pencarian kembali semua senyawa aktif.

$$Se = \frac{TP}{TP + FN}$$

2) Spesifisitas (Sp)

Spesifisitas adalah ukuran untuk fraksi senyawa yang benar-benar aktif yang benar ditolak selama pencarian. Hal ini didefinisikan sebagai jumlah senyawa yang benar-benar negatif ditolak atau true negative (TN) dibagi dengan jumlah TN dan jumlah senyawa positif palsu atau false positive (FP) yang diambil. Spesifisitas berkisar dari

0 sampai 1 dan menunjukkan persentase senyawa yang benar-benar tidak aktif. Oleh karena itu, $Sp = 0$ mendefinisikan skenario terburuk di mana semua *inactives* dipilih oleh kesalahan sebagai aktif, sedangkan $Sp = 1$ berarti bahwa semua senyawa aktif telah benar kembali menolaknya selama proses penyaringan.

$$Sp = \frac{TN}{TN + FP}$$

3) Accuracy (ACC)

Ketepatan menggambarkan persentase molekul yang diklasifikasikan dengan benar oleh protokol skrining.

$$ACC = \frac{TP + TN}{P + N}$$

4) Yield of actives (Ya)

Hasil aktif (Ya) adalah salah satu deskriptor yang paling populer untuk mengevaluasi metode *virtual screening*. Descriptor ini adalah ukuran jumlah senyawa yang diambil benar-benar aktif (TP) di dalam jarak dengan hit.

$$Ya = \frac{TP}{n}$$

5) Goodness of Hit-list (GH)

GH menggabungkan *Sensitivitas*, *spesifisitas*, dan hasil aktif karena itu merupakan tolak ukur yang dapat digunakan untuk evaluasi dari model farmakofor, karena menganggap kedua rasio aktif yang benar dan rasio *inactives* benar. Jumlah senyawa aktif biasanya berbobot lebih tinggi dari aktif di hit-list. Misalnya, Guner berat yang Ya

dengan 3/4 dan Se dengan hanya 1/4. Dengan demikian, nilai yang tinggi dari GH hanya dapat dicapai dengan nilai tinggi aktif dan rendah rasio negatif palsu pada saat yang sama.

$$GH = \left(\frac{3}{4} Ya + \frac{1}{4} Se \right) \cdot Sp$$

6) *Area Under Curve (AUC)*

AUC dapat dihitung sebagai jumlah dari semua persegi panjang yang dibentuk oleh sensitivitas dan spesifisitas dengan nilai untuk ambang batas yang berbeda. Sebuah nilai AUC yang tinggi artinya menunjukkan klasifikasi yang lebih baik. Kinerja sempurna dari skrining secara komputasi memberikan AUC yang baik apabila menunjukkan nilai AUC pada rentang 0,50 = 1,0. Nilai AUC yang kurang dari 0,50 menunjukkan bahwa sejumlah senyawa inaktif lebih tinggi dibandingkan senyawa aktif yang dikenal software (Braga dan Andrade, 2013)

7) *Enrichment factor (EF)*

Pada *LigandScout* 4.0 nilai EF dapat diperoleh nilai EF secara otomatis yang dapat langsung dilihat pada kurva ROC. Nilai EF yang dikatakan valid dan memenuhi syarat ialah $EF > 1.0$ (Braga dan Andrade, 2013).

II.3.7 *Perangkat Lunak PyRx Screening Tools*

PyRx merupakan perangkat lunak skrining virtual untuk penemuan obat secara komputasi yang dapat digunakan untuk menyaring senyawa terhadap target obat yang potensial. PyRx juga mencakup fungsi spreadsheet kimia dan alat visualisasi yang kuat yang penting untuk desain obat berbasis struktur. *Virtual Screening* menggunakan

PyRx dengan melakukan *docking* yang bermanfaat dalam desain obat secara komputasi / *Computer Aided Drug Design* (CADD) PyRx juga berfungsi sebagai mesin visualisasi kuat yang penting untuk desain obat berbasis struktur (pyrx.sourceforge.net) (Dallakyan dan Olson, 2015).

II.3.8 Perangkat Lunak AutoDock

AutoDock adalah seperangkat alat *docking* otomatis. Dirancang untuk memprediksi bagaimana molekul kecil seperti substrat atau kandidat obat berikatan dengan reseptor struktur 3D yang dikenal. AutoDock terdiri dari dua generasi perangkat lunak yaitu AutoDock 4 dan Autodock Vina. Autodock 4 terdiri dari dua program utama yaitu melakukan *docking* ligan ke satu dengan set grid yang menggambarkan protein target dan melakukan pra-perhitungan autogrid terhadap grid. Selain digunakan untuk *docking*, jaringan afinitas atom dapat divisualisasikan sehingga dapat membantu untuk mamandu kimiawan mendesain pengikat yang lebih baik. Pada AutoDock Vina tidak memerlukan pemilihan jenis atom dan pra-kalkulasi peta grid, tetapi perhitungan grid dilakukan secara internal untuk jenis atom yang diperlukan (Sottriffer, dkk., 2011).

II.4 Database dan Dataset

Dalam pengerjaan skrining virtual berbasis farmakofor diperlukan 3 *dataset* dan *database* utama yaitu *active set compound*, *decoy set compound*, dan *database uji* (Ece dan Sevin, 2013). Dalam penelitian ini *database* yang digunakan adalah *database natural product*.

II.4.1 Active Set Compound

Active Set Compound merupakan kumpulan senyawa yang sudah terbukti memiliki aktivitas yang diinginkan dari *database* lain sesuai dengan data yang diinginkan. Cara untuk memilih *active set compound* dapat dilakukan dengan mengakses secara langsung pada ChEMBL. ChEMBL merupakan *database* yang berisi informasi, fungsional dan ADMET untuk sejumlah besar senyawa bioaktif seperti obat. Data aktifitas pada *database* ChEMBL diperoleh dari publikasi ilmiah berbagai jurnal seperti *Journal of Medicinal Chemistry*, *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters* dan *Journal of Natural Product*. ChEMBL dapat diakses pada <http://www.ebi.ac.uk/chembl/db> (Gaulton, dkk., 2012).

II.4.2 Decoy Set Compound

Decoy set compound merupakan dataset yang berisikan senyawa-senyawa yang dianggap tidak aktif terhadap target (tidak akan mungkin mengikat target) dan digunakan untuk memvalidasi kinerja skrining virtual dan *molecular docking*. *Decoy set compound* diperoleh dengan bantuan perangkat lunak penunjang yaitu DecoyFinder (Cereto-Massagué, dkk., 2012).

II.4.3 Database Uji

Database uji merupakan kumpulan data yang telah diatur sedemikian rupa sehingga dapat digunakan untuk memudahkan penggunaannya untuk suatu keperluan analisis. *Database* bisa diperoleh dari *ZINC Natural Product* yang bisa diakses pada zinc.docking.org (Irwin, dkk., 2012).

II.5 Protein Data Bank

Protein data bank (PDB) merupakan satu-satunya arsip dunia yang memuat data protein dalam bentuk 3D, asam nukleat, dan ligan yang membantu dalam penelitian pengembangan obat. Protein yang diperoleh dari *protein data bank* ini dapat digunakan untuk analisis interaksi antara molekul kecil (ligan) atau senyawa obat baru dengan *molecular docking*. Protein dapat diperoleh dengan mengakses www.rcsb.org (Berman, dkk., 2000).