

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Kanker

Kanker adalah suatu kondisi dimana sel-sel abnormal tumbuh di luar kendali pada bagian tubuh tertentu dan dapat menyerang jaringan lain untuk membentuk sel kanker lainnya. Sel kanker bersifat ganas dan dapat menyebabkan kematian. Sel kanker dapat berkembang biak dari semua jenis sel dalam tubuh manusia. Sel kanker menyebar ke organ lain di dalam tubuh melalui jaringan ikat, darah, saraf, dan jaringan pendukung organ di dalam tubuh. Bagian tubuh yang terserang akan menghambat pertumbuhannya (*Dirjen Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan, 2009, t.t.*).

Kanker adalah penyebab kematian nomor dua setelah penyakit kardiovaskular. Jenis-jenis kanker yang utama adalah kanker paru-paru, kanker lambung, kanker kolorektal, kanker hati, kanker payudara, kanker serviks, dll. Lebih dari 70% kematian akibat kanker terjadi di negara yang mempunyai penghasilan rendah hingga sedang dan diperkirakan akan terus mengalami kenaikan sampai dengan 11,5 juta kematian pada tahun 2030. Faktor risiko utama kanker adalah merokok, mengonsumsi alkohol, faktor makanan (kurang memakan sayuran dan buah-buahan), ketidakaktifan fisik, infeksi kronis dari *helicobacter pylori*, virus hepatitis B, virus hepatitis C dan beberapa jenis human papillomavirus (HPV), dan risiko lingkungan pekerjaan yang berhubungan dengan ionisasi dan radiasi (Warganegara & Nur, 2016).

WHO melaporkan jenis kanker terbanyak pada laki-laki di dunia pada tahun 2012, yaitu kanker paru, prostat, kolorektum, kanker perut, dan kanker hati. Sedangkan pada wanita yang terbanyak adalah kanker serviks, payudara, kolorektum, paru-paru, serta kanker perut. Angka kematian akibat kanker lebih tinggi di negara berkembang dibandingkan dengan negara maju. Perbedaan ini disebabkan oleh perbedaan faktor risiko dan keberhasilan penanganan deteksi, serta ketersediaan pengobatan. Kanker paru-paru menjadi penyebab utama kematian akibat kanker di kalangan laki-laki di negara maju maupun negara berkembang. Sedangkan untuk wanita, kanker payudara dan kanker serviks menjadi kematian terbanyak di negara maju dan berkembang (Dewi, 2017).

II.2 Kanker Serviks

Kanker serviks merupakan keganasan yang berada diserviks. Serviks merupakan sepertiga bagian bawah rahim, berbentuk bulat silindris, menonjol dan berhubungan dengan vagina melalui ostium uteri eksternum (*Kemenkes RI, 2019, t.t.*). Kanker serviks atau kanker leher rahim adalah kanker yang terjadi pada wanita yang disebabkan oleh virus HPV (human papillomavirus) (Ocviyanti & Handoko, 2013). Kanker serviks disebabkan oleh infeksi Human

Papilloma Virus (HPV) atau virus papilloma yang ada pada manusia. Virus ini secara keseluruhan kecil dan bisa dilihat dengan alat mikroskop elektron. Beberapa tipe HPV yang menjadi penyebab kanker serviks yaitu tipe 16 dan 18 yang sering dijumpai di negara Indonesia, dan terdapat beberapa tipe lain seperti 31, 33, 45, dll (*Dirjen Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan, 2009*). Penyebab lain dari kanker serviks antara lain aktivitas seksual di usia muda, berhubungan seks dengan banyak pasangan, merokok, memiliki banyak anak, status sosial ekonomi rendah, penggunaan alat kontrasepsi, penyakit menular seksual, dan kekebalan tubuh yang terganggu (*Kemenkes RI, 2019*).

Selain penyebab yang tertera di atas, faktor gen juga turut memengaruhi terjadinya kanker. Rasjidi mengatakan gen merupakan informasi genetika yang diturunkan dari satu generasi ke generasi selanjutnya. (Rio & Sri Tyas Suci, 2017). Pada tahun 2000-an kanker serviks mencapai angka kejadian sebesar 493.243 jiwa per tahun dan sebanyak 80% dari jumlah penderita kanker serviks berasal dari negara berkembang (Wijaya, 2010). Menurut perkiraan Departemen Kesehatan RI saat ini, jumlah wanita penderita baru kanker serviks berkisar 90-100 kasus per 100.000 penduduk dan setiap tahun terjadi 40 ribu kasus kanker serviks (*Kemenkes RI, 2019*). Berdasarkan perkiraan dari Kementerian Kesehatan Republik Indonesia pada tahun 2045 akan terjadi kasus kanker serviks pada wanita Indonesia sebesar 920 ribu (hampir mendekati angka 1 juta kasus).

Terbentuknya lesi menjadi awal pencetus terjadinya kanker, infeksi oleh HPV menyebabkan adanya perubahan morfologi dan pembelahan sel akibat proliferasi yang tidak terkendali dan terhambatnya diferensiasi sel. Karena hal ini terjadinya kanker serviks berkaitan erat dengan siklus sel dengan protein utama adalah E6 dan E7 (Novel dkk., 2010) Mekanisme infeksi pada kanker serviks lebih dititik beratkan pada HPV tipe 16 dan 18, dan beberapa onkoprotein yang terekspresi pada fase awal infeksi yaitu E5, E6, dan E7 sebagai onkoprotein utama pada perkembangan kanker serviks. Setelah virus HPV menyatu ke DNA (*Deoxy ribonucleat Acid*) manusia terjadi peningkatan dari ekspresi E6 dan E7, dimana E6 mencegah aktivasi dari tumor supresor yaitu p53 sedangkan E7 menghambat pRb, yang mengendalikan pembelahan sel dengan menghalangi aktivitas faktor transkripsi, akibat dari meningkatnya sintesis E6 dan E7 induksi E2 terganggu dimana E2 berperan dalam mengatur transkripsi, mengikat dan menahan aktivitas E6 dan E7 dalam sel. Saat E6 dan E7 tidak berikatan dengan E2, E6 bebas untuk berikatan dengan p53 dan E7 berikatan dengan pRb, sehingga p53 dan pRb tidak berfungsi sebagai penekan tumor, tidak berfungsinya p53 memungkinkan sel akan terus membelah tidak terkontrol dan menghasilkan sel dengan fenotip ganas (Ramakrishnan dkk., 2015).

II.3 Enzim Topoisomerase

Topoisomerase adalah enzim yang mengkatalisis kerusakan sementara dan bergabung kembali dengan salah satu untai DNA topoisomerase (I atau II), untuk memungkinkan satu untai melewati yang lain dan mencegah kusut yang tak terpecahkan selama proses seperti replikasi DNA. Kebanyakan inhibitor topoisomerase I dan topoisomerase II menyebabkan peristiwa mutagenik yang terkait proses replikasi (Ferguson & Baguley, 1996). Topoisomerase juga ditemukan di mitokondria sel Mitokondria menghasilkan ATP serta berperan dalam kematian dan penuaan sel terprogram. Kelas topoisomerase yang ditemukan di mitokondria adalah I, II β , III α (Sobek & Boege, 2014)

DNA topoisomerase adalah target obat antikanker dan antibakteri yang penting (Pommier Y dkk., 2010). DNA topoisomerase II (Top2) adalah enzim nukleus yang berperan penting dalam menangani permasalahan topologi DNA yang berasosiasi dengan replikasi DNA, rekombinasi DNA, serta kondensasi kromosom dan segregasi selama fase mitosis. Ada dua jenis isoform dari Top2, yaitu Top2 α dan Top2 β (Auzanneau dkk., 2012). DNA topoisomerase II α (Top2 α) dominan diekspresikan pada sel-sel yang aktif berproliferasi seperti pada sel kanker, berbeda dengan Top2 β yang dominan diekspresikan pada sel-sel yang sedang dalam fase istirahat (Setiawan dkk., 2016). Inhibisi pada Top2 α akan menyebabkan efek antiproliferasi, sedangkan inhibisi pada Top2 β dapat menyebabkan malignansi sekunder. Karena inilah Top2 α sering diteliti untuk dijadikan target obat kanker.

II.4 Terapi dan Pengobatan Anti Kanker Serviks

Kanker serviks dapat menyebar dengan dua cara, yaitu dengan penyebaran secara langsung dan penyebaran melalui kelenjar limfe. Target terapi kanker tidak boleh hanya pada letak tumor, melainkan juga pada jaringan dan kelenjar limfe di sekitar tumor tersebut. Terapi kanker serviks dapat dilakukan dengan histerektomi radikal, limfadenektomi pelvis, radiasi dengan kemoterapi yang sesuai, atau kombinasi dari semuanya (Kemenkes RI, 2019). Secara umum dikenal 3 terapi yang biasa dilakukan untuk penanganan kanker, yaitu

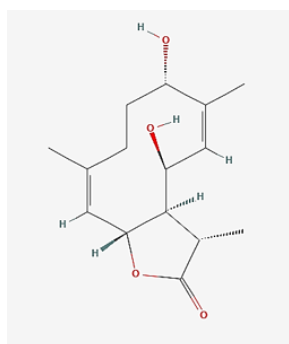
1. Terapi pembedahan digunakan baik dalam diagnosis maupun penentuan stadium tumor. Berdasarkan pengalaman, pembedahan radikal memberikan kemungkinan penyembuhan yang optimal dan tetap menjadi pilihan pada beberapa jenis kanker.
2. Radiasi / Radioterapi, memegang peranan yang penting dalam pengobatan berbagai kanker. Radiasi dapat diberikan sebelum pembedahan sebagai upaya untuk menyusutkan lesi serviks yang sangat besar dan menjadikannya dapat diatasi dengan prosedur pembedahan yang lebih terbatas.

3. Terapi Sitostatika, bekerja dengan mekanisme sebagai berikut, merusak DNA dari sel-sel yang membelah dengan cepat, yang dideteksi oleh jalur p53/Rb, sehingga memicu apoptosis, merusak apparatus spindle, mencegah kejadian pembelahan sel dan menghambat sintesis DNA (Pedoman Teknis Pengendalian Kanker Payudara Kanker Leher Rahim, 2010).

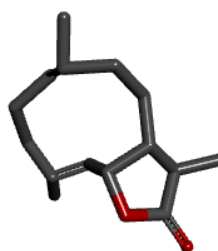
Beberapa jenis obat kemoterapi yang tersedia adalah antagonis folat, analog purin dan pirimidin, obat pengalkilasi (alkylating agent) bekerja dengan merusak DNA obat yang termasuk golongan ini adalah siklofosamid, melfalan dan platina, obat yang dapat berinteraksi dengan topoisomerase I dan topoisomerase II mengadakan interkalasi dengan DNA untai ganda dan membentuk kompleks dengan topoisomerase II yang mudah membelah, alkaloid dan takson menghambat fungsi mikrotubulus dan mengganggu mitosis contohnya adalah alkaloid vinka dan takson. Pengobatan kemoterapi pada kanker serviks dapat berupa pemberian sitostatika tunggal atau kombinasi (Fidinillah & Karuniawati, 2021).

II.5 Senyawa Germacranolide

Germacranolide merupakan isolat dari tanaman *A. garcinii* dari senyawa turunan garcinamine (Valls dkk., 2006). *A. garcinii* merupakan genus terkecil dari keluarga Asteraceae. Tanaman Asteraceae terkenal dengan efek biologis dan farmakologisnya yang sebagian besar disebabkan oleh keberadaan fitokimia yang termasuk dalam kelas polifenol, flavonoid, dan terpenoid. Garcinamine memiliki rumus molekul $C_{15}H_{22}O_4$, dengan berat molekul 266,33.



(Struktur 2D)



(Struktur 3D)

Gambar II. 1 Struktur Germacranolide 2D dan 3D

Flavonoid dan lakton seskuiterpen telah menjadi kelas utama metabolit sekunder yang diperoleh melalui studi fitokimia pada *A. garcinii*. Pada penelitian sebelumnya pada tanaman ini mengungkapkan adanya *lakton seskuiterpen* dari jenis *guaianolide* dan *germacranolide*, yang termasuk aditif asam amino yang sesuai, serta beberapa glikosida flavonoid. Kelas lakton seskuiterpen *Anvillea* didominasi oleh turunan dengan kerangka partenolida, germacranolides

diberkahi dengan aktivitas biologis yang signifikan pada kanker dan peradangan, serta gangguan metabolisme.

II.6 Pencarian Senyawa Obat Baru

Diprediksikan penemuan senyawa obat baru sampai pada uji klinik dibutuhkan waktu sekitar lebih dari 14 tahun. Rentang waktu ini lebih cepat daripada penemuan obat baru di masa lampau yang dapat menghabiskan waktu sampai berpuluh-puluh bahkan ratusan tahun. Rentang waktu tersebut dapat dipercepat sebab teknologi yang terus berkembang saat ini. Teknologi yang dikembangkan adalah CADD (*Computer Aided Drug Design*) yang mendorong pengembangan obat berdasarkan informasi obat dan penyakit yang sudah ada (*Structure Base Drug Design* dan *Ligand Base Drug Design*), dikombinasikan dengan masukan dari berbagai disiplin ilmu yang menjadi acuan (Suhud, 2015).

Pencarian senyawa obat baru dimulai dengan identifikasi dan produksi senyawa aktif baru yang disebut senyawa induk atau senyawa penuntun (*lead compound*). Senyawa tersebut dapat diperoleh dari sintesis kimia, isolasi sumber bahan alam atau dari proses bioteknologi. Selanjutnya optimasi senyawa induk sintesis dimodifikasi agar diperoleh senyawa yang lebih potensial, lebih selektif dan efek toksik yang minimal. Pada tahapan ini dilakukan juga penentuan dan analisis hubungan struktur dengan aktivitas biologik senyawa-senyawa hasil modifikasi. Setelah tahapan tersebut dilakukan optimasi proses sintesis dalam jumlah besar senyawa terpilih dan modifikasi untuk sifat farmakokinetik dan farmasetik agar menjadi lebih sesuai untuk pemakaian klinik. (Wermuth, C. G, 2015)

Sebagian besar pendekatan pencarian kesamaan senyawa untuk senyawa baru hanya membutuhkan struktur referensi tunggal dari senyawa induk (*lead compound*), mengambil struktur yang berisi sekumpulan fitur farmakofor yang sudah ditentukan, Dalam pemetaan dinamis fitur posisi yang sudah disepakati dan disetujui dipilih dengan menemukan posisi umum dalam string bit untuk semua senyawa aktif. Algoritma DMC senyawa skala potensi untuk modifikasi DMC dimana aktivitas senyawa diperhitungkan dan dua metode diakhir dapat dianggap sebagai penengah antara pencarian kesamaan kelaziman atau konvensional dan pendekatan SAR probabilistik (Batista, Godden, & Bajorath, 2006).

II.7 Sumber Dataset dan Database

Database merupakan kumpulan senyawa aktif yang diatur untuk digunakan dalam virtual skrinning untuk memperbanyak senyawa bioaktif dan memudahkan penggunaannya untuk analisis (Syahdi dkk., 2012). Database uji merupakan kumpulan data yang telah diatur sehingga dapat digunakan untuk keperluan analisis. Database terdapat basis dari small molecules global,

seperti PubChem (NCBI), *COCONUT and Natural Products* (Universitas Friedrich-Schiller), ZINC (Shoichet Lab, UCSF), dan drugbank (University of Alberta). Basis data senyawa tanaman obat Indonesia telah dibuat oleh beberapa sumber seperti yang disusun LIPI, IPTEK.net (Yanuar dkk., 2011).

Versi baru basis data ZINC mencakup lebih dari 100 juta senyawa yang dapat diakses dalam format 3D, data ini disediakan oleh Laboratorium Shoichet di Departemen Kimia Farmasi di Universitas California, San Francisco (UCSF) (“Directory of in silico Drug Design tools,” 2018). Database diperoleh dari ZINC Natural Product yang terhitung terdapat 270547 Database Natural Product. Database diunduh pada <http://www.zinc.docking.org> dengan format yang beragam termasuk SMILES, *.mol2, 3D SDF, dan format DOCK (Irwin, 2005).

Dataset adalah kumpulan data dari senyawa aktif dan tidak aktif yang disajikan dan digunakan untuk virtual screening berguna untuk memperbanyak senyawa aktif biologis baru yang mengandung molekul aktif dan tidak aktif digunakan untuk perkembangan (Tran-Nguyen dkk., 2020). Decoy set compound merupakan dataset yang berisikan senyawa-senyawa yang sudah dipastikan tidak memiliki aktivitas sebagai obat yang diinginkan (Cereto-Massagué dkk., 2012). Dalam metode model farmakofor diperlukan tiga database utama yaitu *active set compound*, *decoy set compound* dan database uji untuk pengerjaan virtual skrining.

II.8 Active Set Compound

Active set compound adalah senyawa yang sudah terbukti aktif dan memiliki aktivitas yang diinginkan dari database lain sesuai dengan data yang diinginkan. Untuk memilih *active set compound* yaitu dengan mengaksesnya secara langsung pada ChEMBL (Gaulton dkk., 2012). Pada pembuatan dataset untuk senyawa aktif diambil dari ChEMBL, dimana database dengan data bioaktivitas terbesar di dunia, sebagian besar diekstraksi secara manual dari literatur kimia kedokteran (Papadatos, 2014).

Active set compound dibuat dengan cara memilih senyawa-senyawa yang sudah terbukti memiliki aktivitas yang diinginkan dari database sesuai dengan data yang diinginkan, salah satu pemilihannya yaitu dengan mengaksesnya secara langsung pada ChEMBL. ChEMBL merupakan database bioaktivitas terbesar untuk penemuan obat yang mengandung informasi, kegunaan atau fungsional, dan ADMET (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion dan Toxicology) untuk sejumlah besar senyawa bioaktif seperti obat (Bento dkk., 2014).

ChEMBL dibuat dengan tujuan untuk menjembatani keterbatasan data-data bioaktifitas dari jurnal dengan menyediakan cakupan yang luas di seluruh rangkaian target organisme, dan pengukuran bioaktifitas yang dilaporkan dalam literatur ilmiah dengan berbagai kemampuan pencarian yang mudah diakses oleh pengguna dan dapat diakses pada

<http://www.ebi.ac.uk/chembl> (Bento dkk., 2014). Pada ChEMBL, dipilih kelompok senyawa yang memiliki aktivitas yang sudah terbukti aktif berdasarkan keterangan aktifitas yang dilihat pada dokumen terpilih dan diunduh dalam format *.xlsx agar dapat dibaca melalui Microsoft Office Excel.

II.9 Decoy Set Compound

Decoy set compound ini dapat diperoleh dari perangkat lunak DcoyFinder dari situs web (<http://dude.docking.org>) yang dimana berisikan dataset dari senyawa yang sudah dipastikan tidak memiliki aktivitas dan sudah tidak aktif sebagai senyawa obat yang diinginkan. (Cereto-Massagué dkk., 2012).

DecoyFinder alat untuk menemukan kumpulan molekul umpan untuk kelompok ligan aktif tertentu dengan menemukan molekul yang memiliki ikatan rotasi, akseptor secara kimiawi berbeda, ditentukan oleh ambang nilai tanimoto maksimum antara ligan aktif dan molekul umpan MACCS sidik jari. Secara opsional ambang nilai maksimum tanimoto dapat diatur diantara umpan untuk memastikan keragaman bahan kimia dalam rangkaian umpan (Adrià dkk., 2012).

Algoritma yang digunakan oleh DecoyFinder untuk mencari set umpan akan dijelaskan secara rinci dan penerapannya di jelaskan dan dibahas. Evaluasi kapasitas untuk memisahkan senyawa aktif dari umpan adalah metrik kinerja penting yang terkait dengan docking molekuler atau alur kerja penyaringan virtual. *Directory of Useful Decoys* (DUD) dan versi yang disempurnakan (DUD-E) memberikan tolak ukur untuk docking molekuler. DecoyFinder dirilis untuk mengkompensasi keterbatasan DUD atau DUD-E untuk membuat set umpan khusus target (Wang dkk., 2016).

II.10 Database Uji

Data senyawa aktif atau disebut dengan database yang dapat diatur sedemikian rupa dalam virtual skrining untuk memperbanyak senyawa aktif biologis dan keperluan analisis salah satunya untuk penggunaan basis data adalah Protein Data Bank untuk dapat memudahkan dalam analisis dapat menggunakan sekumpulan data yang mudah diatur (Marchand-Maillet dkk., 2018).

Database natural Product yaitu terdiri dari AfroDB sebagai database senyawa alami, AnalytiCon Discovery NP untuk mengembangkan database senyawa, Herbal Ingredients In-Vivo Metabolism memberikan informasi mengenai desain obat, farmakognosi, metabolisme obat dan lain sebagainya, Herbal Ingredients Targets merupakan database yang komprehensif

dan terakurasi untuk melengkapi sumber protein target sebagai obat yang disetujui FDA, IBScreen NP, Indofine

Database uji merupakan kumpulan data yang telah diatur sehingga dapat digunakan untuk keperluan analisis. Database dapat diperoleh dari ZINC Natural Product yang terhitung terdapat 270547 Database Natural Product. Dapat diunduh pada <http://www.zinc.docking.org> dengan format yang beragam termasuk SMILES, *.mol2, 3D SDF, dan format DOCK (Irwin, 2005). Masing-masing database Natural Product berasal dari negara yang berbeda-beda dan berisikan senyawa alami yang berasal dari tumbuh-tumbuhan. Dalam pengerjaan virtual skrining berbasis farmakofor modelling diperlukan 3 dataset dan database utama yaitu senyawa aktif, senyawa pengecoh dan database uji.

II.11 Protein Data Bank

Protein Data Bank (PDB) adalah basis data untuk data struktural tiga dimensi dari molekul biologis besar, seperti protein dan asam nukleat. PDB didirikan oleh Brookhaven National Laboratories (BNL) pada tahun 1971 (Berman dkk., 2000). Data PDB biasanya diperoleh dengan kristalografi sinar-X, spektroskopi NMR, *cryo-electron microscopy*, dan diserahkan oleh ahli biologi dan ahli biokimia dari seluruh dunia, dapat diakses secara bebas di Internet melalui situs web organisasi anggotanya (PDBe, PDBj, RCSB dan BMRB). PDB diawasi oleh organisasi bernama *Worldwide Protein Data Bank*, wwPDB. *Protein Data Bank* dapat diakses pada (PDB: <http://www.pdb.org>) (Consortium, 2018).

RCSB protein data bank merupakan website yang mengembangkan analisis, alat visualisasi, penjelasam, sumber daya dengan arsip PDB. Data PDB dibuat dengan RCSB PDB database dengan informasi komputasi untuk memberikan gambaran structural biologi. RCSB PDB database di situs (RCSB PDB, <http://www.rcsb.org>). (Rose dkk., 2015). Informasi utama yang disimpan dalam PDB terdiri dari file koordinat untuk molekul biologis. File-file ini mencantumkan atom di setiap protein, dan lokasi 3D. File-file ini tersedia dalam beberapa format (PDB, mmCIF, XML). File berformat PDB mencakup protein, informasi kutipan, dan detail solusi struktur, diikuti dengan urutan dan daftar panjang atom dan koordinatnya. Format tersebut juga berisi pengamatan eksperimental yang digunakan untuk menentukan koordinat atom tersebut ("PDB101," 2023).

II.12 Perangkat Lunak untuk Virtual Skinning

II.12.1 Pharmagist

PharmaGist adalah server web yang tersedia secara gratis untuk deteksi farmakofor. Metode yang digunakan adalah berbasis ligan, sehingga tidak memerlukan struktur reseptor target. Input yang diperlukan dalam server web ini adalah sekumpulan struktur molekul mirip obat yang diketahui berikatan dengan reseptor. Kandidat farmakofor dihitung dengan beberapa penyelarasan fleksibel dari ligan masukan.

Pharmagist bertujuan untuk mendeteksi farmakofor 3D yang berikatan dengan reseptor, secara efisien mencari farmakofor dengan skor tertinggi, farmakofor dideteksi dengan penjajaran fleksibel ganda dari ligan input, dimana fleksibilitas ligan diperlukan secara eksplisit dan dengan cara deterministik dalam proses penyelarasan dapat kita buka di web (*Pharmagist*: <http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PharmaGist/php.php>). Metode ini sangat efisien, dimana proses tipikal hingga 32 molekul mirip obat hanya membutuhkan waktu beberapa detik hingga beberapa menit pada PC standar. Karakteristik penting lainnya dari metode ini adalah kemampuan mendeteksi farmakofor yang digunakan bersama oleh himpunan bagian yang berbeda dari molekul masukan. Kemampuan ini merupakan keunggulan utama saat ligan memiliki mode pengikatan yang berbeda atau saat input berisi outlier. (Schneidman-Duhovny dkk., 2008)

Kinerja PharmaGist untuk skrinning virtual berhasil dievaluasi pada kumpulan data G-Protein Coupled Receptor alpha1A yang umum digunakan. Selain itu, evaluasi skala besar menggunakan kumpulan data DUD (*directory of useful decoys*) telah dilakukan. DUD mengandung 2950 ligan aktif untuk 40 reseptor berbeda, dengan 36 senyawa umpan untuk setiap ligan aktif. Tingkat pengayaan PharmaGist sebanding dengan alat canggih lainnya untuk penyaringan virtual (Schneidman-Duhovny dkk., 2008).

II.13 Virtual Screening

Virtual screening merupakan metode komputasi performa tinggi yang digunakan untuk menganalisa suatu set database dan senyawa kimia untuk mengidentifikasi kandidat senyawa obat. Metode ini mengurangi biaya penelitian dan mengefisienkan waktu dibandingkan dengan screening secara farmakologi (Tang & Marshall, 2011). *Virtual screening* digunakan untuk menggambarkan proses analisis komputasi dari kumpulan senyawa besar untuk memprioritaskan senyawa yang disintesis atau untuk pengujian (Vyas dkk., 2008).

Virtual screening bagian dari kimia komputasi (*in silico*). Kimia komputasi adalah cabang kimia yang menggunakan hasil kimia teori yang diterjemahkan ke dalam program komputer untuk menghitung sifat-sifat molekul dan perubahannya maupun melakukan simulasi terhadap

sistem-sistem besar (makromolekul seperti protein atau sistem banyak molekul seperti gas, cairan, padatan, dan kristal cair), dan menerapkan program tersebut pada sistem kimia nyata (Intan, 2011).

Virtual screening atau *in silico* screening bertujuan untuk mencari senyawa pemandu dengan mereduksi sejumlah besar senyawa kimia untuk dilihat interaksinya terhadap protein target tertentu. Pada penerapannya dibatasi oleh sifat-sifat dari senyawa yang dapat dihitung secara komputasi. Sehingga perlu dilakukan pertimbangan lebih lanjut pada perhitungan untuk database yang cukup besar atau mencapai satu juta senyawa (Vyas dkk., 2008).

II.14 Jenis-jenis Virtual Screening

II.14.1 Virtual Screening Berbasis Pharmacophore

Farmakofor merupakan gugus fungsi dari struktur kimia yang dapat memberikan interaksi pada ligand makromolekulnya yang berperan dalam mekanisme kerja senyawa tersebut. Pencarian struktur kimia tersebut dalam database molekul yang besar dapat membantu dalam mencari kandidat senyawa obat baru dalam upaya pengembangan struktur pemandu. Beberapa hal lain yang juga perlu dipertimbangkan ialah pemilihan senyawa aktif yang memberikan hipotesis farmakofor secara umum ialah menyeimbangkan set data, pengklasifikasian data pada training set yang benar, menyesuaikan dan mengelompokkan decoy set compound, model validasi, dan evaluasi seluruh performa komponen yang digunakan dalam permodelan farmakofor (Braga & Andrade, 2013).

Model farmakofor merupakan metode *virtual screening* yang digunakan untuk mengevaluasi jutaan senyawa dengan komputer yang bertujuan untuk membentuk fitur interaksi ligan-protein yang paling penting untuk mengikat dan aktivitas biologis dan metode berbasis ligan yang tidak memerlukan informasi struktural tentang target tetapi menggunakan data yang dihasilkan dari pengujian molekul dalam biokimia atau tes fungsional dari target yang sesuai dengan model empiris yang menghubungkan atribut senyawa untuk diuji hasil (Liu dkk., 2018).

Model farmakofor bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa yang mengandung perbedaan scaffold, tapi dengan susunan yang serupa dengan 3D dari interaksi gugus fungsi yang biasa disebut sebagai fitur farmakofor (Vuorinen & Schuster, 2015). Model farmakofor juga sering digunakan pada tahapan studi molekular dari HKSA (de Campos & de Melo, 2014). Program yang biasanya digunakan ialah Discovery Studio Catalyst, GALAHADI GASP, PHASE, LigandScout, dan MOE. Perangkat - perangkat lunak tersebut memiliki penilaian yang baik dalam kegunaannya dibidang virtual skrinning (Waltenberger dkk., 2011).

II.14.2 Virtual Screening Berbasis Ligan

Ligand based merupakan metode komputasi yang digunakan untuk menggambarkan interaksi antara suatu molekul sebagai ligan dengan suatu reseptor atau protein. Reseptor atau target pada proses *docking* dapat diperoleh dari hasil eksperimen seperti NMR dan kristalografi sinar X ataupun homologi modeling. Secara umum, tujuan dari studi *docking* adalah membuat pemodelan struktur yang akurat dan prediksi aktivitas yang tepat (Reddy dkk., 2007).

Ligand based virtual screening bertujuan untuk menemukan kandidat suatu obat menggunakan model farmakofor. LBVS dipilih ketika tidak ada struktur tiga dimensi (3D) dari protein target yang tersedia. Metode LBVS menggambarkan interaksi antara suatu molekul sebagai ligan dengan suatu reseptor atau protein (Reddy dkk., 2007). Metode virtual skrining berbasis ligan meliputi pendekatan seperti kesamaan dan pencarian substruktur, hubungan aktivitas struktur kuantitatif (QSAR), pemetaan farmakofor.

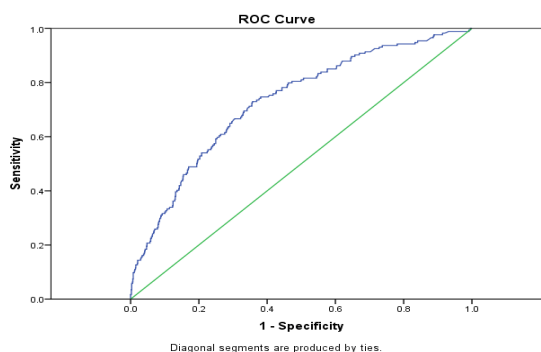
Farmakofor berbasis ligan biasanya digunakan ketika kristalografi struktur larutan atau struktur cetakan protein tidak dapat diperoleh. Ketika satu set senyawa aktif diketahui dan dihipotesiskan bahwa semua senyawa mengikat dengan cara yang mirip dengan protein, maka kelompok umum harus berinteraksi dengan residu protein yang sama. Dengan demikian, farmakofor yang menangkap fitur senyawa ini harus dapat diidentifikasi dari senyawa baru basis data yang mengikat ke situs yang sama dari protein seperti yang dilakukan senyawa yang dikenal (Geppert dkk., 2012).

II.15 Validasi Virtual Skrining Berbasis Farmakofor

Validasi Virtual Screening dapat diverifikasi dengan beberapa parameter. Hal ini bertujuan untuk mengevaluasi atau memverifikasi apakah protein yang dihasilkan dapat mereproduksi hasil data eksperimen kompleks ligan-reseptor. Parameter tersebut diantaranya Receiver Operating Characteristic (ROC), Area Under the Curve ROC (AUC-ROC) (Flach and Wu, 2005; Trott and Olson, 2009), Enrichment Factors (EFs) (Truchon and Bayly, 2007), Sensitivitas (Se), Spesifitas (Sp), dan Accuracy (ACC).

1. Kurva AUC-ROC adalah pengukuran kinerja klasifikasi berbagai pengaturan ambang batas. ROC adalah kurva probabilitas dan AUC mewakili tingkat keterpisahan. Semakin tinggi nilai AUC semakin baik model dalam prediksi kurva semua senyawa tidak aktif dengan yang aktif diambil sesuai dengan spesifisitas dengan sensitifitas. Senyawa hit, nilai AUC dan EF serta kurva plot hasil validasi yang dapat dikenali aplikasi (Arba Muhammad, 2020). TPC dan decoy digunakan untuk membuat kurva ROC dan AUC-ROC. TPC adalah senyawa dengan aktivitas biologis yang diketahui untuk target molekuler yang diinginkan. Sedangkan decoy adalah senyawa yang memiliki sifat fisik

yang mirip dengan TPC tetapi memiliki struktur kimia berbeda yang membuatnya tidak aktif. Semakin besar nilai AUC, maka semakin baik kemampuan untuk memiliki TPC dan semakin sedikit FPC.



Gambar II. 2 Kurva ROC

2. Faktor Pengayaan/*Enrichment Factor* (EF) merupakan salah satu parameter yang paling banyak digunakan dalam validasi virtual screening (Lopes et al., 2017; Mishra & Basu, 2013). EF adalah ukuran dari berapa banyak lagi yang aktif dalam fraksi pengenalan awal (Mishra & Basu, 2013). Metode yang paling umum dan paling sederhana adalah menghitung pengayaan dengan persentase tertentu dari database yang disaring. EF yang digunakan adalah EF 1%, 10%, dan 20% dengan nilai EF yang dapat diterima yaitu >1 (Yanuar, 2012).
3. Sensitivitas atau kepekaan merupakan ukuran untuk persentase dari senyawa yang benar-benar aktif yang dipilih selama penyaringan. Didefinisikan sebagai rasio dari senyawa positif sejati yang diambil (TP) untuk semua senyawa aktif dalam database, yang merupakan jumlah TP dan jumlah senyawa negatif palsu (FN) dan dirangkum sebagai proporsi dengan benar klasifikasi pengamatan positif. Kepekaan nilai dapat berkisar dari 0 hingga 1. Dimana $Se = 0$ berarti bahwa pencarian tidak menemukan salah satu dari senyawa aktif dalam database dan $Se = 1$ berarti pencarian menemukan semua senyawa aktif.

$$Se = \frac{HA}{A}$$

4. Spesifitas (Sp) merupakan ukuran untuk fraksi dari senyawa yang benar-benar tidak aktif ditolak dengan benar pada saat *virtual screening*. Didefinisikan sebagai jumlah yang yang ditolak senyawa negatif (TN) dibagi dengan jumlah TN dan jumlah senyawa positif palsu yang didapat (FP). Kekhususan berkisar dari 0 hingga 1 dan menunjukkan persentase senyawa yang benar-benar tidak aktif. Spesifitas dapat berkisar dari 0 hingga

1. Dimana $Sp = 0$ menentukan skenario terburuk di mana semua *inactives* dipilih oleh kesalahan sebagai aktif, sedangkan $Sp = 1$ berarti semua senyawa tidak aktif telah ditolak dengan benar selama proses penyaringan.

$$Sp = 1 - \frac{Ht - Ha}{D - A}$$

5. *Yield of actives* (Ya), Hasil aktif (Ya) adalah salah satu deskriptor yang paling populer untuk mengevaluasi metode virtual screening. Ya menunjukkan senyawa positif sejati yang diambil (Ha) dalam kaitannya dengan jumlah hit yang diperoleh (Ht).

$$Ya = \frac{Ha}{Ht}$$

6. *Accuracy* (ACC) adalah menggambarkan persentase molekul yang diklasifikasikan dengan benar.

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

II.16 Penambatan Molekul (Docking)

Molecular docking adalah suatu desain obat dan biologi molekuler struktural dengan bantuan komputer. Tujuannya untuk memprediksi model pengikatan dan interaksi dari ligan dengan protein struktur tiga dimensi yang dikenal (Liu dkk., 2018). *Docking* dapat digunakan untuk melakukan *virtual screening* pada pustaka besar senyawa, memberi peringkat hasil, dan mengusulkan hipotesis struktural tentang ligan yang menghambat target. Proses *docking* dilakukan dengan berbagai persiapan perangkat lunak komputer seperti *Autodock* dan *Autodock Vina*. Penggunaan software PyRx untuk menjalankan virtual skrining dari platform apapun sehingga membantu dalam setiap langkah dari proses ini, bermanfaat dalam mendesain obat secara komputasi juga sebagai mesin visualisasi kuat yang penting untuk mendesain obat berbasis struktural. Penemuan obat secara komputasi yang dapat menyaring perpustakaan senyawa terhadap sasaran obat yang potensial dapat diunduh dalam web situs (PyRx : <http://pyrx.sourceforge.net>) (Dallakyan & Olson, 2015). *Vina wizard* berbeda dengan *docking* yang terlebih dahulu digunakan yaitu *Vina Wizard* karena memiliki tingkat akurasi yang baik. Kemudian *autodock wizard* untuk mendapatkan senyawa yang lebih baik lagi (Ramírez & Caballero, 2018)

Docking melakukan algoritma pencarian di mana konformasi ligan dievaluasi secara berulang sehingga energi minimum dapat tercapai. Akhirnya, fungsi penilaian afinitas digunakan untuk memeringkat pose kandidat sebagai jumlah energi elektrostatik dan energi van der Waals

(Pagadala dkk., 2017). Metode ini dapat membatasi jumlah senyawa yang akan dievaluasi oleh HTS (*High Throughput Screening*) ke subset molekul yang menghasilkan “hit” ketika disaring. Virtual skrining dapat mengidentifikasi senyawa “hit” yang berpotensi. Docking virtual skrining berbasis struktur melibatkan ligan dan target protein atau reseptor untuk dapat memperkirakan afinitas ikatan ligan dan reseptor melalui penilaian (Zhao dkk., 2009).

II.17 Validasi Prosedur Penambatan Molekul (Docking)

Validasi metode merupakan salah satu bentuk evaluasi parameter tertentu yang dilakukan berdasarkan uji laboratorium sehingga parameter tersebut dapat dikatakan memenuhi persyaratan untuk menggunakannya. Validasi ini bertujuan untuk menunjukkan bahwa perangkat lunak pada program komputer dapat digunakan untuk simulasi docking atau penambatan molekul. Validasi docking pada aplikasi AutoDock dilakukan dengan cara redocking atau menambatkan ulang ligan alami terhadap protein target. Bentuk dan interaksi ligan terjadi dalam susunan grid box. Validasi dikatakan telah valid jika hasil redocking yang dilakukan pada posisi terbaik memperoleh nilai $RMSD < 2\text{\AA}$

RMSD digunakan untuk mengukur kesamaan koordinat dalam struktur 3D. RMSD biasa digunakan untuk mengukur kesamaan antara dua atau lebih molekul. Dalam docking, RMSD berguna untuk menyelidiki konfigurasi vektor suatu ligan ketika berikatan dengan makromolekul dengan mengamati overlap atau tumpang tindih hasil redocking. Semakin kecil nilai RMSD yang dihasilkan, maka semakin baik kesesuaian model struktur dengan struktur yang diinginkan. Setelah validasi, dilakukan penambatan ligan uji. Interpretasi hasil penambatan ligan uji berdasarkan pada nilai konstanta inhibisi (K_i) dan energi bebas ikatan (ΔG). Keduanya mengacu pada afinitas pengikatan dan analisis interaksi pengikatan antara ligan dan reseptor target.

Kecenderungan atau kekuatan dari suatu ikatan dapat dikatakan sebagai afinitas dari ligan terhadap suatu reseptor atau enzim. Dapat ditentukan dengan melihat nilai ΔG binding affinity (kkal/mol) yang dihasilkan pada saat terbentuknya kompleks protein-ligan. Afinitas yang tinggi dari suatu ligan terhadap protein dihasilkan dari besarnya gaya intermolekuler antara ligan dengan protein tersebut. Sedangkan afinitas yang rendah dari suatu ligan terhadap protein dihasilkan dari kecilnya suatu gaya intermolekuler antara kompleks protein-ligan tersebut.

Kekuatan suatu ikatan dapat digambarkan sebagai afinitas ligan terhadap suatu enzim atau reseptor. Hal ini dapat ditentukan dengan mempertimbangkan nilai afinitas pengikatan ΔG (kkal/mol) yang terbentuk ketika kompleks protein-ligan terbentuk. Tingginya afinitas ligan terhadap protein disebabkan oleh gaya antarmolekul yang besar antara ligan dan protein. Pada saat yang sama, rendahnya afinitas ligan terhadap protein disebabkan oleh rendahnya gaya

intermolekuler antara kompleks protein dengan ligan. Nilai energi bebas ikatan (ΔG binding) dapat diasumsikan dengan kesetimbangan termodinamika yang berupa pembentukan kompleks antara protein dan ligan [EI] dengan menggunakan konstanta aktivitas biologis (KA). Nilai energi bebas ikatan (ΔG binding) dan konstanta inhibitor (K_i) berhubungan berdasarkan persamaan termodinamika berikut (Kitchen dkk., 2004). Berdasarkan persamaan ini, diperoleh bahwa semakin kecil nilai ΔG , maka ikatan kompleks antara protein dan ligan akan semakin besar atau kuat. Hal ini dapat disebabkan oleh kekuatan dan kestabilan interaksi dari ikatan non-kovalen yang terjadi pada kompleks protein dan ligan. Hal itu dapat dilihat dari besarnya energi bebas ikatan yang dilepaskan ketika interaksi terbentuk pada kompleks protein dan ligan.