

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

II.1. Penyakit Parkinson

Penyakit Parkinson adalah kondisi neurodegeneratif progresif yang dihasilkan dari kematian sel dopaminergik dari substantia nigra di otak (*Joint Formulary Committee*, 2018). Penyakit Parkinson terjadi karena penurunan kadar dopamin yang masif akibat kematian neuron di *substantia nigra pars compacta* (SNc). Kerusakan progresif lebih dari 60% pada neuron dopaminergik substantia nigra merupakan faktor dasar munculnya penyakit Parkinson (Gunawan et al., 2017).

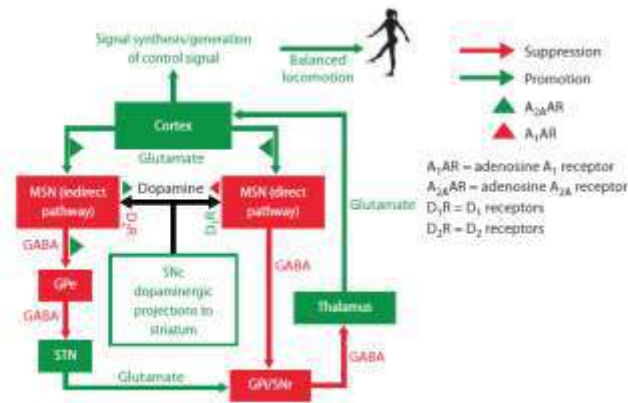
II.1.1. Etiologi

Penyebab dari penyakit Parkinson pada sebagian besar kasus yang diidentifikasi belum diketahui. Anggota pada keluarga tingkat pertama dari pasien yang terkena penyakit Parkinson memiliki risiko terkena 2 hingga 3 kali lipat (Sveinbjornsdottir et al., 2000; Savica et al., 2016).

Meskipun penyakit Parkinson masih jarang terjadi, genetika dapat menjadi salah satu faktor risiko untuk penyakit Parkinson (Rana et al., 2013). Penelitian epidemiologis mengaitkan faktor lingkungan yang dapat mempengaruhi risiko penyakit, seperti pada perokok, konsumsi alkohol, paparan vitamin D dan kadar asam urat (Kalia & Lang, 2015).

II.1.2. Patofisiologi

Dalam SNc, dua ciri histopatologis yang khas dari penyakit Parkinson ialah depigmentasi neuron penghasil dopamin (yaitu, hilangnya neuron SNc) dan keberadaan badan Lewy (agregat filamen sitoplasma neuron yang terdiri dari protein presinaptik α -synuclein) dalam neuron SNc yang tersisa. Kehilangan neuron dopamin nigrostriatal presinaptik dapat menghambat aktivitas thalamus dan mengurangi aktivasi korteks motorik (Dipiro et al., 2008).

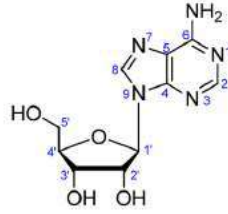


Gambar 2.1. Distribusi neurotransmitter pada siklus motorik (Kulisevsky & Poyurovsky, 2012)

Pada penyakit Parkinson terjadi degenerasi pada SNc dan neuron dopaminergik di nigrostriatal, sehingga tidak ada rangsangan terhadap reseptor D₁ (eksitasi) dan D₂ (inhibisi). Reseptor D₂ (inhibisi) tidak teraktivasi, sehingga jalur tidak langsung dari putamen ke GPe (*globus pallidus pars external*) tidak ada yang menghambat yang mengakibatkan inhibisi terhadap GPe berlebihan. Reseptor adenosin A_{2A} terlokalisasi dengan reseptor dopamin D₂ pada jalur neuron tidak langsung, dimana stimulasi reseptor adenosin A_{2A} merangsang pelepasan GABA, sedangkan stimulasi reseptor dopamin D₂ menghambat pelepasan GABA di globus pallidus. Fungsi inhibisi pelepasan GABA dari GPe ke STN (*subthalamic nucleus*) melemah dikarenakan reseptor D₂ tidak terstimulasi, sehingga kegiatan STN meningkat. Peningkatan STN diteruskan ke GPi (*globus pallidus pars internal*)/ SNr (*substantia nigra pars reticulata*) melalui glutamatergik sehingga aktivitasnya meningkat. Hal ini mengakibatkan output ganglia basalis yang bersifat GABAergik (inhibisi) meningkat ke thalamus, sehingga rangsangan dari thalamus ke korteks menurun menyebabkan proyeksi ke neuron motorik dan medula spinalis juga melemah dan terjadi hipokinesia/ sindroma Parkinson (Kulisevsky & Poyurovsky, 2012).

II.2. Reseptor Adenosin

Adenosin adalah mediator biologis kuat yang mempengaruhi banyak jenis sel, termasuk sel-sel neuron, trombosit, neutrofil, dan sel-sel otot polos. Adenosin merupakan salah satu neuromodulator terpenting tubuh manusia di sistem saraf pusat dan perifer (Ruiz et al., 2013).



Gambar 2.2. Struktur adenosin (Ruiz et al., 2013)

Reseptor adenosin ditemukan pada tahun 1970-an, berdasarkan efek antagonis dari kafein. Reseptor adenosin dapat dibedakan berdasarkan jalur pensinyalan yang mereka aktifkan atau hambat. Sampai saat ini, empat reseptor adenosin telah diidentifikasi, diantaranya: Reseptor adenosin A_1 , A_{2A} , dan A_{2B} yang terdapat pada mamalia, sedangkan reseptor adenosin A_3 memiliki variabilitas struktural yang cukup banyak dalam spesies yang berbeda dan dibandingkan dengan reseptor adenosin lainnya (Grably, 2010).

Reseptor A_{2A} banyak ditemukan di striatum otak, sel-sel kekebalan limpa, timus, leukosit dan trombosit darah, selain itu juga ditemukan di jantung, paru-paru dan pembuluh darah. Reseptor A_{2A} di otak berinteraksi dengan beberapa neurotransmitter untuk mengatur aktivitas motorik, perilaku psikiatris, siklus tidur-bangun dan kematian sel neuron. Dalam jaringan perifer, reseptor A_{2A} memiliki peran penting dalam modulasi peradangan, konsumsi oksigen miokard, aliran darah koroner, angiogenesis dan kontrol patogenesis kanker (Chen et al., 2013).

Berdasarkan ekspresi striatal terkonsentrasi pada reseptor A_{2A} , interaksi antagonis terhadap reseptor A_{2A} dan studi praklinis menunjukkan manfaat motorik pada model hewan tikus dan hewan primata non-manusia yang terjangkit Penyakit Parkinson. Antagonis reseptor A_{2A} teridentifikasi sebagai obat non-dopaminergik untuk pengobatan pada Penyakit Parkinson (Chen et al., 2013).



Gambar 2.3. Struktur kristal reseptor adenosin A_{2A} dalam kompleks dengan ZM241385 (PDB ID : 5IU4) (RCSB PDB, 2020)

Klasifikasi	: Protein membran
Organisme	: <i>Escherichia coli</i> , <i>Homo sapiens</i>
Sistem Ekspresi	: <i>Trichoplusia ni</i>
Metode	: Difraksi sinar-X
Resolusi	: 1,72 Å

II.3. Alkaloid

Alkaloid adalah kelompok senyawa basa organik yang mengandung amina sekunder, tersier, atau siklik. Sekitar 5500 alkaloid telah diketahui, dimana golongan ini merupakan senyawa metabolit sekunder terbanyak pada tanaman. Definisi dari istilah alkaloid, pada umumnya ialah zat-zat dasar yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, biasanya dalam kombinasi sebagai bagian dari sistem siklik (Makkar et al., 2007).

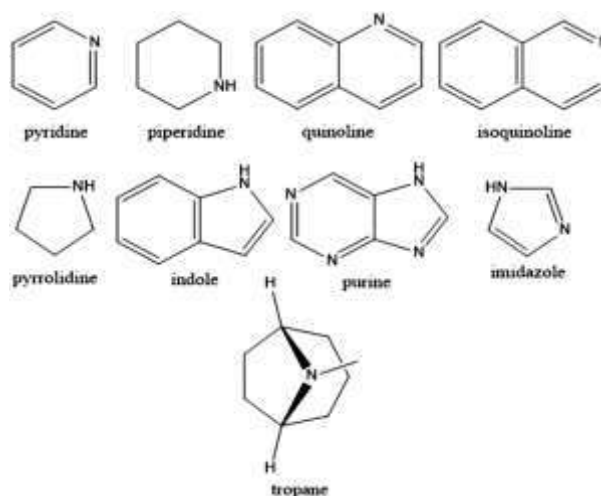
Beberapa alkaloid yang telah menunjukkan potensi untuk mengobati penyakit neurodegeneratif dalam studi praklinis, seperti *neurotransmitter modulatory*, antiamiloid, antioksidan, dan antiinflamasi (Girdhar, 2015).

Alkaloid umumnya diklasifikasikan berdasarkan jalur biosintesis yang digunakan untuk membangun molekulnya. Dilihat dari struktur penyusunnya, alkaloid terbagi menjadi tiga jenis, yaitu alkaloid sejati, protoalkaloid dan pseudoalkaloid. Alkaloid sejati merupakan senyawa yang berasal dari asam amino dengan atom nitrogen terdapat dalam cincin heterosikliknya. Protoalkaloid ialah senyawa dengan atom nitrogen dari asam amino bukan merupakan bagian dari heterosiklik. Pseudoalkaloid merupakan senyawa berupa kerangka karbon dasar yang tidak berasal dari asam amino (Aniszewski, 2007).

Alkaloid sebagai metabolit sekunder memiliki perbedaan dalam strukturnya. Hal ini dikarenakan alkaloid memiliki prekursor dan sub-jalur yang berbeda. Berikut ini ialah penggolongan alkaloid (Aniszewski, 2007), diantaranya :

1. Alkaloid piperidin
2. Alkaloid indolizidin
3. Alkaloid kuinolizidin
4. Alkaloid pirolizidin
5. Alkaloid izidin
6. Alkaloid pirolidin
7. Alkaloid tropana

8. Alkaloid imidazol
9. Alkaloid quinazolin
10. Alkaloid asridon
11. Alkaloid piridin
12. Alkaloid piridin sesquiterpen
13. Alkaloid fenil dan fenilpropil
14. Alkaloid indol
15. Alkaloid manzamin



Gambar 2.4. Klasifikasi senyawa alkaloid (Robinson, 1995)

II.4. *Docking*, Dinamika Molekul dan Prediksi Toksisitas

Docking dan dinamika molekul termasuk ke dalam bagian dari metode *in silico*, yang merupakan desain rasional dimana senyawa obat baru dirancang atau ditemukan menggunakan metode komputasi. Pada metode *in silico* dilakukan pendekatan pada suatu kondisi atau keadaan nyata ke dalam simulasi komputer menggunakan program-program tertentu dalam mendesain obat atau dikenal dengan *computer-aided drug design* (CADD) (J.Geldenhuys et al., 2006).

CADD umumnya diklasifikasikan menjadi menjadi dua, yaitu *ligan-based drug design* (LBDD) dan *structure-based drug design* (SBDD). LBDD dilakukan apabila struktur 3D dari protein target tidak tersedia, sehingga desain obat dapat didasarkan dengan menggunakan ligan yang diketahui sebagai titik awal penelitian. Sedangkan pada SBDD dapat dilakukan jika terdapat informasi yang valid pada struktur 3D dan situs aktif dari protein target yang diperoleh dari kristalografi sinar-X, *nuclear magnetic resonance*

(NMR) atau basis data struktur 3D, dan dimasukkan ke dalam model komputasi, sehingga senyawa yang mengikat target dapat dirancang. Teknik yang sering digunakan pada pendekatan SBDD ialah *docking* dan simulasi dinamika molekul (Lee et al., 2011).

II.4.1. *Molecular Docking*

Molecular docking atau penambatan molekul digunakan karena kemampuannya untuk memprediksi konformasi ligan dalam reseptor target dengan tingkat akurasi yang tinggi (Ferreira et al., 2015). Tujuan *docking* ialah untuk memprediksi interaksi ikatan antara molekul kecil (ligan) dan reseptor target dengan afinitas terbaik (Trott & Olson, 2010).

Sebelum dilakukan studi *docking*, terlebih dahulu dilakukan optimasi geometri yang berfungsi untuk menentukan energi minimal atau terendah dari suatu molekul. Struktur senyawa dengan energi terendah dapat diinterpretasikan sebagai sistem dengan keadaan yang stabil. Senyawa hasil optimasi selanjutnya digunakan pada proses *docking* dan simulasi dinamika molekul. Optimasi geometri dapat dilakukan menggunakan metode mekanika molekul (MM) ataupun mekanika kuantum (MK). Pemilihan metode yang digunakan disesuaikan dengan kebutuhan penelitian (Leach, 2001; Pongajow et al., 2013).

Metode optimasi geometri yang dilakukan ialah *Density Functional Theory* (DFT) merupakan metode untuk menghitung energi dari suatu molekul berdasarkan kerapatan elektron dari molekul tersebut, penggunaan metode ini memberikan kemudahan karena dapat menghitung dengan tingkat ketelitian yang lebih akurat serta dapat memberikan data dalam tingkat mikroskopik yang berkorelasi signifikan dengan hasil eksperimen laboratorium namun waktu yang diperlukan lebih lama dan membutuhkan spesifikasi komputer yang tinggi (Pamungkas, 2013; Tomberg, 2013).

Menurut Leach (2006), Tahapan penambatan molekul terdiri dari :

1. Algoritma Pencarian, yakni menentukan pose optimal yang mungkin dari suatu ligan terhadap reseptor, sehingga diperoleh pose paling stabil dari kompleks ligan-reseptor yang terbentuk. Gugus fungsional ligan akan berinteraksi dengan residu asam amino reseptor sehingga akan membentuk ikatan.

2. *Scoring*, yakni bertujuan untuk menghitung atau memprediksi afinitas pengikatan antara reseptor dan ligan yang terbentuk. Skor penilaian diberikan pada masing-masing pose yang akan diurutkan. Senyawa aktif dengan skor tertinggi ditetapkan sebagai pose ligan terhadap protein yang paling sesuai.

Sebelum dilakukan *docking* senyawa uji terhadap reseptor, terlebih dahulu dilakukan proses validasi *docking* (*re-docking*). Interpretasi hasil validasi *docking* dapat dilihat dari nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*). RMSD ialah parameter yang menggambarkan suatu metode *docking* dalam memproses maupun mengalkulasi interaksi antara ligan dengan reseptor (Tan, 2013). Metode *docking* dapat dinyatakan apabila nilai RMSD kurang dari 2 Å, artinya metode *docking* yang digunakan memberikan hasil simpangan yang tidak besar, sehingga dapat digunakan untuk melakukan *docking* senyawa uji (Tan, 2013; Lopez-Camacho et al., 2016; Ferwadi, 2017).

Setelah validasi *docking*, dilakukan *docking* dengan senyawa uji untuk mengetahui pose interaksi dan afinitas pengikatan senyawa uji pada sisi aktif reseptor target. Interpretasi hasil dapat dilihat dari nilai energi bebas ikatan (ΔG) dan konstanta inhibisi (K_i). Keduanya berkaitan dengan afinitas pengikatan, serta analisis interaksi ikatan yang terjadi antara ligan dan reseptor target (misalnya ikatan ionik, ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik dan lain-lainnya) (Syahputra et al., 2014; Marlina, 2017).

Metode penambatan molekul mengasumsikan bahwa reseptor dan ligan bersifat kaku, namun pada kenyataannya reseptor dan ligan bersifat fleksibel dan dinamik. Sehingga dilakukan metode simulasi dinamika molekul untuk mengeksplorasi pergerakan serta perubahan posisi yang terjadi (Farkhani, 2012).

II.4.2. Simulasi Dinamika Molekul

Simulasi dinamika molekul merupakan simulasi yang digunakan menganalisis kestabilan interaksi ligan dengan reseptornya yang dikondisikan mendekati keadaan fisiologis tubuh dalam jangka waktu tertentu (Becker et al., 2001; Marlina, 2017).

Tahapan-tahapan dalam simulasi dinamika molekul (Simanjuntak, 2015) ialah :

1. Persiapan file ligand dan reseptor,
2. Pembuatan topologi dan koordinat,

3. Minimisasi,
4. Ekuilibrasi, dan
5. Produksi.

Parameter interpretasi hasil dari simulasi dinamika molekul ialah :

1. RMSD (*Root Mean Square Deviation*)

RMSD merupakan ukuran yang sering digunakan dalam geometri molekul 3D untuk membandingkan perubahan atau pergerakan molekul. RMSD berguna untuk menganalisa gerakan dan memastikan stabilitas struktur pada waktu tertentu. Nilai dan gambaran RMSD, digambarkan dalam sebuah grafik yang diplot dengan waktu (Simanjuntak, 2015).

2. RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*)

RMSF merupakan ukuran dari deviasi antara posisi partikel dan beberapa posisi referensi. Berbeda dengan RMSD, RMSF ini dihitung terhadap masing–masing residu penyusun protein yakni melihat sejauh mana fluktuasi pergerakan masing–masing residu selama simulasi berlangsung (Simanjuntak, 2015).

Nilai RMSF menggambarkan pergeseran setiap residu asam amino yang memberikan fleksibilitas protein. RMSF ditentukan dari waktu saat energi potensial memiliki fluktuasi minimal yakni dimulai dari 1 ns sampai akhir simulasi. (Farkhani, 2012).

3. Analisis Interaksi Ikatan Hidrogen

Interaksi ikatan yang dianalisis ialah ikatan hidrogen antara residu asam amino dengan senyawa. Ikatan hidrogen adalah ikatan antara atom H dengan atom yang bersifat elektronegatif dan memiliki pasangan elektron bebas seperti F, O dan N, kriteria jarak ikatan hidrogen yakni kurang dari 3.9 Å (Xu et al., 2012).

4. MM/PBSA dan MM/GBSA (*Molecular Mechanics combined with Poisson-Boltzmann or Generalized Born and Surface Area*) serta Energi Bebas Ikatan (ΔG)

MM/PBSA dan MM/GBSA ialah metode yang dapat memperkirakan energi bebas untuk mempelajari afinitas ikatan reseptor-ligan. Karena sifatnya perkiraan, sehingga lebih berlaku sebagai fungsi *scoring* dari afinitas pengikatan ligan daripada prediksi secara kuantitatif pada energi bebas ikatan absolut (Yunta, 2016).

Nilai energi bebas ikatan (ΔG) menunjukkan adanya afinitas antara senyawa uji dengan reseptor target. Apabila nilai energi bebas ikatan (ΔG) semakin negatif artinya afinitas antara ligan dengan reseptor semakin tinggi. Namun jika nilai semakin positif berarti afinitas ligan dengan reseptor semakin rendah (Ruswanto et al., 2015; Dias & Jr., 2008).

II.4.3. Prediksi Toksisitas

Uji toksisitas merupakan pengujian untuk mendeteksi efek toksik suatu zat terhadap sistem biologi. Data yang diperoleh dapat memberi informasi derajat bahaya suatu zat apabila terpapar, yang ditunjukkan demi keamanan manusia (KBPOM RI, 2014). Metode pengujian toksisitas secara *in silico* umumnya mengacu pada percobaan komputasi, perhitungan matematis dan analisis ilmiah suatu senyawa menggunakan algoritma komputasi yang dirancang untuk menghasilkan prediksi toksisitas, digunakan dalam pengujian hipotesis ilmiah atau analisis keamanan suatu senyawa (Valerio Jr., 2009). Prediksi toksisitas berbasis web dilakukan meliputi tes ames, tes karsinogenisitas terhadap hewan pengerat dan prediksi risiko kardiotoxikisitas (*Yonsei Engineering Research*, 2017).