

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Hipertensi

Hipertensi adalah sindrom kardiovaskuler progresif yang timbul dari etiologi yang kompleks dan saling terkait. Penanda awal sindrom ini sering muncul sebelum peningkatan tekanan darah yang tinggi. Oleh karena itu, hipertensi tidak dapat diklasifikasikan hanya tingginya tekanan darah. Perkembangan ini sangat terkait dengan fungsional dan kelainan struktural jantung dan pembuluh darah yang merusak jantung, ginjal, otak, pembuluh darah, dan organ lain. Serta, menyebabkan morbiditas dini dan kematian (Giles dkk., 2009).

Hipertensi didefinisikan sebagai kondisi tekanan darah sistolik ≥ 130 mmHg atau diastolik ≥ 80 mmHg. Sekitar 80 – 95% merupakan hipertensi esensial yang berarti tidak ada penyebab spesifik. Kondisi ini umumnya jarang menimbulkan gejala dan sering luput dari perhatian, sehingga dapat menyebabkan morbiditas lain seperti gagal jantung kongestif, hipertrofi ventrikel kiri, stroke, gagal ginjal stadium akhir, atau bahkan kematian (Adrian, 2019).

Hipertensi adalah penyakit umum yang secara sederhana didefinisikan sebagai peningkatan yang terus-menerus pada tekanan darah arteria atau *blood pressure* (BP). Definisi hipertensi diubah dengan pedoman ACC/AHA 2017 dari tekanan darah $\geq 140/90$ mmHg menjadi $\geq 130/80$ mmHg, dan hampir setengah (46%) orang dewasa di Amerika berusia 20 dan lebih tua menderita hipertensi. Meskipun prevalensi secara keseluruhan telah meningkat, hanya 1,9% membutuhkan terapi obat tambahan karena sebagian besar pasien yang baru didiagnosis hanya membutuhkan terapi non farmakologis. Prevalensi tekanan darah tinggi pada pria sebelumnya usia 65 tahun lebih tinggi dari wanita. Namun, setelah usia 74 tahun, wanita lebih banyak memiliki tekanan darah yang lebih tinggi dari pada pria. Nilai tekanan darah meningkat dengan bertambahnya usia (Prieto-Martínez dkk., 2018).

II.1.1 Klasifikasi Hipertensi

Klasifikasi tekanan darah pada orang dewasa (usia 18 tahun ke atas) didasarkan pada rata-rata dari dua atau lebih nilai BP yang diukur dengan benar. Menurut ACC/AHA, ada empat kategori BP: normal, tinggi, hipertensi stadium 1, dan hipertensi stadium 2 pada Tabel II.1.

Tabel II.1 Klasifikasi Tekanan Darah pada Orang Dewasa (Usia 18 Tahun)
(Prieto-Martínez dkk., 2018)

Klasifikasi	Tekanan darah		Tekanan diastolic
	sistolik (mmHg)		(mm Hg)
Normal	<120	Dan	<80
Tinggi	120-129	Dan	<80
Hipertensi stadium 1	130-139	Atau	80-89
Hipertensi stadium 2	≥ 140	Atau	≥90

Peningkatan tekanan darah adalah bukan kategori penyakit, tetapi dikaitkan dengan peningkatan risiko kardiovaskular dibandingkan dengan pasien dengan tekanan darah normal. Tabel II.1 mengidentifikasi pasien yang tekanan darahnya cenderung berkembang menjadi hipertensi di masa yang akan datang, sehingga mengatur gaya hidup kedepan untuk mencegah terjadi hipertensi (MacLaughlin dan Saseen, 2020).

II.1.2 Etiologi

Pada kebanyakan pasien, hipertensi disebabkan oleh etiologi patofisiologi yang tidak diketahui (hipertensi esensial atau primer). Bentuk hipertensi ini tidak dapat disembuhkan, tetapi dapat dikendalikan. Persentase yang lebih kecil dari pasien memiliki penyebab spesifik dari hipertensi diketahui (hipertensi sekunder). Ada banyak potensi penyebab hipertensi sekunder yang merupakan kondisi medis bersamaan atau diinduksi secara endogen. Jika diidentifikasi, hipertensi pada pasien ini dapat dikurangi atau berpotensi (Oparil dkk., 2018).

a. Hipertensi Primer

Sebagian besar individu dengan tekanan darah tinggi (lebih dari 90%) memiliki penyakit esensial atau hipertensi primer. Banyak mekanisme potensial telah diidentifikasi bahwa patogenesis berkontribusi pada hipertensi esensial, sehingga mengidentifikasi kelainan yang mendasarinya tidak mungkin. Faktor genetik mungkin berperan dalam perkembangan hipertensi esensial dengan mempengaruhi jalur pengatur keseimbangan natrium atau tekanan darah (Bolívar, 2013).

b. Hipertensi Sekunder

Hipertensi sekunder, di mana penyakit penyerta atau obat (atau produk) bertanggung jawab untuk meningkatkan tekanan darah, jauh lebih jarang dibandingkan hipertensi primer (sampai 10%). Dalam sebagian besar kasus, penyebab hipertensi sekunder paling umum disfungsi ginjal akibat penyakit ginjal kronis yang parah atau penyakit renovaskular adalah

penyebab hipertensi sekunder yang paling umum (obat-obatan atau produk lainnya), baik secara langsung maupun tidak langsung, dapat meningkatkan tekanan darah (Delacroix dan Chokka, 2014).

II.1.3 Patofisiologi

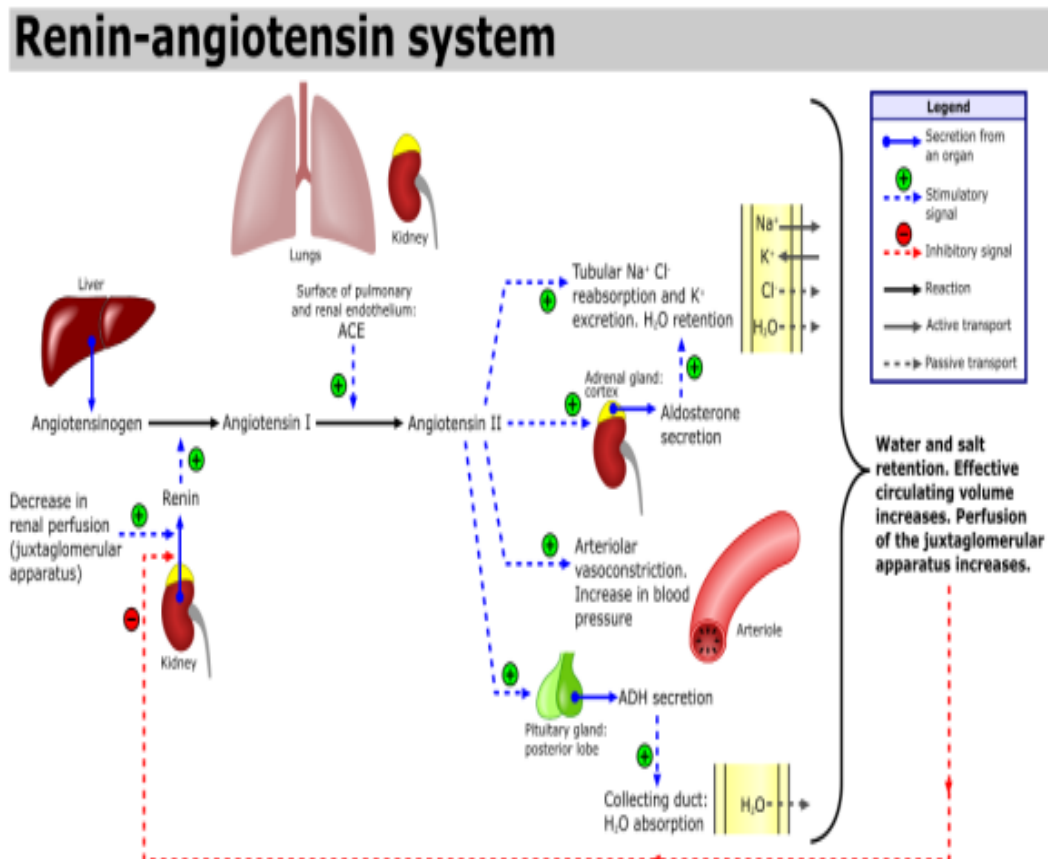
Beberapa faktor fisiologis mengontrol tekanan darah dan kelainan dari faktor fisiologis adalah komponen potensial yang berkontribusi dalam pengembangan hipertensi esensial, termasuk malfungsi baik di humoral sistem renin angiotensin efek pada autoregulasi perifer, dan gangguan pada natrium, kalsium, dan hormon natriuretik (MacLaughlin dan Saseen, 2020).

RAAS merupakan suatu regulator yang sangat penting untuk mengatur keseimbangan natrium, volume cairan ekstrasel, resistensi pembuluh darah ginjal, dan resistensi vaskular sistemik yang diaktifkan oleh enzim renin (Hanner dkk., 2008). Renin juga akan memecah angiotensinogen menjadi angiotensin I, kemudian angiotensin I secara cepat dikonversi oleh ACE menjadi angiotensin II. Angiotensin II menyebabkan vasokonstriksi seluruh pembuluh darah sehingga meningkatkan resistensi pembuluh darah, yang berakibat peningkatan tekanan darah. Kompleks jukstaglomerulus sebagai komponen struktural utama sistem renin angiotensin berperan penting dalam pengaturan resistensi pembuluh darah. Sintesis dan pelepasan renin ke sirkulasi terjadi karena tekanan darah yang rendah, kehilangan cairan tubuh, dan kurangnya intake natrium (Toreh dkk., 2012). Peningkatan konsentrasi angiotensin II dalam sirkulasi akan menghambat sintesis dan sekresi renin dari kompleks jukstaglomerulus, sedangkan penurunan angiotensin II memiliki efek berlawanan yaitu merangsang sintesis dan sekresi renin dari kompleks jukstaglomerulus. Dengan demikian keseimbangan resistensi pembuluh darah akan terpelihara baik (Muller dan Luft, 2006).

II.2 *Angiotensin II Receptor Blockers (ARB)*

Renin mengkatalis konversi angiotensinogen menjadi angiotensin I dalam darah. Kemudian angiotensin I diubah menjadi angiotensin II oleh ACE. Setelah mengikat reseptor tertentu diklasifikasikan sebagai AT1 atau sub tipe AT2, angiotensin II memberikan efek biologis di berbagai jaringan. Reseptor AT1 terletak di kelenjar adrenal, otak, ginjal, miokardium, dan pembuluh darah perifer. Reseptor ini memediasi sebagian besar respon yang penting untuk fungsi kardiovaskuler dan ginjal. Reseptor AT2 yang

tidak mempengaruhi pengaturan tekanan darah terletak di medula kelenjar adrenal, rahim, dan otak. Angiotensin II yang bersirkulasi meningkatkan tekanan darah dan merangsang sintesis aldosteron dari korteks adrenal dan menyebabkan reabsorpsi natrium dan air, sehingga meningkatkan volume plasma, resistensi perifer total (TPR), dan tekanan darah (Prieto-Martínez dkk., 2018). Berikut Gambar II.1 tentang sistem renin angiotensin.



Gambar II.1 Sistem Renin Angiotensin (Khairnar dkk., 2014)

II.2.1 Golongan Obat ARB

Obat golongan ARB memberikan efek yang lebih spesifik dalam memblokir sistem renin angiotensin dan memiliki efek yang lebih baik tolerabilitas bila dibandingkan dengan ACEI. Sifat ARB mirip dengan ACEI, tetapi obat golongan ini tidak menghambat pemecahan bradikinin dan kinin-kinin lainnya, sehingga tidak menimbulkan batuk kering persisten yang biasanya mengganggu terapi dengan ACEI. Oleh karena itu, dijadikan alternatif untuk pasien yang harus menghentikan penggunaan ACEI akibat batuk yang persisten. Antagonis reseptor angiotensin II digunakan sebagai alternatif dari penghambat ACE dalam tatalaksana gagal

jantung atau nefropati akibat diabetes (Wu dkk., 2021). Beberapa obat golongan ARB yang digunakan bisa dilihat pada (Tabel II.2)

Tabel II.2 Obat Golongan ARB
(Prieto-Martínez dkk., 2018)

Obat (Nama Paten)	Rentang dosis (mg/day)
Azilsartan (Edarbi)	40-80
Candesartan (Atacand)	8-32
Aprosarten (Teveten)	600-800
Irbesartan (Avapro)	150-100
Losartan (Cozaar)	50-100
Telmisartan (Micardis)	20-40
Olmesartan (Benicar)	20-80
Valsartan (Diovan)	80-320

Salah satu contoh golongan ARB adalah Olmesartan. Olmesartan secara selektif menghambat pengikatan angiotensin II ke AT1, yang ditemukan di banyak jaringan seperti otot polos pembuluh darah dan kelenjar adrenal. ARB secara efektif menghambat efek mediasi vasokonstriksi dan aldosteron AT1 yang disekresikan dari angiotensin II dan menyebabkan penurunan resistensi vaskular dan tekanan darah. Olmesartan selektif untuk AT1 dan memiliki afinitas 12,500 kali lebih besar untuk AT1 daripada reseptor AT2 (Rada, 2020).

II.3 Pegagan

Centella asiatica (L.) (pegagan) adalah herba, tanaman tahunan lunak beku di tanaman berbunga keluarga *Apiaceae*. Pegagan merupakan tanaman kosmopolit ditemukan di Asia Tropis sampai daerah sub-tropis, mulai dari dataran rendah sampai tinggi 100- 2500 m di atas permukaan laut, pada tanah lembab sampai berpasir ternaungi maupun di lahan terbuka, sehingga diduga telah terbentuk berbagai eko maupun genotipe yang memperkaya keragaman genetik pegagan di alam (Wiestawa, 2020).

II.3.1 Klasifikasi

Berdasarkan klasifikasi taksonomi, pegagan termasuk ke dalam;

Divisi : Spermatophyta

Subdivisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledonae
Ordo : Umbellales
Famili : Umbelliferae (Apiaceae)
Genus : Centella
Spesies : *Centella asiatica* (L.) Urban atau *Hydrocotyle asiatica* Linn



Gambar II.2 Tanaman Pegagan (Sutardi, 2006)

II.3.2 Morfologi

Morfologi dari tanaman pegagan yaitu batangnya menjalar hingga mencapai satu meter, beruas dan lunak serta bentuk daunnya bulat. Panjang akar dan daun tiap tangkai daun sekitar 5-15 cm, akar berwarna putih, rimpang pendek, dan panjang batang 10-80 cm. Tinggi tanaman pegagan 5,39 - 13,3 cm dengan jumlah daun pada tanaman induk 5-8 dan jumlah daun di cabang 2-5 (Bermawie dkk., 2015). Biasanya terdapat 3 buah bunga, bertengger di tengah, dengan tangkai pendek di samping, 2 daun pelindung panjang 3-4 mm. Buah pegagan berbentuk pipih, lebar sekitar 7 mm dan tinggi 3 mm, berwarna kuning kecoklatan, dan berdinding cukup tebal (Direktorat Obat Asli Indonesia., 2010).

II.3.3 Senyawa kimia

Pegagan telah dilaporkan mengandung sejumlah besar senyawa yang termasuk dalam kelas kimia yang berbeda. Kelas kimia utama yang ditemukan dalam tanaman ini adalah triterpen saponosida yang utama dikenal sebagai asam asiatik, madecassic acid (*asam 6-hidroksi-asiatik*), *asiaticoside*, *madecassoside*, dan asam madasiat, asam betulinat, asam tankunic, dan asam isotank unik. Ada beberapa triterpen lain seperti asam brahmat, *centellin*, *centellicin*, *asiaticin*, bayogenin, asam terminolic, *3 β ,6 β ,23-trihydroxyolean-12-en-28-oic acid*, *3 β ,6 β ,23-trihydroxyurs12-en-28-oic acid*, *3-O-[α -L-arabinofuranosyl] 2 α ,3 β ,6 β ,23-asam tetrahidroksiur-12-en-28-oat*, *centellasapogenol A*, *centellasaponins A-D*, asam ursolat,

asam pomolat, asam 3-epimaslinat, 23-O-asetilmadecassoside, dan 23-O-acetylasiaticoside B (Koentjoro dkk., 2018).

Adanya beberapa turunan flavonoid seperti *quercetin*, *kaempferol*, *patuletin*, *rutin*, *apigenin*, *castilliferol* *castillicetin*, dan *myricetin* telah dilaporkan dalam *C. asiatica*, sementara isolasi polisakarida (*centellose*), *polyacetylenes* (misalnya *cadinol*, *acetoxycentellinol*, *centellin*, *centellicin*, dan *asiaticin*, *sterol* (*11-oxoheneicosanil-cyclohexane*, *dotriacont-8-en-1-oic acid*, *sitosterol* (*3-O- β -glucoside*), *stigmasterol* (*3-O- β -glucoside*, dan *castasterone*), dan asam fenolik (misalnya, *asam rosmarinic*, *asam 3,5-di-O-caffeoilquinic*, *1,5-di-O-caffeoil* asam quinic, *3,4-di-O-caffeoil* asam quinic, *4,5-di-O-caffeoil* asam quinic, asam ettacrinic, asam klorogenat, dan *asam isoklorogenik* telah juga diidentifikasi dalam spesies ini (Orhan, 2012).

II.3.4 Aktivitas Farmakologi

Pegagan adalah tanaman obat yang terkenal karena berbagai efek farmakologisnya yang menguntungkan untuk kesehatan manusia (Sutardi, 2016). Berikut beberapa aktivitas farmakologi dari pegagan;

a. Aktivitas antikanker

Asiatikosida telah menunjukkan keefektifannya dalam model kanker payudara *in vitro* dan *in vivo*, secara signifikan mengurangi TNF- α dan IL-1 β ekspresi, menginduksi apoptosis dan meningkatkan aktivitas antitumor. Sementara itu, asam madecassic telah terbukti mengerahkan aktivitas antitumor dengan menginduksi apoptosis sel kanker dan meningkatkan imunomodulasi dalam model kanker usus besar tikus. Selain itu, asiatikosida menangkalkan proliferasi, migrasi, dan invasi sel multiple myeloma yang resisten terhadap obat dengan memicu autophagy melalui penghambatan jalur STAT-3 (Harwoko dkk., 2014).

b. Aktivitas Antibakteri dan Antijamur

Pegagan merupakan salah satu tumbuhan yang memiliki senyawa bioaktif antifungi dan antibakteri. Senyawa asiatikosida yang terkandung dalam pegagan merupakan antibiotik alami yang banyak terkumpul di bagian daun, selain itu kandungan triterpenoidnya dapat bersifat sebagai antimikroba dan pelindung tanaman terhadap serangan patogen (Ismaini, 2014).

c. Aktivitas Antioksidan

Menurut Zainol dkk., 2008 di dalam pegagan banyak ditemukan senyawa triterpenoid, dan senyawa utama yang mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat adalah senyawa

asiatikosida. Senyawa total fenol juga merupakan salah satu kontributor utama dalam aktivitas antioksidan pada pegagan. Hasil penelitian Sembiring dkk., 2010 menunjukkan bahwa tanaman pegagan memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi dibandingkan dengan tanaman obat lainnya, seperti jahe merah dan temulawak. Penelitian Rao dkk., 2005 juga menunjukkan bahwa senyawa aktif dalam pegagan mampu menangkal radikal bebas sehingga dapat memperkuat fungsi otak, meningkatkan kecerdasan dan daya ingat, serta sebagai daya hambat yang kuat terhadap kematian sel saraf otak (Tan dkk., 2021).

d. Aktivitas Antihipertensi

Asam Asiatik mengurangi stres dengan mengurangi aktivitas renin-angiotensin yang berlebihan, aktivitas saraf simpatis yang berlebihan dan meningkatkan fungsi vaskular pada tikus sindrom metabolik yang diinduksi oleh diet tinggi karbohidrat dan lemak tinggi, serta meningkatkan perubahan hemodinamik pada tikus hipertensi 2K-1C (Maneesai dkk., 2008). Pegagan mampu menurunkan tekanan darah sistolik dan diastolik pada tikus yang dibuat hipertensi dan tidak mempengaruhi detak jantung pada tikus yang diinduksi garam (Intharachatorn, 2013).

e. Aktivitas Antidiabetes

Pegagan telah digunakan sebagai obat untuk diabetes melinitus secara tradisional Ayurveda. Sebuah penelitian melaporkan bahwa asiatikosida menunjukkan efek antidiabetes yang signifikan aktivitas pada tikus diabetes yang diinduksi aloksan, kemungkinan besar dengan merangsang sel pankreas untuk mengeluarkan insulin. Asam asiatik dan asiatikosida mungkin juga efektif dalam mengurangi komplikasi diabetes. Asam asiatik dapat melindungi terhadap nefropati diabetik pada tikus dengan diabetes yang diinduksi STZ. Secara *in vitro*, asiatikosida terbukti melindungi sel-sel rambut koklea dari cedera yang diinduksi glukosa tinggi dengan meningkatkan aktivitas antioksidan dan menekan jalur AGEs/RAGE/NF- κ B (Tan dkk., 2021).

II.4 Computer Aided Drug Design (CADD)

Penemuan dan pengembangan obat baru umumnya dikenal sebagai proses yang sangat kompleks yang membutuhkan banyak waktu dan sumber daya. Pendekatan desain obat berbantuan komputer digunakan secara luas untuk meningkatkan efisiensi penemuan obat dan kursus pengembangan (Imam dan Gilani., 2012). Berbagai pendekatan CADD dievaluasi sebagai teknik yang menjanjikan sesuai dengan kebutuhan, di antara semua pendekatan desain obat berbasis struktur dan desain obat berbasis ligan dikenal sebagai teknik yang sangat

efisien dan kuat dalam penemuan dan pengembangan obat. Dengan menggunakan pendekatan CADD kita dapat mengurangi biaya penemuan dan pengembangan obat hingga 50% (Surabhi dan Singh, 2012).

CADD dapat diklasifikasikan menjadi dua kategori umum, berbasis struktur dan berbasis ligan. Berbasis struktur CADD bergantung pada pengetahuan tentang protein target struktur untuk menghitung energi interaksi untuk semua senyawa yang diuji, sedangkan CADD berbasis ligan mengeksplorasi pengetahuan tentang molekul aktif dan tidak aktif yang diketahui melalui pencarian kesamaan kimia, model hubungan struktur-aktivitas kuantitatif (HKSA). CADD berbasis struktur umumnya lebih disukai di mana resolusi tinggi data struktural dari protein target tersedia untuk protein yang dapat dengan mudah dikristalkan. CADD berbasis ligan umumnya lebih disukai bila tidak ada atau sedikit informasi struktural tersedia, khususnya untuk target protein membran (Sliwoski dkk., 2014).

II.5 Optimasi Geometri

Optimasi geometri adalah komponen kunci dari sebagian besar studi kimia komputasi yang berkaitan dengan struktur atau reaktivitas molekul. Aktivitas optimasi geometri untuk mendapatkan hasil terbaik dibawah keadaan yang diberikan berupa minimasi energi molekul untuk memperoleh konformasi struktur paling stabil (Schlegel, 2011). Parameter fisikokimia akan mempengaruhi molekul obat. Parameter fisikokimia dijadikan tolak ukur senyawa ini baik secara kimia dan fisika adalah BM (Berat Molekul), Log P (Koefisien Partisi), dan HOMO-LUMO.

a. Bobot Molekul

Berat molekul suatu senyawa yang baik adalah kurang dari 500 g/mol, karena membran biologis dan sawar darah lebih mudah ditembus dengan proses difusi apabila ukuran molekul obatnya relatif kecil (Ivanovic dkk., 2017).

b. Log P

Log P digunakan dalam industri farmasi atau biotek untuk memahami perilaku molekul obat dalam tubuh. Kandidat obat sering disaring menurut log P, di antara kriteria lainnya, untuk membantu memandu pemilihan obat dan optimasi analog. Hal ini dikarenakan lipofilisitas merupakan faktor penentu utama dalam penyerapan senyawa, distribusi dalam tubuh, penetrasi melintasi membran vital, biologis hambatan, metabolisme, dan ekskresi (sifat ADME) (Bhal, 2007).

c. HOMO-LUMO

Highest occupied molecular orbital (HOMO) adalah orbital molekul yang masih dihuni elektron yang tingkat energi tertinggi. *Lowest unoccupied molecular orbital* (LUMO) adalah orbital molekul yang tidak dihuni molekul yang tingkat energi terendah. Energi HOMO menunjukkan kemampuan suatu molekul dalam mendonorkan elektron. Semakin besar energi HOMO maka akan semakin mudah suatu molekul untuk mendonorkan elektronnya. Sedangkan energi LUMO merupakan kemampuan suatu molekul dalam menerima elektron. Semakin kecil energi LUMO maka semakin mudah molekul tersebut dalam menerima elektron. Molekul inhibitor berfungsi menyumbangkan pasangan elektron bebasnya ke logam besi. Sehingga inhibitor yang lebih reaktif adalah yang memiliki energi HOMO lebih besar dan energi LUMO yang besar (Radhi dkk., 2020).

II.6 *Density Functional Theory* (DFT)

DFT adalah salah satu metode yang paling banyak digunakan untuk perhitungan *ab initio* struktur atom, molekul, kristal, permukaan, dan interaksinya (Argaman dan Makov, 2000). DFT bertujuan untuk mencari keadaan dasar atom secara numerik. Energi pada keadaan dasar merupakan energi pada kondisi atom paling stabil, artinya untuk melakukan desain material perlu diketahui energi keadaan dasar dari atom penyusunnya (Sholl dan Steckel, 2009).

Penggunaan metode ini memberikan kemudahan karena dapat menghitung dengan tingkat ketelitian yang lebih akurat, namun waktu yang diperlukan lebih lama dan membutuhkan spesifikasi komputer yang tinggi, serta dapat memberikan data dalam tingkat mikroskopik yang berkorelasi signifikan dengan hasil eksperimen laboratorium (Comba dkk., 2009). Metode DFT umum digunakan untuk optimasi geometri dan struktur elektron kompleks logam transisi. Keakuratan perhitungan DFT dapat diuji dengan cara mencocokkan data perhitungannya dengan data eksperimen, seperti data XRD, UV-Vis, FTIR, dan NMR (Pongajow dkk., 2011).

II.7. Penambatan Molekul

Penambatan adalah metode yang digunakan untuk memprediksi interaksi ikatan antara satu molekul ke molekul lain, saat terjadi interaksi elektrostatik antara satu molekul dan molekul lain untuk membentuk stabil. Penambatan molekul dilakukan terhadap senyawa obat ke dalam situs pengikatan reseptor dan menghitung afinitas pengikatan ligan. Hal ini yang paling penting dari proses desain obat berbasis struktur (Ferreira dkk., 2015). Program

penambatan ligan dan reseptor dalam target yang berbeda posisi konformasi dengan konfirmasi energi terendah yang mudah dievaluasi, dan dianalisis untuk interaksinya (Gujjula dkk., 2012).



Gambar II.4 Proses Penambatan Target dan Ligan (Surabhi dan Singh., 2012)

Pada dasarnya tujuan dari penambatan molekul adalah untuk memberikan prediksi ligan-reseptor struktur kompleks menggunakan metode komputasi. Penambatan dapat dilakukan melalui dua langkah yang saling terkait. Pertama dengan mengambil sampel konformasi ligan di situs aktif protein kemudian memberi peringkat konformasi ini melalui fungsi penilaian. Pengambilan sampel algoritma harus dapat menghasilkan mode pengikatan eksperimental dan penilaian fungsi juga harus memberi peringkat tertinggi di antara semua konformasi yang dihasilkan (Meng dkk., 2011).

Identifikasi konformasi pengikatan yang paling mungkin membutuhkan dua langkah yaitu eksplorasi ruang konformasi yang mewakili berbagai mode pengikatan potensial dan prediksi akurat dari energi interaksi yang terkait dengan masing-masing konformasi pengikatan yang diprediksi (Kapetanovic, 2008). Penambatan molekul memiliki berbagai kegunaan dan aplikasi dalam penemuan obat, termasuk studi struktur aktivitas, menemukan prospek potensial dengan *screening virtual*, memberikan hipotesis pengikatan untuk memfasilitasi prediksi studi mutagenesis, membantu kristalografi sinar-X dalam fiksasi substrat dan penghambatan kerapatan elektron, serta mempelajari mekanisme kimia dan desain kombinatorial (Sousa dkk., 2012).

II.7.1 Validasi Penambatan Molekul

Validasi penambatan bertujuan untuk mendapatkan pengaturan metode yang valid. Validasi penambatan molekul menggunakan aplikasi *Autodock* melalui penambatan ligan alami terhadap protein target. Konformasi dan tempat ligan berinteraksi ditentukan dengan pengaturan *grid box*. Dinyatakan valid jika hasil penambatan pada pose pengikatan paling

bagus didapatkan nilai $RMSD \leq 2 \text{ \AA}$. RMSD adalah ukuran kesamaan antara posisi ligan nyata di reseptor dan posisi ligan yang dihitung, yang memperhitungkan simetri akurasi, simetri parsial (misalnya simetri dalam cabang yang dapat diputar) dan simetri dengan cara heuristik sederhana. Solusi penambatan reseptor ligan dengan skor RMSD di bawah 2 \AA dianggap sebagai solusi dengan akurasi penambatan molekul tinggi. Perlu diperhatikan bahwa penambatan molekul lainnya dapat dikembalikan dengan skor RMSD yang lebih tinggi dan nilai E_{inter} rendah, menunjukkan bahwa pengikatan ligan interaksi lain yang mungkin harus dipertimbangkan (Lopez-Camacho dkk., 2016).

II.7.2 Tahapan Penambatan Molekul

Tahapan dalam penambatan molekul terdiri dari;

a. Algoritma Pencarian

Algoritma pencarian yang digunakan untuk memprediksi konformasi yang masuk dari kompleks, ditentukan oleh aturan dan parameter. Dalam hal fleksibilitas ligan atau reseptor, algoritma penambatan dapat dikategorikan dalam dua set besar yaitu penambatan tubuh kaku dan fleksibel yang didasarkan pada jenis yang berbeda dari algoritma (Yadava, 2018).

b. *Scoring*

Fungsi penilaian adalah salah satu komponen terpenting dalam desain obat berbasis struktur. Meskipun cukup sukses, prediksi yang akurat dan cepat dari interaksi protein-ligan masih menjadi tantangan dalam penambatan molekul. Ada tiga aplikasi penting dari fungsi penilaian dalam penambatan molekul. Pertama adalah penentuan Mode pengikatan dan situs ligan pada protein. Kedua dari fungsi penilaian, yaitu terkait dengan aplikasi pertama adalah untuk memprediksi yang absolut afinitas ikatan antara protein dan ligan. Ini sangat penting dalam optimasi timbal. Ketiga, mungkin yang paling penting di desain obat berbasis struktur, adalah untuk mengidentifikasi obat potensial *hit/lead* untuk target protein tertentu dengan mencari ligan besar database, yaitu penyaringan *virtual screening* (Huang dkk., 2010).

II.7.3 Parameter Penambatan Molekul

Ada beberapa parameter untuk menunjukkan interpretasi hasil pada proses penambatan molekul, yaitu;

a. Energi Bebas Gibbs (ΔG)

Scoring function berfungsi untuk menghitung afinitas kompleks ligan-protein reseptor yang terbentuk. Identifikasi ini didasarkan pada beberapa teori energi bebas ikatan (ΔG_{bind}). Nilai energi bebas ikatan yang kecil menunjukkan bahwa konfirmasi yang terbentuk adalah stabil, sedangkan nilai energi bebas ikatan yang besar menunjukkan kurang stabilnya kompleks yang terbentuk. Semakin negatif nilai yang dihasilkan, maka semakin baik afinitas kompleks antara ligan-protein, sehingga diharapkan aktivitasnya pun semakin baik (Yanuar, 2012). Berikut persamaan untuk menghitung ΔG sebagai berikut:

$$\Delta G = \Delta E_{\text{EL}} + \Delta E_{\text{VDW}} + \Delta G_{\text{pol}} + \Delta G_{\text{np}} \dots\dots\dots (\text{II.1})$$

Keterangan nilai persamaan diatas nilai G_{pol} dan G_{np} adalah kontribusi polar dan non-polar untuk energi bebas solvasi. G_{pol} biasanya diperoleh dengan menggunakan persamaan *Poissson Boltzmann* (PB) atau *Generalized Born* (GB), sedangkan non-polar diperkirakan dari hubungan linear permukaan pelarut, untuk nilai T (suhu) dikalikan dengan entropi (S).

b. Konstanta Inhibisi (K_i)

Konstanta Inhibisi disebut sebagai konstanta disosiasi pengurangan yang dapat memberikan gambaran mengenai afinitas antara ligan dan penguraian. Semakin kecil K_i , maka kesetimbangan reaksi cenderung kearah pembentukan kompleks. Kompleks protein-ligan dikatakan memiliki afinitas ikatan yang baik jika memiliki nilai K_i pada skala micromolar (Harganingtyas, 2011). Persamaan untuk menghitung nilai K_i sebagai berikut:

$$K_i = e^{-\Delta G / RT} \dots\dots\dots (\text{II.2})$$

Keterangan nilai persamaan diatas, ΔG (energi penambatan molekul), (konstanta gas), dan T (suhu dalam satuan Kelvin).

c. Interaksi Ikatan

Ketika obat berinteraksi dengan reseptor, beberapa gaya tarik-menarik dapat terjadi pada awal interaksi. Ikatan yang sering terjadi antara lain;

a) Ikatan Hidrogen

Salah satu interaksi antara protein dan ligan yang terbentuk adalah ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen adalah gaya intermolekul atau intramolekul yang terjadi antara atom yang memiliki keelektronegatifan tinggi dengan atom hidrogen yang terikat secara kovalen pada suatu atom elektronegatif (Nurbaiti, 2009). Ikatan hidrogen tersebut dapat terbentuk karena adanya gugus-gugus atom pendonor dan akseptor ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen paling kuat ketika molekul berada dalam orientasi interaksi elektrostatik yang maksimum (Harganingtyas, 2011).

b) Ikatan Ionik

Ketika dua ion yang berbeda muatan saling tarik-menarik melalui gaya elektrostatis, terbentuklah ikatan ionik. Kekuatan ikatan ionik berkisar antara 5-10 kkal/mol, dan berkurang secara proporsional terhadap kuadrat jarak antara dua atom. Kemampuan obat untuk mengikat reseptor melalui interaksi ionik sehingga menambah secara signifikan sebagai molekul obat berdifusi lebih dekat dengan reseptor.

c) Ikatan Hidrofobik

Ikatan hidrofobik antara senyawa organik nonpolar dapat berkontribusi pada gaya ikatan yang menarik ligan pada reseptor, gaya pada ikatan ini sangat lemah (0,5-1 kkal/mol). Ikatan ini biasa disebut juga dengan gaya *van der waals* (gaya London), yang membutuhkan 2 molekul nonpolar yang saling berdekatan (Huang dkk., 2010).

d. Kontak Residu antar Protein dan Ligan

Interaksi non-kovalen atau non ikatan (*non-bonded interaction*) yang terjadi antara protein dan ligan dapat meningkatkan afinitas ligan terhadap protein. Interaksi non-ikatan mempresentasikan interaksi fleksibel diantara pasangan atom dan partikel. Dua jenis interaksi non-ikatan paling umum yang dapat mengakibatkan perubahan energi potensial adalah interaksi elektrostatis dan interaksi *van der waals*. Oleh karena itu, perlu dilakukan analisis terhadap kontak residu kompleks protein-ligan hasil simulasi penambatan. Sehingga dapat diketahui residu-residu protein yang berinteraksi dengan ligan (Huang dkk., 2010).

II.7.4 Aplikasi Penambatan Molekul

AutoDock merupakan sebuah perangkat lunak yang dibangun untuk melakukan penambatan molekul yang efektif secara cepat dan akurat dapat memprediksi konformasi dan energi dari suatu ikatan antara ligan dan target makromolekul (Ravi dan Krishnan, 2016). *AutoDock* terdiri dari dua program utama, yaitu program pelaksanaan penambatan pada *AutoDock* dari suatu ligan dengan tempat pengikatannya pada protein target, dan program perhitungan awal pada tempat penambatan tersebut yaitu *autogrid* (Forlic dkk., 2016). Sebagai tambahan, melalui program *autogrid* ini, afinitas atom pada tempat penambatan dapat divisualisasikan. Hal tersebut sangat membantu, contohnya dapat menuntun seorang ahli kimia menghasilkan suatu zat pengikat yang kuat dari suatu senyawa kimia tertentu (Ravi dan Krishnan, 2016).

Sebagai tambahan, *AutoDock* juga telah dilengkapi dengan *AutoDock Tools* (ADT) yang berfungsi sebagai tampilan grafis yang membantu menganalisis ligan dan proses penambatan. Setiap proses penambatan dengan *AutoDock* membutuhkan paling sedikit empat file yang di input antara lain; *pdqt* file untuk ligan, *pdqt* file untuk makromolekul atau reseptor, *grid parameter file* (GPF) untuk perhitungan oleh *AutoDock* dan *Docking Parameter File* (DPF) untuk perhitungan tertentu oleh *AutoDock* (Ravi dan Krishnan, 2016).

II.8. Dinamika Molekul

Simulasi dinamika molekul adalah metode simulasi yang paling dikenal dan dianggap sangat dekat dengan simulasi aslinya. Dinamika molekul adalah teknik untuk simulasi komputer dari sistem yang kompleks, dimodelkan di tingkat atom (Meller, 2001). Simulasi dinamika molekul sering digunakan dalam kombinasi dengan berbagai teknik biologi struktural eksperimental, termasuk, kristalografi sinar-X, (*Cryoelectron Microscopy*), NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*), EPR (*Electron Paramagnetic Resonance*), dan FRET (*Forster Resonance Energy Transfer*). Dampak simulasi dinamika molekul dalam biologi molekuler dan penemuan obat telah meluas secara signifikan dalam beberapa tahun terakhir.

Simulasi dinamika molekul dapat menangkap berbagai macam proses biomolekuler yang penting, termasuk perubahan konformasi, pengikatan ligan, dan protein, mengungkapkan posisi semua atom pada femtodetik resolusi sementara (Hollingsworth dan Dror, 2018).

II.8.1 Tahapan Simulasi Dinamika molekul

a. Persiapan

- a) Persiapan makromolekul
- b) Persiapan ligan terbaik hasil dari penambatan molekul
- c) Pembuatan topologi dan koordinat

Topologi dan koordinat yang akan dibuat adalah ligan, makromolekul, dan kompleks (ligan-makromolekul) dalam suasana vakum dan pelarut air. Pada tahap ini struktur ligan harus diberikan penambatan muatan molekul (Desheng dkk, 2011).

b. Solvasi

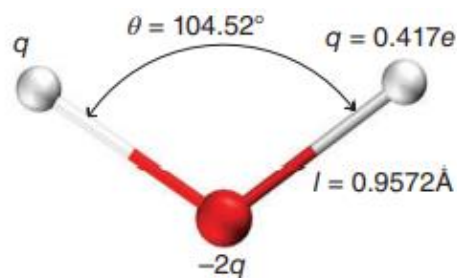
Sistem dilarutkan dalam suatu model pelarut air. Model air digunakan dengan tujuan ligan-reseptor dilarutkan dalam suatu model air tujuannya mengkondisikan sesuai dengan fisiologis tubuh manusia, yang kandungan terbesarnya adalah air (Desheng dkk, 2011).

- a) Transferable Intermolecular Potential (TIP)

Model N-point 'TIPn' pertama kali dikembangkan pada tahun 1981 oleh Jorgensen. Model ini terdiri dari 3.

- Model TIP3P

Model paling sederhananya adalah model TIP3P (3 titik) berdasarkan geometri molekul air dalam fase gas, memiliki tiga titik interaksi yang sesuai dengan tiga atom molekul air. Model TIP3P ini efektif, efisien pada komputasi, akurat, dan sederhana, sering digunakan pada simulasi dinamika molekul geometri, yaitu OH jarak dan sudut HOH, mendekati nilai eksperimental untuk molekul air dalam fase gas.

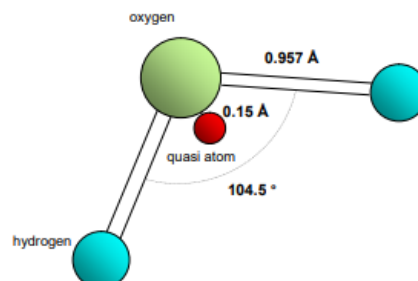


Gambar II.5 TIP3P

(Desheng dkk., 2011)

- Model TIP4P

Model TIP4P (4 titik), memiliki empat titik interaksi dengan menambahkan satu atom dummy di dekat oksigen di sepanjang garis sudut HOH dari model tiga situs (diberi label M pada gambar). Atom dummy hanya memiliki muatan negatif. Model ini meningkatkan distribusi elektrostatik di sekitar molekul air. Model pertama yang menggunakan pendekatan ini adalah model Bernal-Fowler yang diterbitkan pada tahun 1933.

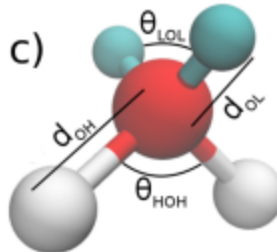


Gambar II.6 TIP4P

(Hayashi dan Tag, 2003)

- Model TIP5P

Model TIP5P (5 titik) menempatkan muatan negatif pada atom dummy (berlabel L) yang mewakili pasangan elektron 32 oksigen, dengan geometri seperti tetrahedral. Model awal dari jenis ini adalah model BNS dari Ben-Naim dan Stillinger, diusulkan pada tahun 1971 (Desheng dkk., 2011).



Gambar II.7 TIP5P
(Khalak dkk., 2018)

b) *Single Point Charge* (SPC)

Model SPC terdiri dari tiga titik muatan. Perbedaan utama antara SPC dan TIP adalah geometri model. SPC didasarkan pada panjang ikatan OH 1 \AA dan $\angle \text{HOH}$ $109,5^\circ$, meniru bentuk tetrahedral molekul air dalam es. Contoh model air ini yakni SPC, SPC/E dan lain-lain (Desheng dkk., 2011).

c. Netralisasi

Muatan listrik yang ditimbulkan oleh air dapat menimbulkan gangguan terhadap sistem, tujuan netralisasi adalah agar sistem dalam keadaan netral, dengan penambahan ion seperti Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , dan Cl^- (Desheng dkk., 2011).

d. Minimisasi

Minimisasi untuk menghindari kontak antar atom yang tidak diinginkan (merelaksasi sistem). Terdiri dari tiga tahap yakni tahap pertama minimisasi terhadap molekul air saja, tahap kedua merupakan tahapan yang diberi tahanan terhadap proteinnya saja dan tahap terakhir merupakan minimisasi terhadap seluruh sistem yang tidak diberi tahanan agar minimisasinya maksimal (Case dkk., 2018).

e. Ekuilibrase

Dilakukan untuk menstabilkan suhu, volume dan tekanan pada sistem, sehingga sistem mencapai keadaan konstan sebelum menjalani simulasi dinamika molekul. Ada empat parameter yang harus diamati setelah ekuilibrase dilakukan. Keempat parameter tersebut adalah temperatur, berat jenis, energi potensial, dan tekanan (Intan dan Arman, 2021).

f. Produksi

Sebelumnya dilakukan pengecekan terhadap temperatur, berat jenis, energi potensial, dan tekanan. Parameter tersebut dilihat untuk menentukan sistem telah siap untuk dilakukan proses produksi (Case dkk., 2018). Dalam simulasi dinamika molekul berkas masukan harus disiapkan meliputi persiapan makromolekul, ligan, serta topologi dan koordinat.

II.8.2 Parameter Simulasi Dinamika molekul

Setelah simulasi dinamika molekul dilakukan interpretasi hasil untuk mengetahui hasil dari simulasi tersebut.

a. Root Mean Standart Deviation (RMSD)

RMSD adalah deviasi yang diamati antara dua atom untuk memprediksi stabilitas protein. Analisis RMSD terbukti menjadi parameter penting dalam memberikan wawasan tentang pelipatan protein dalam studi *in vivo*. RMSD dari protein menjelaskan sifat pelipatan protein, di mana RMSD dari N set atom di waktu t, dihitung menggunakan (Delis susilawati dan Ruswanto, 2019) :

$$\text{RMSD}(t) = \sqrt{\frac{\sum_{i=0}^N |\vec{r}_i(t) - \vec{r}_i^0|^2}{N}} \dots\dots\dots (\text{II.3})$$

b. Root Mean Square Fluctuation (RMSF)

RMSF (fluktuasi akar rata-rata kuadrat) adalah fluktuasi yang diamati antara residu atau atom yang ada dalam makromolekul. Fluktuasi atom menjelaskan tingkat fleksibilitas protein selama simulasi. RMSF dari protein dapat dihitung menggunakan (Delis susilawati dan Ruswanto, 2019) :

$$\text{RMSFi} = \sqrt{\langle (\vec{r}_i - \langle \vec{r}_i \rangle)^2 \rangle} \dots\dots\dots (\text{II.4})$$

Perhitungan RMSF juga ditentukan untuk memahami fleksibilitas dan perbedaan motilitas dalam atom antara mutan dan asli. Alat lain seperti NAMD, plugin visual molekuler dynamics (VMD) juga digunakan secara luas untuk menghitung (Sneha dan Doss, 2016).

c. Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area (MMGBSA)

Energi bebas untuk pengikatan ligan (ΔG_{bind} dalam kkal/mol) dihitung dari dinamika molekul menggunakan metode MMGBSA. MMGBSA adalah sebuah metode aksesibilitas pelarut untuk mendapatkan energi bebas dari informasi struktural, menghindari kompleksitas simulasi energi bebas. Perhitungan MMGBSA cara tercepat dan paling hemat biaya untuk membuat perkiraan perubahan dalam afinitas, sifat interaksi protein-

peptida dapat dihitung. Pendekatan ini melihat parameter dalam perkiraan aviditas, dimana perubahan energi bebas bersih dihitung sebagai sejumlah komponen energi individu yang komprehensif. Dalam metode simulasi dinamika molekul untuk memperkirakan energi bebas, dan konstanta (Ylilauri, 2013).

d. *Molecular Mechanic Poisson Boltzmann Surface Area* (MMPBSA)

Energi bebas ikatan kompleks protein dan ligan dapat dihitung dengan menggabungkan luas permukaan molekul dengan dinamika molekul. Energi bebas yang mengikat memberikan gambaran tentang interaksi biomolekuler antara protein dan ligan. Energi ikat terdiri dari energi potensial, energi solvasi polar dan non polar. Perhitungan energi ikat pada metode ini dihitung dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\Delta G_{\text{binding}} = G_{\text{kompleks}} - (G_{\text{reseptor}} + G_{\text{ligan}}) \dots\dots\dots (II.5)$$

$\Delta G_{\text{binding}}$ mewakili energi ikat total G_{kompleks} , sedangkan energi ikat reseptor bebas adalah G_{reseptor} , dan ligan tak terikat diwakili oleh G_{ligan} (Rashmi, 2014).

II.8.3 Aplikasi Dinamika molekul

Assisted Model Building with Energy Refinement (AMBER) adalah program yang dibuat untuk melakukan simulasi dinamika molekul, terutama pada biomolekul. Kata amber juga sering digunakan pada *force fields* terhadap file dari senyawa yang akan digunakan untuk simulasi dinamika molekul. Pada program AMBER terdapat *AmberTools* yang merupakan gabungan dari beberapa program lisensi dari GPL. Rangkaian perangkat lunak AMBER dibagi menjadi dua bagian: *AmberTools18*, kumpulan program yang tersedia secara gratis sebagian besar dibawah lisensi GPL, dan AMBER 18, yang berpusat di sekitar program simulasi pmemd, dan yang terus dilisensikan seperti sebelumnya, di bawah lisensi yang lebih ketat. AMBER dibagi menjadi dua bagian *AmberTools* dan AMBER 11. *AmberTools* yaitu koleksi program sebagian besar bebas tersedia dibawah lisensi GPL dan AMBER 11 yang berpusat pada program simulasi pmemd dan sander. Penginstalan program memerlukan kedua bagian dan dimulai dengan *AmberTools* (Case dkk., 2018).