

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Inflamasi merupakan respons pertahanan alami yang bermanfaat bagi *host* dan dapat membatasi diri dengan cepat ketika faktor pemicu dihilangkan, infeksi teratasi dan jaringan yang rusak dapat diperbaiki. Respon inflamasi yang tidak terkontrol dapat menyebabkan kerusakan yang tidak dapat diperbaiki. Saat inflamasi terjadi, makrofag memproduksi dan mengekspresikan berbagai sitokin dan kemokin, *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) *interleukin-1 β* (IL-1 β) dan *interleukin-1 α* (IL-1 α) yang merupakan sitokin proinflamasi utama yang disekresi sebagai respon pulpa terhadap serangan bakteri (Goldberg, 2014).

Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) berperan penting dalam proliferasi sel, metabolisme sel, inflamasi, diferensiasi sel dan apoptosis serta berperan dalam proses perbaikan jaringan yang rusak dan mempromosikan pemanfaatan *mesenchymal stem cells* (MSCs). Penelitian *in vitro* yang dilakukan oleh Feng *et al* (2013) menunjukkan bahwa TNF- α mengaktifkan jalur NF- κ B dan mempromosikan diferensiasi osteogenik *Dental Pulp Stem Cells* (DPSCs) pada perbaikan jaringan pulpa. (Saddala and Huang, 2019; Zia *et al.*, 2020a; Sonmez *et al.*, 2023).

Interleukin-1 (IL-1) adalah salah satu sitokin pro-inflamasi yang terlibat dalam proses inflamasi akut dan kronis pada pulpa atau periapikal. *Interleukin-1* (IL-1) juga terlibat proses penyembuhan jaringan dengan menginduksi ekspresi *Urokinase plasminogen activator* (uPA) yang merupakan protease serin yang terlibat dalam remodeling jaringan dan migrasi sel. *Interleukin-1 β* (IL-1 β) dan IL-1 α memainkan peran penting dalam peradangan pulpa iatrogenik, dan merupakan kondisi yang sering disebabkan oleh prosedur gigi. Kadar IL-1 α yang meningkat pada pulpa yang meradang menunjukkan keterlibatannya dalam pembentukan pulpitis dan lesi periapikal. *Nuclear factor-kappa β* (NF- κ β) dan *mitogen-activated protein* (MAP) kinase yang teraktivasi pada proses peradangan menghasilkan pelepasan peptida antimikroba, sitokin, dan kemokin, seperti TNF- α , IL-1 β dan IL-1 α . (Lin *et al.*, 2018; Arora *et al.*, 2021; Kritikou *et al.*, 2021; Sonmez *et al.*, 2023)

Pulpa vital yang terpapar secara iatrogenik atau akibat trauma sebaiknya dipertahankan vitalitasnya menggunakan bahan biokompatibel untuk menstimulasi pembentukan dentin reparatif pada daerah yang terpapar (Nasri *et al.*, 2022). Kalsium hidroksida (Ca(OH)₂) telah lama digunakan sebagai bahan perawatan pulpa yang terpapar, dikenal sebagai perawatan *pulp capping*. Karakteristik antibakteri Ca(OH)₂ dapat mengurangi kontaminasi pulpa dari mikroba sehingga mempertahankan vitalitas jaringan pulpa, namun Ca(OH)₂ juga memiliki kekurangan yaitu solubilitas yang tinggi, degradasi seiring dengan waktu dan dapat menyebabkan *tunnel defect* yang menjadi jalan masuk bakteri ke dalam pulpa. Selain

itu, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dapat menyebabkan inflamasi persisten dan mengarah pada kematian pulpa. Penelitian telah banyak dilakukan untuk mendapatkan alternatif *capping agent* seperti MTA yang memberikan hasil yang memuaskan. Disamping itu bahan alami juga diteliti untuk dimanfaatkan sebagai alternatif *capping agent* atau ditambahkan ke dalam kalsium hidroksida untuk meningkatkan efektivitasnya antara lain propolis, ekstrak biji anggur serta *genistein* yang merupakan isoflavon dari kedelai. (Hayashi et al., 2013; Serra et al., 2017; Noor et al., 2021; Hamdy, Elgendi and Sharaan, 2022; Nasri, Jahromi and Aminzadeh, 2022).

Rumput laut *Eucheuma cottonii* (EC) merupakan tanaman laut yang tersebar banyak di perairan Indonesia, yang memiliki aktivitas farmakologis termasuk antitumor, antiprotozoal, antivirus, antioksidan, antinosiseptif, antiinflamasi, serta efek antikoagulan. Senyawa bioaktif dominan yang dikandung EC antara lain *quercetin*, *rutin*, *kaempferol*, *asam askorbat* (vitamin C) *triterpenoid*, *cholesterol*, *campesterol*, *stigmasterol*, β -sitosterol yang terbukti berpotensi pada dunia kesehatan melalui beberapa penelitian yang telah dilakukan (Abu Bakar et al., 2015; Twentyna et al., 2017; Sudirman et al., 2018; Fasya et al., 2019a; Sari et al., 2021; Hidayah et al., 2022).

Eucheuma cottonii dapat mengurangi inflamasi pada pasien asma, menunjukkan efek antikanker yang kuat dengan sifat modulasi enzim, dan efektif dalam menghambat pertumbuhan tumor. *Eucheuma cottonii* juga tidak menunjukkan efek toksik terhadap hati dan ginjal. Dalam bidang kedokteran gigi, Hidayah et al (2022) menunjukkan EC efektif dalam penyembuhan ulkus traumatik pada rongga mulut hewan uji. Saifudin et al (2015) dan Sari (2018) mendapatkan EC dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* yang banyak ditemukan pada lesi karies. Hal ini menunjukkan beragam manfaat dari EC, yang bisa dikaitkan dengan banyaknya senyawa bioaktif yang terkandung dalam EC sehingga perlu ditelusuri lebih jauh aktivitas terapeutik yang potensial dari EC untuk dimanfaatkan sebagai bahan tambahan dalam material *capping agent*, utamanya sebagai antiinflamasi (Saifudin, Raharjo and Eso, 2015; Sari and Auliya, 2018; Hidayah et al., 2022).

Berkembangnya teknologi dalam dunia kesehatan melahirkan banyak pendekatan dalam melakukan penelitian. Studi *in silico* merupakan metode yang digunakan untuk menganalisis potensi terapi alami, dari ligan dan kompleks reseptor berbasis komputer. Pendekatan *in silico* berperan penting dalam setiap tahap alur penemuan kandidat obat. Kelebihan metode ini ialah hasil yang didapatkan lebih efisien karena tidak membutuhkan biaya besar dan tidak membutuhkan waktu yang lama dalam pengerjaannya (Khurshid Ahmad, 2014; Makatita, 2020; Moradi et al., 2022).

Studi *in silico* menyediakan *platform* untuk menyaring aktivitas terapeutik potensial tertinggi terhadap target molekuler untuk uji *in vitro* dan *in vivo* lebih lanjut serta memberikan informasi tentang struktur molekul yang tidak diketahui, termasuk

enzim dan ligan potensial. *Molecular docking* merupakan metode dalam studi *in silico* yang sering digunakan untuk memprediksi interaksi dua molekul menghasilkan model yang mengikat dengan menggunakan metode komputasi. *Docking* dilakukan antara molekul kecil dan makromolekul, misalnya docking protein-ligan. Studi *in silico* dapat memberikan informasi yang lebih jauh tentang aktivitas senyawa potensialnya yang lebih menonjol dan data yang diperoleh dapat menjadi acuan untuk uji lanjutan secara *in vitro* dan *in vivo* (Khurshid Ahmad, 2014; Luki, 2018; Angraeni, Wardhani and Nuraini, 2020; Makatita, 2020; Moradi et al., 2022).

Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi interaksi antara senyawa bioaktif dari rumput laut (*Eucheuma cottonii*) terhadap *Tumor necrosis factor α* (TNF- α), *interleukin-1 β* (IL-1 β), dan *interleukin-1 α* (IL-1 α) dengan cara *molecular docking* terhadap jenis interaksi, jarak ikatan, dan *binding affinity*.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana interaksi senyawa bioaktif dari rumput laut (*Eucheuma cottonii*) terhadap TNF- α , IL-1 β dan IL-1 α menggunakan metode *in silico*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Tujuan umum penelitian ini adalah mengevaluasi interaksi senyawa bioaktif dari rumput laut (*Eucheuma cottonii*) terhadap TNF- α , IL-1 β dan IL-1 α sebagai kandidat bahan tambahan *capping agent* menggunakan studi *in silico*.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah:

- Menganalisis *binding affinity* dari hasil *docking* TNF- α , IL-1 β dan IL-1 α terhadap senyawa bioaktif rumput laut (*Eucheuma cottonii*) menggunakan studi *in silico*.
- Menganalisis jenis ikatan dari hasil *docking* TNF- α , IL-1 β dan IL-1 α terhadap senyawa bioaktif rumput laut (*Eucheuma cottonii*) menggunakan studi *in silico*.
- Mengevaluasi apakah TNF- α , IL-1 β dan IL-1 α berinteraksi dengan baik terhadap senyawa bioaktif rumput laut (*Eucheuma cottonii*) dan berpotensi sebagai kandidat bahan tambahan *capping agent*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai bahan rujukan referensi, masukan, dan wawasan tentang studi *in silico* rumput laut (*Eucheuma cottonii*) terhadap TNF- α , IL-1 β dan IL-1 α sebagai kandidat bahan tambahan *capping agent*.

1.4.2 Manfaat Klinis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai masukan dalam pengembangan dan pemanfaatan hasil sumber daya alam Sulawesi Selatan, yaitu

rumput laut yang dapat dimanfaatkan sebagai kandidat bahan tambahan *capping agent* dalam perawatan *pulp capping*.

1.4.3 Manfaat Bagi Masyarakat

Penelitian ini diharapkan berguna untuk pengembangan bahan alternatif yang dapat digunakan dalam perawatan *pulp capping* berbahan dasar alam khususnya untuk masyarakat Sulawesi Selatan dengan menggunakan rumput laut.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan waktu

Penelitian ini dilakukan di fakultas kedokteran gigi universitas Hasanuddin dan laboratorium farmasi poltekkes kemenkes makassar dengan periode waktu januari - Februari 2024.

2.2 Alat dan Bahan Penelitian

2.2.1 Alat yang Digunakan

2.2.1.1 Perangkat Keras

Perangkat keras yang digunakan dalam penelitian ini adalah laptop dan sistem operasi *Windows 10* yang terhubung dengan jaringan internet.

2.2.1.2 Perangkat Lunak

Perangkat lunak yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya : *Protein Data Bank* (PDB), Website Pubchem, Aplikasi pyrx, Aplikasi *Autodock*, Aplikasi *Biovia Discovery Studio*, Website *pkCSM*, Website *Protox Online Tool*.

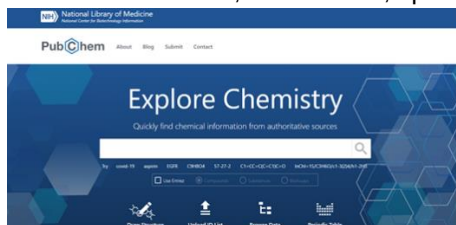
- a. website *Protein Data Bank* (PDB) ID (<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) untuk mendownload data protein.



Gambar 2. 1 Tampilan website PDB

Sumber: <https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

- b. Website Pubchem yang merupakan arsip terbuka berisi informasi berbagai entitas kimia termasuk molekul kecil, karbohidrat, lipid dan asam amino.



Gambar 2. 2 Tampilan website PubChem.

Sumber: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

- c. Aplikasi pyrx untuk preparasi ligan



Gambar 2. 3 Tampilan Aplikasi PyRx.

Sumber: dokumentasi pribadi

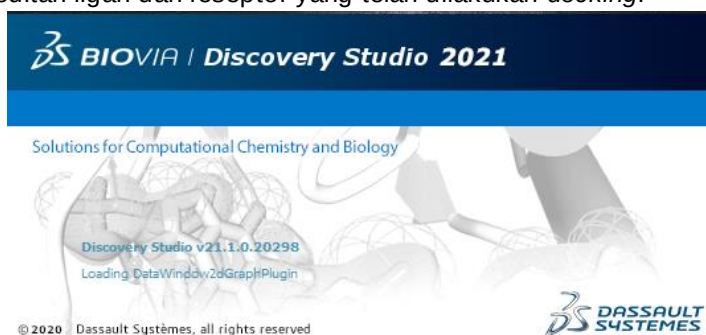
- d. Aplikasi Autodock untuk melakukan docking



Gambar 2. 4 Tampilan Aplikasi Autodock.

Sumber: dokumentasi pribadi

- e. Aplikasi Biovia Discovery Studio V21.1.0.20298 untuk melakukan pengeditan ligan dan reseptor yang telah dilakukan docking.



Gambar 2. 5 Aplikasi Biovia Discovery Studio

Sumber: dokumentasi pribadi

f. Website pkCSM untuk melakukan prediksi ADMET

The screenshot shows the pkCSM website with a navigation bar at the top. The main heading is "Pharmacokinetic properties". Below this, there is a diagram illustrating the prediction workflow: a chemical structure is input into the pkCSM tool, which then outputs various pharmacokinetic parameters. The "Step 1: Please provide a set of molecules (SMILES format)" section contains two options: "Upload your SMILES file:" with a "Pick File" button, and "Provide a SMILES string:" with a text input field. An example SMILES string is provided: CC(=O)OCC(=O)CC(=O)CC(=O)O. A "Run example" button is also visible.

Gambar 2. 6 Tampilan website pkCSM.

Sumber: <https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsml/prediction>

g. Website Protox Online Tool untuk prediksi Toksisitas

The screenshot shows the Protox Online Tool interface. At the top, there are several tabs: "TOX PREDICTION", "MODEL INFO", "STATISTICS", "CONTACT", and "LITERATURE". The "TOX PREDICTION" tab is active. Below the tabs, there is a "Tox-Prediction" section with a search bar. The search bar contains the text "Tox-Prediction". Below the search bar, there are two input fields: "Protein Name" and "Chemical Smiles". The "Protein Name" field contains the text "Tox-Prediction" and the "Chemical Smiles" field contains the text "Tox-Prediction". Below the input fields, there is a "Please select any additional models to predict" section with several checkboxes: "Organ Toxicity", "Toxicity and points", "Cardiogenicity", "Immunotoxicity", "Mutagenicity", "Cytotoxicity", "Tox21 Nuclear receptor signaling pathway", "Androgen Receptor (AR)", and "Androgen Receptor (AR)". To the right of the checkboxes, there is a "Selected molecule: Tamoxifen" section with a chemical structure of Tamoxifen and a "To load a molecule click" button.

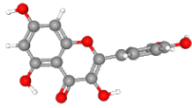
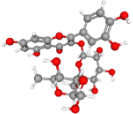
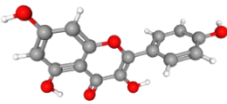
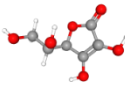
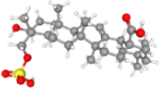
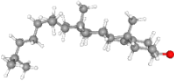
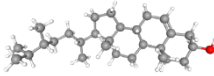
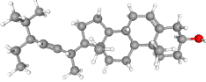
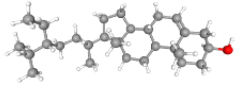
Gambar 2. 7 Tampilan website Protox Online Tool.

Sumber: <https://tox.charite.de/protox3/>

2.2.2 Bahan yang Digunakan

2.2.2.1 Senyawa bioaktif rumput laut (*Eucheuma cottonii*)

Tabel 2. 1 Senyawa bioaktif rumput laut (*Eucheuma cottonii*)

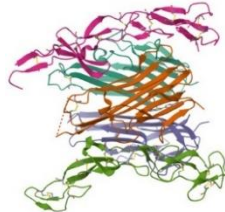
No	Nama	Gambaran 3D	Formula	Sumber
1	<i>Quercetin</i>		C ₁₅ H ₁₀ O ₇	<i>PubChem</i>
2	<i>Rutin</i>		C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	<i>PubChem</i>
3	<i>Kaempferol</i>		C ₁₅ H ₁₀ O ₆	<i>PubChem</i>
4	Vitamin C		C ₆ H ₈ O ₆	<i>PubChem</i>
5	Triterpenoid		C ₃₀ H ₄₈ O ₇ S	<i>PubChem</i>
6	Cholesterol		C ₂₇ H ₄₆ O	<i>PubChem</i>
7	Campesterol		C ₂₈ H ₄₈ O	<i>PubChem</i>
8	Stigmasterol		C ₂₉ H ₄₈ O	<i>PubChem</i>
9	β-sitosterol		C ₂₉ H ₅₀ O	<i>PubChem</i>

2.2.2.2 Reseptor target

Struktur tiga dimensi dari reseptor *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) (PDB ID:7KP8), *Interleukin-1 β* (IL-1 β) (PDB ID:5R8O) dan *Interleukin-1 α* (IL-1 α) (PDB ID:1IRA) yang berfungsi sebagai protein target diperoleh dari laman PDB ID <https://www.rcsb.org/pdb>.

1. *Tumor necrosis factor- α* (TNF- α)

Reseptor yang digunakan adalah *Tumor necrosis factor- α* (TNF- α) yang diperoleh dari *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/>).



Gambar 2. 8 Reseptor TNF- α dengan PDB ID 7KP8.

Sumber: <https://www.rcsb.org/structure/7KP8>

2. *Interleukin-1 β*

Reseptor yang digunakan adalah *interleukin-1 β* yang diperoleh dari *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/>).



Gambar 2. 9 Reseptor IL-1 β dengan PDB ID 5R8O

Sumber: <https://www.rcsb.org/structure/5R8O>

3. *Interleukin-1 α*

Reseptor yang digunakan adalah *interleukin-1 α* yang diperoleh dari *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/>).



Gambar 2. 10 Reseptor IL-1 α dengan PDB ID 1IRA.

Sumber: <https://www.rcsb.org/structure/1IRA>

2.3 Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian *eksperimental* secara studi *in silico* untuk menguji apakah variabel-variabel eksperimen efektif atau tidak dengan bantuan sistem komputer. Penelitian ini menggunakan analisis *molecular docking* dari interaksi reseptor dan ligan yang didapatkan dari web *Protein Data Bank* (PDB) ID dan *Pubchem*. Struktur Senyawa bioaktif diperoleh melalui *database Knapsack*. Interaksi antara senyawa bioaktif rumput laut (*Eucheuma cottonii*) sebagai ligan terhadap TNF- α , IL-1 β , dan IL-1 α sebagai reseptor dianalisis menggunakan *Autodock*. Ligan dan reseptor yang ditargetkan akan divisualisasikan menggunakan aplikasi *software BIOVIA Discovery Studio V21.1.0.20298*.

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Persiapan Ligan

a. Pengunduhan Ligan

Pengunduhan ligan senyawa bioaktif rumput laut melalui *PubChem ID* sesuai senyawa yang akan dilakukan *docking*. Diunduh dengan format *sdf*, yang diperoleh dari <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

b. Preparasi Ligan

Preparasi ligan menggunakan aplikasi perangkat lunak *AutoDock tools* 1.5.6 dan *Pyrx*.

2.4.2 Persiapan Reseptor

a. Pengunduhan

penelitian ini menggunakan TNF- α , IL-1 β , IL-1 α dengan identitas makromolekul *PDB ID* diunduh dalam format *pdb*. Pada *Protein Data Bank* dengan alamat situs (<http://www.rcsb.org/pdb/>)

b. Preparasi Reseptor

preparasi protein target menggunakan perangkat lunak *AutoDock tools* 1.5.6 dengan cara memprotonasi dan menentukan koordinat dari protein target, disimpan dalam format *format.pdbqt*.

2.4.3 Molecular Docking

Docking molekul senyawa bioaktif rumput laut dilakukan dengan menggunakan aplikasi *Autodock*.

2.4.4 Fungsi Penilaian (Skor)

Penilaian dalam penelitian ini berupa penilaian terhadap *Root Mean Square Deviation* (RMSD) dengan satuan amstrong (A), energi ikatan dalam satuan Kcal/mol, Konstanta penghambatan / Inhibition Constant (Ki) dalam satuan mM.

2.4.5 Validasi Metode Docking.

Validasi *docking* dilakukan untuk memastikan bahwa orientasi ligan dan posisi yang diperoleh dari studi *docking* bernilai valid dengan nilai RMSD $\leq 2,0 \text{ \AA}$.

2.4.6 Visualisasi Hasil Docking

Visualisasi hasil *docking* dilakukan untuk menganalisis jenis interaksi antara senyawa bioaktif rumput laut dengan TNF- α , IL-1 β , IL-1 α . Analisis data dilakukan *Biovia Discovery Studio* dengan memperhatikan hasil *docking* senyawa aktif rumput laut dengan TNF- α , IL-1 β , IL-1 α . Penentuan konformasi ligan hasil *docking* dilakukan dengan memilih konformasi ligan yang mempunyai afinitas ikatan yang paling rendah dengan pose terbaik kemudian dianalisis menggunakan *Biovia Discovery Studio*. Selanjutnya hasil penelitian akan ditampilkan dalam bentuk tabulasi dan ilustrasi tiga dimensi, serta dijelaskan secara naratif.

2.4.7 Drug Likeness dan Profil ADMET

Analisis absorpsi, distribusi, metabolisme, eliminasi, dan toksisitas (ADMET) merupakan hal yang penting dalam penemuan dan pengembangan obat. *Drug likeness* ditentukan oleh aturan Lipinski 5 (RO5). Profil ADMET yang berhubungan dengan RO5 seperti *H-bond donor* (HBD) kurang dari 5, *H-bond acceptor* (HBA) kurang dari 10, *Moriguchi Log P* (M Log P) kurang dari 4,15 atau terhitung sebagai *Log P* (C Log P) kurang dari 5, dan berat molekul kurang dari 500 g/mol. Sifat fisikokimial lainnya seperti *topological polar surface area* (TPSA, kurang dari $\text{\AA}^2$) juga dianalisis. Software berbasis web, yaitu *SwissADME* (<http://www.swissadme.ch>) atau website *PkCSM* digunakan untuk memeriksa parameter tersebut. Beberapa dari senyawa yang tidak memiliki informasi di *PubChem* diprediksi menggunakan metode konsensus dalam *Toxicity Estimation Software Tool* (T.E.S.T.).

2.5 Tahap Pelaporan

Data yang diperoleh akan diolah dan dianalisis, selanjutnya dilaporkan dalam bentuk tabel hasil penelitian.

2.6 Parameter Pengamatan

2.6.1 Validasi Metode Docking

Validasi metode *docking* dilakukan dengan *redocking native ligand* terhadap reseptornya. Parameter yang diamati pada proses ini adalah nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*). Metode *docking* dikatakan valid jika memiliki nilai RMSD $\leq 2,5 \text{ \AA}$. Jika nilai RMSD yang diperoleh lebih besar dari $2,5 \text{ \AA}$ maka metode yang digunakan tidak valid (Frengki et al 2013)

2.6.2 Hasil Docking Senyawa bioaktif

Parameter yang diamati dalam proses docking adalah *free energy of binding* dengan satuan Kcal/mol. Semakin rendah energi pengikatan antara ligan dan reseptor, semakin stabil ikatannya. Fungsi *docking* juga dapat melihat konstanta penghambatan (*Inhibition Constant*) untuk mengetahui daya hambat suatu senyawa terhadap reseptornya.

2.6.3 Hasil Visualisasi Molecular Docking Dengan Discovery Studio 2017 R2 Client

Parameter yang diobservasi dalam eksperimen ini adalah kesesuaian antara residu asam amino dan jenis ikatan yang dibentuk antara ligan dan reseptor.

2.6.4 Hasil Prediksi Nilai Parameter Farmakokinetik Senyawa Bioaktif

Parameter farmakokinetik senyawa bioaktif *Eucheuma cottonii* dan prediksi sifat fisikokimia berdasarkan aturan *Lipinski's Rule of Five* (RO5). Menurut aturan Lipinski, pemberian obat oral terkait dengan absorpsi dan distribusi obat. Selama tidak ada pelanggaran terhadap aturan RO5, senyawa uji dianggap memenuhi persyaratan untuk digunakan sebagai sediaan oral (Lipinski, 2004). Peningkatan berat molekul dikaitkan dengan bioavailabilitas yang buruk, fraksi yang diserap buruk, fraksi terikat lebih tinggi dan pembersihan ginjal buruk (Sakaeda *et al.*, 2001). Nilai Log P suatu senyawa bervariasi antara -0,56 hingga 4,29, semakin besar nilai Log P maka hidrofilitas senyawa tersebut semakin berkurang, hal ini menunjukkan rendahnya bioavailabilitas (Singh, 2016).