

**UJI IKATAN ELLAGITANIN EKSTRAK ETANOL DAUN BENALU MANGGA
(*Dendrothoe pentandra*) DENGAN DNA TOPOISOMERASE II α SEBAGAI
AGEN KOKEMOTERAPI 5-FU PADA KANKER SERVIKS (SECARA *IN
SILICO*)**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh:

Daniel Winatakusuma

155070100111044

**PROGRAM STUDI S1 PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2018

DAFTAR ISI

Halaman

Halaman Judul.....	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan.....	iii
Kata Pengantar.....	iv
Abstrak.....	vi
Abstract.....	vii
Daftar Isi.....	viii
Daftar Tabel.....	xii
Daftar Gambar.....	xiii
Daftar Singkatan.....	xv
Daftar Lampiran.....	xvi

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Manfaat Akademis.....	5
1.4.2 Manfaat Praktis.....	5

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker	
2.2 Kanker serviks.....	6
2.2.1 Definisi.....	6
2.2.2 Epidemiologi.....	6
2.2.3 Anatomi Serviks.....	7
2.2.4 Etiologi dan Patofisiologi.....	8
2.2.5 Faktor Resiko.....	10
2.2.6 Klasifikasi.....	13
2.2.7 Tatalaksana.....	13
2.2.7.1 Tatalaksana Lesi Prakanker.....	13
2.2.7.2 Tatalaksana Kanker Invasif.....	14
2.3 Fluoropyrimidine 5-Fluorouracil (5-FU).....	17
2.4 Benalu Mangga (<i>Dendroptoe pentandra</i>).....	19
2.5 Tanin.....	20
2.5.1 Manfaat Tanin.....	20
2.5.2 Ellagitanin.....	21
2.6 DNA Topoisomerase II.....	22
2.6.1 DNA Topoisomerase II α	23
2.7 <i>In Silico</i>	23
2.7.1 Metode <i>Docking</i>	24
2.7.2 <i>Binding Affinity</i>	26

BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1	Kerangka Konsep.....	27
3.2	Deskripsi Kerangka Konsep.....	28
3.3	Hipotesis Penelitian.....	29
BAB 4. METODE PENELITIAN		
4.1	Rancangan Penelitian.....	30
4.2	Populasi dan Sampel Penelitian.....	30
4.2.1	Populasi Penelitian.....	30
4.2.2	Sampel Penelitian.....	30
4.3	Identifikasi Variabel.....	30
4.3.1	Variabel Tergantung.....	30
4.3.2	Variabel Bebas.....	31
4.4	Lokasi dan Waktu Penelitian.....	31
4.5	Alat dan Bahan Penelitian.....	31
4.5.1	Alat Penelitian.....	31
4.5.2	Bahan Penelitian.....	31
4.6	Definisi Operasional.....	32
4.7	Prosedur Penelitian.....	33
4.7.1	Pencarian dan Preparasi Data Struktur Ligan (Ellagitannin dan FdUMP).....	33
4.7.2	Pencarian dan Preparasi Data Struktur Makromolekul.....	34
4.7.2.1	Pencarian dan Preparasi Data Struktur DNA Topoisomerase II α	34
4.7.2.2	Pencarian dan Preparasi Data Struktur Thymidylate Synthase.....	36

4.7.3	Proses <i>Docking</i> Protein.....	38
4.8	Alur Penelitian.....	40
4.9	Analisis Data.....	40
BAB 5. HASIL PENELITIAN		
5.1	Hasil <i>Binding Affinity</i> 5-FU dengan <i>Thymidylate Synthase</i>	42
5.2	Hasil <i>Binding Affinity</i> Ellagitanin dengan <i>DNA Topoisomerase II α</i>	44
5.3	Identifikasi Ikatan Ellagitanin dengan <i>DNA Topoisomerase II α</i>	47
BAB 6. PEMBAHASAN		
6.1	Ikatan 5-FU dengan <i>Thymidylate Synthase</i>	49
6.2	Ikatan Ellagitanin dengan <i>DNA Topoisomerase II α</i>	50
6.3	Interaksi Ikatan Ellagitanin dengan <i>DNA Topoisomerase II α</i>	51
6.4	Keterbatasan Penelitian.....	52
BAB 7. PENUTUP		
7.1	Kesimpulan.....	53
7.2	Saran.....	53
DAFTAR PUSTAKA		54
LAMPIRAN		57

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

UJI IKATAN ELLAGITANIN EKSTRAK ETANOL DAUN BENALU MANGGA
(*Dendrophthoe pentandra*) DENGAN DNA TOPOISOMERASE II α SEBAGAI
AGEN KOKEMOTERAPI 5-FU PADA KANKER SERVIKS
(SECARA *IN SILICO*)

Oleh :

Daniel Winatakusuma
NIM. 155070100111044

Telah diuji pada

Hari : Selasa

Tanggal : 4 Desember 2018

Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I,

dr. Ardian Rizal, Sp.JP
NIP. 198108232008121002

Pembimbing I/Penguji II,

Pembimbing II/Penguji III,

Agustina Tri Endharti, M.Si, Ph.D
NIP: 196908191998022001

dr. Hidayat Suluti, Ph.D, Sp.M
NIP: 196701231996011001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter

dr. Triwahju Astuti, M.Kes., Sp.P(K)
NIP. 196310221996012001

ABSTRAK

Winatakusuma, Daniel. 2018. **Uji Ikatan Ellagitanin Ekstrak Daun Benalu Mangga (*Dendrothoe pentandra*) dengan DNA Topoisomerase II α Sebagai Agen Kokemoterapi 5-FU pada Kanker Serviks (Secara *in silico*)**. Tugas akhir, Program Studi S1 Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Agustina Tri Endharti, S.Si, Ph.D (2) dr. Hidayat Sujuti, Ph.D, Sp.M

Kanker serviks merupakan jenis kanker dengan prevalensi tinggi di Indonesia, penyebab utamanya yaitu virus HPV. Pengobatan kanker serviks yang ada pada saat ini salah satunya dengan kemoterapi, 5-FU merupakan agen kemoterapi yang biasa digunakan. Mekanisme kerja 5-FU melalui penghambatan enzim *thymidylate synthase*. Salah satu mekanisme 5-FU adalah menghambat enzim *thymidylate synthase*. Penggunaan 5-FU dosis tunggal memiliki efek samping sehingga perlu dikombinasikan dengan agen kokemoterapi berbahan alam, salah satunya ellagitanin yang terdapat pada berbagai jenis tanaman, termasuk pada benalu mangga (*Dendrothoe pentandra*). Ellagitanin dapat bertindak sebagai inhibitor *DNA topoisomerase II α* pada sel kanker. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui potensi ikatan ellagitanin dengan *DNA topoisomerase II α* dengan menggunakan metode *molecular docking*, potensi dapat dinilai dari besar afinitas ikatan dan perbandingannya dengan ligan/ obat kontrol. Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental sekunder menggunakan data struktur yang diambil dari *database Pubchem* dan *Uniprot*. Pyrx 0.8 digunakan untuk mengikatkan ellagitanin dengan *DNA topoisomerase II α* , Pymol untuk visualisasi struktur antarmolekul kompleks, dan LigPlot untuk identifikasi ikatan yang terbentuk. Pada hasil docking terhadap *DNA topoisomerase II α* , didapatkan nilai *binding affinity* ellagitanin sebesar -5,3 kkal/mol sementara *binding affinity etoposide* (obat kontrol) sebesar -4,8 kkal/mol. Dalam perbandingannya dengan obat kontrol *etoposide*, ellagitanin memiliki nilai *binding affinity* yang lebih kuat sehingga ellagitanin dapat dikatakan berpotensi dalam berikatan dengan *DNA topoisomerase II α* . Mekanisme kerja ellagitanin yang berbeda dengan 5-FU menjadikan efek sinergis dalam menghambat kanker serviks.

Kata Kunci: kanker serviks, 5-FU, *thymidylate synthase*, ellagitanin, *DNA topoisomerase II α*

ABSTRACT

Cervical cancer is a type of cancer with high prevalence in Indonesia, the main cause of which is the HPV virus. The treatment of cervical cancer that is currently available is chemotherapy, 5-FU is a commonly used chemotherapy agent. The mechanism of action of 5-FU is through inhibition of the enzyme thymidylate synthase. One of the 5-FU mechanisms is to inhibit the thymidylate synthase enzyme. The use of a single 5-FU dose has side effects so it needs to be combined with natural chemotherapy agents, one of which is ellagitannin found in various types of plants, including the mango parasite (*Dendrophthoe pentandra*). Ellagitannin can act as a DNA topoisomerase II α inhibitor in cancer cells. The purpose of this study is to determine the potential of ellagitannin bonds with DNA topoisomerase II α using the molecular docking method, the potential can be assessed from the large bond affinity and its comparison with ligands / control drugs. This research is a kind of secondary experimental research by using data from *Pubchem* and *Uniprot* databases. Pyrx 0.8 is used to bind ellagitannin with DNA topoisomerase II α , Pymol to visualize complex intermolecular structures, and LigPlot to identify the bonds formed. In the docking result of DNA topoisomerase II α , the binding affinity score of ellagitannin was -5.3 kcal / mol while etoposide (control drug) was -4,8 kcal/mol. Ellagitannin can bind to DNA topoisomerase II α with a stronger binding affinity than etoposide thus ellagitannin can be said to have the potential to bind to DNA topoisomerase II α . The mechanism of action of ellagitannin that is different from 5-FU makes a synergistic effect in inhibiting cervical cancer.

Keywords: cervical cancer, 5-FU, thymidylate synthase, ellagitannin, DNA topoisomerase II α

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker serviks adalah suatu penyakit keganasan yang menyerang leher rahim atau sering disebut serviks pada wanita. Kanker serviks merupakan jenis kanker terbanyak kedua dan ditemukan 445.000 kasus baru di dunia pada tahun 2012 (Ferwadi & Gunawan, 2017). Diperkirakan ditemukan 40 ribu kasus baru kanker leher rahim di Indonesia setiap tahunnya (Pustaka & Rasjidi, 2009). Pada tahun 2013, kanker serviks merupakan jenis kanker dengan prevalensi terbesar pada wanita di Indonesia, yaitu 0,8% (Kementerian Kesehatan RI Pusat Data dan Informasi Kesehatan, 2015).

Selama ini, penyakit kanker ditanggulangi melalui pengobatan secara fisika, yaitu dengan pembedahan, penyinaran, dan secara kimia menggunakan kemoterapi atau dengan ramuan tradisional. Salah satu obat kemoterapi yang sering digunakan adalah *Fluoropyrimidine 5-Fluorouracil* (5-FU). 5-FU adalah salah satu jenis obat kemoterapi yang digunakan cukup luas untuk mengatasi kanker. 5-FU termasuk obat golongan antimetabolit dimana 5-FU bekerja dengan cara menghambat proses biosintesis esensial dan menghambat aktivitas normal dari makromolekul seperti DNA atau RNA. Mekanisme 5-FU dalam menghambat pembentukan DNA adalah dengan bertindak sebagai inhibitor terhadap enzim *thymidylate synthase* (TS) (Longley *et al.*, 2003).

Pengobatan kanker dengan kemoterapi tunggal memiliki efek samping yang berat dan sukar dihindari. Efek samping yang paling sering terjadi pada pasien dengan terapi sitostatika/ kemoterapi adalah mual dan muntah (Ratih, 2010).

Oleh karena itu pengobatan tersebut perlu dikombinasikan dengan suatu senyawa yang disebut agen kokemoterapi atau penunjang terapi kanker.

Penggunaan agen kokemoterapi dapat mengurangi dosis dari obat kemoterapi utama sehingga efek samping dan toksisitas dari obat kemoterapi dapat lebih ditekan (Rahayu *et al.*, 2010).

Beberapa senyawa penunjang terapi kanker bersumber dari bahan alam yang diperkirakan mempunyai prospek tinggi antara lain tanin (termasuk ellagitanin), flavonoid, saponin, dan triterpenoid. Senyawa-senyawa ini terdapat dalam beberapa jenis tanaman, salah satunya pada tanaman benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*), yang telah diteliti menggunakan ekstraksi etanol (Fitrilia *et al.*, 2015). Hasil uji *in vitro*, telah terbukti bahwa kombinasi antara 5-FU dengan ekstrak daun benalu mangga dapat meningkatkan apoptosis dan ekspresi p21 pada sel kanker serviks (sel HeLa) dibanding dengan penggunaan 5-FU secara tunggal (Endharti *et al.*, 2018).

Ellagitanin merupakan satu dari dua jenis tanin terhidrolisis bersama dengan gallotanin. Di antara jenis tanin yang lain, ellagitanin merupakan jenis yang paling banyak memiliki nilai bagi manusia, terutama nilai di bidang kesehatan. Aktivitas biologis dan farmakologi ellagitanin yang telah diketahui antara lain, penghambatan proses karsinogenesis, anti-tumor, antivirus, dan antioksidan (peroksidasi lipida, lipoksigenase, oksidasi xanthin, dan oksidasi monoamin) (Hernawan & Setyawan, 2003).

Efek ellagitanin sebagai antikanker dapat bekerja pada beberapa target protein. Menggunakan *Pass Online*, salah satu target protein ellagitanin pada sel kanker adalah *DNA topoisomerase II α* . *DNA topoisomerase II α* (Top2 α) merupakan isoform dari enzim topoisomerase, yang merupakan enzim nukleus

yang berperan penting dalam menangani permasalahan topologi DNA yang berasosiasi dengan replikasi DNA (Pouyse *et al.*, 2012). Top2 α dominan diekspresikan pada sel-sel yang aktif berproliferasi seperti pada sel kanker, termasuk juga pada sel kanker serviks (Setiawan *et al.*, 2016). Inhibisi pada Top2 α akan menyebabkan efek antiproliferasi sehingga Top2 α sering diteliti untuk dijadikan target obat kanker, namun mekanisme obat-obat kanker yang ada saat ini adalah menghambat Top2, tidak spesifik hanya menghambat Top2 α (Pouyse *et al.*, 2012). Saat ini, masih belum ada penelitian *in silico* yang meneliti mengenai potensi ikatan antara ellagitannin dengan Top2 α .

In silico merupakan pendekatan pada suatu kondisi/ keadaan nyata ke dalam simulasi computer dengan menggunakan program tertentu dalam mendesain obat sebelum dilanjutkan secara *in vitro* maupun *in vivo* (Suharna, 2012). *Molecular docking* adalah salah satu cakupan dalam penelitian *in silico*, yang merupakan suatu prosedur komputasi yang digunakan untuk memprediksi konformasi antara suatu protein atau molekul asam nukleat (DNA atau RNA) dengan suatu protein lain atau ligan yang merupakan molekul kecil (Danniswara, 2018)). Salah satu aspek penting dalam *molecular docking* adalah fungsi *scoring* yang berperan dalam menentukan afinitas ikatan (*binding affinity*) antara makromolekul dengan ligan (Funkhouser, 2007). Nilai *binding affinity* merupakan jumlah energi yang dibutuhkan agar suatu ligan dapat berikatan dengan reseptornya yang diukur dalam satuan kkal/mol. Makin negatif nilai *binding affinity*, maka makin kuat afinitas antara ligan dengan reseptornya karena energi yang digunakan adalah seminimum mungkin (Dallakyan dan Olson, 2015).

Berdasarkan penjelasan di atas, perlu diteliti seberapa besar kekuatan ikatan antara ellagitanin dari ekstrak daun benalu mangga dengan *DNA topoisomerase II α* pada sel kanker serviks secara *in silico* dengan *molecular docking* untuk dapat mengetahui secara lebih lanjut apakah ellagitanin dapat digunakan sebagai salah satu agen ko-kemoterapi dengan 5-FU untuk pengobatan kanker serviks yang lebih efektif.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ellagitanin memiliki potensi ikatan yang baik dengan *DNA topoisomerase II α* sehingga dapat berpotensi menjadi agen kokemoterapi 5-FU untuk pengobatan kanker serviks?

Sub Rumusan Masalah

1. Berapa nilai *binding affinity* pada ikatan antara 5-FU dengan enzim *thymidylate synthase* secara *in silico*?
2. Berapa nilai *binding affinity* pada ikatan antara ellagitanin dengan *DNA topoisomerase II α* secara *in silico*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui potensi ikatan ellagitanin dalam ekstrak daun benalu mangga dengan *DNA topoisomerase II α* sebagai agen kokemoterapi 5-FU pada kanker serviks secara *in silico*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui nilai *binding affinity* antara 5-FU dengan *thymidylate synthase* secara *in silico*.
2. Mengetahui nilai *binding affinity* antara ellagitanin dengan DNA *topoisomerase II α* secara *in silico*.

1.4 Manfaat penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

Memperluas pengetahuan mengenai salah satu kandungan senyawa kimia dalam ekstrak daun benalu mangga yaitu ellagitanin yang diduga memiliki potensi ikatan yang baik terhadap DNA *topoisomerase II α* pada sel kanker serviks secara *in silico* untuk dapat dijadikan acuan untuk diteliti lebih lanjut dengan menggunakan metode *in vivo*.

1.4.2 Manfaat Praktis

Memberikan informasi baru pada masyarakat mengenai adanya salah satu kandungan senyawa kimia dalam ekstrak daun benalu mangga yaitu ellagitanin yang memiliki potensi sebagai agen ko-kemoterapi untuk pengobatan kanker serviks.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker

Kanker adalah istilah umum untuk satu kelompok besar penyakit yang dapat mempengaruhi setiap bagian dari tubuh. Istilah lain yang digunakan adalah tumor ganas dan neoplasma. Salah satu fitur mendefinisikan bahwa kanker adalah pertumbuhan sel-sel baru secara abnormal yang tumbuh melampaui batas normal, dan yang kemudian dapat menyerang bagian sebelah tubuh dan menyebar ke organ lain (Schiffman *et al*, 2011).

Pada tahun 2013, prevalensi penyakit kanker pada penduduk semua umur di Indonesia adalah sebesar 1,4% atau sekitar 347.792 orang. Jenis kanker dengan prevalensi tertinggi pada wanita adalah kanker serviks dengan prevalensi sebesar 0,8% dan kanker payudara dengan prevalensi sebesar 0,5% (Kementerian Kesehatan RI Pusat Data dan Informasi Kesehatan, 2015).

2.2 Kanker Serviks

2.2.1 Definisi

Kanker serviks merupakan penyakit keganasan yang berasal dari serviks. Serviks merupakan sepertiga bagian bawah uterus, berbentuk silindris, menonjol dan berhubungan dengan vagina melalui ostium uteri eksternum. Serviks sering juga disebut leher rahim (Andrijono *et al.*, 2013).

2.2.2 Epidemiologi

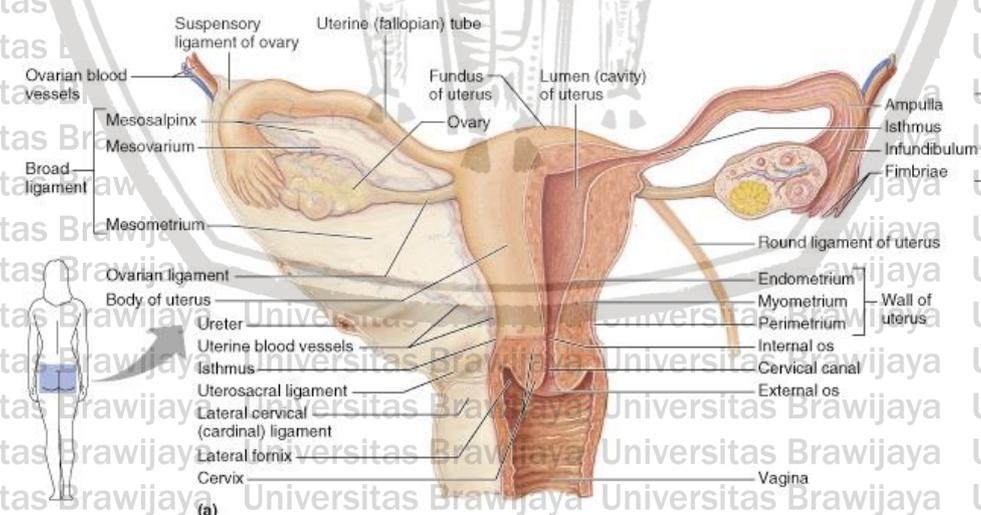
Kanker serviks merupakan jenis kanker terbanyak kedua dan ditemukan 445.000 kasus baru di dunia pada tahun 2012 (Ferwadi & Gunawan, 2017). Per tahun insiden dari kanker serviks meningkat 3.1% dari 378.000 kasus pada tahun

1980. Ditemukan sekitar 200.000 kematian terkait kanker serviks, dan 46.000 diantaranya adalah wanita usia 15-49 tahun yang hidup di negara sedang berkembang (Andrijono et al., 2013).

Berdasarkan data dari Patologi Anatomi tahun 2010, di Indonesia sendiri kanker serviks menduduki urutan kedua untuk kanker dengan insidens terbanyak dengan angka insidens sebesar 12,7 % (Andrijono et al., 2013). Diperkirakan ditemukan sekitar 40 ribu kasus baru kanker serviks di Indonesia setiap tahunnya (Pustaka & Rasjidi, 2009).

2.2.3 Anatomi Serviks

Serviks atau leher rahim merupakan organ reproduksi wanita yang terletak pada sepertiga bawah uterus atau rahim. Serviks memiliki tubulus (saluran berbentuk tabung) yang memanjang hingga bagian atas vagina. Serviks berbentuk silinder, terdiri dari tulang rawan yang ditutupi oleh jaringan halus, lembab, dan memiliki ketebalan sekitar 1 inchi. Serviks dibagi menjadi 2 bagian, endoserviks dan ektoserviks (Hatta, 2017).



Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Gambar 2.1 Anatomi organ reproduksi wanita. Serviks terletak di antara vagina dan uterus, di bagian lateral serviks terdapat ligamentum servikalis lateralis.

2.2.4 Etiologi dan Patofisiologi

Perjalanan penyakit kanker serviks melalui beberapa tahapan, dimulai dari tahap karsinogenesis awal, terjadinya perubahan morfologi, hingga sampai menjadi kanker invasif (Rini, 2009). Penyebab kanker serviks adalah virus, yaitu

Human Papilloma Virus (HPV) dan Virus Herpes Simpleks tipe 2 (HSV-2).

Berdasarkan studi epidemiologi, sekitar 90% kanker serviks disebabkan oleh

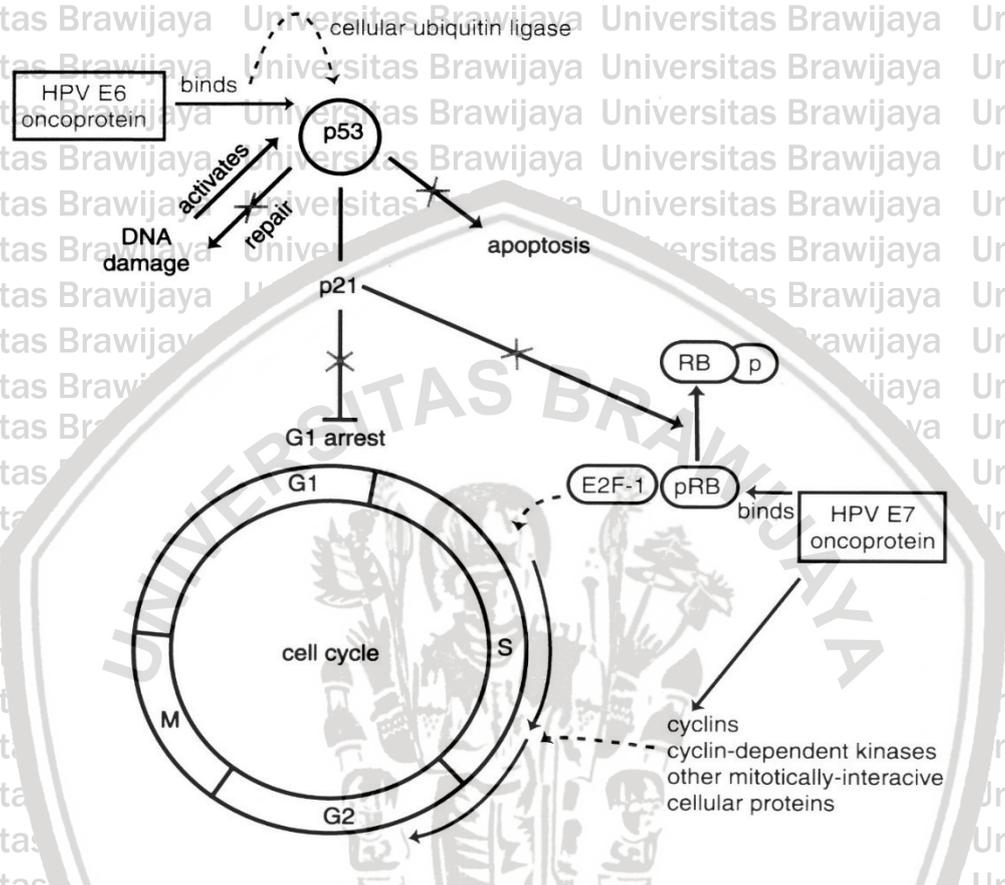
Human Papilloma Virus (HPV) (Darmawati, 2007).

a) *Human Papilloma Virus* (HPV)

Terdapat sejumlah bukti yang menunjukkan bahwa *Human Papilloma Virus* (HPV) sebagai penyebab karsinoma serviks. Bukti pertama, dimulainya proses karsinogenesis pada kanker serviks terjadi sejak seseorang terinfeksi HPV, dimana HPV merupakan faktor inisiator yang dapat menimbulkan keganasan pada sel serviks. Ada bukti lain yaitu onkogenitas virus papilloma hewan; hubungan infeksi HPV serviks dengan kondiloma dan atipik koilositotik yang menunjukkan displasia ringan atau sedang; serta deteksi antigen HPV dan DNA dengan lesi servikal (Pustaka & Rasjidi, 2009).

Yang berhubungan dengan displasia ringan yang sering regresi adalah HPV tipe 6 dan 11. Sedangkan HPV tipe 16 dan 18 berhubungan dengan displasia berat yang jarang regresi dan rentan untuk progresif menjadi suatu karsinoma *in situ*. Infeksi *Human Papilloma Virus* persisten dapat berkembang menjadi neoplasia intraepitel serviks (NIS) (*American Cancer Society*, 2016). Seorang wanita yang aktif secara seksual dapat terinfeksi oleh HPV risiko tinggi dan memiliki kemungkinan 80% untuk menjadi transien dan tidak berkembang menjadi NIS. Dalam kasus ini, HPV akan hilang dalam waktu 6-8 bulan. Hal ini disebabkan karena peran respon antibodi terhadap HPV risiko tinggi. 20% lainnya berkembang

progresif menjadi NIS dan sebagian besar dari NIS, yaitu sekitar 80% akan sembuh dimana HPV dan lesi yang ada lama-lama akan menghilang. Dalam kasus



Gambar 2.2 Patofisiologi kanker serviks oleh HPV. Onkoprotein E6 dari HPV mengikat p53 sehingga apoptosis terhambat. Onkoprotein E7 dari HPV berkompetisi dengan E2F1 untuk berikatan dengan pRB. Karena banyak pRB yang berikatan dengan onkoprotein E7, E2F1 menjadi banyak yang bebas sehingga menyebabkan siklus sel memasuki fase sintesis.

ini, yang berperan adalah sel T sitotoksik. Sebanyak 20% dari kasus NIS yang terinfeksi HPV akan tetap progresif dan terjadi infeksi persisten. NIS ini dapat tetap persisten, berkembang dari NIS 1 menjadi NIS 3, atau yang terburuk adalah dapat menjadi suatu kanker yang invasif. Orang yang terinfeksi HPV risiko rendah tidak akan progresif menjadi NIS 3 atau kanker invasif, melainkan hanya menjadi NIS 1 dan sebagian kecil menjadi NIS 2. Infeksi HPV risiko rendah sendirian tidak pernah ditemukan pada NIS 3 atau karsinoma invasif (Pustaka & Rasjidi, 2009).

Berdasarkan hasil program skrining berbasis populasi di Belanda, interval waktu antara NIS 1 menjadi kanker invasif diperkirakan sekitar 12,7 tahun dan jika dihitung sejak awal terinfeksi HPV sampai menjadi kanker adalah sekitar 15 tahun.

Lamanya interval waktu ini, selain berhubungan dengan infeksi HPV risiko tinggi persisten dan faktor imunologi (respon *HPV-specific T-cell*, presentasi antigen), juga dibutuhkan untuk merubah genom dari sel serviks yang terinfeksi HPV.

Proses ini diperankan oleh onkoprotein E6 dan E7 dari HPV yang mengganggu kestabilan genetik sehingga akhirnya sel menjadi ganas. Onkoprotein E6 akan berikatan dengan p53 sehingga fungsi TSG p53 akan terganggu sehingga proses apoptosis akan terhambat. Sedangkan onkoprotein E7 akan berikatan dengan TSG Rb. Ikatan ini akan menyebabkan lepasnya E2F yang merupakan faktor transkripsi sehingga mengakibatkan siklus sel berjalan tak terkendali (Pustaka & Rasjidi, 2009).

b) Virus Herpes Simpleks

Semua virus herpes simpleks tipe 2 (HSV-2) belum didemonstrasikan pada sel kanker serviks, namun pada teknik hibridisasi insitu telah menunjukkan bahwa terdapat HSV spesifik RNA pada sampel jaringan serviks yang diambil dari wanita dengan kasus displasia serviks. Sekuens DNA juga telah teridentifikasi pada sel kanker dengan menggunakan DNA rekombinan. Diperkirakan sekitar 90% pasien dengan kanker serviks invasif dan 60% pasien dengan neoplasia intraepithelial serviks (NIS) mempunyai antibodi terhadap HSV-2 (Pustaka & Rasjidi, 2009).

2.2.5 Faktor Resiko

Beberapa faktor resiko terjadinya kanker serviks antara lain :

1. Hubungan Seksual

Kanker serviks merupakan jenis penyakit kanker yang banyak dipengaruhi oleh aktivitas seksual. Beberapa bukti telah menunjukkan bahwa ada hubungan antara riwayat aktivitas seksual dengan risiko terjadinya penyakit ini. Berdasarkan dari etiologi kanker serviks, wanita dengan banyak pasangan seksual yang dan wanita yang mulai melakukan hubungan seksual saat usia muda memiliki risiko lebih tinggi untuk terkena kanker serviks. Hal ini dikarenakan sel epitel kolumnar pada serviks lebih peka terhadap proses metaplasia pada saat usia dewasa. Oleh karena itu wanita yang telah berhubungan seksual sebelum berusia 18 tahun memiliki resiko terkena kanker serviks lebih tinggi lima kali lipat. Usia saat pertama berhubungan seksual maupun banyaknya pasangan seksual merupakan faktor resiko kuat yang dapat menyebabkan kanker serviks (Pustaka & Rasjidi, 2009).

1. Karakteristik Pasangan Seksual

Sirkumsisi pernah dipertimbangkan sebagai faktor pelindung, namun sekarang hanya berhubungan dengan penurunan faktor risiko. Wanita yang berhubungan seksual dengan pasangan pria dengan kanker penis atau pasangan dari pria yang istrinya memiliki riwayat kanker serviks juga akan memiliki resiko lebih tinggi untuk terkena kanker serviks (Pustaka & Rasjidi, 2009). Selain itu, kanker serviks juga meningkat pada wanita monogami yang pasangannya sering berhungan seksual dengan banyak wanita lain (Wulandari, 2010).

2. Riwayat Ginekologis

Usia menarke atau menopause tidak berpengaruh terhadap risiko kanker serviks. Namun, kehamilan di usia muda, jumlah kehamilan yang

banyak, dan penanganan persalinan yang tidak tepat juga dapat meningkatkan risiko (Pustaka & Rasjidi, 2009).

3. Kontrasepsi

Penggunaan kondom dan diafragma dapat memberikan perlindungan terhadap terjadinya kanker serviks. Kontrasepsi oral yang digunakan dalam jangka waktu lama lebih dari 5 tahun dapat meningkatkan resiko relatif dari kanker serviks sebesar 1,53 kali (Wulandari, 2010).

4. Merokok

Saat ini terdapat data yang mendukung bahwa merokok adalah salah satu faktor resiko dari kanker serviks dan terdapat hubungan antara merokok dengan kejadian kanker sel skuamosa pada serviks (bukan adenoskuamosa atau adenokarsinoma). Mekanisme kerja bisa langsung (aktivitas mutasi mukus serviks telah ditunjukkan pada perokok) atau melalui efek immunosupresif dari merokok. Bahan karsinogenik spesifik seperti nikotin dari tembakau dapat dijumpai dalam lendir dari serviks pada wanita perokok. Bahan karsinogenik ini dapat merusak DNA sel epitel skuamosa dan bersama infeksi HPV dapat mencetuskan transformasi keganasan (Pustaka & Rasjidi, 2009). Wanita perokok memiliki konsentrasi nikotin pada getah serviks 56 kali lebih banyak dibanding di dalam serum (Wulandari, 2010).

5. Infeksi Lain

Infeksi trikomonas, sifilis, dan gonokokus juga diperkirakan memiliki hubungan dengan kanker serviks. Namun, infeksi ini diyakini muncul sebagai akibat hubungan seksual dengan banyak pasangan sehingga tidak

dipertimbangkan sebagai salah satu faktor risiko langsung dari kanker serviks (Pustaka & Rasjidi, 2009).

2.2.6 Klasifikasi

Tabel 2.1 Klasifikasi kanker serviks berdasarkan staging FIGO 2009

Tingkat	Kriteria
0	Kanker in situ
I	Karsinoma yang hanya bisa menyerang serviks (tanpa bisa mengenali ekstensi ke corpus)
IA	Karsinoma serviks berdasar pemeriksaan mikroskopis, dengan kedalaman invasi < 5 mm dan ekstensi sebesar > 7 mm
IA1	Invasi stroma sedalam ≤ 3 mm dan invasi horizontal ≤ 7 mm
IA2	Invasi stroma sedalam > 3 mm dan invasi horizontal > 7 mm
IB	Lesi yang nampak secara klinis, terbatas pada serviks uteri atau kanker preklinis yang lebih besar daripada stadium IA
IB1	Lesi yang nampak ≤ 4 cm
IB2	Lesi yang nampak > 4 cm
II	Karsinoma serviks menyerang di luar rahim, tetapi tidak ke dinding pelvis atau sepertiga bagian bawah vagina
IIA	Tanpa invasi ke parametrium
IIA1	Lesi yang nampak ≤ 4 cm
IIA2	Lesi yang nampak > 4 cm
IIB	Tanpa invasi ke parametrium
III	Tumor meluas ke dinding pelvis dan/atau melibatkan sepertiga bawah vagina dan/atau menyebabkan hidronefrosis atau merusak ginjal
IIIA	Tumor melibatkan sepertiga bawah vagina, tanpa ekstensi ke dinding pelvis
IIIB	Ekstensi ke dinding pelvis dan atau hidronefrosis datau merusak ginjal
IV	Karsinoma yang meluas ke pelvis sejati atau telah melibatkan mukosa kandung kemih atau rektum
IVA	Pertumbuhannya yang menyebar ke organ-organ sekitar
IVB	Menyebar ke organ yang jauh

(AJCC, 2017)

2.2.7 Tatalaksana

2.2.7.1 Tatalaksana Lesi Pra Kanker (NIS)

1. Krioterapi

Krioterapi merupakan suatu prosedur untuk menghancurkan lapisan epitel serviks dengan menggunakan metode pembekuan menggunakan gas N₂O atau CO₂ dalam suhu -20°C selama 6 menit.

2. Elektrokauter

Metode ini dilakukan dengan menggunakan alat elektrokauter atau radiofrekuensi dengan melakukan eksisi *loop diathermy* terhadap jaringan lesi prakanker pada zona transformasi. Sampel jaringan yang dieksisi akan diperiksa di laboratorium untuk dilakukan konfirmasi secara histopatologik.

3. Diatermi Elektrokoagulasi

Metode ini dapat menghancurkan jaringan secara lebih efektif jika dibanding dengan metode elektrokauter. Namun prosedur ini harus dilakukan dengan anestesi umum. Metode ini dapat menghancurkan jaringan serviks sampai kedalaman 1 cm.

4. Laser

Merupakan suatu metode menggunakan sinar laser yang dihasilkan oleh pelepasan muatan listrik dalam suatu tabung yang berisi campuran gas nitrogen, helium, dan karbon dioksida. Sinar laser ini dapat membuat cairan intraseluler mendidih sehingga lapisan luar mukosa serviks menguap. Selain itu jaringan di bawah mukosa serviks juga akan mengalami nekrosis

(Andrijono et al., 2013)

2.2.7.2 Tatalaksana Kanker Invasif

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 (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017).

Secara umum dikenal 3 terapi yang biasa dilakukan untuk penanganan kanker, yaitu (Andrijono *et al.*, 2013):

1. Terapi pembedahan

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

Radioterapi memegang peranan yang penting dalam pengobatan berbagai kanker. Radiasi pengion menginduksi kerusakan DNA, yang memicu apoptosis (kematian sel terprogram). Dosis radiasi dibagi (difraksi) untuk memungkinkan pemulihan jaringan normal sehingga mengurangi efek samping.

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

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.

Terapi tersebut dapat 11 memperpanjang hidup tapi tidak menyembuhkan.

Beberapa jenis obat kemoterapi yang tersedia adalah :

1. Antagonis folat, analog purin dan pirimidin : obat-obat ini menghambat sintesis DNA (metotreksat, 5-fluorourasil dan hidroksiurea):

2. Obat pengalkilasi (*alkylating agent*), bekerja dengan merusak DNA. Obat yang termasuk golongan ini adalah siklofosamid, melfalan dan platina.

3. 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, yaitu enzim inti sel penting yang menyebabkan pembelahan DNA untai ganda.

4. 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. Regimen sitostatika untuk pengobatan kanker serviks yang telah bermetastasis yaitu (Mardiani, 2010):

1. Terapi kombinasi pilihan pertama:

Cisplatin/ paclitaxel (kategori 1), cisplatin/ topotecan (kategori 1), cisplatin/ gemcitabine (kategori 2B), carboplatin/ paclitaxel.

2. Terapi agen tunggal pilihan pertama:

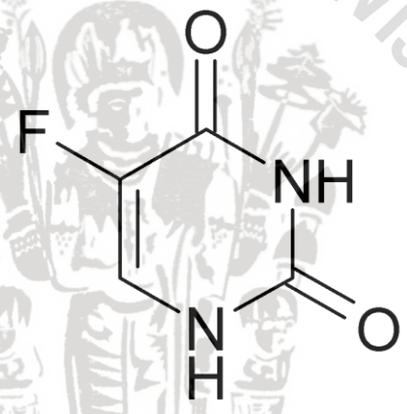
Cisplatin, carboplatin, paclitaxel, topotecan (kategori 2B) (Greer, *et al*, 2008). Cisplatin merupakan agen tunggal yang menunjukkan kerja yang paling konsisten pada pengobatan kanker serviks. Pemberian cisplatin pada dosis yang lebih tinggi menunjukkan respon yang lebih baik daripada dosis rendah, namun dosis yang lebih tinggi berhubungan dengan meningkatnya efek toksisitas. Takson dilaporkan mempunyai aktivitas pada kanker serviks. Pada penelitian dari paclitaxel (taxol) dengan dosis 170 mg/m² selama 24 jam menunjukkan respon objektif rata-rata 17% dan pada penelitian paclitaxel lain dengan dosis 250 mg/m² selama 3 jam menunjukkan respon rata-rata 27%.

3. Terapi pilihan kedua.

Semua agen yang masuk dalam kategori 2B (docetaxel, ifosfamid, vinorelbin, irinotecan, mitomycin, 5-FU, epirubicin) (Greer, 2008).

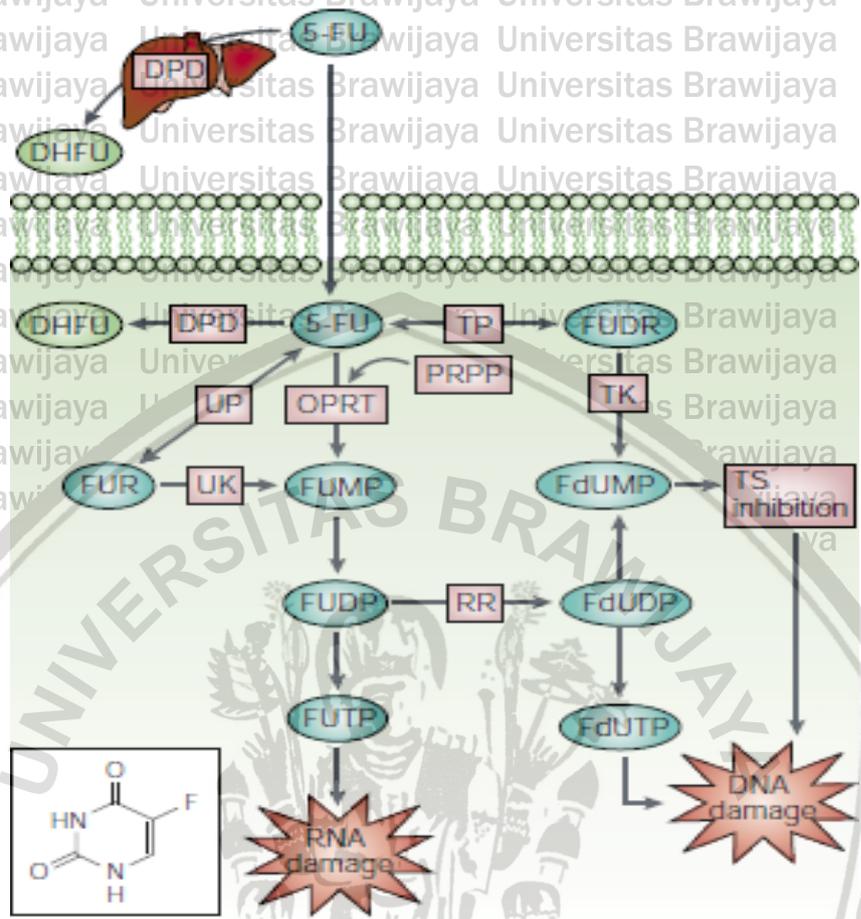
Pemberian ifosfamid pada berbagai dosis menghasilkan respon rata-rata antara 33% - 50%. Dosis 1,5 g/m² selama 30 menit untuk 5 hari menghasilkan respon 40% dan 20%. Sementara pemberian kaptopensin, irinotecan, dan topotecan menghasilkan respon objektif rata-rata 21% dan 19%.

2.3 Fluoropyrimidine 5-Fluorouracil (5-FU)



Gambar 2.3 Struktur Fluoropyrimidine 5-Fluorouracil (5-FU). Pada karbon ke 5 cincin urasil terdapat atom fluorin.

5-FU adalah salah satu jenis obat kemoterapi yang digunakan cukup luas untuk mengatasi kanker. 5-FU termasuk obat golongan antimetabolit dimana obat antimetabolit bekerja dengan cara menghambat proses biosintesis esensial atau bergabung dengan makromolekul seperti DNA dan RNA untuk menghambat aktivitas normal mereka. 5-FU ini termasuk obat yang bekerja di kedua proses tersebut (Longley *et al.*, 2003).



Gambar 2.4 Proses metabolisme dan mekanisme kerja 5-FU. 5-FU masuk ke dalam intraseluler akan dikonversi menjadi 3 bahan metabolit penting yaitu FUTP, FdUTP, dan FdUMP. FUTP berperan dalam merusak RNA, FdUTP berperan dalam merusak DNA, sedangkan FdUMP berperan dalam menghambat enzim *thymidylate synthase* yang jika kerja enzim ini terhambat akan menyebabkan kerusakan pada DNA. Metabolisme 5-FU diperrankan oleh enzim DPD, dimana enzim DPD ini terdapat terutama di hepar, berperan mengkatabolisme 5-FU menjadi DHFU.

5-FU adalah suatu analog dari urasil dengan atom fluorin yang terletak pada posisi C-5. 5-FU dapat secara cepat masuk ke dalam sel dengan menggunakan mekanisme transport terfasilitasi yang sama dengan urasil. 5-FU dikonversi secara intraselular menjadi beberapa bahan metabolit aktif: *fluorodeoxyuridine monophosphate* (FdUMP), *fluorodeoxyuridine triphosphate* (FdUTP) dan *fluorouridine triphosphate* (FUTP). Bahan-bahan metabolit aktif ini mengganggu pembentukan RNA dan kerja dari *thymidylate synthase* (TS). FUTP bekerja dengan merusak RNA, FdUTP bekerja dengan merusak DNA, sedangkan

FdUMP bekerja dengan menghambat enzim TS sehingga pembentukan purimidin timidin terhambat. Enzim yang berperan dalam katabolisme 5-FU adalah dihidropyrimidine dehydrogenase (DPD), yang mengkonversi 5-FU menjadi dihydrofluorouracil (DHFU). Enzim DPD ini dihasilkan di liver. Lebih dari 80% 5-FU yang masuk ke tubuh dikatabolisme oleh enzim ini (Longley et al, 2003).

2.4 Benalu Mangga (*Dendrothoe pentandra*)



Tanaman mangga
Benalu mangga

Gambar 2.5 Benalu mangga (*Dendrothoe pentandra*) yang menempel pada tanaman mangga.

Benalu mangga (*Dendrothoe pentandra*) adalah tanaman semi parasit yang termasuk dalam famili *Loranthaceae*, sering disebut sebagai tanaman obat, yang biasa digunakan dalam pengobatan tradisional/ alternatif untuk mengatasi batuk, cacar air, diabetes, hipertensi, ulkus, infeksi kulit, hingga kanker. Pada ekstraksi etanol daun benalu mangga, didapatkan senyawa-senyawa seperti tanin, flavonoid, saponin, dan triterpenoid yang diduga memiliki sifat antikanker (Artanti et al, 2012; Fitrilia et al, 2015).

- Klasifikasi benalu mangga:
- Kingdom : *Plantae*
- Phylum : *Tracheophyta*
- Class : *Magnoliopsida*

Ordo : *Santalales*

Famili : *Loranthaceae*

Genus : *Dendrophthoe* Mart.

Spesies : *Dendrophthoe pentandra* (L) Miq.

(Backer and Van den Brink, 1965)

2.5 Tanin

Definisi tanin secara umum adalah suatu senyawa polifenol yang dapat berikatan dengan protein membentuk suatu kopolimer yang bersifat hidrofobik.

Tanin dibagi menjadi 2 jenis, tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Tanin terhidrolisis sendiri terbagi lagi menjadi dua jenis, gallotanin dan ellagitanin. Berat molekul tanin terkondensasi antara 1000-3000, sedangkan berat molekul tanin terhidrolisis adalah antara 1000-1500 (gallotanin) dan 1000-3000 (ellagitanin).

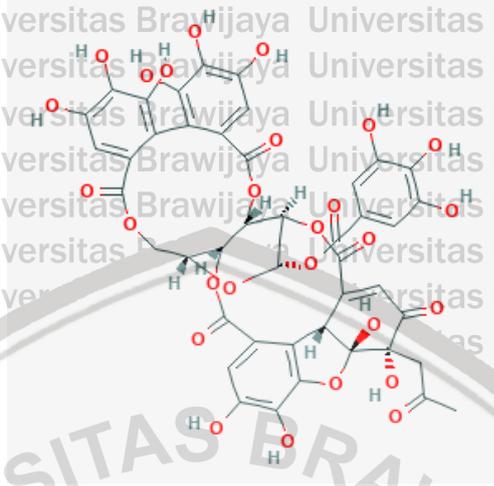
Dilihat dari struktur, tanin memiliki 2 cincin aromatik yang diikat oleh 3 atom karbon.

Oleh karena itu tanin termasuk golongan senyawa flavonoid (Mabruroh, 2015).

2.5.1 Manfaat Tanin

Tanin merupakan senyawa aktif metabolit sekunder yang diketahui mempunyai beberapa khasiat yaitu sebagai astringen, anti diare, anti bakteri dan antioksidan. Beberapa tanin juga terbukti memiliki aktivitas antioksidan, menghambat pertumbuhan tumor dan menghambat enzim seperti *reverse transcriptase* dan *DNA topoisomerase* (Mabruroh, 2015). Tanin memiliki efek antioksidan dan antiproliferatif pada berbagai jenis kanker (Darvin *et al.*, 2017).

2.5.2 Ellagitanin



Gambar 2.6 Struktur ellagitanin. Pada ellagitanin terdapat 13 donor ikatan hidrogen dan 27 akseptor ikatan hidrogen.

Ellagitanin merupakan ester dari asam heksahidroksidifenil (HDDP). HDDP dapat terdehidrasi secara spontan membentuk lakton menjadi asam elagat. Ellagitanin merupakan salah satu jenis dari tanin terhidrolisis bersama dengan gallotanin. Perbedaan pada struktur gallotanin dan ellagitanin adalah pada gallotanin terdapat ester asam galat, sedangkan pada ellagitanin terdapat ester asam heksahidroksidifenat (HDDP). Kedua jenis ester asam tersebut sama-sama memiliki ikatan dengan glukosa (Mabrurroh, 2015).

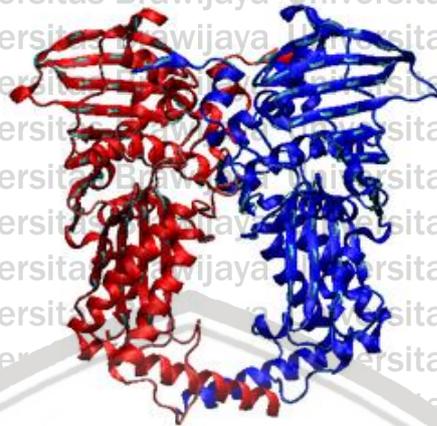
Bila ellagitanin dihidrolisis maka akan menghasilkan asam elagat. Asam elagat merupakan produk sekunder yang terbentuk pada hidrolisis beberapa tanin yaitu ester asam heksaoksidifenat. Aktivitas biologi ellagitanin merupakan implikasi dari ikatan antara ellagitanin dengan protein, senyawa dengan berat molekul tinggi, senyawa sederhana, dan ion logam berat. Ikatan tersebut membentuk kompleks senyawa yang dapat menyebabkan perubahan fisiologis dalam sel atau jaringan makhluk hidup. Berbagai penelitian telah dikembangkan untuk mengeksplorasi ellagitanin dan aktivitas biologinya. Aktivitas biologis dan

farmakologi ellagitanin yang telah diketahui antara lain, penghambatan proses karsinogenesis, anti-tumor, antivirus, dan antioksidan (peroksidasi lipida, lipoksigenase, oksidasi xanthin, dan oksidasi monoamin) (Hernawan & Setyawan, 2003). Aktivitas biologis ellagitanin lainnya antara lain sebagai antidiabetes, antibakteri, dan antihipertensi. Dari banyak penelitian yang telah dilakukan, belum ada yang menemukan adanya efek toksik dari ellagitanin (Mabrurroh, 2015).

Pada efeknya sebagai antikarsinogenesis, ellagitanin dapat bekerja pada beberapa target protein. Menggunakan *Pass Online*, ellagitanin dapat bekerja sebagai inhibitor protein kinase A, inhibitor protein kinase C, stimulan caspase 3, stimulan caspase 8, inhibitor *DNA topoisomerase I*, serta inhibitor *DNA topoisomerase II*. Pada suatu penelitian *in vitro* telah diteliti bahwa ellagitanin vescalagin dapat bertindak sebagai inhibitor katalitik secara selektif terhadap *DNA topoisomerase II α* pada *CEM cells* (Pouyse *et al.*, 2012) .

2.6 DNA Topoisomerase II

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 (Pouyse *et al.*, 2012).



Gambar 2.7 Struktur DNA topoisomerase II

2.6.1 DNA Topoisomerase II α

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 *et al.*, 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. Salah satu contoh obat kanker yang memiliki Top2 α sebagai targetnya adalah *ulde*. Namun, obat-obat kanker yang ada sekarang seperti *etoposide* tidak selektif dalam menghambat Top2 α tapi juga sekaligus menghambat Top2 β . Karena itu dibutuhkan penemuan akan suatu senyawa inhibitor yang lebih selektif terhadap Top2 α (Pouyse *et al.*, 2012).

2.7 *In Silico*

Studi *in silico* merupakan pendekatan pada suatu kondisi/ keadaan nyata ke dalam simulasi computer dengan menggunakan program tertentu dalam mendesain obat. Metode *in silico* merupakan suatu metode yang menarik dan menjanjikan dalam mengidentifikasi senyawa baru karena lebih cepat dan biaya yang lebih ekonomis (Suharna, 2012).

In silico ini cakupannya cukup luas, diantaranya (Danniswara, 2018):

1. Studi *molecular docking*, dimana merupakan pembelajaran komputasi pada ligan atau obat yang akan berikatan dengan protein target.
2. Formasi kimia, dimana aktivitas dan struktur berkorelasi dengan menggunakan sarana statistika.
3. Bioinformatika, dimana target obat berasal dari data genom.

Untuk mengetahui struktur 3 dimensi dari molekul, prosedur *in silico* menggunakan data informasi dari *database* yang dapat diakses oleh siapa saja, misalnya menggunakan PDB (*protein data bank*). Selain PDB, *database* yang dapat digunakan adalah EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*), GenBank, Swiss-prot, *The European Molecular Biology Network* (EMBnet), *The European Bioinformatics Institute* (EBI), *Global data overload*, InterPro, UniProt, *The Swiss Institute of Bioinformatics* (SIB), *The European Nucleotide Archive*, dan lain sebagainya (Attwood *et al.*, 2011).

2.7.1 Metode *Docking*

Molecular docking merupakan suatu prosedur komputasi yang digunakan untuk memprediksi konformasi antara suatu protein atau molekul asam nukleat (DNA atau RNA) dengan suatu protein lain atau ligan yang merupakan molekul kecil. Dengan kata lain, *molecular docking* adalah suatu prosedur untuk memprediksi struktur antarmolekul kompleks yang terbentuk antara dua atau lebih konstituen molekul (Danniswara, 2018).

Dalam *molecular docking*, terdapat dua aspek penting yakni fungsi *scoring* dan penggunaan algoritma. Fungsi *scoring* berperan dalam menentukan *binding affinity* antara makromolekul dengan ligan yang salah satunya berdasarkan pada teori energy bebas *Gibbs*, dimana besarnya nilai energi bebas dapat menunjukkan

apakah konformasi yang terbentuk stabil atau tidak stabil, sedangkan penggunaan algoritma berperan dalam penentuan konformasi (*docking pose*) yang stabil (*favourable*) dari pembentukan kompleks (Funkhouser, 2007). Berdasarkan pada jenis interaksi yang terjadi, terdapat beberapa jenis *molecular docking*, yaitu *docking* ligan dengan DNA, *docking* ligan dengan protein, dan *docking* protein dengan protein. Tipe *docking* dapat dibedakan menjadi *blind docking* dan *specific docking*. *Blind docking* yaitu jenis *docking* yang dilakukan pada seluruh bagian protein, sementara *specific docking* merupakan jenis *docking* yang hanya dilakukan pada bagian tertentu yang merupakan ikatan paling spesifik antara protein dan ligan (Utomo, 2018).

Terdapat *software* untuk melakukan *docking* molekul kecil atau ligan dengan makromolekul untuk melihat hubungan ikatan pada dua molekul berbeda. *Software* yang dapat digunakan untuk *docking* salah satunya adalah PyRx. Data senyawa molekul yang digunakan untuk aplikasi PyRx adalah data yang diambil dari PDB, *DrugBank*, *PubChem*, *Uniprot* dan lain sebagainya. Namun sebelum data tersebut dimasukkan kedalam PyRx, data tersebut harus diubah dulu dalam format "PDBQT" dengan menggunakan *Autodock Vina*. Melalui *docking*, akan didapatkan nilai *binding affinity* dari ikatan yang terbentuk antara ligan dan makromolekul. Untuk visualisasi kompleks ikatan molekul secara 3 dimensi dapat menggunakan PyMOL maupun *PoseView* (Dallakyan dan Olson, 2015).

Untuk melakukan prosedur *molecular docking*, hal yang dibutuhkan pertama adalah data struktur tiga dimensi dari ligan (obat) dan protein target. Struktur tiga dimensi ligan dapat dimodelkan dengan menggunakan teknik *molecular modeling* sedangkan struktur tiga dimensi protein target dapat ditentukan secara empiris dengan menggunakan teknik *NMR spectroscopy* dan x-

ray crystallography yang terdapat pada *database protein data bank* dan secara *in silico* dengan *homology modeling*. *Homology modeling* merupakan suatu prosedur yang dapat digunakan untuk mengetahui bagian protein mana yang terlibat dalam pembentukan struktur dan berinteraksi dengan protein yang lain (Attwood *et al.*, 2011).

2.7.2 *Binding Affinity*

Nilai *binding affinity* merupakan jumlah energi yang dibutuhkan agar suatu ligan dapat berikatan dengan reseptornya yang diukur dalam satuan kkal/mol.

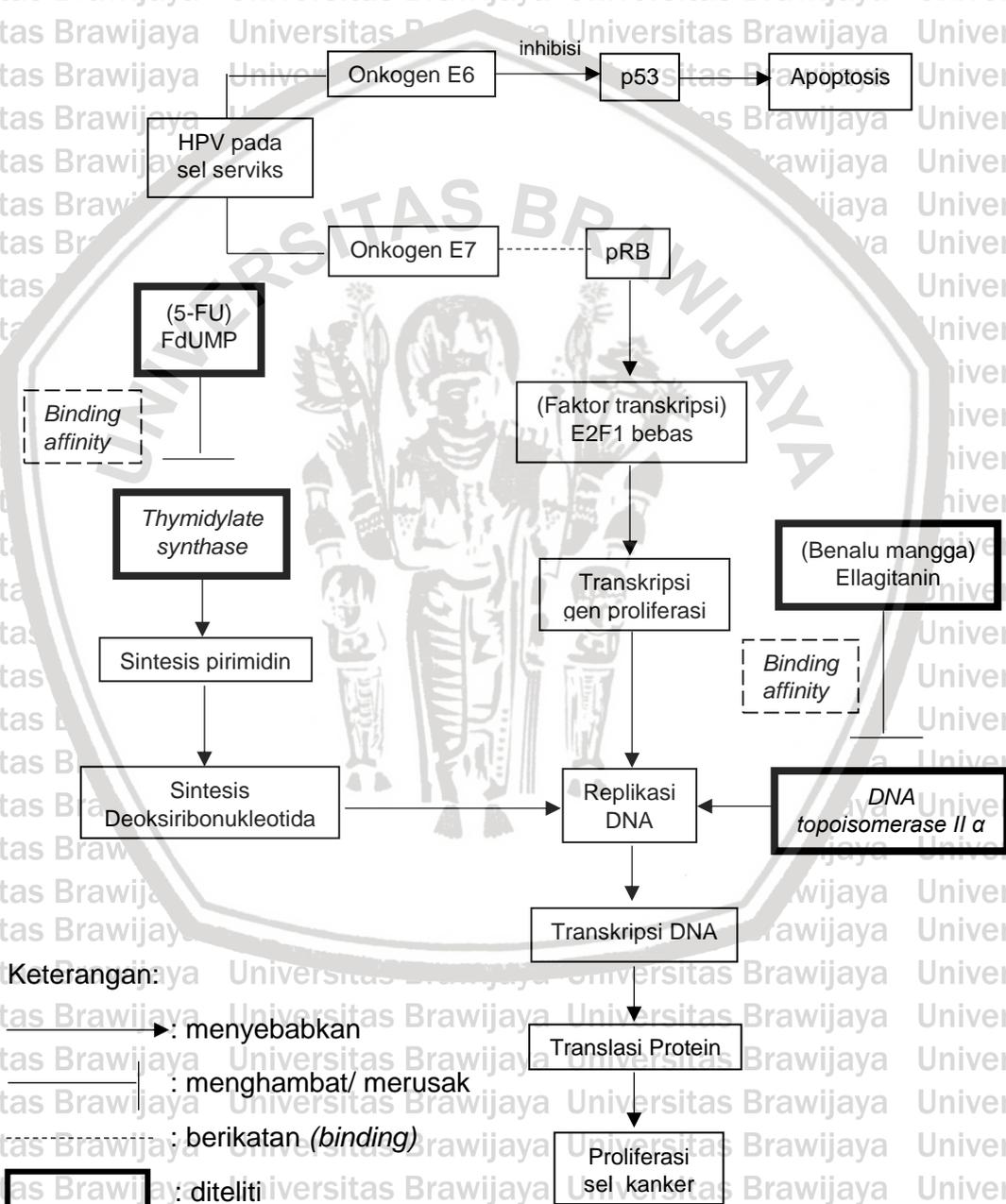
Semakin negatif nilai *binding affinity* maka semakin kuat afinitas antara ligan dengan reseptornya karena energi yang digunakan adalah seminimum mungkin.

Energi yang minimum ini berarti bahwa prediksi ikatan memiliki keakuratan yang tinggi, atau secara nyata interaksi yang diprediksikan dapat terjadi, sehingga secara spontan reseptor dan ligan dapat terjadi tanpa perlu direaksikan (Utomo, 2018). Suatu ikatan dikatakan kuat apabila nilai *binding affinity* $< -7,3$ kkal/mol (Dallakyan dan Olson, 2015).

BAB 3

KERANGKA KONSEP dan HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



3.2 Deskripsi Kerangka Konsep

HPV ketika menginfeksi sel serviks akan mengeluarkan onkogen E6 dan E7. Onkogen E6 akan menghambat p53, dimana p53 adalah protein yang berperan dalam menginisiasi proses apoptosis pada sel yang bermutasi sehingga inhibisi E6 pada p53 akan menyebabkan terhambatnya proses apoptosis pada sel serviks yang terinfeksi HPV. Sedangkan onkogen E7 akan berikatan dengan pRB sehingga menggeser ikatan antara pRB dengan E2F1, akibatnya E2F1 akan terlepas dalam kondisi bebas. E2F1 merupakan faktor transkripsi sehingga ketika berada dalam kondisi bebas (tidak berikatan dengan pRB), akan menyebabkan transkripsi gen-gen proliferasi dan kemudian sel memasuki fase sintesis (replikasi, transkripsi, translasi). Adanya onkogen E7 yang berikatan dengan pRB mengakibatkan E2F menjadi banyak yang dalam keadaan bebas sehingga menyebabkan sel memasuki fase sintesis dan siklus sel berjalan tidak terkendali.

Fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP) merupakan bahan metabolit aktif dari obat *fluorouracil* (5-FU) saat masuk ke dalam intrasel, yang bekerja dengan cara menghambat kerja enzim *thymidylate synthase*. *Thymidylate synthase* berperan dalam sintesis purimidin timidin sehingga ketika *thymidylate synthase* dihambat oleh FdUMP maka purimidin timidin menjadi tidak terbentuk.

Ellagitanin bekerja dengan bertindak sebagai inhibitor terhadap *DNA topoisomerase II α* . Dengan terhambatnya kerja *DNA topoisomerase II α* maka proses replikasi dan transkripsi DNA terganggu sehingga akan menyebabkan efek antiproliferasi pada sel. Perbedaan mekanisme kerja ellagitanin dengan 5-FU dapat menyebabkan efek sinergis pada penghambatan proliferasi dari sel kanker serviks.

3.3 Hipotesis Penelitian

Ellagitannin dalam ekstrak daun benalu manggis berpotensi ikatan yang baik dengan DNA topoisomerase II α sehingga berpotensi untuk menjadi agen kokemoterapi dengan 5-FU untuk pengobatan kanker serviks..



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental sekunder dimana sampel didapatkan dari *database Pubchem*, yang bertujuan untuk mengetahui kekuatan ikatan ellagitanin dalam ekstrak daun benalu mangga terhadap *DNA topoisomerase II α* pada sel kanker serviks secara *in silico* yang ke depannya diharapkan dapat menjadi agen kokemoterapi 5-FU untuk pengobatan kanker serviks.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah struktur 3 dimensi dari makromolekul, yaitu *DNA topoisomerase II α* dan *thymidylate synthase*. Data struktur makromolekul didapatkan dari *database Uniprot*.

4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah struktur 3 dimensi dari ligan, yaitu ellagitanin dan 5-FU (FdUMP). Data struktur ligan didapatkan dari *database PubChem*.

4.3 Identifikasi Variabel

4.3.1 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah afinitas ikatan ellagitanin dengan *DNA topoisomerase II α* dan afinitas ikatan 5-FU (FdUMP) dengan *thymidylate synthase*.

4.3.2 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah jenis ligan dan makromolekul yang digunakan, yaitu ellagitanin sebagai ligan dan *DNA topoisomerase II α* sebagai makromolekul.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Ruang Ketahanan Jurnal dan Laboratorium Biokomputasi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, Malang pada bulan Maret 2018 – Agustus 2018.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini secara garis besar dibagi menjadi dua, yakni perangkat keras dan perangkat lunak. Perangkat keras yang digunakan berupa satu set laptop dengan spesifikasi : *processor tipe @inside™ CORE i5*, RAM 4 GB, *hard disk 500 GB*, *64-bit Windows 7 Ultimate operating system*. Sedangkan perangkat lunak yang digunakan adalah *Discovery Studio* untuk mengkonversi *canonical smiles* ligan dari struktur dua dimensi menjadi struktur tiga dimensi, *PyRx 0.8* untuk melakukan simulasi penambatan molekuler secara spesifik sehingga didapatkan *binding affinity score*, *LigPlot* untuk identifikasi ikatan yang terbentuk pada kompleks ligan dengan makromolekul, serta *PyMOL 2.0.6* untuk memisahkan ligan/ obat kontrol dari makromolekul dan memvisualisasi kompleks ikatan ligan dengan makromolekul.

4.5.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan meliputi data struktur tiga dimensi dari ligan (ellagitanin dan FdUMP) yang diperoleh dari *PubChem*, *National Centre of*

Technology Information (NCBI) dan data struktur tiga dimensi dari makromolekul (*DNA topoisomerase II α* dan *thymidylate synthase*) yang diperoleh dari *Uniprot*.

4.6 Definisi Operasional

1. Benalu mangga (*Dendrothoe pentandra*) adalah tanaman semi parasit dalam famili *Loranthaceae* yang biasa digunakan dalam pengobatan tradisional/ alternatif untuk mengatasi berbagai penyakit. Pada ekstraksi etanol daun benalu mangga didapatkan senyawa-senyawa seperti tanin (termasuk ellagitanin), flavonoid, saponin, dan triterpenoid yang diduga memiliki sifat antikanker (Artanti *et al.*, 2012; Fitrilia *et al.*, 2015).
2. Ellagitanin adalah salah satu jenis tanin terhidrolisis yang merupakan senyawa polifenol yang dapat membentuk kompleks dengan protein membentuk kopolimer yang tidak larut dalam air (Mabruroh, 2015). Data struktur ellagitanin didapatkan dari *database PubChem*.
3. *DNA topoisomerase II α* adalah enzim nukleus yang dominan diekspresikan pada sel aktif berproliferasi seperti pada sel kanker, yang berperan penting dalam menangani permasalahan topologi DNA yang berasosiasi dengan replikasi DNA, rekombinasi DNA, serta kondensasi kromosom dan segregasi selama fase mitosis (Setiawan *et al.*, 2016). Data struktur *DNA topoisomerase II α* didapatkan dari *database Uniprot*.
4. 5-FU adalah jenis obat kemoterapi golongan antimetabolit yang bekerja dengan menghambat biosintesis esensial. Salah satu metabolit aktif dari 5-FU yaitu FdUMP bertindak sebagai inhibitor terhadap enzim *thymidylate synthase* (Longley *et al.*, 2003). Data struktur FdUMP didapatkan dari *database PubChem*, sedangkan data struktur *thymidylate synthase* didapatkan dari *database Uniprot*.

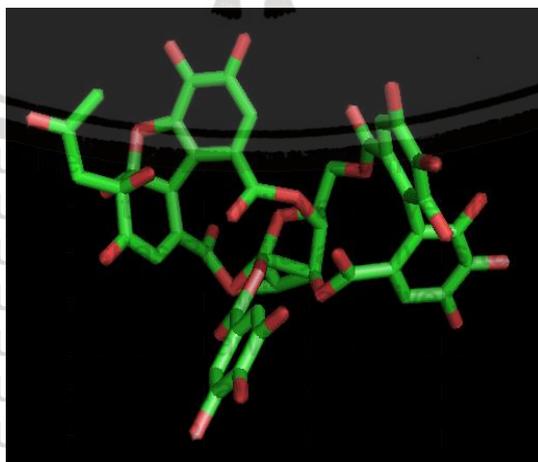
5. *Molecular docking* adalah salah satu cakupan dari studi *in silico*, yang mempelajari bagaimana dua atau lebih struktur molekul dapat berikatan satu sama lain yang diukur dengan nilai afinitas ikatan (*binding affinity score*) dengan nilai yang negatif, menggunakan suatu *software* Pyrx 0.8 (Funkhouser, 2007).

6. *Binding affinity* merupakan jumlah energi yang dibutuhkan agar suatu ligan dapat berikatan dengan reseptornya yang diukur dalam satuan kkal/mol. Semakin negatif nilai *binding affinity* maka semakin kuat afinitas antara ligan dengan reseptornya karena energi yang digunakan adalah seminimum mungkin (Utomo, 2018).

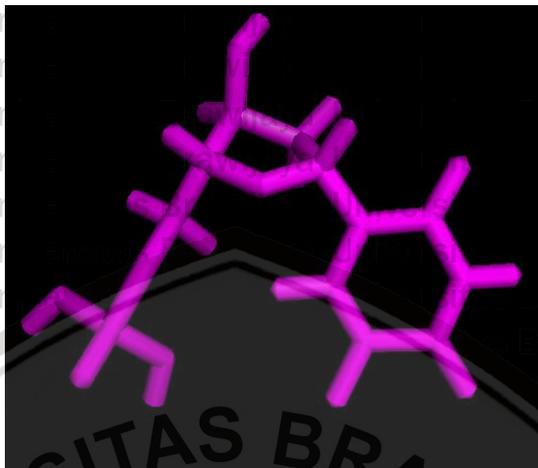
4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pencarian dan Preparasi Data Struktur Ligan (Ellagitanin dan FdUMP)

Data struktur ellagitanin dan *fluorodeoxyuridine monophosphate* (FdUMP) diambil dari *PubChem* melalui situs <https://pubchem.ncbi.nih.gov/search/search.cgi> dalam format “.sdf” sebagai struktur dua dimensi. Setelah itu struktur dua dimensi dikonversikan menjadi struktur tiga dimensi dengan menggunakan perangkat lunak *Discovery Studio* dan disimpan dalam format “.pdb”.



Gambar 4.1 Struktur 3 dimensi ellagitanin

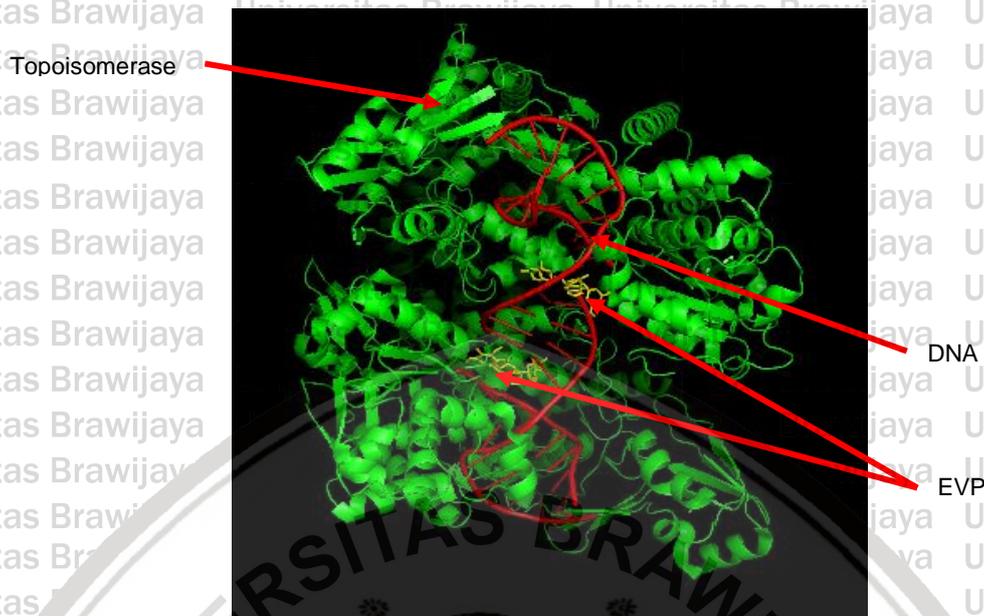


Gambar 4.2 Struktur 3 dimensi FdUMP. FdUMP adalah bahan metabolit aktif dari 5-FU yang terbentuk saat masuk ke intrasel

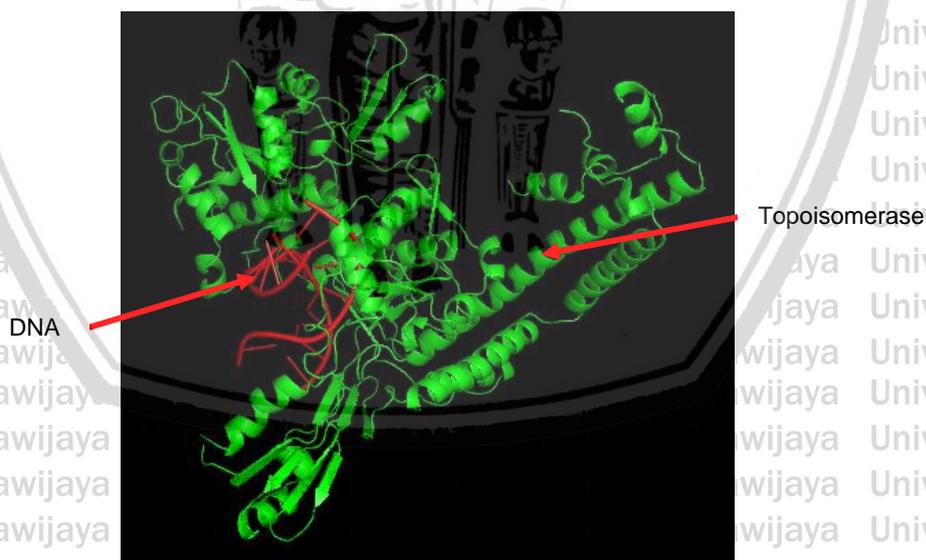
4.7.2 Pencarian dan Preparasi Data Struktur Makromolekul

4.7.2.1 Pencarian dan Preparasi Data Struktur *DNA Topoisomerase II α*

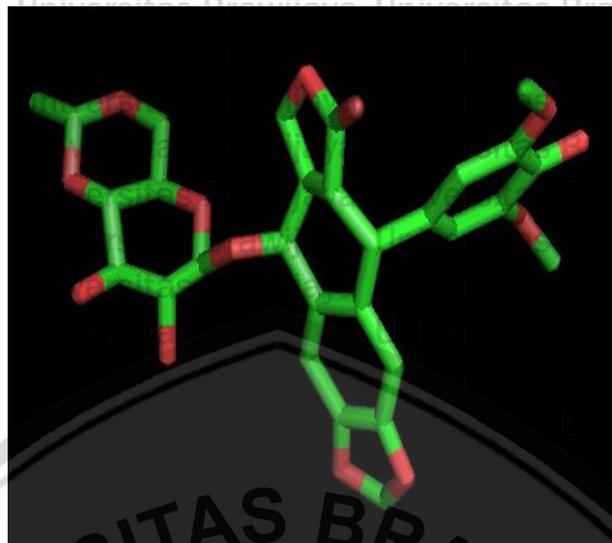
Data struktur tiga dimensi *DNA topoisomerase II α* yang masih berikatan dengan obat kontrol *etoposide* (EVP) diambil dari database *Uniprot* melalui situs <http://www.uniprot.org> dalam format “.pdb”. Setelah itu struktur tiga dimensi *DNA topoisomerase II α* dihilangkan bagian *chain* yang tidak diperlukan dan dipisahkan dari struktur tiga dimensi *etoposide* dengan menggunakan menggunakan perangkat lunak PyMOL 2.0.6 dan disimpan dalam format “.pdb”. *Etoposide* nantinya digunakan untuk ligan pembanding dari ellagitanin



Gambar 4.3 Struktur 3 dimensi DNA topoisomerase II α utuh yang masih berikatan dengan obat kontrol etoposide (EVP). Chain warna hijau menunjukkan chain dari topoisomerase, chain warna merah menunjukkan chain dari DNA, sedangkan chain warna kuning menunjukkan chain dari obat kontrol etoposide (EVP)



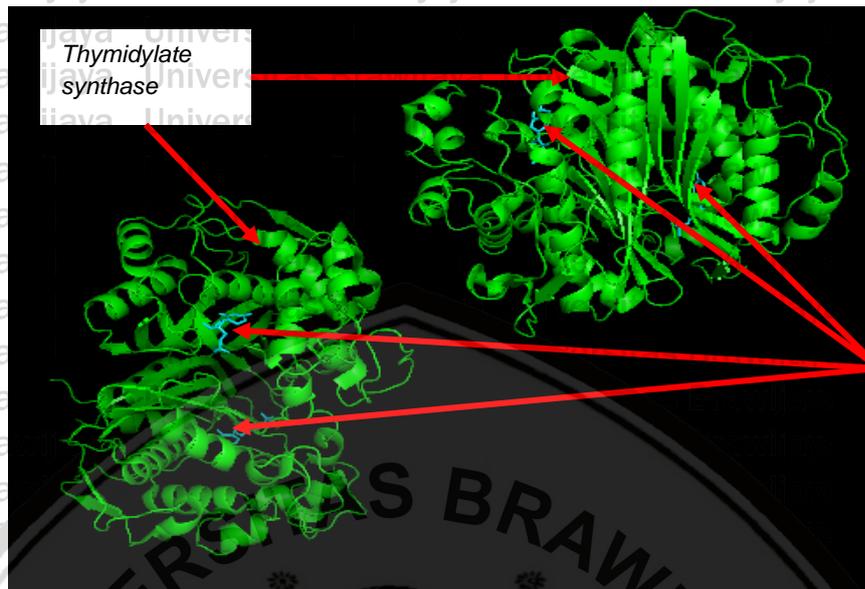
Gambar 4.4 Struktur 3 dimensi DNA topoisomerase II α yang sudah dihilangkan obat kontrol etoposide serta separuh chain-nya. Chain warna hijau menunjukkan chain dari topoisomerase, sedangkan chain warna merah menunjukkan chain dari DNA



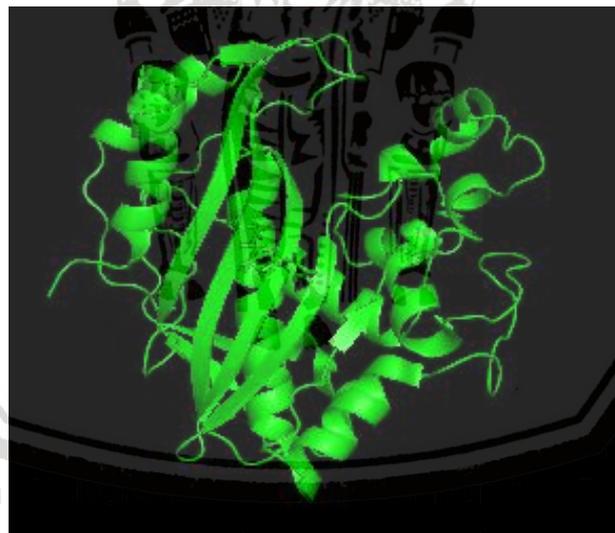
Gambar 4.5 Struktur 3 dimensi obat kontrol *etoposide* (EVP). *Etoposide* adalah obat kontrol yang berikatan dengan *DNA topoisomerase II α* , yang bertindak sebagai inhibitor *DNA topoisomerase II*.

4.7.2.2 Pencarian dan Preparasi Data Struktur *Thymidylate Synthase*

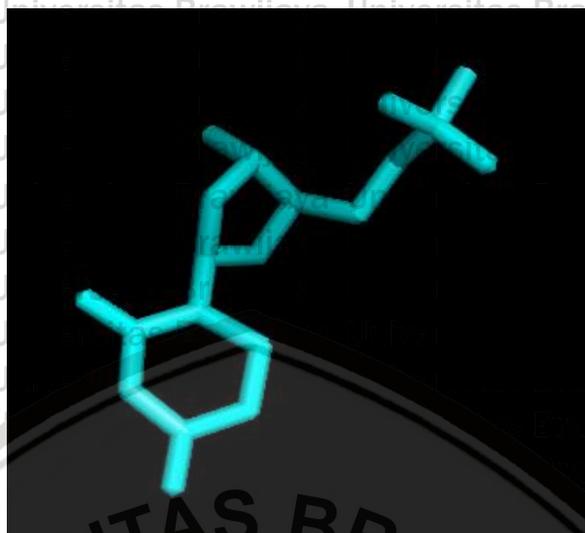
Data struktur tiga dimensi *thymidylate synthase* (TS) yang masih berikatan dengan *uridine monophosphate* (UMP) diambil dari database *Uniprot* melalui situs <http://www.uniprot.org> dalam format “.pdb”. Setelah itu struktur tiga dimensi *thymidylate synthase* dihilangkan bagian *chain* yang tidak perlu dan dipisahkan dari struktur tiga dimensi UMP dengan menggunakan menggunakan perangkat lunak PyMOL 2.0.6 dan disimpan dalam format “.pdb”. UMP nantinya akan digunakan sebagai ligan pembanding dari FdUMP.



Gambar 4.6 Struktur 3 dimensi *thymidylate synthase* utuh yang masih berikatan dengan *uridine monophosphate* (UMP). *Chain* warna hijau merupakan *chain* dari *thymidylate synthase*, sedangkan *chain* warna biru muda merupakan *chain* dari UMP



Gambar 4.7 Struktur 3 dimensi *thymidylate synthase* yang sudah dihilangkan UMP serta sebagian *chain*-nya



Gambar 4.8 Struktur 3 dimensi *uridine monophosphate* (UMP). UMP adalah ligan kontrol yang normalnya berikatan dengan sisi aktif dari enzim *thymidylate synthase* untuk dikatalisis membentuk purimidin timidin.

4.7.3 Proses *Docking* Protein

Docking protein dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak PyRx 0.8 yang diunduh melalui situs <https://pyrx.sourceforge.io/downloads>. *Docking* protein merupakan teknik biokomputasi untuk menggambarkan suatu interaksi antara molekul senyawa dengan protein reseptor. Dengan menggunakan teknik biokomputasi *docking*, didapatkan permodelan struktur yang akurat dan prediksi afinitas ikatan yang tepat. Langkah-langkah yang dilakukan dalam proses *docking* dengan menggunakan perangkat lunak PyRx 0.8 adalah sebagai berikut:

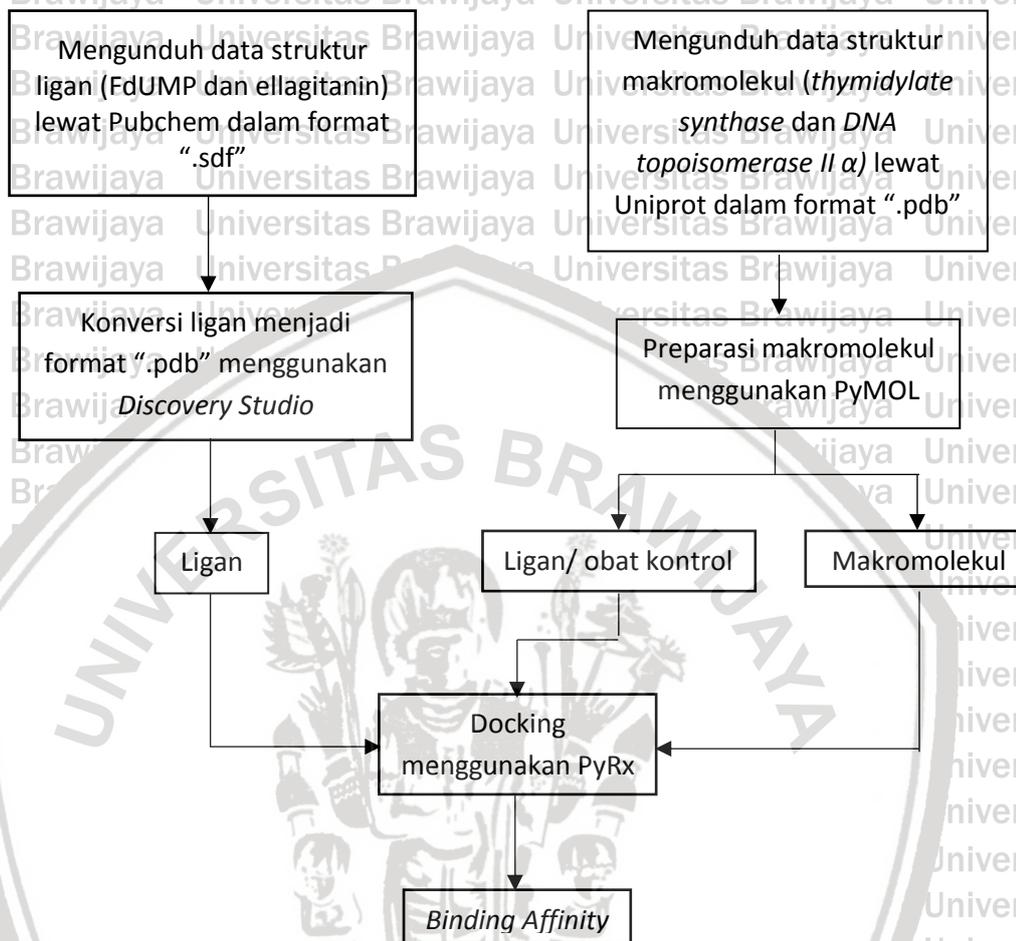
1. Dibuka program PyRx 0.8
2. Dipilih "*Vina Wizard*" untuk melakukan proses *docking* dengan Autodock *Vina*
3. Pada bagian *vina wizard*, diklik "*add ligand*" untuk memasukkan data struktur tiga dimensi *ellagitannin* dan obat kontrol *etoposide* yang sebelumnya sudah dipisahkan dari *DNA topoisomerase II α* . Lalu diklik

"*add macromolecules*" untuk memasukkan data struktur tiga dimensi *DNA topoisomerase II α* .

4. Pada kolom *autodock*, diklik kanan pada masing-masing ligan dan makromolekul, setelah itu diklik "*display*" sehingga semua struktur ligan dan makromolekul terlihat pada ruang "*3D scene*".
5. Pada kolom *molecules*, diklik kanan pada kedua ligan (*ellagitanin* dan *etoposide*), setelah itu diklik "*display*", dan dipilih "*ball and sticks*" dan "*molecular surface*" untuk melihat visualisasi letak kedua ligan tersebut pada ruang "*3D scene*".
6. Diklik "*forward*" pada bagian kanan bawah *Vina wizard*, setelah itu *grid box* disesuaikan dengan posisi sisi pengikatan dari *etoposide* pada "*3D scene*" sehingga semua sisi dari *etoposide* terletak pada area reaksi yang tepat dalam kubus.
7. Setelah semua letak ligan sesuai, diklik "*forward*" untuk menjalankan proses *docking* dan tunggu sampai proses selesai.
8. Diklik hasil *docking* pada *navigator* lalu diklik kanan "*save as PDB*" untuk menyimpan data struktur kompleks hasil *docking* antara *ellagitanin* dengan *DNA topoisomerase II α* .

Untuk *docking thymidylate synthase* (TS) dengan *fluorouridine monophosphate* (FdUMP) menggunakan prosedur yang sama seperti yang di atas, hanya pada langkah nomor 3 dan 5 cukup disesuaikan ligan dan makromolekulnya. Untuk ligan yang digunakan adalah FdUMP dan ligan kontrol UMP, sedangkan makromolekul yang digunakan adalah *thymidylate synthase*.

4.8 Alur Penelitian



4.9 Analisis Data

Hasil akhir yang didapat dari *docking* menggunakan perangkat lunak PyRx 0.8 adalah besarnya *binding affinity* antara ligan dengan makromolekul. Nilai negatif pada *binding affinity* (atau *binding free energy*) mengindikasikan ikatan antara ligan dengan makromolekul. Bila nilai *binding affinity* semakin negatif, maka semakin kuat afinitas ikatan antara ligan dan makromolekul. Suatu ikatan dikatakan kuat apabila nilai *binding affinity* $< -7,3$ kkal/mol (Dallakyan dan Olson, 2015). Pada *specific docking*, perbandingan nilai *binding affinity* ligan dengan ligan

kontrol pada suatu makromolekul digunakan untuk mengetahui potensi ligan dalam berikatan dengan makromolekul.



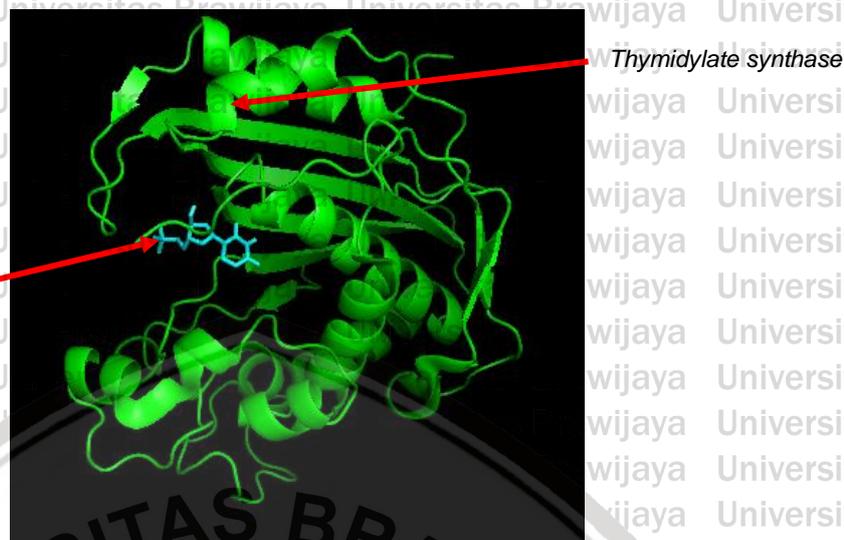
BAB 5

HASIL PENELITIAN

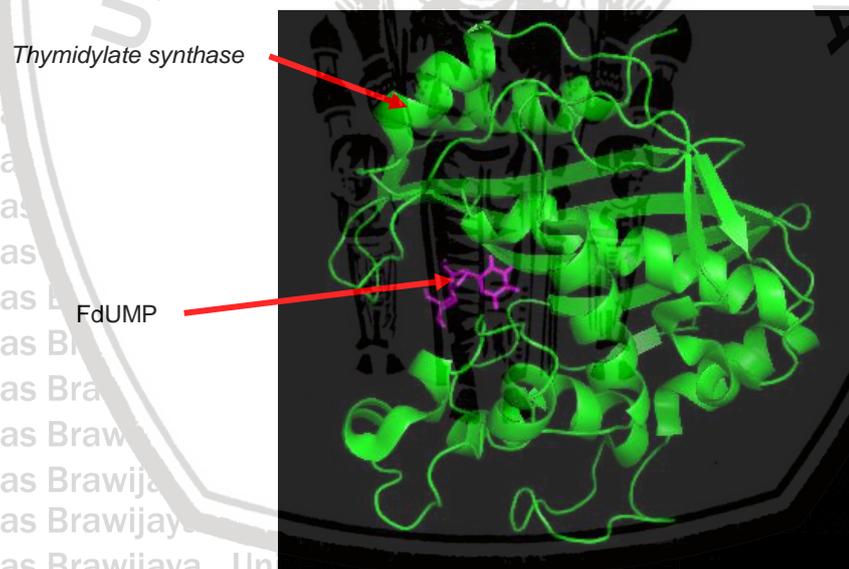
5.1 Hasil *Binding Affinity* 5-FU dengan *Thymidylate Synthase*

Molecular docking merupakan suatu prosedur komputasi yang digunakan untuk memprediksi konformasi antara suatu protein atau molekul asam nukleat (DNA atau RNA) dengan suatu protein lain atau ligan yang merupakan molekul kecil. Dengan kata lain, *molecular docking* adalah suatu prosedur untuk memprediksi struktur antarmolekul kompleks yang terbentuk antara dua atau lebih konstituen molekul. Dalam mendesain suatu senyawa obat, sangat penting untuk mengetahui interaksi antar molekul ligan dengan makromolekul karena interaksi-interaksi ini yang menentukan terjadinya beberapa proses fisiologi dalam sel (Dias, 2008).

5-FU termasuk obat kemoterapi golongan antimetabolit dimana 5-FU bekerja dengan cara menghambat proses biosintesis esensial dan menghambat aktivitas normal dari makromolekul seperti DNA atau RNA. 5-FU ketika masuk ke intraselular akan dikonversi menjadi beberapa bahan metabolit aktif, yaitu *fluorodeoxyuridine monophosphate* (FdUMP), *fluorodeoxyuridine triphosphate* (FdUTP) dan *fluorouridine triphosphate* (FUTP). FUTP bekerja dengan merusak RNA, FdUTP bekerja dengan merusak DNA, sedangkan FdUMP bekerja dengan menghambat enzim *thymidylate synthase* (TS) sehingga pembentukan DNA terganggu (Longley *et al.*, 2003). Pada penelitian ini meneliti ikatan antara FdUMP dengan enzim *thymidylate synthase* dan dibandingkan nilai *binding affinity*-nya dengan ligan kontrol *uridine monophosphate* UMP.



Gambar 5.1 Struktur antarmolekul kompleks *thymidylate synthase* dengan UMP. Chain warna hijau merupakan chain dari *thymidylate synthase*, sedangkan chain warna biru muda merupakan chain dari UMP.



Gambar 5.2 Struktur antarmolekul kompleks *thymidylate synthase* dengan FdUMP. Chain warna hijau merupakan chain dari *thymidylate synthase*, sedangkan chain warna ungu merupakan chain dari FdUMP.

Berdasarkan proses *docking* yang telah dilakukan, didapatkan nilai *binding affinity thymidylate synthase* dengan FdUMP adalah -8,0 kkal/ mol. Sedangkan nilai *binding affinity thymidylate synthase* dengan ligan kontrol UMP adalah sebesar -7,6 kkal/mol. Afinitas dari FdUMP maupun UMP terhadap *thymidylate synthase* termasuk ikatan kuat karena keduanya memiliki nilai *binding affinity* < -7,3 kkal/mol.

Tabel 5.1 Nilai *binding affinity thymidylate synthase* dengan ligan

Ligan yang Berikatan dengan

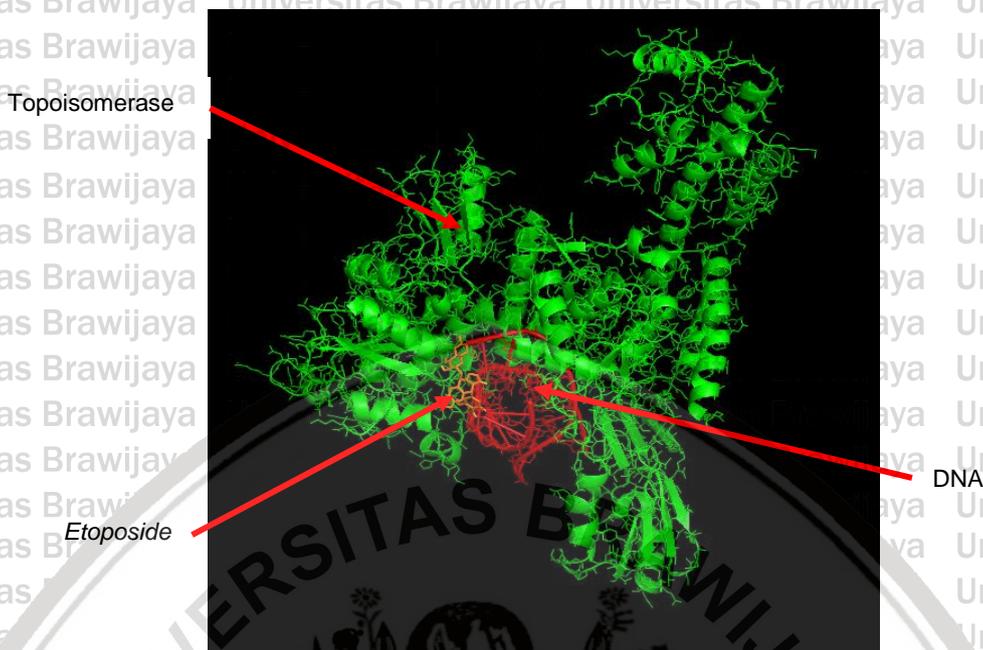
Makromolekul (*Thymidylate Synthase*)

***Binding Affinity* (kkal/mol)**

UMP (ligan kontrol)	-7,6
FdUMP	-8,0

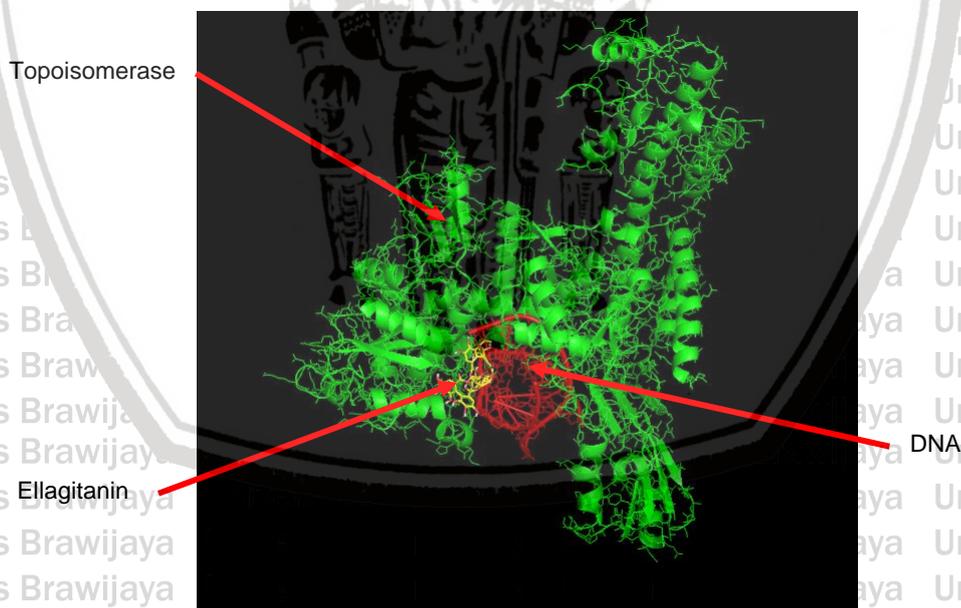
5.2 Hasil *Binding Affinity* Ellagitanin dengan *DNA Topoisomerase II α*

DNA topoisomerase II α (Top2 α) 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. *DNA topoisomerase II α* dominan diekspresikan pada sel-sel yang aktif berproliferasi seperti pada sel kanker sehingga inhibisi akan menyebabkan efek antiproliferasi (Setiawan *et al.*, 2016; Pouyse *et al.* 2012).



Gambar 5.3 Struktur antarmolekul kompleks DNA topoisomerase II α dengan etoposide.

Chain warna hijau merupakan chain dari topoisomerase, chain warna merah merupakan chain dari DNA, sedangkan chain warna jingga merupakan chain dari obat kontrol etoposide (EVP)



Gambar 5.4 Struktur antarmolekul kompleks DNA topoisomerase II α dengan ellagitanin.

Chain warna hijau merupakan chain dari topoisomerase, chain warna merah merupakan chain dari DNA, sedangkan chain warna kuning merupakan chain dari ellagitanin.

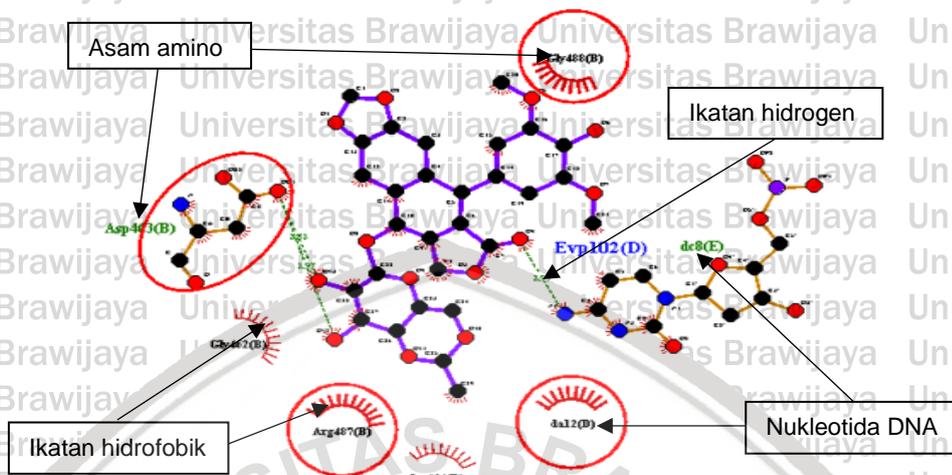
Berdasarkan proses *docking* yang telah dilakukan, didapatkan nilai *binding affinity DNA topoisomerase II α* dengan *ellagitanin* adalah -5,3 kkal/ mol.

Sedangkan nilai *binding affinity DNA topoisomerase II α* dengan obat kontrol *etoposide* adalah sebesar -4,8 kkal/mol. Meskipun nilai *binding affinity DNA topoisomerase II α* dengan *ellagitanin* tidak cukup kuat karena nilainya > -7.3 kkal/mol, namun ikatan *ellagitanin* masih lebih kuat dibanding dengan ikatan obat kontrol *etoposide* dengan *DNA topoisomerase II α* .

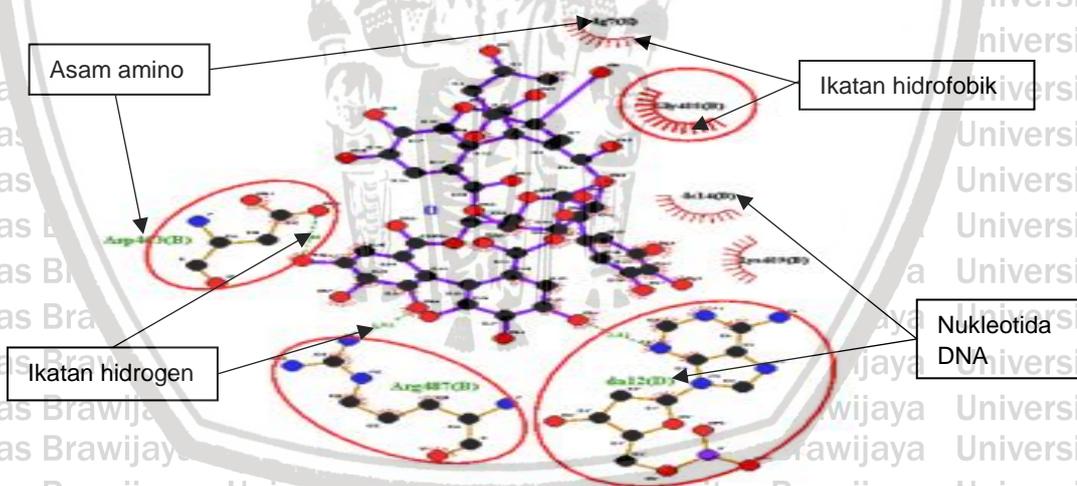
Tabel 5.2 Nilai *binding affinity DNA topoisomerase II α* dengan ligan

Ligan yang Berikatan dengan Makromolekul (<i>DNA Topoisomerase II α</i>)	<i>Binding Affinity</i> (kkal/mol)
<i>Etoposide</i> (obat kontrol)	-4,8
Ellagitanin	-5,3

5.3 Identifikasi Ikatan Ellagitanin dengan DNA Topoisomerase II α



Gambar 5.5 Identifikasi ikatan asam amino dan nukleotida pada kompleks DNA topoisomerase II α dengan etoposide. Rantai berwarna ungu merupakan rantai dari obat kontrol etoposide, sedangkan yang di sekitarnya merupakan bagian dari DNA topoisomerase II α , terdiri atas asam amino dan nukleotida DNA. Garis hijau menunjukkan jenis ikatan hidrogen, sedangkan garis-garis merah berbentuk seperti bulu mata menunjukkan jenis ikatan hidrofobik. Yang dilingkari merah merupakan asam amino dan nukleotida yang juga ditemukan pada kompleks DNA topoisomerase II α dengan ellagitanin.



Gambar 5.6 Identifikasi ikatan asam amino dan nukleotida pada kompleks DNA topoisomerase II α dengan ellagitanin. Rantai berwarna ungu merupakan rantai dari ellagitanin, sedangkan yang di sekitarnya merupakan bagian dari DNA topoisomerase II α , terdiri atas asam amino dan nukleotida DNA. Garis hijau menunjukkan jenis ikatan hidrogen, sedangkan garis-garis merah berbentuk seperti bulu mata menunjukkan jenis ikatan hidrofobik. Yang dilingkari merah merupakan asam amino dan nukleotida yang juga ditemukan pada kompleks DNA topoisomerase II α dengan obat kontrol etoposide.

Pada kompleks ikatan antara DNA topoisomerase II α dengan obat kontrol etoposide, terdapat 5 asam amino dan 2 nukleotida DNA yang

membentuk total 7 ikatan, yaitu 2 ikatan hidrogen dan 5 ikatan hidrofobik. Yang membentuk ikatan hidrogen adalah asam amino Asp463 dan nukleotida dc8.

Sedangkan yang membentuk ikatan hidrofobik adalah asam amino Gly488, asam amino Gly462, asam amino Arg487, asam amino Ser464 dan nukleotida da12.

Pada kompleks ikatan antara *DNA topoisomerase II α* dengan ellagitanin, terdapat 4 asam amino dan 3 nukleotida DNA yang membentuk total 7 ikatan,

yaitu 3 ikatan hidrogen dan 4 ikatan hidrofobik. Yang membentuk ikatan hidrogen adalah asam amino Asp463, asam amino Arg487, dan nukleotida da12.

Sedangkan yang membentuk ikatan hidrofobik adalah asam amino Gly488, asam amino Lys489, nukleotida dg7, dan nukleotida dc14.

Tabel 5.3 Perbandingan interaksi antara *etoposide* dan ellagitanin dengan *DNA topoisomerase II α* . Yang dicetak tebal merupakan asam amino maupun nukleotida yang ditemukan baik pada kompleks *etoposide-DNA topoisomerase II α* maupun pada kompleks ellagitanin-*DNA topoisomerase II α* .

Ligan	Interaksi yang Terbentuk
<i>Etoposide</i>	Ikatan hidrogen : Asp463 , dc8 Ikatan hidrofobik : Gly488 , Gly462, Arg487 , Ser464, da12
Ellagitanin	Ikatan hidrogen : Asp463 , Arg487 , da12 Ikatan hidrofobik : Gly488 , Lys489, dg7, dc14

Terdapat 3 kesamaan interaksi asam amino dan 1 kesamaan interaksi nukleotida pada perbandingan antara kompleks *etoposide-DNA topoisomerase II α* dengan kompleks ellagitanin-*DNA topoisomerase II α* . Asam amino yang sama adalah Asp463, Arg487, dan Gly488, sedangkan nukleotida yang sama adalah da12.

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya ikatan spesifik dan nilai *binding affinity* pada kompleks ikatan antara ellagitannin dengan DNA *topoisomerase II α* untuk memprediksi apakah ellagitannin dalam ekstrak daun benalu mangga berpotensi menjadi agen kokemoterapi 5-FU untuk pengobatan kanker serviks. Metode yang digunakan adalah metode *specific docking* yang dilakukan dengan mengikatkan suatu ligan terhadap suatu sisi aktif makromolekul yang sebelumnya telah berikatan dengan suatu obat/ ligan kontrol. Harapannya adalah ligan yang digunakan dapat berikatan pada sisi yang sama dengan obat/ ligan kontrol sehingga dapat dilakukan perbandingan nilai *binding affinity* ligan dengan obat/ ligan kontrol untuk mengetahui potensi ikatan dari ligan terhadap reseptor.

6.1 Ikatan 5-FU dengan *Thymidylate Synthase*

5-FU adalah salah satu jenis obat kemoterapi golongan antimetabolit yang digunakan cukup luas untuk mengatasi kanker, termasuk kanker serviks. Mekanisme kerja 5-FU dengan cara menghambat proses biosintesis esensial atau bergabung dengan makromolekul seperti DNA dan RNA dalam sel kanker untuk menghambat aktivitas normal mereka. Salah satu bahan metabolit dari 5-FU, yaitu *fluorodeoxyuridine monophosphate* (FdUMP) bekerja sebagai inhibitor terhadap enzim *thymidylate synthase* (TS). Ketika enzim TS dihambat oleh FdUMP, mengakibatkan tidak terbentuknya pirimidin timidin dikarenakan proses katalisis *uridine monophosphate* (UMP) menjadi *thymidine monophosphate* (TMP) terhambat. Karena timidin tidak terbentuk akhirnya pembentukan DNA sel kanker akan terganggu (Longley et al, 2003).

Hasil *docking* FdUMP dengan *thymidylate synthase* memiliki nilai *binding affinity* sebesar -8,0 kkal/mol, sedangkan *docking* ligan kontrol UMP dengan *thymidylate synthase* memiliki nilai *binding affinity* sebesar -7,6 kkal/mol. Suatu ikatan dapat dikatakan kuat bila nilai *binding affinity* < -7,3 kkal/mol sehingga baik FdUMP maupun UMP sama-sama memiliki ikatan kuat dengan *thymidylate synthase*. FdUMP memiliki nilai *binding affinity* lebih kuat dibanding dengan UMP sehingga FdUMP lebih berpotensi besar untuk berikatan dengan sisi aktif *thymidylate synthase* sebagai kompetitif inhibitor sehingga FdUMP (5-FU) dapat dikatakan berpotensi cukup baik dalam menghambat kerja enzim *thymidylate synthase*.

6.2 Ikatan Ellagitanin dengan *DNA Topoisomerase II α*

Ellagitanin merupakan ester dari asam heksahidroksidifenil (HDDP) dan merupakan salah satu jenis tanin yang terbukti memiliki banyak nilai di bidang kesehatan. Aktivitas biologi ellagitanin yang telah diketahui antara lain sebagai antidiabetes, antibakteri, antivirus, antihipertensi, antioksidan, dan antikanker atau antitumor. Pada efeknya sebagai antikanker, ellagitanin salah satunya dapat bertindak sebagai inhibitor terhadap *DNA topoisomerase II α* (Mabruroh, 2015).

DNA topoisomerase II α adalah enzim nukleus yang banyak diekspresikan pada sel-sel aktif berproliferasi (seperti pada sel kanker) yang berperan penting dalam menanganai permasalahan topologi DNA yang berasosiasi dengan replikasi DNA, rekombinasi DNA, serta kondensasi kromosom dan segregasi selama fase mitosis (Pouyse *et al.*, 2012). Obat kontrol *etoposide* digunakan sebagai pembanding dalam penelitian ini dikarenakan *etoposide* sudah teruji sebagai obat kemoterapi yang memiliki efektifitas baik dalam bertindak sebagai inhibitor *DNA topoisomerase II α* .

Hasil *docking* ellagitanin dengan *DNA topoisomerase II α* memiliki nilai *binding affinity* sebesar -5,3 kkal/mol, sedangkan *docking* obat kontrol *etoposide* dengan *DNA topoisomerase II α* memiliki nilai *binding affinity* sebesar -4,8 kkal/mol. Suatu ikatan dapat dikatakan kuat bila nilai *binding affinity* < -7,3 kkal/mol. Meskipun ikatan ellagitanin dengan *DNA topoisomerase II α* tidak termasuk ikatan kuat karena nilai *binding affinity* > -7,3 kkal/mol, namun ellagitanin memiliki nilai *binding affinity* yang lebih kuat daripada obat kontrol *etoposide* sehingga ellagitanin masih dapat dikatakan memiliki potensi baik dalam bertindak sebagai inhibitor *DNA topoisomerase II α* . Nilai *binding affinity* yang lemah kemungkinan karena tidak semua bagian ellagitanin berikatan dengan sisi dari *topoisomerase II α* melainkan juga ada bagian ellagitanin yang berikatan dengan DNA.

6.3 Interaksi Ikatan Ellagitanin dengan *DNA Topoisomerase II α*

Besar nilai *binding affinity* bergantung pada banyaknya ikatan yang terbentuk pada kompleks ligan-makromolekul. Semakin banyak ikatan yang terbentuk maka nilai *binding affinity* akan semakin kuat. Pada hasil identifikasi ikatan asam amino dan nukleotida, didapatkan bahwa kompleks ellagitanin dengan *DNA topoisomerase II α* memiliki total 7 ikatan, sama dengan kompleks obat kontrol *etoposide* dengan *DNA topoisomerase II α* yang juga memiliki total 7 ikatan. Perbedaannya adalah dari 7 ikatan pada kompleks ellagitanin-DNA *topoisomerase II α* terdapat 3 ikatan hidrogen, sedangkan pada kompleks *etoposide*-DNA *topoisomerase II α* hanya terdapat 2 ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen memiliki afinitas yang lebih kuat dibandingkan dengan ikatan hidrofobik sehingga meskipun ellagitanin dan *etoposide* sama-sama memiliki total 7 ikatan dengan *DNA topoisomerase II α* namun nilai *binding affinity* ellagitanin lebih kuat

karena jumlah ikatan hidrogen ellagitanin lebih banyak daripada *etoposide* sehingga ellagitanin dapat dikatakan memiliki potensi lebih baik dibanding *etoposide* dalam berikatan dengan *DNA Topoisomerase II α* .

Mekanisme kerja yang berbeda dari ellagitanin dengan 5-FU dapat menyebabkan efek sinergis dalam penghambatan proliferasi sel kanker serviks sehingga ellagitanin diharapkan dapat dikembangkan untuk menjadi salah satu agen kokemoterapi untuk pengobatan kanker serviks.

6.4 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan penelitian ini adalah tidak dilakukan simulasi menggunakan *software* YASARA untuk mengondisikan struktur kompleks ellagitanin-*DNA topoisomerase II α* ke dalam suatu lingkungan yang dikondisikan menyerupai tubuh manusia untuk mengetahui dinamika molekul apakah ikatannya stabil atau tidak. Hal ini dikarenakan keterbatasan waktu dan fasilitas yang dimiliki oleh peneliti.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa ellagitanin berpotensi sebagai agen kokemoterapi 5-FU dikarenakan memiliki mekanisme kerja yang berbeda dari 5-FU dalam menghambat kanker serviks. Hal ini dapat dilihat melalui:

1. 5-FU (FdUMP) dengan *thymidylate synthase* memiliki ikatan kuat dengan nilai *binding affinity* -8,0 kkal/mol dan juga berpotensi menghambat *thymidylate synthase* dikarenakan nilai *binding affinity*-nya lebih negatif dibanding ligan kontrol UMP.
2. Ellagitanin dengan *DNA topoisomerase II α* memiliki ikatan lemah dengan nilai *binding affinity* -5,3 kkal/mol namun masih dapat dikatakan berpotensi berikatan sebagai inhibitor dengan *DNA topoisomerase II α* dikarenakan nilai *binding affinity*-nya masih lebih negatif dibanding obat kontrol *etoposide*.

7.2 Saran

Adapun saran yang dapat peneliti berikan dari penelitian ini adalah agar dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui dinamika molekul dari kompleks ellagitanin-*DNA topoisomerase II α* dengan mengondisikannya sesuai dengan keadaan yang dimiripkan menyerupai lingkungan tubuh manusia menggunakan software YASARA.

DAFTAR PUSTAKA

American Cancer Society, 2016. *Cervical Cancer*. [Online] Tersedia pada: <<http://www.cancer.org>> [diakses 7 November 2017].

American Joint Committee on Cancer, 2017. *Cancer Staging System*. [Online] Tersedia pada: <<https://cancerstaging.org/references-tools/Pages/What-is-Cancer-Staging.aspx>> [diakses 20 November 2017].

Andrijono, Purwoto, G., Sekarutami, S. M., Handjari, D. R., Primariadewi, Nuhonni, S. A., ... Octavia, L. I., 2013. Panduan Penatalaksanaan Kanker Serviks. *Komite Penanggulangan Kanker Nasional*, 1–30.

Artanti, N., Firmansyah, T., & Darmawan, A., 2012. Bioactivities Evaluation of Indonesian Mistletoes (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) Leaves Extracts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(1), 24–27.

Attwood, T.K., Gisel, A., Eriksson, NE., Bongcam-Rudloff, E., Mahdavi, M.A (ed), 2011. Concepts, Historical Milestones and the Central Place of Bioinformatics in Modern Biology: A European Perspective. *Bioinformatics - Trends and Methodologies*.

Backer, C.A., dan Bakhuizen van den Brink, R.C., 1965. *Flora of Java (Spermatophytes Only) Vol. 2*. Netherland: Groningen.

Dallakyan, S. dan Olson, A., J., 2015. Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Methods in Molecular Biology*.

Danniswara, A., 2018. *Uji In Silico Ikatan Ellagitannin Dalam Benalu Mangga (Dendrophthoe pentandra) Dengan Protein Kinase A Sebagai Terapi Kombinasi Pada Sel Kanker Payudara*. Universitas Brawijaya.

Darmawati., 2007. Kanker Serviks Wanita Usia Subur. *Idea Nursing Journal*, 1, 9–14.

Darvin, P., Joung, Y. H., Kang, D. Y., Sp, N., Byun, H. J., Hwang, T. S., ... Yang, Y. M., 2017. Tannic Acid Inhibits EGFR/STAT1/3 and Enhances p38/STAT1 Signalling Axis in Breast Cancer Cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(4), 720–734. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13015>

Endharti, A. T., Sulastri, E., Umanailo, R., Nurseta, T., & Handono, K., 2018. Mango Mistletoe *Dendrophthoe pentandra* Leaf Extract Acts Synergistically With 5-Fluorouracil to Induce Apoptosis and Increase p21 Expression in Human Cervical Adenocarcinoma HeLa Cells by Reducing Survivin Expression. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(07), 10–15. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.8702>

Ferwadi, S., & Gunawan, R., 2017. Molecular Docking Study of Cinnamate Acid Compound and Its Derivatives As Protein 1J4X Inhibitor To Cervical Cancer

- Cell. *Jurnal Kimia Mulawarman*, (Vmd).
- Fitrilia, T., Bintang, M., & Safithri, M., 2015. Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Clove Mistletoe Leaf Extracts (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq). *IOSR Journal Of Pharmacy*, 5(8), 2250–3013.
- Funkhouser, T., 2007. *Protein-Ligand Docking Methods*. New Jersey: Princeton University.
- Hatta, G.P., 2017. *Perbandingan Akurasi Diagnostik IVA pada Primipara dan Multipara Terhadap Diagnostik Papsmear Sebagai Gold Standar*. Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
- Hernawan, U. E. K. O., & Setyawan, A. D. W. I., 2003. Review: Ellagitanin ; Biosintesis , Isolasi , dan Aktivitas Biologi. *Biofarmasi*, 1(1), 25–38.
- Kemendes, 2017. *Panduan Penatalaksanaan Kanker Serviks*. [Online] Tersedia pada: <<http://kanker.kemkes.go.id/guidelines/PPKServiks.pdf>> [diakses 8 Desember 2017].
- Kementerian Kesehatan RI Pusat Data dan Informasi Kesehatan., 2015. Stop Kanker. *Infodatin-Kanker*, hal 3.
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G., 2003. 5-Fluorouracil: Mechanism of Action and Clinical Strategies. *Nature Reviews*, 3(May), 330–338.
- Mabrurh, A. I., 2015. *Uji Aktifitas Antioksidan Ekstrak Tannin (Lopanthorum gracile Brogn) dari Daun Rumput Bambu dan Identifikasinya*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Mardiani, R., 2010. *Evaluasi Penggunaan Antiemetika pada Pasien Kanker Serviks dengan Terapi Sitostatik di Instalasi Rawat Inap RSUD Dr. Moewardi Surakarta pada Tahun 2009*. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Pouyse, L., Deffieux, D., Elkaoukabi-chaibi, A., Giorgi, F. De, & Pourquier, P., 2012. The Polyphenolic Ellagitannin Vescalagin Acts As a Preferential Catalytic Inhibitor of the α Isoform of Human DNA Topoisomerase II. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics Journal*, 134–141.
- Pustaka, S., & Rasjidi, I., 2009. Epidemiologi Kanker Serviks. *Indonesian Journal of Cancer*, III(3), 103–108.
- Rahayu, S., Sofaroh, A. E., & Sari, D. N. P., 2010. *Teh Celup Benalu Mangga (Dendrophthoe pentandra): Minuman Sehat Penunjang Terapi Kanker*. Universitas Gajah Mada.
- Rini, L. M., 2009. *Analisa Faktor Usia pada Wanita Peserta Program Penapisan Kanker Leher Rahim dengan Pendekatan "See & Treat": untuk Deteksi Lesi Prakanker dan Pengobatan dengan Terapi Beku*. Universitas Indonesia.

Tersedia pada: http://lib.ui.ac.id/file?file=digital/122893-S09049fk-Analisa_faktor_Literatur.pdf

Schiffman, M., Wentzensen, N., Wacholder, S., Kinney, W., Gage, J. C., Castle, P. E., 2017. Human Papillomavirus Testing in the Prevention of Cervical Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(5), 368-383. <https://doi.org/10.1093/inci/djz562>.

Setiawan, T., Ambarsari, L., Sumaryada, T. I., Biokimia, D., Biofarmaka, P. P., & Fisika, D., 2016. Studi In Silico Converse Region Etoposite Binding Domain pada Isozim Human DNA Topoisomerase II. *Indonesian E-Journal of Applied Chemistry*, 4, 61-70.

Suharna, S., 2012. *Studi In Silico Senyawa Turunan Flavonoid terhadap Penghambatan Enzim Tirosinase*. Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar.

Utomo, D. H., 2018. *Cara Mudah Melakukan Docking dengan Pyrx (Autodock Vina)*. Indonesian Institute of Bioinformatics.

Wulandari, A. S., 2010. *Pengertian dan Pemahaman Resiko Ca Cervix pada Wanita Subur di Indonesia*. Universitas Wijaya Kusuma.

