

## BAB 4

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Analisis *Molecular docking* Asam Klorogenat dengan Reseptor Beta Adrenergik dan *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE)

##### 4.1.1 Analisis Uji PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*)

Hasil uji spektrum aktivitas biologi dari asam klorogenat menggunakan program PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*) dengan memasukkan *canonnical SMILES* dari asam klorogenat. Analisis PASS berdasarkan pada SAR (*Structure Activity Relationship*) yaitu hubungan struktur senyawa dengan aktivitas biologi. Spektrum aktivitas disajikan secara kualitatif dalam daftar aktivitas probabilitas aktif (Pa) dan probabilitas tidak aktif (Pi). Pada penelitian ini disederhanakan berdasarkan *cutoff* pada nilai  $Pa > 0.7$ .

**Tabel 4.1** Hasil Uji Aktivitas Biologi Asam Klorogenat

Pa	Pi	Aktivitas	Keterangan
0.940	0.004	Agonis integritas membran	Menjaga keutuhan membran sel
0.920	0.001	Koleretik	Meningkatkan produksi empedu
0.865	0.004	Menekan permeabilitas membran	Melindungi dan menyaring sel dari molekul yang tidak dibutuhkan
<b>0,856</b>	<b>0,002</b>	<b>Penangkal radikal bebas</b>	<b>Menghindari stress oksidatif yang berperan sebagai vasodilator</b>
<b>0,855</b>	<b>0,003</b>	<b>Inhibitor lipid peroksidase</b>	<b>Menghambat lemak teroksidasi menjadi radikal bebas</b>

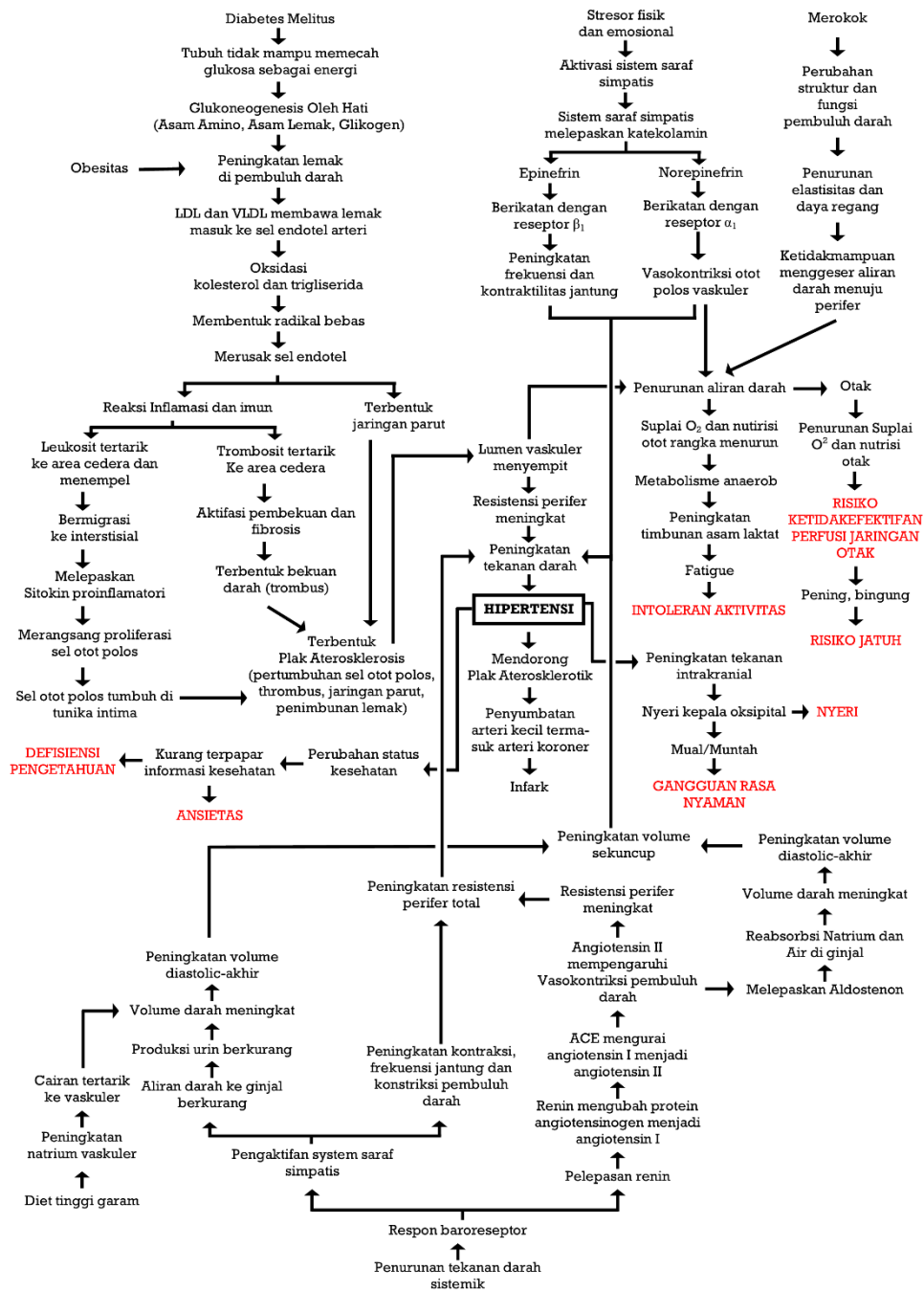
<b>0,846</b>	<b>0,004</b>	<b>Inhibitor oksidoreduktase</b>	<b>Menghambat epinefrin untuk meningkatkan tekanan darah</b>
0,846	0,004	Antikarsinogenik	Mencegah pertumbuhan kanker
0,833	0,003	Kemopreventif	Mencegah pertumbuhan kanker
0,826	0,010	Inhibitor ekspresi HIF1A	Mencegah pertumbuhan kanker
0,815	0,003	Inhibitor fosfatase	Menghambat gangguan hati dan saluran empedu
0,808	0,017	Antiekzematik	Mencegah eksim
<b>0,785</b>	<b>0,004</b>	<b>Antioksidan</b>	<b>Menyeimbangkan radikal bebas</b>
0,769	0,004	Pengobatan penyakit proliferasif	Pengobatan kanker
0,778	0,014	Antineoplastik	Menghancurkan sel kanker
0,750	0,001	Inhibitor 5-dehidrogenase quinate	Penghambat penghancuran dinding <i>E. coli</i>
0,726	0,006	Antihipoksia	Mencegah hipoksia
0,752	0,034	Pelindung membran mukosa	Melindungi dari infeksi virus dan bakteri
0,716	0,021	Penghambat reseptor kinase berpasangan G-protein	Menghambat proliferasi sel
<b>0,716</b>	<b>0,021</b>	<b>Penghambat reseptor beta-adrenergik kinase</b>	<b>Menghambat vasodilasi pembuluh darah</b>
0,707	0,014	Substrat UDP-glukuronosiltransferase	Mendukung konjugasi xenobiotik
0,700	0,017	Imunosupresan	Menekan sistem kekebalan tubuh

Sumber: Hasil Uji PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*)

Berdasarkan hasil PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*) asam klorogenat yang tercantum pada Tabel 4.1 memiliki hasil yang baik dengan aktivitas biologi sebagai penangkal radikal bebas dan antioksidan serta menunjukkan aktivitas

sebagai penghambat reseptor beta adrenergik kinase. Hasil ini bermakna bahwa asam klorogenat sebagai kandungan kopi robusta memiliki potensi yang baik sebagai antihipertensi.

Aktivitas hipertensi terjadi akibat dampak *cardiac output* (curah jantung) dan peningkatan tekanan perifer. Tekanan darah secara umum ditentukan oleh 2 mekanisme yaitu sistem saraf simpatis dan sistem renin angiotensin aldosteron (Novita, 2019). Kala sistem saraf simpatis diaktifkan akan membebaskan katekolamin berupa epinefrin yang bekerja di otot jantung untuk bertaut dengan reseptor beta adrenergik di dinding pembuluh darah untuk meningkatkan denyut jantung dan vasokonstriksi pembuluh darah sehingga curah jantung meningkat dan resistensi perifer meningkat sehingga terjadi hipertensi. Hipertensi yang datang melalui mekanisme sistem renin angiotensin aldosteron bermula kala renin diproduksi oleh sel juxtaglomerular namun tidak berpartisipasi dalam filtrasi glomerulus, renin akan masuk ke sirkulasi melalui arteriol aferen ginjal bertemu Angiotensinogen yang diproduksi hati untuk menjadi Angiotensinogen I kemudian bergerak melalui aliran darah hingga mencapai di paru-paru bertemu dengan *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) dan berubah menjadi Angiotensin II sebagai hormon meningkatkan tekanan darah dengan menimbulkan vasokonstriksi di sirkulasi sistemik sehingga resistensi perifer meningkat dan membuat tekanan darah tinggi (Allikmets, 2022; Filippo, 2022; Geleijnse, 2022; Iqbal & Jamal, 2022; Kujawska *et al.*, 2021; Mangopo *et al.*, 2022; Melik *et al.*, 2019; Nabiha, 2020; Nadhira Zakiyah, 2021; Palatini *et al.*, 2022; Sureshkumar, 2022; Van Oort *et al.*, 2020; Yamaji *et al.*, 2022).



**Gambar 4. 1** Patofisiologi Hipertensi  
 Sumber : (Nabiha, 2020)

Berdasarkan gambar 4.1 obesitas berkaitan dengan hipertensi karena ketidakseimbangan konsumsi makanan memperbesar beban jantung untuk memompa darah lebih keras menyuplai makanan dan oksigen ke jaringan. Aktivitas fisik dapat melatih frekuensi denyut jantung untuk tetap stabil dan sedikit aktivitas fisik membuat risiko obesitas lebih besar yang memicu hipertensi. Kebiasaan merokok menyebabkan saraf simpatis dirangsang nikotin dan karbon monoksida untuk meningkatkan curah jantung merusak pembuluh darah disusul pelonjakan tekanan darah (Kurnia & Malinti, 2020). Ketika asupan natrium melebihi batas wajar mengganggu keseimbangan cairan karena dapat menarik air yang membuat volume darah meningkat sehingga tekanan pembuluh darah tinggi.

Asam klorogenat sebagai penghambat reseptor beta adrenergik dan sebagai inhibitor oksidoreduktase yang menekan epinefrin. Oksidoreduktase sebagai enzim yang mempercepat oksidasi yang dapat meningkatkan radikal bebas. Reseptor beta adrenergik di stimulasi sistem saraf simpatis dengan membebaskan katekolamin berupa epinefrin yang bekerja di otot jantung untuk bertaut dengan reseptor beta adrenergik di dinding pembuluh darah untuk meningkatkan denyut jantung dan vasokonstriksi pembuluh darah sehingga curah jantung meningkat dan resistensi perifer meningkat sehingga terjadi hipertensi (Filippo, 2022; Inderberg & Wälchli, 2020). Beta blocker menghambat sekresi renin dari sel juxtaglomerular (Sureshkumar, 2022).

Asam klorogenat sebagai antioksidan dan inhibitor lipid peroksidase yang dibutuhkan oleh tubuh untuk menangkal radikal bebas dan mencegah terjadinya kerusakan. Radikal bebas di dalam tubuh merupakan hasil samping dari proses oksidasi dan pembakaran sel yang berlangsung pada waktu bernafas, metabolisme sel, olahraga yang berlebihan, peradangan, dan terpapar polusi (asap kendaraan, asap rokok, makanan, logam berat, dan radiasi matahari). Radikal bebas memiliki satu atau bahkan lebih dari satu elektron bebas tidak berpasangan. Radikal bebas bersifat tidak stabil dan selalu berusaha mengambil elektron dari molekul di sekitarnya, sehingga radikal bebas

dapat merusak organisme molekul dan menimbulkan stres oksidatif yang dapat merusak sel tubuh. Antioksidan dapat membuat radikal bebas menjadi stabil dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan memutuskan reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas agar mengurangi stres oksidatif (Ifmaily et al., 2022; Singh et al., 2022; Tanjoto et al., 2021; Tarigan, 2020).

Asam klorogenat memiliki potensi aktivitas sebagai antihipertensi karena asam klorogenat menghambat *Angiotensin Converting Enzyme* untuk mengurangi terjadinya stres oksidatif yang berefek pada penurunan tekanan darah melalui peningkatan peningkatan bioavailabilitas nitrit oksida (NO) di pembuluh darah arteri (Griendling et al., 2021; Han et al., 2022; Kajikawa et al., 2018; Krzeminska et al., 2022; Nwabuo et al., 2020; Rahmawati et al., 2021; Teramoto et al., 2022). NO berfungsi untuk melemaskan pembuluh darah sehingga dapat menurunkan tekanan darah. Asam klorogenat dalam peranannya menghambat aktivitas *Angiotensin Converting Enzyme* sehingga kadar Angiotensin II yang terbentuk menurun dan peningkatan bradikinin yang menyebabkan efek vasodilatasi atau merelaksasikan pembuluh darah dan menurunkan tekanan darah (Bare et al., 2019; Rahmawati et al., 2021; Saifur Rohman et al., 2020; Surma & Oparil, 2021).

Angiotensin II merupakan produk utama dari sistem RAAS yang berperan pada peristiwa hipertensi sebagai vasokonstriktor. Hipertensi yang datang melalui mekanisme sistem renin-angiotensin-aldosteron bermula kala renin diproduksi oleh sel juxtaglomerular namun tidak berpartisipasi dalam filtrasi glomerulus, renin akan masuk ke sirkulasi melalui arteriol aferen ginjal bertemu Angiotensinogen yang diproduksi hati untuk menjadi Angiotensinogen I kemudian bergerak melalui aliran darah hingga mencapai di paru-paru bertemu dengan *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) dan dikonversi menjadi Angiotensin II sebagai hormon meningkatkan tekanan darah dengan menimbulkan vasokonstriksi di sirkulasi sistemik sehingga resistensi perifer meningkat dan membuat tekanan darah tinggi. Enzim ACE mempunyai peranan

penting dalam regulasi tekanan darah sehingga inhibisi kerja enzim ACE dapat memberikan efek hipotensi (Allikmets, 2022; Filippo, 2022; Geleijnse, 2022; Iqbal & Jamal, 2022; Kujawska *et al.*, 2021; Mangopo *et al.*, 2022; Melik *et al.*, 2019; Nabihah, 2020; Nadhira Zakiyah, 2021; Palatini *et al.*, 2022; Sureshkumar, 2022; Van Oort *et al.*, 2020; Yamaji *et al.*, 2022).

#### **4.1.2 Analisis *Molecular docking***

Lokasi terbaik bagi ligan untuk melekat pada reseptor dengan energi afinitas ditentukan dengan menggunakan proses komputasi yang dikenal sebagai *molecular docking*. Ligan yang ditargetkan sebagai mikromolekul yang berikatan dengan daerah ikatan reseptor yang dipandang sebagai makromolekul protein yang menjadi target dengan parameter yang disebut config (Nurarifa *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2022). Preparasi ligan dan reseptor merupakan langkah awal dalam proses penambatan molekul. Sebelum dipreparasi, ligan dikonversi dari format \*.sdf ke format \*.pdb memanfaatkan aplikasi *Biovia Discovery Studio 2021* supaya dapat terbaca *Autodock Tools*. Dalam *Autodock Tools*, muatan Gasteiger ditambahkan ke ligan untuk membantunya beradaptasi dengan zona docking dan menjamin bahwa perhitungan dilakukan dengan tepat. Hidrogen polar ditambahkan ligan sehingga terlihat interaksi yang timbul saat pengikatan dengan reseptor dan menyesuaikan suasana docking supaya menyerupai suasana pH fisiologis yang bernilai 7. Kemudian mengatur torsi ligan supaya hanya bagian yang fleksibel berotasi yang menempel dengan reseptor dengan makna warna pada ligan yakni hijau berarti bagian yang fleksibel, bagian berwarna magenta berpotensi untuk berotasi dan bagian yang kaku ditunjuk dengan berwarna merah. Reseptor dipreparasi dengan memanfaatkan perangkat lunak *Biovia Discovery Studio 2021* dengan menghilangkan temuan kristalisasi yang tersisa yaitu ligan yang tidak dibutuhkan dan pelarut berupa air agar tidak menghalangi proses pencarian konformasi. Preparasi reseptor di *Autodock Tools* menambahkan hidrogen yang bersifat polar dan muatan Kollman agar dapat beradaptasi dengan sistem *docking*

sehingga perhitungan dilakukan dengan tepat dan mendekati suasana pH fisiologis (Apriani, 2015). Selanjutnya dilakukan penentuan pusat dari gridbox pada proses docking digunakan untuk menentukan lokasi berikatan reseptor yang akan ditambatkan dengan ligan yang akan di docking berdasarkan koordinat x, y dan z untuk mengetahui konformasi energi ligan terendah. Pada tabel II mencantumkan koordinat gridbox serta ukurannya.

**Tabel 4.2** Koordinat Grid Box pada *Molecular Docking*

Reseptor	Koordinat (Å)			Ukuran (Å)		
	X	Y	Z	X	Y	Z
<b>Beta Adrenergik</b>	25.838	-32.808	-0.373	66	74	94
<i>Angiotensin Converting Enzyme (ACE)</i>	35.728	38.235	36.408	86	84	78

Sumber: Hasil *Grid Box* menggunakan *AutoDock Tools 1.5.7*

Penambatan molekul dapat dilaksanakan menggunakan Autodock Vina sesuai persiapan protein dan ligan dengan tujuan mengoptimalkan geometri untuk menyelidiki energi terendah yang menampilkan stabilisasi struktur kimia ligan yang dioptimalkan (A. B. Pratama et al., 2021). Salin file protein dan ligan berformat \*.pdbqt ke dalam folder download pada Local Disk (C:) sebagai langkah awal pada tahap ini. Selanjutnya seluruh konfigurasi diketik pada notepad dan disimpan dengan nama 'config.txt' dalam sebuah folder. Konfigurasi vina mencakup penulisan nama reseptor dan ligan, output, dan gridbox. Nama reseptor dan ligan pada notepad harus sesuai dengan nama file yang berada di folder download. Parameter grid box yang telah diatur pada protein reseptor yang tertera pada Tabel 4.2 mencakup center\_x, center\_y,



center\_z, size\_x, size\_y, dan size\_z. Sesuai file konfigurasi notepad disiapkan, maka proses docking dengan vina dapat dioperasikan melalui perintah *Command prompt*. Akses ke dalam Local Disk (C:) dengan perintah “cd” terlebih dahulu, untuk masuk ke dalam folder download yang berisikan config dilanjutkan dengan perintah “cd download”. Proses docking dapat dioperasikan menggunakan perintah “Vina --config conf.txt - -log log.txt” (Apriani, 2015; Daniaty Malau & Fatimah Azzahra, 2019; Fauziyyah, 2021). Ligan yang ditambahkan dan spesifikasi komputer, keduanya berdampak pada berapa lama proses *docking* berlangsung. Namun, hal tersebut tidak mempengaruhi ketepatan hasil yang diperoleh. Dibandingkan dengan Autodock 4, proses *molecular docking* menggunakan Autodock Vina dapat bekerja dengan presisi memperkirakan mode ikatan. Selain itu, Vina dapat memanfaatkan keuntungan unit pemrosesan pusat komputer untuk memangkas waktu kerja yang dibutuhkan secara signifikan. File baru dalam folder vina, yaitu “log.txt” dan “out.pdbqt” yang muncul sesuai proses *docking* selesai. Nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) dan nilai afinitas ikatan hasil docking tersedia pada log.txt. Sedangkan "out.pdbqt" adalah konformasi ligan dan reseptor yang ditambahkan (Apriani, 2015).

Hasil penambatan molekul pada penelitian ini meliputi nilai energi afinitas ( $\Delta G$ ) dan *Root Mean Square Deviation* (RMSD), serta interaksi ligan dengan residu pada makromolekul protein. Energi afinitas yang lebih rendah yang menentukan pose pengikatan ideal reseptor dan ligan. Interaksi ligan dan reseptor cenderung terjadi pada keadaan energi yang paling rendah, keadaan tersebut menyulut molekul berada pada keadaan yang stabil dan memiliki potensi lebih besar kepada ligan dalam memberikan pengaruh pada reseptor. Konformasi ligan hasil docking diperingkatkan dari yang terkecil sampai yang tertinggi berdasarkan nilai afinitas. Energi afinitas yang diperlukan ligan untuk berinteraksi dengan reseptor pada situs pengikatan dikenal dengan energi bebas (Amanda, 2021; Ekawasti et al., 2021).

Energi bebas Gibbs ( $\Delta G$ ) merupakan indikator stabilitas konformasi antara ligan dengan reseptor. Secara termodinamika reaksi metabolisme dalam tubuh

berlangsung secara eksergonik dan endergonik. Reaksi eksergonik adalah reaksi yang mendatangkan energi bebas Gibbs, yaitu energi yang diperlukan untuk melakukan aktivitas pada tekanan dan temperatur yang konstan. Karena energi bebas dilepaskan selama reaksi berlangsung, reaksi eksergonik mengurangi energi bebas molekul pereaksi. Akibatnya, produk memiliki energi bebas lebih rendah dibanding energi bebas pereaksi. Nilai negatif muncul kala stabilitas molekul meningkat menimbulkan energi bebasnya menurun, dan reaksi berlangsung secara alami. Keadaan ini disebut sebagai kesetimbangan termodinamika, dan semakin negatif energi bebasnya, semakin cepat dan spontan reaksi tersebut membentuk konformasi yang stabil. Kestabilan interaksi yang terbentuk berkorelasi dengan kapasitas senyawa untuk membentuk ikatan kimia yang kuat (Daniaty Malau & Fatimah Azzahra, 2019; Daria et al., 2022; Maftucha et al., 2022; Shofi, 2022). Semakin kuat ikatannya, maka semakin sedikit energi yang dibutuhkan senyawa untuk mengikat protein target dengan ligan. Interaksi ini terdiri atas ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan interaksi van der waals (Cintia et al., 2018; Hanif et al., 2021; Koban et al., 2022).

Mengukur validitas secara simultan protokol *molecular docking* dengan melihat ketangkasan untuk mereproduksi pose ligan dalam protein target. Fungsi objektif yang kerap diterapkan dalam menilai ketangkasan ini adalah RMSD (*Root Mean Square Deviation*). RMSD ialah tolak ukur yang mencitrakan seberapa besar deviasi jarak perbandingan antara posisi atom ligan secara eksperimental dengan posisi prediksi algoritmanya (Kurniawan et al., 2022; Rachmania, 2019; I. W. Sari et al., 2020). Formasi penambatan yang tepat terbentuk dari fleksibilitas ligan. Pada umumnya, kualitas metode *docking* dikatakan telah memenuhi kriteria valid apabila nilai  $RMSD \leq 2$  karena semakin besar penyimpangan, mengindikasikan semakin besar pula galat pada interaksi ligan dengan protein (Mastura et al., 2020; A. B. Pratama et al., 2021). Pada proses ini penambatan dengan iterasi sebanyak 9 kali yang memungkinkan untuk memperoleh nilai RMSD sekecil mungkin. Peluang untuk mendapatkan nilai RMSD minimal meningkat seiring dengan jumlah pengulangan.

Ligan yang diuji semakin menyerupai *native* ligan yang dibentuk kristalografi kala nilai RMSD mendekati nol. Visualisasi pose validasi antara *native* ligan hasil kristalografi dengan ligan yang diuji menampakkan bahwa struktur dua molekul identik dalam hal posisi dan sudut dari setiap atomnya (Daria et al., 2022; Rachmania, 2019). Luaran AutoDock Vina menyediakan 2 nilai RMSD, yakni batas atas RMSD (RMSD u.b) dan batas bawah RMSD (RMSD l.b). Nilai RMSD yang dibandingkan untuk meninjau keefektifitasan sebuah ligan menghambat reseptor adalah RMSD l.b karena RMSD u.b dapat dipakai jika ligan tidak memiliki simetri internal sehingga nilai RMSD l.b memberikan nilai yang lebih spesifik berdasarkan ligan yang dapat dirotasi sebagai hasil RMSD penambatan (Thahara et al., 2022).

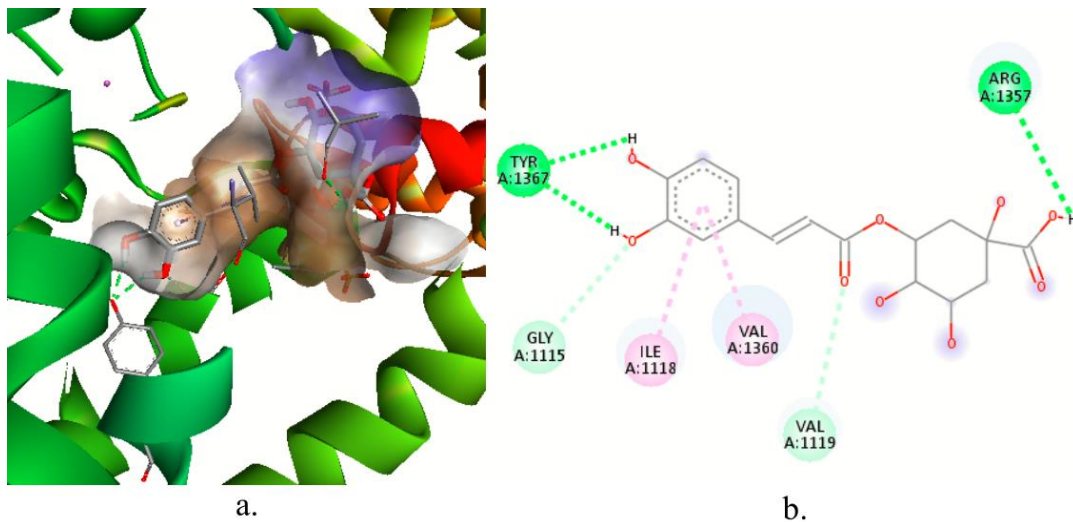
**Tabel 4.3** Hasil Energi Afinitas dan RMSD

Reseptor	Konformasi	<i>Binding Affinity</i> (kcal/mol) Ligan Kontrol	<i>Binding Affinity</i> (kcal/mol) Ligan Uji	dist. from best mode	
				rmsd l.b.	rmsd u.b.
<b>Beta Adrenergik</b>	1	-7.7	-8.9	0.000	0.000
	2	-7.7	-8.8	4.031	6.108
	3	-7.6	-8.2	5.847	8.196
	4	-7.5	-8.1	7.554	12.552
	5	-7.5	-8.1	5.444	7.764
	6	-7.4	-8.0	10.275	12.094
	7	-7.4	-8.0	9.188	13.053
	8	-7.1	-7.9	27.506	30.134
	9	-7.1	-7.8	6.056	9.872
<b>Angiotensin Converting</b>	1	-7.6	-10.1	0.000	0.000
	2	-7.6	-9.9	24.188	28.450

<b>Enzyme (ACE)</b>	3	-7.0	-9.7	7.964	9.749
	4	-6.9	-9.4	4.199	5.854
	5	-6.8	-9.2	5.098	7.172
	6	-6.6	-9.1	2.343	9.023
	7	-6.6	-9.0	2.704	4.452
	8	-6.5	-8.9	4.140	7.568
	9	-6.5	-8.4	4.475	6.733

Sumber: Hasil Pengolahan Data Menggunakan *Autodock Vina*

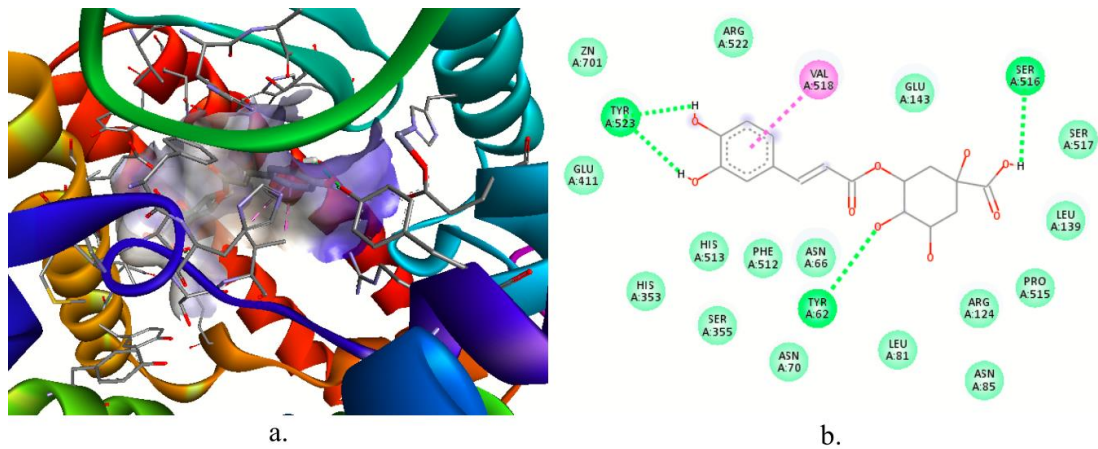
Peringkat teratas dengan nilai energi afinitas terendah dan RMSD nol dipilih dari sembilan peringkat konformasi untuk setiap reseptor yang tertera pada Tabel 4.3, karena merupakan konformasi ideal dari penambatan ligan dengan reseptor. Energi afinitas hasil penambatan molekular asam klorogenat pada reseptor beta adrenergik yang melibatkan 9 mode ligan menghasilkan nilai terendah -8.9 kkal/mol dan energi afinitas hasil penambatan asam klorogenat dan *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) mencakup 9 mode ligan dengan nilai terendah -10.1 kkal/mol. Penambatan ligan uji dengan reseptor dalam penelitian ini terbukti memiliki interaksi lebih kuat dan stabil daripada penambatan molekul reseptor dengan ligan kontrol. Stabilitas molekul meningkat dengan energi bebasnya, Pada penelitian ini, asam klorogenat terbukti secara *in silico* cukup stabil dan spontan untuk digunakan sebagai penghambat reseptor beta adrenergik dan *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) sehingga dapat diyakini mampu mengobati hipertensi.



**Gambar 4.2** Hasil Interaksi Asam Klorogenat dengan Reseptor Beta Adrenergik (a) Bentuk 3D dan (b) Bentuk 2D

Sumber: Hasil Pengolahan Data Menggunakan *Biovia Discovery Studio 2021 Client*

Data interaksi ligan dengan reseptor  $\beta$ -adrenergik dan *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) yang disajikan pada gambar 4.2 dan gambar 4.3 yang divisualisasikan dalam bentuk 2D dan 3D dengan menggunakan *Discovery Studio Visualizer* untuk mengidentifikasi residu asam amino yang terlibat dan kekuatan pengikatan yang terjadi diantara senyawa yang diteliti dengan target protein. Ikatan atau interaksi yang terjadi pada ligan dan reseptor dilambangkan dengan garis yang putus-putus. Kedatangan interaksi asam amino ditimbulkan sebagai reaksi adanya kontak dan efek farmakologis antara ligan dan reseptor sehingga memiliki aktivitas penghambatan (Rachmania, 2019; I. W. Sari et al., 2020).



**Gambar 4.3** Hasil Interaksi Asam Klorogenat dengan Angiotensin Converting Enzyme (ACE) (a) Bentuk 3D dan (b) Bentuk 2D

Sumber: Hasil Pengolahan Data Menggunakan *Biovia Discovery Studio 2021 Client*

Ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan interaksi Van der Waals sebagai interaksi kimia yang dapat dikonstruksi dari hasil docking. Ikatan hidrogen yaitu ikatan yang terjadi antara atom hidrogen dari suatu molekul dengan molekul lain yang lebih elektronegatif. Ikatan hidrogen sebagai wujud ikatan antar molekul yang stabilitasnya paling kuat. Interaksi hidrofobik adalah interaksi antara molekul air dengan molekul nonpolar yang tidak sanggup membentuk ikatan hidrogen. Ikatan hidrofobik lebih renggang daripada ikatan hidrogen namun masih lebih stabil dibanding interaksi Van der Waals. Interaksi Van der Waals merupakan ikatan yang terwujud kala dua atom saling berdekatan dan membentuk tarikan lemah. Interaksi ini sanggup berlangsung kala jarak 2 atom berdekatan (Ekawasti et al., 2021).

Formasi docking dengan afinitas terbaik antara asam klorogenat dengan reseptor beta adrenergik yang tercantum pada gambar 4.2 memiliki interaksi ikatan hidrogen sebanyak 5 ikatan dan 2 interaksi hidrofobik dan tidak ada interaksi Van der Waals pada 5 residu asam amino yang meliputi Arginin (ARG), Tirosin (TYR), Glisin (GLY), Valin (VAL), Isoleusin (ILE). Ikatan hidrogen terdiri atas 2 tipe yaitu 3 ikatan hidrogen konvensional yang disimbolkan dengan hijau pekat yaitu ARG1357, TYR1367, TYR1367 dan 2 ikatan hidrogen karbon yang disimbolkan dengan warna

hijau pucat yaitu GLY1115 dan VAL1119 dimana ikatan hidrogen konvensional jauh lebih kuat dibandingkan dengan ikatan hidrogen karbon. Interaksi hidrofobik yaitu sebanyak 2 interaksi pada tipe interaksi pi-alkil yang disimbolkan dengan warna ungu pucat yaitu ILE1118 dan VAL1360. Interaksi antara asam klorogenat dan *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) pada gambar 4.3 memiliki interaksi ikatan hidrogen sebanyak 4 ikatan dan 2 interaksi hidrofobik dan tidak ada interaksi Van der Waals pada 3 residu asam amino yang meliputi Tirosin (TYR), Serin (SER), dan Valin (VAL). Ikatan hidrogen terdiri 4 ikatan hidrogen konvensional yang disimbolkan warna hijau pekat yaitu TYR62, SER516, TYR523, TYR523. Interaksi hidrofobik sebanyak 2 interaksi pada tipe interaksi pi-sigma yang disimbolkan dengan warna ungu pekat yaitu 2 residu asam amino VAL51.

Dapat ditentukan bahwa ikatan hidrogen lebih mendominasi interaksi antara asam klorogenat dengan reseptor beta adrenergik dan *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) dibandingkan interaksi hidrofobik. Kuantitas ikatan hidrogen menentukan kekuatan kolaborasi ligan dan reseptor (Daniaty Malau & Fatimah Azzahra, 2019; Ekawasti et al., 2021; Rachmania, 2019; Shofi, 2022). Dengan ini, interaksi dianggap sangat stabil karena mendominasi ikatan hidrogen. Oleh karena itu, ikatan hidrogen yang terbentuk dapat mengungkapkan bahwa ligan asam klorogenat stabil untuk digunakan sebagai inhibitor pada reseptor beta adrenergik dan *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) karena terdapat ikatan hidrogen yang akan meningkatkan kestabilan ikatan. Ikatan hidrogen pada ligan asam klorogenat dengan reseptor beta adrenergik dan *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) dapat menjadi lebih stabil lagi karena pada setiap interaksi ikatan hidrofobik berkontribusi untuk menstabilkan ikatan hidrogen. Stabilitas ligan terhadap reseptor juga dipengaruhi oleh interaksi ikatan hidrofobik, karena kehadiran ikatan ini akan mereduksi interaksi dengan air yang akan menyebabkan kerusakan struktur protein dan hilangnya aktivitas enzim (Daniaty Malau & Fatimah Azzahra, 2019; Koban et al., 2022). Keberadaan interaksi hidrofobik

dan ikatan hidrogen menunjukkan, bahwa interaksi antara ligan dan protein target kuat. Dengan demikian dapat dikonfirmasi secara komputasi, bahwa senyawa asam klorogenat memiliki potensi sebagai antihipertensi.

## 4.2 Hasil Prediksi Toksisitas

Penelitian *molecular docking* ini bertujuan guna perancangan obat dengan menemukan senyawa yang dapat berinteraksi secara efektif terhadap reseptor. Mengembangkan obat harus memenuhi syarat aman dan bisa diterima tubuh yang dapat dihitung menggunakan web pkCSM dan Protox sebagai rujukan awal untuk menunjang keberhasilan proses selanjutnya.

### 4.2.1 Hasil Prediksi Toksisitas pkCSM

Sebelum kandidat obat dilanjutkan ke uji klinis, sifat ADMET-nya harus ditentukan. Suatu senyawa yang aman diserap tubuh ditetapkan dengan sifat fisikokimia berbasis *Lipinski's rule of five* yang menunjukkan bioavailabilitas oral suatu senyawa serta farmakokinetik yang meliputi absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi dan toksisitas. Berikut ini hasil prediksi toksisitas dengan pkCSM berdasarkan sifat fisikokimia dan farmakokinetik.

**Tabel 4. 4** Sifat Fisikokimia Berbasis Lipinski's Rule of Five

Kriteria	Aturan Lipinski	Asam Klorogenat	Keterangan
Massa molekul	<500	354.311	Memenuhi
Lipofilitas (LogP)	<5	-0.6459	Memenuhi
Donor ikatan hidrogen	<5	6	Tidak Memenuhi
Akseptor ikatan hidrogen	<10	8	Memenuhi
Ikatan berotasi	0-15	4	Memenuhi

Sumber: Hasil Pengolahan Data Menggunakan pkCSM



Hasil yang diperoleh melalui analisis *Lipinski Rule of Five* berdasarkan data dari tabel 4.4 dapat diketahui bahwa asam klorogenat layak dikategorikan sebagai molekul obat karena sanggup meraih 4 dari 5 ketentuan perhitungan *Lipinski's Rule of Five*. Asam klorogenat memiliki berat molekul yang kurang dari 500 Da, artinya asam klorogenat tidak membutuhkan waktu yang lama untuk berdifusi menembus membran sel dan mudah untuk diabsorpsi tubuh, karena senyawa yang memiliki berat molekul lebih dari 500 Da tidak mampu dalam berdifusi ke dalam sel (Koban et al., 2022).

Data selanjutnya yaitu jumlah donor-akseptor ikatan hidrogen yang menunjukkan bahwa asam klorogenat memiliki jumlah donor ikatan hidrogen yang tidak memenuhi kriteria lipinski dan akseptor ikatan hidrogen dibawah 10 memenuhi kriteria lipinski. Jumlah donor dan akseptor ikatan hidrogen menjelaskan semakin tinggi kapasitas ikatan hidrogen, maka energi yang dibutuhkannya juga akan semakin tinggi untuk proses absorpsi dapat terjadi (Koban et al., 2022; Shofi, 2022).

Selanjutnya berdasarkan nilai logP asam klorogenat memiliki nilai kurang dari 5 yang berarti memiliki sifat lipofilisitas yang tinggi. Lipofilisitas senyawa memungkinkan prediksi keberadaan senyawa dalam organisme hidup yang menunjukkan jenis transportasi dan akumulasi obat dalam tubuh. Sebelum molekul mencapai target farmakologisnya, lipofilisitas suatu senyawa menunjukkan bahwa strukturnya mirip dengan lingkungan lipofiliknya, probabilitasnya untuk diangkut melintasi membran protein-lipid ke dalam sistem biologis, serta kemampuannya membentuk kompleks antara senyawa dan situs pengikatan reseptor (Morak-Młodawska & Jeleń, 2022). Kisaran rentangan nilai Log P yang memenuhi aturan Lipinski adalah -4 sampai 5. Nilai log P yang terlalu negatif mengakibatkan suatu molekul tidak dapat melewati membran lipid bilayer. Sifat molekul akan semakin hidrofobik jika nilai log P nya juga semakin tinggi. Nilai log P lebih dari 5 dapat menimbulkan efek toksik karena kemampuan kelarutannya dalam air yang rendah, sehingga sulit dikeluarkan dan dapat terakumulasi, mudah berikatan dengan target

hidrofobik dibandingkan target yang dituju, dan sulit melakukan metabolisme (Koban et al., 2022).

Penentuan fleksibilitas dan permeabilitas obat digunakan parameter berupa ikatan yang dapat berotasi. Jumlah ikatan yang dapat berotasi pada asam klorogenat 4 menunjukkan bahwa struktur tersebut lebih cenderung mempunyai jumlah ikatan yang bisa berotasi lebih tinggi yang mengakibatkan molekul obat menjadi struktural yang jauh lebih fleksibel (Shofi, 2022).

**Tabel 4. 5** Hasil Farmakokinetik berbasis ADMET

Kategori Prediksi		Hasil	Kriteria	Keterangan
<b>Absorpsi</b>	Kelarutan dalam air	-2.449	<-6 log mol/L (rendah)	Tinggi
	<b>Permeabilitas CaCO<sub>2</sub></b>	<b>-0.84</b>	<b>&gt;0,90 cm/s (Tinggi)</b>	<b>Rendah</b>
	Penyerapan usus manusia	36.377	30% (Baik)	Baik
	Substrat P-glikoprotein	Ya	Ya	Dapat menembus P-glikoprotein
	Inhibitor P-glikoprotein I	Tidak	Tidak	
	Inhibitor P-glikoprotein II	Tidak	Tidak	
<b>Distribusi</b>	VD <sub>ss</sub> (manusia)	0.581	> 0,45 log L/kg (Tinggi)	Dapat terdistribusi ke jaringan
	Fraksi tidak terikat (manusia)	0.658	> 10% Fu (Cepat)	Dapat mencapai reseptor dengan cepat

	Permeabilitas BBB	-1.407	logBB > 0,3 (Mudah melintasi sawar darah otak) dan logBB < -1 (Tidak terdistribusi ke otak)	Tidak dapat menembus otak
	Permeabilitas CNS	-3.856	logPS > -2 (Sanggup menembus Sistem Saraf Pusat)	
<b>Metabolisme</b>	Substrat CYP2D6	Tidak	Tidak	Tidak memperberat kerja hati
	Substrat CYP3A4	Tidak	Tidak	
	Inhibitor CYP2C19	Tidak	Tidak	
	Inhibitor CYP2C9	Tidak	Tidak	
	Inhibitor CYP2D6	Tidak	Tidak	
	Inhibitor CYP3A4	Tidak	Tidak	
<b>Ekskresi</b>	Total Clearance	0.307	0,030 – 1,219 mL/ menit (baik)	Baik
	Substrat renal OCT2	Tidak	Tidak	Tidak menimbulkan beban ginjal
<b>Toksisitas</b>	Toksisitas AMES	Tidak	Tidak	Tidak bersifat mutagenik
	Dosis toleransi maksimal (manusia)	-0.134	$\leq 0,477$ log mg/kg_bw/day (rendah)	Dosis awal direkomendasi

				rendah $\leq 3$ mg/kg_bb/hari
	Inhibitor hERG I	Tidak	Tidak	Tidak membuat pemanjangan depolarisasi jantung
	Inhibitor hERG II	Tidak	Tidak	
	<i>Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL)</i>	2.982	log mg/kg_bw/day	Memiliki toksisitas kronis pada dosis 960 mg/kg_bb/hari
	Hepatoksisitas	Tidak	Tidak	Tidak bersifat hepatoksisitas
	Sensitivitas Kulit	Tidak	Tidak	Tidak sensitif bagi kulit

Sumber: Hasil Pengolahan Data Menggunakan pkCSM

Berdasarkan tabel 4.5 farmakokinetik asam klorogenat yang mencakup penilaian Adsorpsi, Distribusi, Metabolisme, Ekskresi, dan Toksisitas yang tersedia 25 prediktor dalam pkCSM yang dibagi menjadi 6 prediktor absorpsi, 4 prediktor distribusi, 6 prediktor metabolisme, ekskresi 2 prediktor, dan 7 prediktor toksisitas. Kelarutan dalam air (logS) mencerminkan kelarutan molekul dalam air pada 25°C. Obat yang larut dalam lemak kurang baik diabsorpsi dibandingkan obat yang larut dalam air, terutama jika obat tersebut bersifat enteral (pemberian nutrisi menggunakan selang khusus). Senyawa dengan nilai kelarutan air  $< -6$  menunjukkan kelarutan yang rendah (Abdullah et al., 2021). Asam klorogenat memiliki nilai  $-2.449$  log mol/L yang menunjukkan kelarutan air tinggi. Kelarutan obat akan berkorelasi dengan laju penyerapan obat dan menghasilkan efek terapeutik. Selain itu kelarutan juga

menentukan posisi obat dalam tubuh. Obat dengan kelarutan rendah (lipofilik) akan terikat dengan protein plasma. Sebaliknya, obat dengan kelarutan tinggi (hidrofilik) akan terdistribusi secara bebas (Apsari & Chaerunisa, 2020).

Permeabilitas sel lapis tunggal CaCO<sub>2</sub> (*Human colon adenocarcinoma*) biasanya sering digunakan dalam uji eksperimental *in vitro* untuk mengetahui transportasi obat melalui epitel usus yang berasal dari adenocarcinoma kolon manusia. Senyawa dianggap memiliki permeabilitas Caco-2 yang tinggi jika Papp > 8 x 10<sup>-6</sup> cm/s. Namun pada prediksi menggunakan pkCSM tool permeabilitas akan diterjemahkan kedalam nilai log Papp dengan dinyatakan tinggi bila memiliki nilai >0,90 cm/s (Bucuo & Solidum, 2022). Pada penelitian ini asam klorogenat memiliki nilai -0,84 cm/s yang berarti kemampuan untuk menembus membran sel usus tidak maksimal. Usus sebagai tempat utama penyerapan obat yang diberikan secara oral. Asam klorogenat memiliki nilai absorpsi lebih dari 30%. Bila zat yang diserap melebihi 30%, maka zat tersebut memiliki nilai absorpsi yang baik (Shofi, 2021). Sehingga, sanggup diabsorpsi dengan baik meskipun kemampuan untuk menembus membran sel usus tidak maksimal.

P-glikoprotein (P-gp) merupakan protein yang membentuk membran, berfungsi untuk memompa transmembran efluks. P-gp bertugas sebagai penjaga yang akan menendang racun dan xenobiotk dari sel sehingga dapat menimbulkan kebal (Abdullah et al., 2021). Pada tabel 4.5 asam klorogenat menyatakan akan melewati penyerapan melalui P-glikoprotein dan tidak menghambat P- glikoprotein yang mengakibatkan bioavailabilitas berkurang.

*Volume distribusi at Steady State* (VDSS) merupakan volume yang menyatakan dosis total obat perlu didistribusikan dengan merata agar dapat mempunyai kesamaan konsentrasi dengan plasma darah. Menurut Pires et al. (2015), Volume Distribusi memiliki nilai rendah jika Log VD < -0,15 dan nilai tinggi jika > 0,45 (Abdullah et al., 2021). Hasil pada tabel 4.5 menyatakan nilai yang lebih tinggi dari 0,45 sehingga asam

klorogenat bisa mengalami distribusi merata dengan konsentrasi yang sama seperti dengan plasma darah.

Obat dalam darah ada dalam dua bentuk yaitu terikat dan tidak terikat protein plasma. Fraksi yang tidak terikat dapat menimbulkan efek farmakologis pada tempat kerja saat berikatan dengan reseptor. Fraksi tidak terikat dapat menuju ke jaringan, dapat mengalami biotransformasi untuk metabolisme dan diekskresi, dapat langsung diekskresi. Distribusi fraksi yang tidak terikat berlangsung serentak. Fraksi yang terikat tidak mencegah namun memperpanjang waktu untuk sampai ke reseptor. Bila fraksi tidak terikat  $> 10\%$  maka akan lebih cepat terdistribusi ke reseptor dan lebih cepat mengalami biotransformasi (Apriali et al., 2022). Asam klorogenat memiliki fraksi tidak terikat 65,8% yang berarti asam klorogenat bekerja aktif dan gesit untuk mencapai reseptor dan mengalami biotransformasi.

Otak manusia dilindungi *Blood Brain Barrier* (BBB). Parameter ini penting untuk mengetahui kemampuan obat menembus sawar darah otak. Permeabilitas darah ke otak diukur secara *in vivo* pada model hewan sebagai  $\log BB$ . Pada model prediktif *pkCSM*, nilai BBB tergolong dalam dua kategori yakni nilai  $\log BB > 0,3$  dianggap mudah melintasi sawar darah otak sementara molekul dan nilai  $\log BB < -1$  tidak terdistribusi dengan baik ke otak. Permeabilitas *Central Nervous System* (CNS) yakni kemampuan menembus sistem saraf pusat dapat diukur menggunakan indikator  $\log PS$ . Senyawa dengan  $\log PS > -2$  dianggap menembus Sistem Saraf Pusat (CNS), sedangkan senyawa dengan  $\log PS < -3$  dianggap tidak dapat menembus CNS (Abdullah et al., 2021; Apriali et al., 2022; Nursanti, 2021; Shofi, 2021). Berdasarkan Tabel 3, asam klorogenat tidak sanggup menembus sawar darah otak dan sistem saraf pusat dengan nilai permeabilitas BBB yaitu  $-1.407 \log BB$  dan nilai permeabilitas CNS  $-3.856 \log PS$ , sehingga asam klorogenat tidak menyebabkan toksisitas pada otak.

Sitokrom P450 (CYP) ialah enzim yang penting dalam tubuh dan terdapat di hati. Sitokrom P450 mengoksidasi untuk merubah senyawa obat yang menjadi

nonaktif. Sitokrom memiliki beberapa model isoform yakni terdiri dari beberapa senyawa substrat CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, dan CYP3A4. Senyawa yang menjadi substrat menunjukkan bahwa senyawa tersebut dapat dimetabolisme oleh CYP450, sedangkan senyawa yang dapat menjadi inhibitor dapat menekan aktivitas metabolismenya (Fadlan et al., 2021; Shofi, 2021). Asam klorogenat tidak bertindak sebagai substrat maupun inhibitor isoform CYP450 sehingga tidak mempengaruhi metabolisme dan tidak menimbulkan hepatoksik.

*Total clearance* (CLTOT) merupakan gambaran eliminasi obat dari volume cairan plasma dengan mekanisme dari *renal clearance* (ekskresi melalui ginjal) atau *hepatic clearance* (metabolisme di hati dan empedu) maupun kombinasi keduanya. Satuan *clearance* adalah volume/ waktu. *Clearance* total dikatakan baik pada rentang 0,030 – 1,219 mL/ menit (P. R. Pratama et al., 2022). *Clearance* asam klorogenat 0,307 mL/menit yang masuk kategori baik. Asam klorogenat yang memiliki volume distribusi 0.581 L dengan *Clearance* 0,307 mL/menit, akan habis dalam waktu  $\pm 31$  jam.

Asam klorogenat tidak bertindak sebagai substrat renal OCT2 yang bertanggungjawab atas transportasi obat dalam *renal clearance*, sehingga asam klorogenat tidak berpotensi menimbulkan gagal ginjal yang dapat mengganggu produksi renin yang mengganggu mekanisme *Renin-Angiotensin-Aldosteron System* (RAAS) yang menimbulkan hipertensi karena tidak menambah beban ginjal dengan mendorong renal OCT2 (Abdullah et al., 2021; P. R. Pratama et al., 2022).

AMES toxicity digunakan untuk menilai senyawa yang berpotensi mutagenik dengan menggunakan bakteri (Nursanti, 2021; Shofi, 2021). Hasil toksisitas AMES negatif pada asam klorogenat menunjukkan bahwa senyawa tersebut tidak bersifat mutagenik. Dosis maksimum yang dapat ditoleransi (MRTD) memberikan perkiraan ambang batas dosis racun bahan kimia pada manusia. Hal ini membantu memandu dosis awal maksimum yang direkomendasikan berdasarkan ekstrapolasi dari data

hewan (Bucao & Solidum, 2022). Hasil MRTD kurang dari atau sama dengan 0,477 log mg/kg/hari (3mg/kg/day) dianggap rendah. Toleransi dosis awal maksimum asam klorogenat rendah karena menunjukkan hasil -0,134 log mg/kg/hari sehingga tidak menimbulkan overdosis.

HERG (*Human ether a-go-go gen*) adalah saluran kalium yang sangat penting untuk aktivitas listrik di jantung. HERG I bekerja di jantung dan hERG II bekerja di sistem saraf pada jantung. Inhibitor hERG akan menyebabkan kalium menetap saat natrium masuk sehingga menimbulkan sindrom pemanjangan QT (durasi depolarisasi dan repolarisasi jantung) yang dapat menyebabkan pemberhentian kerja jantung mendadak atau kardi toksisitas (Bucao & Solidum, 2022). Asam klorogenat tidak bertindak sebagai inhibitor HERG I dan II sehingga tidak menimbulkan kardi toksisitas.

*Hepatotoxicity* adalah reaksi yang disebabkan oleh akumulasi sifat obat yang berbahaya di dalam hati. Analisis *skin sensitisation* yang merupakan kepekaan kulit terhadap bahan kimia yang dapat menimbulkan respon alergi (Bucao & Solidum, 2022). Asam klorogenat tidak bersifat hepatoksisitas. Hati berperan krusial dalam proses metabolisme, pencernaan, sekresi, pembentukan sel darah merah, dan melakukan detoksifikasi terhadap zat berbahaya. Hepatoksiksisitas dapat mengakibatkan penurunan kemampuan hati. Asam klorogenat tidak menimbulkan sensitif terhadap kulit sehingga tidak menimbulkan gatal dan perih pada kulit saat dikonsumsi.

*Oral Rat Chronic Toxicity* (LOAEL) adalah pengujian toksisitas kronis tikus oral memberikan informasi tentang kemungkinan efek samping yang tidak menyenangkan yang timbul dari paparan berulang terhadap suatu senyawa dalam jangka waktu yang lama. Ini mengidentifikasi dosis terendah dari suatu senyawa yang menghasilkan efek merugikan yang teramati (Bucao & Solidum, 2022). Asam klorogenat memiliki toksisitas kronis pada dosis 2,982 log mg/kg\_bw/day.



#### 4.2.2 Hasil Prediksi Toksisitas ProTox

**Tabel 4. 6** Hasil Prediksi Toksisitas Menggunakan ProTox II

<b>Kelas Toksisitas</b>	5
<b>LD50 mg/Kg</b>	5000
<i>Average similarity</i>	71.21%
<i>Prediction accuracy</i>	69.26%
<b>Karsinogenisitas</b>	Tidak
<b>Immunotoksisitas</b>	Ya
<b>Mutagenisitas</b>	Tidak
<b>Sitotoksisitas</b>	Tidak
<b>Hepatoksisitas</b>	Tidak

Sumber: Hasil Pengolahan Data Menggunakan ProTox II

Berdasarkan tabel 4.7 menunjukkan hasil prediksi toksisitas menggunakan ProTox II *Web Server*, asam klorogenat berada pada kelas toksisitas 5 yang mengindikasikan toksisitas rendah berdasarkan nilai *Lethal Dose 50* (LD50). *Lethal Dose 50* (LD50) didefinisikan sebagai dosis tunggal atau dosis berulang dalam jangka waktu 24 jam yang dapat menyebabkan kematian sebanyak 50% dari jumlah hewan uji (Arulanandam et al., 2022).

*Average Similarity* and *Prediction Accuracy* adalah pencarian kesamaan, kemiripan dan keakuratan dari struktur input yang dibangun dan dibandingkan dengan model dari basis data dengan menggunakan tampilan 2D. Indeks kesamaan dan kemiripan didefinisikan sebagai struktur molekul yang dibandingkan dengan ribuan struktur yang kemiripannya sama dalam *database ProTox II Web Server* (Nursanti et al., 2022). Asam klorogenat menunjukkan nilai baik dengan *Average Similarity* 71,21% dan *Prediction Accuracy* 69,26%. Asam klorogenat tidak bersifat karsinogenisitas berarti asam klorogenat tidak dapat merangsang tumor tumbuh tanpa

terkoordinasi dengan sel-sel tubuh lain. Asam klorogenat tidak menyebabkan mutagenisitas yang dapat mengakibatkan mutasi genetik sel yang abnormal dan memicu kemunculan kanker. Asam klorogenat tidak menyebabkan kerusakan sel yang tidak diinginkan yang dikenal dengan sitotoksisitas. Kerusakan sel yang terus menerus akan mengakibatkan peradangan dan kematian sel yang mempercepat penyakit degeneratif seperti penyakit kardiovaskular, neoplastik dan kemuduran sistem saraf. Namun, asam klorogenat dapat menimbulkan efek merugikan pada sistem kekebalan tubuh yang disebut imunotoksisitas. Penurunan imun mengakibatkan peningkatan infeksi. Sehingga asam klorogenat dinilai memiliki toksisitas rendah pada sel dan organ manusia sehingga aman dikonsumsi manusia.

#### **4.3 Implikasi dalam Pendidikan**

Saat ini perlu ada upaya memupuk budaya keingintahuan yang mampu mewujudkan pembelajaran yang dapat membenteng wawasan siswa terkait kemajuan ilmu pengetahuan khususnya di bidang biologi. Salah satu topik dalam bidang biologi yang perlu digali lebih dalam oleh peserta didik adalah bioteknologi karena kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi saat ini telah dikuasai oleh berkembangnya ilmu bioteknologi. Bioteknologi merupakan ilmu kajian yang memadukan perkembangan ilmu biologi dan teknologi dengan fokus pada beragam aplikasi teknik yang memakai organisme untuk menciptakan dan mengembangkan manfaat yang bersinggungan dengan manusia dengan menghasilkan atau memodifikasi produk atau proses guna meraih produk yang lebih baik dalam aspek kualitas maupun kuantitas dalam durasi produksi yang singkat (Prasetya, 2021). Bioteknologi berkembang dengan sangat cepat sebagai tanggapan atas tuntutan peningkatan kebutuhan hidup manusia. Mayoritas penduduk dunia menumpu harapan bahwa bioteknologi sanggup menanggulangi beragam permasalahan manusia. Bioteknologi mendapat perhatian yang dikembangkan secara intensif oleh pemerintah negara maju untuk memenuhi kebutuhan manusia maupun untuk produksi industri. Amin (dalam (A. P. P. Sari et al.,

2017) menekankan bahwa kajian terhadap bioteknologi sebagai salah satu jembatan yang dapat digunakan untuk melekatkan IPTEK sehingga meningkatkan kemampuan peserta didik untuk beradaptasi dengan perubahan dunia teknologi.

Menghasilkan lulusan dengan kemampuan literasi yang mencakup literasi data, literasi teknologi, dan literasi manusia (humanisasi) menjadi tantangan pengembangan kurikulum pendidikan di era revolusi industri 4.0 dan society 5.0. Literasi data yaitu kemampuan pemahaman menganalisis menggunakan data dan informasi di dunia digital. Literasi teknologi yaitu kemampuan memahami operasi mesin dan aplikasi teknologi. Literasi manusia adalah kemampuan merancang pengetahuan demi kemaslahatan bersama dalam lokal, nasional, maupun global. Teknologi pembelajaran mesin dan *Artificial Intelligence* (AI) merupakan fondasi dari proses pembelajaran, yang dapat meningkatkan sistem manajemen secara otomatis dan terintegrasi (Widodo, 2019).

Langkah untuk menjawab tantangan abad ke-21 dan persaingan global adalah membekali kemampuan teknologi yang harus dimiliki peserta didik. Hal ini selaras dengan kurikulum merdeka yang dipakai saat ini di Indonesia. Capaian pembelajaran peserta didik pada fase E yang umumnya kelas X SMA/MA/Program Paket C yaitu memiliki kemampuan responsif yang meliputi mengamati, mempertanyakan dan memprediksi, merencanakan dan melakukan penelitian, memproses dan menganalisis data dan informasi, mengevaluasi dan merefleksi serta mengkomunikasikan dalam bentuk proyek sederhana atau simulasi visual menggunakan aplikasi teknologi sehingga berkontribusi aktif dalam penyelesaian masalah global. Untuk pembelajaran penerapan bioteknologi biasanya berkaitan dengan bioteknologi konvensional, dapat dilakukan dengan praktek, misalnya membuat yoghurt, tempe, tape, dan makanan atau minuman fermentasi lainnya. Namun, hampir tidak mungkin untuk mengajarkan siswa sekolah menengah atas tentang bioteknologi modern, seperti rekayasa genetika, kultur jaringan, organisme transgenik, dan lain-lain, melalui kegiatan praktikum karena

alasan yang masuk akal seperti aksesibilitas alat dan bahan serta resiko proses. Oleh karena itu, diskusi atau presentasi semakin sering digunakan untuk mengajarkan konsep-konsep bioteknologi saat ini (Widyaningsih, 2018).

Namun, sering kali dijumpai hanya guru dan peserta didik tertentu yang mendominasi diskusi informasi dan kegiatan pembelajaran berbasis presentasi, yang mengakibatkan pembelajaran menjadi monoton dan siswa menjadi bosan karena peserta didik cenderung enggan berdiskusi dengan teman sebaya untuk menemukan solusi. Guru yang terlalu dominan di kelas akan menimbulkan guru tertutup dalam menerima masukan dan pendapat siswa yang menimbulkan peserta didik malas bahkan takut untuk bertanya dan mengemukakan pendapatnya. Hal ini karena rendahnya minat baca dan tidak mengetahui banyak hal dari sumber lain. Peserta didik juga tidak mampu memahami apa yang mereka baca, sehingga tidak tahu banyak tentang materi pelajaran yang sedang dibahas. Pada akhirnya, semua masalah ini bermuara pada hasil belajar siswa yang buruk dan kegagalan untuk mencapai tujuan pembelajaran (Widyaningsih, 2018). Penulis menyadari perlunya tindakan untuk mengatasi kesulitan peserta didik dalam mengeksplorasi penerapan bioteknologi yaitu melalui sajian materi bioinformatika yang memberikan gairah kepada peserta didik agar terlibat dalam proses pembelajaran. Diharapkan dengan adanya bioinformatika dapat menjadi salah satu alternatif yang dapat mengatasi permasalahan siswa dalam pembelajaran bioteknologi dalam mata pelajaran biologi.

Bioinformatika merupakan teknologi informasi untuk mengekstraksi BigData organisme yang memainkan bagian krusial dalam perkembangan Revolusi Industri 4.0 dibidang kesehatan, pangan dan bioteknologi. Bioinformatika umumnya dikenal sebagai sebuah aplikasi atau algoritma yang menguraikan data biologis yang pelik dan fenomena yang ada di alam menjadi informasi biologis melalui simulasi data yang telah ada yang dibuat secara artifisial agar mudah dipahami (Mahrus et al., 2021). Data biologis yang bioinformatika analisis mencakup DNA, RNA dan protein memadukan

berbagai teknologi informasi yang akan mempercepat kalkulasi dan klasifikasi data gen dalam jumlah besar dengan untuk di interpretasi (William J. Thieman & Palladino dalam Nurfadillah et al., 2023). Implementasi bioinformatika memakai *software*, *online database*, dan koneksi internet sebagai sumber daya utama yang menunjang peranan Bioinformatika. *Software* atau perangkat lunak komputer ialah program komputer yang menerima dan menjalankan menjalankan instruksi yang diberikan untuk mengubah data biologis menjadi informasi yang bermakna. *Database* atau basis data ialah sekumpulan data-data yang disimpan dalam media digital sebagai sumber informasi untuk memudahkan dalam mengakses dan menggunakan informasi tersebut (Mahrus et al., 2021; Nurfadillah et al., 2023).

Bioinformatika pada penerapannya digunakan secara meluas pada sektor kesehatan dan pertanian. Peserta didik diuntungkan dengan kehadiran program Bioinformatika dalam menganalisis dan menafsirkan data biologis. Penggunaan Bioinformatika dalam sektor kesehatan yaitu menyediakan informasi klinis, identifikasi mutasi gen penyebab penyakit, terapi gen, *desain* molekul kandidat obat baru dan pengobatan individual sesuai profil genetik. Merancang kandidat obat dengan bantuan komputasi dapat memeriksa aspek yang tidak dapat diakses oleh penelitian skala laboratorium, seperti asam amino yang terlibat dalam reaksi enzimatik, panjang dan jenis ikatan molekul obat, serta pelipatan rantai enzim atau protein (Nurfadillah et al., 2023).

Obat ditemukan dengan menemukan zat atau senyawa yang dapat menekan pertumbuhan agen penyebab penyakit melalui hasil dari kesempatan, observasi, dan proses kimia yang ekstensif dan lambat dengan proses uji dan gagal (*trial-error process*). Diawali dengan menganalisis struktur dan fungsi enzim dengan cara mengganti asam amino tertentu dan menguji efeknya. Langkah selanjutnya menemukan zat atau senyawa yang berpeluang menghambat kerja enzim-enzim tersebut. Analisis penggantian asam amino ini dahulu dilaksanakan secara acak yang

menghabiskan waktu yang lama. Saat ini struktur 3D yang berisikan asam amino beserta sisi aktif yang dapat mengukur jenis senyawa apa yang dapat berinteraksi dengan protein yang sudah dianalisis bebas dapat ditelusuri di Protein Data Bank (PDB) <http://www.rcsb.org/pdb/> serta senyawa yang akan disintesis sebagai penekan kerja enzim dapat diakses melalui PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) oleh siapapun, kapanpun dan dimanapun berkat Bioinformatika. Alhasil, senyawa yang diharapkan berinteraksi dapat mudah ditemukan, sehingga obat untuk suatu penyakit akan jauh lebih cepat ditemukan. Cara ini dinamakan *docking* dan telah meluas untuk digunakan oleh perusahaan farmasi dalam penemuan obat baru. Bahkan bioinformatika hadir untuk memaparkan informasi adsorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi dan toksisitas suatu senyawa dalam tubuh manusia dengan mengidentifikasi karakteristik profil respons dan hubungan genomik pasien tertentu (Aprijani & Elfaizi, 2004). Disiplin ilmu ini juga dapat digunakan untuk menentukan dosis yang manjur. Hebatnya bioinformatika mengupayakan untuk memulihkan pandangan terhadap tanaman yang sebelumnya dikira tidak efektif, namun ternyata diketahui manjur pada sekelompok pasien tertentu. Meskipun dengan Bioinformatika ini dapat meramalkan senyawa yang berinteraksi dan menekan fungsi suatu enzim, namun temuannya harus diverifikasi melalui eksperimen di laboratorium. Akan tetapi dengan Bioinformatika, semua prosedur ini bisa dilakukan lebih cepat sehingga lebih efisien baik dari segi waktu maupun finansial (Banerjee et al., 2018; Rim, 2020; Wahyudi & Utomo, 2022).

Pembelajaran bioinformatika akan melatih mengenalkan literasi BigData maupun mengolah data yang terintegrasi dan otomatisasi analisisnya yang sejalan dengan kebutuhan kompetensi di era revolusi industri 4.0. Ketersediaan *database* fundamental yang terbuka bebas dan gratis menawarkan peluang besar untuk mengeksplorasi informasi biologis. Telah disepakati bahwa setiap kalangan dapat mengakses *database* genom manusia sehingga kandidat gen yang berpotensi berguna secara medis dapat diselidiki dan dipelajari. Penggunaan bioinformatika sanggup

merencanakan dan mengotomatiskan secara cerdas proses sintesis kimiawi yang terkait dari pengobatan dengan prospek yang sangat menarik. Dalam beberapa dekade berikutnya, bioinformatika memiliki potensi yang luar biasa untuk merevolusi biologi (Nurfadillah et al., 2023). Sehingga literasi tentang Bioinformatika ini menjadi esensial dalam dunia pendidikan. Di Indonesia, Bioinformatika masih belum dikenal oleh guru dan peserta didik menengah atas karena kurangnya budaya dan perhatian penggunaan komputer sebagai alat bantu mengajar.

Saat ini, media pembelajaran sebagai salah satu alat bantu pembelajaran perlahan namun pasti telah tersentuh dampak perkembangan teknologi. Kemajuan teknologi informasi yang sangat pesat membuat beberapa sumber kini dapat dengan mudah mengakses dan menganalisis informasi. Perlu dicatat bahwa peserta didik sekarang ini lebih terampil Informasi dan Teknologi dibandingkan guru-gurunya, terutama internet, jaringan, dan aplikasi komputer atau *software*. Dunia pendidikan, khususnya guru sebagai fasilitator yang tidak dapat mengoptimalkan teknologi informasi dalam pembelajaran akan tertinggal seiring berkembangnya fenomena ini. Oleh karena itu, sudah seyakinya guru dan siswa memanfaatkan *software* yang mendukung proses pembelajaran khususnya mata pelajaran biologi (Mahrus et al., 2021). Guru cenderung masih menggunakan buku dan belum pernah menggunakan aplikasi atau *software* biologi dalam proses pembelajaran karena guru-guru biologi belum terbiasa atau bahkan belum mengetahui keberadaan *software* biologi yang mendukung proses pembelajaran. Basis data bioinformatika yang terkoneksi internet mempermudah guru dan peserta didik memperoleh data biologis sebagai bahan analisis. Selain itu, siswa memiliki akses yang mudah ke program aplikasi bioinformatika berkat distribusi internet. Metode ini unggul karena biaya menjadi terjangkau dan dapat menjadi pendahuluan penelitian sebelum percobaan eksperimen. Karena dapat memberikan perspektif baru dalam mencapai perspektif global yang mendukung perkembangan bioteknologi di masa depan, bioinformatika perlu diajarkan

kepada peserta didik menengah atas sebagai keterampilan yang diperlukan untuk memanfaatkan teknologi informasi (TI) dalam pengajaran biologi. Kebutuhan akan materi yang aplikatif dan dapat dipelajari secara mandiri mengharuskan dibuatnya bahan ajar bioteknologi berbasis bioinformatika (Astriani & Angraini, 2019; Dewi Pratiwi et al., 2018; A. P. P. Sari et al., 2017). Sehingga bahan ajar berbasis bioinformatika juga diperlukan karena peserta didik saat ini telah memasuki era penggunaan perangkat digital.

Bioinformatika dapat dituangkan dalam bentuk modul ajar yang disusun penulis dengan judul “Modul Penuntun Praktikum Bioteknologi : *Molecular docking* dan Prediksi Tosisitas”. Dengan adanya modul ini, selain menambah wawasan tentang apa itu bioinformatika, *database* dan pemanfaatan bioinformatika dalam aspek medis, peserta didik juga diharapkan mampu menelusuri ide-ide pengembangan terkait bioinformatika di masa depan. Karna sebagaimana kita sadari bahwa semakin hari, internet semakin berkembang dan perkembangan internet mendukung kemajuan data-data biologis yang menyokong penelitian dalam bidang bioinformatika.

Modul ajar yang akan dikembangkan akan berisi kajian tentang bioteknologi yang mengintegrasikan topik bioinformatika tentang pengembangan kandidat obat dari bahan alami dengan teknik *molecular docking* dan prediksi toksisitas. Pemilihan materi pengembangan kandidat obat dari bahan alami berlandaskan masyarakat saat ini telah berupaya kembali pada bahan alam dalam mengobati penyakit atau gangguan kesehatan. Materi ini dipilih sesuai hasil analisis kebutuhan dan proses pemahaman materi dirasa sederhana karena dapat dilakukan secara mandiri tanpa penelitian di laboratorium. Modul ini menggunakan bahasa Indonesia yang baik dan benar dengan penyampaian yang mudah dipahami.

#### **4.4. Kelebihan dan Kekurangan Penelitian**

Penelitian ini dimaksudkan untuk memanfaatkan fitur *online* untuk merancang obat dengan aktivitas senyawa alami yang berasal dari tumbuhan secara cepat namun



memiliki akurasi yang baik. Sebelum pengujian dan sintesis skala laboratorium, penelitian ini dapat mengidentifikasi aktivitas kandidat obat. Hal ini guna mengecilkan peluang senyawa kandidat obat tidak menunjukkan reaksi yang ditargetkan. Langkah yang sangat membantu dalam penemuan obat berbasis struktur dan desain adalah *molecular docking*. Perpaduan uji aktivitas dan prosedur sintesis menjadi rumit dan menyita waktu yang lama sampai pada pemanfaatan obat namun senyawa tersebut tidak memiliki aktivitas seperti yang diharapkan dapat diatasi dengan penelitian ini. Kemampuan komputer yang semakin cepat dan mudah digunakan, diiringi dengan kecanggihan pemodelan matematis, telah memperkenankan untuk mendapatkan sifat-sifat spesifik senyawa obat. Dalam desain molekul obat, *in silico* diterapkan guna mempermudah dengan penggunaan algoritma bahasa pemrograman tertentu untuk menghitung sifat-sifat molekul yang kompleks. Dengan bantuan komputasi, desain molekul obat juga dapat mengkaji hal-hal yang tidak dapat dijangkau di laboratorium, seperti asam amino yang terlibat dalam reaksi enzimatik, kondisi struktural protein dan enzim, serta panjang dan jenis ikatan kimia yang terlibat dalam reaksi dalam desain molekul obat. Interaksi kandidat obat dengan reseptor sel dapat ditelusuri dengan simulasi *docking* (Aprijani & Elfaizi, 2004; Nurfadillah et al., 2023).

Kandidat molekul obat yang dipilih tidak menjadikan disetujui untuk disintesis di laboratorium. Sifat toksisitas yang diprediksi dari kandidat molekul obat yang dipilih perlu diperiksa agar aman saat dikonsumsi manusia. Analisis dilanjutkan dengan perhitungan persamaan struktural suatu senyawa untuk meninjau kombinasi antara karakteristik fisikokimia dengan profil farmakokinetik kandidat molekul obat dengan bantuan komputer agar penyediaan alat lebih cepat, lebih ekonomis dan bebas hewan. Hal ini menandakan bahwa ketika memilih kandidat obat selain hasil dari simulasi *docking*, sifat toksisitas molekul obat juga harus dianalisis karena pada uji klinis fisikokimia dan farmakokinetik kerap menjadi faktor kegagalan dalam penemuan obat (Rim, 2020; Yasin et al., 2020).

Penelitian ini juga mampu melunturkan persepsi negatif dan meluruskan pengetahuan bahwa kopi robusta yang dicap kurang aman karena memiliki kafein yang paling tinggi dan dapat dibeli dengan harga yang lebih ekonomis terbukti tidak memiliki efek jahat terhadap tekanan darah. Hal ini dapat dipengaruhi oleh kandungan polifenol utama pada kopi yaitu asam klorogenat yang memiliki kandungan lebih banyak dari kafein yang dapat menangkal dampak negatif kafein terhadap tekanan darah dan efek buruk kafein dalam meningkatkan tekanan darah adalah tiga jam setelah mengonsumsi kafein, lalu akan kembali ke awal semula setelah tiga jam. Penelitian ini juga menginformasikan konsumsi kopi yang baik dibatasi 1-3 cangkir kopi tanpa dituntun dengan bahan kimia yang berbahaya bagi tubuh seperti rokok, alkohol, dan konsumsi garam berlebihan (Geleijnse, 2022; Hou et al., 2021; Kujawska et al., 2021; Surma & Oparil, 2021).

Terkait dengan pendidikan, penelitian ini menyertakan modul ajar dengan judul “Modul Penuntun Praktikum Bioteknologi : *Molecular docking* dan Prediksi Tosisitas” dapat menjadi strategi dan media pembelajaran baru untuk mengenalkan bioteknologi modern kepada peserta didik jenjang menengah atas dengan pembelajaran yang lebih segar dan mengaplikasikan teknologi yang sesuai tuntutan kurikulum merdeka yang kini dipakai di Indonesia. Penelitian ini dapat membantu meningkatkan kemampuan komputasi peserta didik dan meningkatkan kompetensi guru yang berguna untuk menciptakan sumber daya manusia yang tanggap dan bermutu yang sanggup bersaing di dunia dengan maraknya perkembangan digital.

Penulis mengakui kelemahan penelitian ini yaitu hanya memakai asam klorogenat sebagai polifenol utama dan tidak meninjau kandungan lain pada kopi robusta. Hasil ini merupakan prediksi aktivitas terkomputerisasi dari pemodelan molekuler yang perlu dilakukan uji lanjut yaitu uji *in vitro* dan *in vivo* untuk verifikasi aktivitas asam klorogenat dalam kopi robusta sebagai antihipertensi. Pengujian *in vitro* dapat dilakukan dengan absorbansi menggunakan spektrofotometri sinar-uv (Garmana

et al., 2017). Pengujian *in vivo* dapat dilakukan menggunakan tikus wistar jantan 6 ekor yang dibuat menjadi 3 kelompok. Kelompok 1 diinduksi dengan ketamin dan epinefrin (membuat tikus hipertensi dalam keadaan teranastesi sehingga memudahkan pengukuran tekanan darah) Kelompok 2 diinduksi dengan ketamin, epinefrin, dan kopi robusta, Kelompok 3 diinduksi dengan ketamin, epinefrin, dan katopril. Setelah diinduksi tekanan darah diukur dengan metode *tail cuff* menggunakan alat *Blood Pressure Recorded* (Irianto et al., 2021). Hasil *molecular docking* belum dinamis dengan suhu dan waktu tertentu karena hanya ligan yang fleksibel dan reseptor dibuat rigid (Nadhira Zakiyah, 2021). Akibatnya tidak dapat mengevaluasi stabilitas konformasi ikatan asam klorogenat dengan reseptor beta adrenergik dan *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) sehingga perlu penelitian simulasi dinamika molekuler.