

BAB I PENDAHULUAN

I.1 Latar belakang

Amiloidosis adalah kondisi langka yang disebabkan oleh penumpukan protein abnormal yang disebut amiloid di dalam berbagai jaringan tubuh, yang dapat menyebabkan kerusakan organ dan fungsi tubuh yang signifikan (Merlini and Bellotti 2003). Penumpukan protein amiloid yang abnormal terjadi karena protein tersebut kehilangan kemampuan untuk melipat secara normal atau *misfolding*, protein abnormal ini berinteraksi dengan protein normal dan membentuk agregat yang lebih besar atau biasa disebut agregasi protein (Starowicz 2019). Fenomena agregasi protein ini telah menjadi pusat perhatian dalam studi penyakit degeneratif karena merupakan ciri patologis utama pada berbagai penyakit berat, termasuk Alzheimer, Parkinson, diabetes tipe II, dan Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). Proses ini tidak hanya memicu disfungsi seluler, tetapi juga merangsang respons peradangan dan kerusakan jaringan yang berkelanjutan (Selkoe & Hardy, 2016).

Agregasi protein merupakan fenomena biologis penting yang terjadi ketika protein kehilangan stabilitas strukturalnya dan mengalami misfolding, sehingga bagian hidrofobik yang seharusnya tersembunyi menjadi terekspos dan memicu interaksi antarprotein. Kondisi ini dapat dipicu oleh berbagai bentuk stres seluler, seperti peningkatan suhu, perubahan pH, atau stres oksidatif, yang menyebabkan protein terdenaturasi dan gagal mempertahankan konformasi alaminya. Agregasi dapat menghasilkan dua bentuk utama, yaitu agregat amorf yang bersifat tidak teratur dan terbentuk cepat serta agregat amiloid yang memiliki struktur fibrilar β -sheet yang sangat terorganisasi. Kedua jenis agregat ini memiliki implikasi biologis

signifikan, terutama karena toksisitasnya dapat mengganggu fungsi sel dan menjadi dasar patogenesis berbagai penyakit degeneratif. Lebih dari 35 penyakit manusia, termasuk Alzheimer, Parkinson, dan diabetes tipe II, telah dikaitkan dengan proses misfolding dan pembentukan fibril amiloid, sehingga memahami mekanisme agregasi protein menjadi krusial dalam pengembangan strategi pencegahan dan terapi. Dengan demikian, penelitian mengenai dinamika agregasi serta upaya menghambat pembentukannya, baik melalui agen bioaktif maupun melalui pendekatan kimia dan biologis lainnya, memiliki urgensi tinggi dalam konteks biomedis dan industri farmasi.

Upaya pencegahan agregasi protein menjadi penting dalam pengembangan terapi penyakit degeneratif (Lozupone et al. 2020). Senyawa yang dapat menghambat terjadinya agregasi protein disebut senyawa anti agregasi (Henr et al. 2020). Salah satu obat sintetik yang sudah terbukti dalam pencegahan anti-agregasi adalah dari senyawa *latrepirdine* atau dimebon (Bharadwaj et al. 2013). *Latrepirdine* sebagai senyawa dengan sifat hidrofobik, mampu menutup celah hidrofobik pada terjadinya amiloid beta agregasi (Porter et al. 2016). Meskipun efektif, penggunaan obat sintesis sering kali menimbulkan efek samping dan keterbatasan bioavailabilitas, sehingga mendorong eksplorasi alternatif alami yang lebih aman dan berkelanjutan.

Senyawa alternatif dari bahan alam yang sudah terbukti sebagai agen anti-agregasi adalah dari golongan flavonoid, salah satunya adalah quercetin yang sudah terbukti dalam menghambat pembentukan fibril amyloid (Yu and Lee 2020). Selain itu quercetin juga telah diuji pada model agregasi bovine serum albumin

(BSA) yang diinduksi dithiothreitol (DTT), yaitu kondisi yang memicu agregasi melalui reduksi ikatan disulfida protein (Rifai, dkk 2020). Pada model DTT-induced aggregation, quercetin menunjukkan aktivitas anti-agregasi yang tinggi pada tahap awal inkubasi, namun efektivitasnya menurun pada waktu inkubasi yang lebih panjang, menunjukkan mekanisme yang bersifat temporal dan bergantung pada stabilitas interaksi quercetin protein. Temuan ini sejalan dengan laporan dari Precupas dkk (2016) bahwa interaksi quercetin dengan BSA bersifat dualistik, yaitu mampu menstabilkan struktur protein pada kondisi tertentu, tetapi pada kondisi stres seperti pemanasan atau inkubasi berkepanjangan justru dapat memicu perubahan konformasi yang mempercepat unfolding dan denaturasi. Hal ini mengindikasikan bahwa meskipun quercetin memiliki aktivitas anti-agregasi, efektivitasnya tidak selalu optimal pada kondisi stres termal maupun kimia. Oleh karena itu, diperlukan eksplorasi senyawa alternatif dengan mekanisme yang lebih stabil terhadap berbagai induktor agregasi, seperti senyawa triterpenoid yang bersifat lebih hidrofobik diduga mampu berinteraksi langsung dengan daerah hidrofobik protein, sehingga memberikan efek anti-agregasi yang lebih konsisten.

Senyawa alami seperti limonoid, yang merupakan turunan triterpenoid khas famili *Meliaceae*, telah dilaporkan memiliki kemampuan menghambat agregasi protein (Gorantla, Das, Chidam, et al. 2020). Biji mahoni (*Swietenia macrophylla*), salah satu anggota famili *Meliaceae*, mengandung berbagai metabolit sekunder seperti triterpenoid, flavonoid, dan fenolik. Biji ini telah digunakan secara tradisional sebagai antioksidan, antidiabetes, antikanker, antimikroba, dan antiinflamasi (Telrandhe et al. 2022). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa

senyawa utama dalam biji mahoni terdiri atas limonoid, ester asam lemak, steroid, dan kumarin, dengan beberapa senyawa seperti Khayasin T, Swietenine B, Swietenine C, Swietenine E, dan 3-O-tigloylswietenolide yang diekstrak menggunakan pelarut etil asetat menunjukkan aktivitas antiinflamasi (Supriady et al. 2015) mendapatkan senyawa seperti Khayasin T, Swietenine B, Swietenine C, Swietenine E, 3-O-tigloylswietenolide. Meskipun demikian, tidak seluruh senyawa bioaktif dalam biji mahoni dapat diekstraksi secara optimal dengan metode konvensional, sehingga diperlukan pendekatan alternatif yang lebih efektif.

Salah satu pendekatan yang menjanjikan adalah dengan biotransformasi dengan mikroorganisme. fermentasi menggunakan *Aspergillus niger* telah dilaporkan sebagai pendekatan bioteknologi yang efektif untuk meningkatkan bioaktivitas melalui mekanisme biotransformasi enzimatik (Feitosa dkk, 2020). Kapang ini menghasilkan berbagai enzim ekstraseluler, termasuk β -glukosidase, esterase, serta enzim pendegradasi dinding sel seperti selulase, hemiselulase, dan pektinase, yang mampu merombak matriks dinding sel tanaman (Schuster dkk, 2002). Aktivitas enzimatik tersebut menyebabkan pelepasan senyawa bioaktif yang sebelumnya terperangkap dalam struktur sel, sehingga meningkatkan kandungan dan ketersediaan hayati metabolit sekunder. Selain itu, proses hidrolisis ikatan glikosida dan modifikasi gugus fungsional selama fermentasi dapat menghasilkan bentuk aglikon atau metabolit turunan dengan bioavailabilitas dan bioaktivitas yang lebih tinggi.

Penelitian yang dilakukan oleh Bayu dan Fayiz tahun 2023 melaporkan bahwa ekstrak metanol hasil biotransformasi biji mahoni menggunakan *Aspergillus*

niger pada fase logaritmik puncak mampu meningkatkan bioavailabilitas total triterpenoid lebih 400% dibandingkan total flavonoid dan fenolik. Peningkatan bioavailabilitas ini berkorelasi positif dengan peningkatan bioaktivitas anti-agregasinya setelah di fermentasi, sehingga diduga bahwa peningkatan triterpenoid berperan terhadap aktivitas anti-agregasinya, namun penelitian tersebut masih terbatas pada ekstrak kasar dengan pelarut metanol.

Beberapa penelitian melaporkan bahwa fraksi etil asetat merupakan pelarut yang paling aktif dalam mengekstraksi senyawa bioaktif dari biji mahoni. Penelitian Tohir dkk (2020) menunjukkan bahwa fraksi etil asetat biji mahoni memiliki aktivitas antikanker paling tinggi dibandingkan fraksi lainnya. Penelitian yang dilaporkan oleh (Masdar et al. 2022) juga melaporkan bahwa persen *yield* ekstrak etil asetat lebih besar dibandingkan ekstrak metanol. Penelitian baru baru ini yang dilaporkan oleh (Khoo et al. 2023) menyatakan bahwa ekstrak nonpolar seperti etil asetat mampu mengekstraksi triterpenoid lebih efektif dibanding pelarut polar seperti metanol dan air. Sebaliknya, penggunaan n-heksana hanya menghasilkan minyak tanpa metabolit sekunder (Mursiti et al. 2019). Oleh karena itu, penggunaan etil asetat menjadi pilihan ideal untuk memperoleh senyawa triterpenoid dari biji mahoni.

Berdasarkan uraian diatas, penulis menduga bahwa fraksi etil asetat hasil biotransformasi biji mahoni (*Swietenia macrophylla*) menggunakan *Aspergillus niger* memiliki aktivitas anti-agregasi protein yang lebih tinggi dan lebih stabil jika dibandingkan dengan quercetin, yang disebabkan oleh peningkatan kandungan dan ketersediaan senyawa triterpenoid hasil biotransformasi. Senyawa-senyawa yang

bersifat lebih hidrofobik ini diduga mampu berinteraksi secara efektif dengan daerah hidrofobik protein yang terekspos selama proses misfolding, sehingga menghambat pembentukan agregat protein secara lebih konsisten, baik pada model agregasi induksi termal maupun kimia, dibandingkan senyawa flavonoid seperti quercetin yang aktivitasnya cenderung bersifat sementara dan kurang stabil pada kondisi stress.

Meskipun uji *in vitro* mampu menunjukkan aktivitas anti-agregasi secara kuantitatif, pendekatan tersebut belum sepenuhnya mampu menjelaskan mekanisme molekuler interaksi antara senyawa bioaktif dan protein target selama proses agregasi. Mengingat bahwa agregasi protein merupakan proses yang dipicu oleh interaksi non-kovalen, terutama interaksi hidrofobik dan pembentukan struktur β -sheet, pendekatan komputasional (*in silico*) menjadi penting sebagai alat bantu untuk memahami mekanisme penghambatan pada tingkat molekuler. Studi *in silico* seperti *molecular docking* dan *molecular dynamics* telah banyak digunakan untuk memprediksi afinitas ikatan, kestabilan kompleks, serta peran interaksi hidrofobik dalam menghambat misfolding dan agregasi protein .

Eksplorasi aktivitas senyawa anti-agregasi dari ekstrak dan fraksi produk fermentasi biji mahoni menggunakan pelarut etil asetat hingga saat ini belum banyak dilaporkan. Oleh karena itu, penelitian ini diawali dengan uji *in vitro* terhadap produk fermentasi fraksi etil asetat untuk mengevaluasi aktivitas anti-agregasi protein. Model agregasi dilakukan menggunakan bovine serum albumin (BSA) yang diinduksi panas dan dithiothreitol (DTT) sebagai representasi dua mekanisme agregasi yang berbeda, yaitu agregasi akibat stres termal dan

ketidakstabilan ikatan disulfida. Aktivitas anti-agregasi dievaluasi melalui pengukuran turbiditas untuk memantau pembentukan agregat amorf serta uji Congo red untuk mengonfirmasi pembentukan fibril amiloid, khususnya pada model β -amyloid sebagai protein target yang relevan secara patologis. Selanjutnya, fraksi aktif dikarakterisasi menggunakan LCMS untuk mengidentifikasi senyawa dominan yang berkontribusi terhadap aktivitas anti-agregasi. Berdasarkan hasil identifikasi tersebut, dilakukan studi *in silico* menggunakan metode *molecular docking* dan *molecular dynamics* terhadap senyawa-senyawa hasil LCMS dengan model protein BSA dan β -amyloid. Pendekatan ini digunakan untuk menjelaskan interaksi senyawa hidrofobik, serta perannya dalam menghambat terjadinya agregasi baik itu dengan stabilisasi struktur protein maupun penghambatan pembentukan β -sheet.

I.2 Rumusan masalah

- a. Bagaimana hasil fermentasi biji mahoni, hasil fraksi etil asetat, serta pengujian penapisan fitokimia dan aktifitas anti-aggregasinya?
- b. Bagaimana komposisi senyawa dari fraksi etil asetat fermentasi biji mahoni?
- c. Bagaimana prediksi interaksi senyawa triterpenoid biji mahoni dengan protein BSA?
- d. Bagaimana prediksi senyawa ekstrak etil asetat dalam menghambat beta amyloid fibril?

I.3 Tujuan penelitian

- a. Melakukan fermentasi biji mahoni, mendapatkan fraksi etil asetat, serta menguji penapisan fitokimia, dan uji aktifitas anti agregasi
- b. Mendapatkan data komposisi senyawa dari fraksi etil asetat fermentasi biji mahoni dengan LCMS.
- c. Melakukan *molecular docking* dan *molecular dynamic* protein BSA dengan senyawa hasil LCMS
- d. Melakukan *molecular docking* dan *molecular dynamic* terkait protein beta amyloid dengan senyawa hasil LCMS.

I.4 Manfaat penelitian

Penelitian ini menghasilkan data ilmiah yang mendalam mengenai potensi anti-agregasi protein dari fraksi etil asetat produk fermentasi biji mahoni, yang dapat memberikan kontribusi dalam bidang pengembangan bahan alam terutama senyawa hidrofobik yang terdapat dalam biji mahoni sebagai kandidat obat untuk penyakit yang melibatkan agregasi protein, seperti Alzheimer. Hasil penelitian ini direncanakan untuk dipublikasikan dalam jurnal ilmiah bereputasi, baik nasional maupun internasional, guna memperluas cakupan pengetahuan ilmiah.