

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar belakang

Inflamasi merupakan mekanisme pertahanan tubuh terhadap berbagai rangsangan berbahaya, seperti infeksi, cedera, dan stres oksidatif. Apabila respons inflamasi akut tidak terselesaikan dengan baik, kondisi tersebut dapat berkembang menjadi inflamasi kronis yang ditandai oleh pelepasan mediator proinflamasi secara persisten sehingga memicu kerusakan jaringan yang lebih berat (Deng & Liu, 2021). Berbagai agen antiinflamasi, termasuk aspirin, obat antiinflamasi nonsteroid (NSAID), glukokortikoid, terapi anti-sitokin, dan terapeutik berbasis asam nukleat, telah digunakan untuk mengendalikan inflamasi kronis. Namun, efektivitas penggunaan jangka panjangnya masih dibatasi oleh berbagai tantangan, seperti resistensi terapi, immunosupresi, serta keterbatasan farmakokinetika (Balmanno et al., 2024; Deng & Liu, 2021; C. Wang et al., 2023).

Pada proses inflamasi, makrofag merupakan salah satu sel efektor utama yang berperan dalam mengenali rangsangan berbahaya melalui berbagai reseptor. Aktivasi makrofag memicu jalur pensinyalan inflamasi, termasuk NF- κ B dan MAPK, yang selanjutnya meningkatkan ekspresi berbagai mediator proinflamasi, terutama *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) (Zhao et al., 2021). TNF- α awalnya disintesis dalam bentuk protein transmembran (transmembrane TNF- α ; tmTNF- α) yang memiliki aktivitas biologis terbatas. Agar dapat berfungsi sebagai sitokin proinflamasi sistemik, tmTNF- α harus dipotong menjadi bentuk larut (*soluble* TNF- α ; sTNF- α). Proses ini dikatalisis oleh *A Disintegrin and Metalloproteinase 17* (ADAM17), suatu metalloprotease bergantung Zn^{2+} yang juga dikenal sebagai *TNF- α converting enzyme* (TACE) (Bolik et al., 2021; Schumacher & Rose-John, 2022). Melalui aktivitas proteolitiknya, ADAM17 melepaskan sTNF- α dari permukaan sel, termasuk makrofag yang teraktivasi, sehingga memungkinkan TNF- α berikatan dengan reseptornya pada berbagai sel target dan memicu amplifikasi respons inflamasi. Dengan demikian, ADAM17 berperan sebagai

regulator penting yang menentukan jumlah sTNF- α yang tersedia, serta memengaruhi intensitas dan durasi respons inflamasi (Calligaris et al., 2021).

Dibandingkan strategi yang secara langsung menetralkan TNF- α setelah dilepaskan, penghambatan ADAM17 menawarkan pendekatan yang lebih hulu karena mampu menekan pembentukan sTNF- α sejak tahap pelepasannya dari membran sel. Pendekatan ini berpotensi mengurangi aktivasi jalur inflamasi yang dimediasi TNF- α tanpa harus menargetkan sitokin yang telah beredar. Pentingnya ADAM17 sebagai target antiinflamasi didukung oleh penelitian Tape et al. (2011), yang melaporkan bahwa penghambatan aktivitas proteolitik ADAM17 secara signifikan menurunkan pelepasan sTNF- α . Pada perannya dalam pemrosesan TNF- α , ADAM17 memiliki domain metalloprotease yang mengandung ion Zn^{2+} katalitik sebagai pusat aktivitas enzimatis. Domain inilah yang bertanggung jawab terhadap pemotongan tmTNF- α menjadi sTNF- α sehingga menjadi target utama dalam pengembangan inhibitor ADAM17. Meskipun berbagai inhibitor sintetik telah dikembangkan, hingga saat ini belum ada kandidat yang berhasil mencapai penggunaan klinis karena masih menghadapi tantangan selektivitas dan toksisitas (DasGupta et al., 2009).

Seiring meningkatnya minat terhadap senyawa alami sebagai kandidat terapi dengan profil keamanan yang lebih baik, kelompok polifenol menjadi salah satu sumber senyawa bioaktif yang paling banyak diteliti. Polifenol merupakan metabolit sekunder tumbuhan yang dicirikan oleh keberadaan satu atau lebih gugus fenolik dan diketahui memiliki berbagai aktivitas biologis, termasuk antiinflamasi. Berdasarkan struktur kimianya, polifenol dapat dikelompokkan menjadi beberapa kelas utama, seperti asam fenolat, flavonoid, stilbenoid, lignan, dan tanin.

Salah satu polifenol yang banyak mendapat perhatian adalah punicalagin, ellagitannin utama yang ditemukan dalam buah delima (*Punica granatum*). Berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa punicalagin memiliki aktivitas antiinflamasi yang kuat baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Pada makrofag RAW264.7 yang distimulasi lipopolisakarida (LPS), punicalagin dilaporkan mampu menurunkan sekresi TNF- α secara signifikan (Cao et al., 2019). Selain itu, punicalagin juga diketahui menghambat aktivasi jalur NF- κ B dan MAPK serta

menekan produksi berbagai mediator proinflamasi pada berbagai model seluler dan hewan (BenSaad et al., 2017; Liu et al., 2021; Xu et al., 2014). Temuan-temuan tersebut menunjukkan bahwa punicalagin berpotensi mengintervensi proses inflamasi yang bergantung pada TNF- α .

Selain punicalagin, beberapa senyawa yang terlibat dalam jalur biosintesis maupun metabolisme punicalagin juga dilaporkan memiliki aktivitas antiinflamasi. Asam galat, salah satu prekursor utama punicalagin, terbukti mampu menurunkan sekresi dan ekspresi TNF- α pada model *in vitro* dan *in vivo*, menunjukkan kemampuannya dalam menekan respons inflamasi yang dimediasi sitokin tersebut (Li et al., 2023). Menariknya, asam galat juga dilaporkan menghambat aktivitas matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) dan matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) (Filipiak et al., 2014). Mengingat MMP-2, MMP-9, dan ADAM17 sama-sama termasuk keluarga metalloproteinase yang memanfaatkan ion Zn^{2+} pada situs katalitiknya, temuan tersebut mengindikasikan bahwa senyawa polifenol seperti asam galat berpotensi berinteraksi dengan enzim metalloproteinase, termasuk ADAM17.

Punicalagin memiliki beberapa prekursor biosintetik, yaitu punicalin, asam elagat, asam galagat, asam galat, asam heksahidro-difenat, asam shikimat, asam 3-dehidroshikimat, dan asam 3,4-dihidroksibenzoat. Secara umum, senyawa-senyawa tersebut termasuk kelompok ellagitannin, asam fenolat, atau prekursor biosintesis senyawa fenolik. Setelah dikonsumsi, punicalagin juga mengalami biotransformasi oleh mikrobiota usus menjadi metabolit bioaktif berupa urolitin A, urolitin B, urolitin C, dan urolitin D. Beberapa prekursor dan metabolit tersebut telah dilaporkan memiliki aktivitas antiinflamasi dan antioksidan. Meskipun demikian, sebagian besar penelitian yang tersedia masih berfokus pada pengamatan efek seluler, seperti penurunan produksi sitokin proinflamasi atau modulasi jalur pensinyalan inflamasi, sehingga target molekuler spesifik yang mendasari aktivitas tersebut belum sepenuhnya terjelaskan. Penelitian yang secara khusus mengevaluasi potensi punicalagin beserta prekursor dan metabolitnya sebagai inhibitor ADAM17 masih sangat terbatas. Oleh karena itu, eksplorasi interaksi senyawa-senyawa tersebut terhadap domain katalitik ADAM17 penting dilakukan

untuk memperjelas kemungkinan keterlibatan ADAM17 sebagai target molekuler antiinflamasi serta mengungkap mekanisme yang mendasari aktivitas antiinflamasi yang telah dilaporkan sebelumnya.

Pengembangan inhibitor ADAM17 selama ini didominasi oleh senyawa sintetik berbasis hidroksamat yang menargetkan domain katalitik melalui pengikatan ion Zn^{2+} . Beberapa inhibitor telah menunjukkan aktivitas yang kuat terhadap ADAM17, baik yang menargetkan situs katalitik maupun kantong spesifisitas enzim (Barlaam et al., 1999; Knapinska et al., 2015; Madoux et al., 2016; Tateishi et al., 2021). Namun, banyak inhibitor sintetik tersebut menghadapi kendala selektivitas dan potensi toksisitas sehingga belum berhasil dikembangkan lebih lanjut secara klinis.

Marimastat merupakan salah satu inhibitor berbasis hidroksamat yang sering digunakan sebagai senyawa pembanding dalam studi ADAM17 karena kemampuannya berinteraksi dengan domain katalitik enzim. Berbeda dengan marimastat, punicalagin beserta prekursor dan metabolitnya merupakan senyawa alami golongan polifenol yang memiliki aktivitas antiinflamasi, termasuk kemampuan menurunkan produksi TNF- α . Oleh karena itu, eksplorasi potensi senyawa-senyawa tersebut sebagai inhibitor ADAM17 menjadi menarik untuk dilakukan, terutama sebagai alternatif kandidat inhibitor yang berpotensi memiliki profil keamanan lebih baik dibandingkan senyawa sintetik.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi potensi punicalagin beserta prekursor biosintetik dan metabolitnya sebagai inhibitor alami ADAM17. Marimastat digunakan sebagai pembanding untuk mengevaluasi karakteristik penghambatan senyawa alami terhadap domain katalitik enzim. Penelitian dilakukan melalui pendekatan *in silico* dan *in vitro* yang saling terintegrasi. Analisis *in silico* meliputi *molecular docking* untuk memprediksi afinitas dan mode interaksi bioaktif pada domain katalitik ADAM17, simulasi *molecular dynamics* (MD) untuk mengevaluasi kestabilan kompleks enzim–bioaktif, serta analisis mekanika kuantum (QM) untuk mengkaji karakter elektronik yang mendasari interaksi tersebut. Selanjutnya, validasi *in vitro* dilakukan melalui pengujian aktivitas enzimatik ADAM17 untuk menentukan

pengaruh konsentrasi inhibitor terhadap aktivitas enzim dan persen inhibisi, diikuti analisis kinetika enzim untuk mengidentifikasi mekanisme penghambatan yang terjadi. Selain itu, interaksi enzim–bioaktif diamati melalui spektroskopi UV-Vis dan diintegrasikan dengan hasil analisis mekanika kuantum guna mengevaluasi konsistensi perubahan elektronik yang terkait dengan mekanisme interaksi pada domain katalitik ADAM17. Melalui pendekatan multidisiplin tersebut, penelitian ini diharapkan dapat memberikan pemahaman yang lebih komprehensif mengenai potensi punicalagin dan senyawa terkait sebagai kandidat inhibitor alami ADAM17 serta menjelaskan kemungkinan mekanisme molekuler yang mendasari aktivitas antiinflamasi.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana prediksi interaksi molekuler antara senyawa terkait punicalagin, yaitu punicalagin, punicalin, asam galat, asam elagat, asam galat, asam heksahidrofenat, asam shikimat, asam 3-dehidroshikimat, asam 3,4-dihidroksibenzoat, serta metabolitnya (urolitin A, urolitin B, urolitin C, dan urolitin D) dengan domain katalitik ADAM17?
2. Bagaimana prediksi skrining dan seleksi senyawa terkait punicalagin yang memiliki potensi terbaik sebagai inhibitor ADAM17 berdasarkan afinitas pengikatan dan stabilitas kompleks?
3. Bagaimana data aktivitas inhibisi senyawa terpilih (punicalagin dan asam galat) terhadap ADAM17 melalui pengukuran aktivitas enzim dan persen inhibisi?
4. Bagaimana data interaksi molekuler dan profil elektronik senyawa bioaktif terpilih (punicalagin dan asam galat) dengan ADAM17 berdasarkan analisis *molecular docking*, *molecular dynamics*, mekanika kuantum, dan spektroskopi UV-Vis?
5. Bagaimana mekanisme inhibisi senyawa bioaktif terpilih (punicalagin dan asam galat) terhadap ADAM17 melalui integrasi hasil prediksi *in silico* dan pengujian *in vitro*.

I.3 Tujuan Penelitian

1. Memperoleh prediksi interaksi molekuler antara senyawa terkait punicalagin, yaitu punicalagin, punicalin, asam galagat, asam elagat, asam galat, asam heksahidrofenat, asam shikimat, asam 3-dehidroshikimat, asam 3,4-dihidroksibenzoat, serta metabolitnya (urolitin A, urolitin B, urolitin C, dan urolitin D) dengan domain katalitik ADAM17.
2. Melakukan skrining dan seleksi senyawa terkait punicalagin yang memiliki potensi terbaik sebagai inhibitor ADAM17 berdasarkan afinitas pengikatan dan stabilitas kompleks.
3. Memperoleh data aktivitas inhibisi senyawa terpilih (punicalagin dan asam galat) terhadap ADAM17 melalui pengukuran aktivitas enzim dan persen inhibisi.
4. Memperoleh data interaksi molekuler dan profil elektronik senyawa bioaktif terpilih (punicalagin dan asam galat) dengan ADAM17 berdasarkan analisis *molecular docking*, *molecular dynamics*, mekanika kuantum, dan spektroskopi UV-Vis.
5. Menentukan mekanisme inhibisi senyawa bioaktif terpilih (punicalagin dan asam galat) terhadap ADAM17 melalui integrasi hasil prediksi *in silico* dan pengujian *in vitro*.

I.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan memberikan manfaat ilmiah dan praktis dalam pengembangan strategi terapi antiinflamasi berbasis senyawa alami. Secara ilmiah, penelitian ini diharapkan dapat memperluas pemahaman mengenai potensi ADAM17 sebagai target molekuler antiinflamasi serta mekanisme inhibisinya oleh senyawa terkait punicalagin. Integrasi pendekatan *in silico* dan *in vitro* diharapkan mampu menjembatani kesenjangan antara prediksi komputasional dan bukti eksperimental. Secara praktis, hasil penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai referensi dalam penelitian lanjutan pengembangan inhibitor yang lebih selektif dan aman, maupun pengembangan agen antiinflamasi baru yang menargetkan jalur TNF- α melalui penghambatan ADAM17.