

## **BAB 1 PENDAHULUAN**

### **1.1. Latar Belakang**

Mikotoksin adalah metabolit sekunder dihasilkan fungi yang mampu menyebabkan penyakit dan kematian pada manusia dan hewan, beberapa mikotoksin atau turunan mikotoksin telah ditemukan aktivitas farmakologinya dan digunakan sebagai antibiotik, promotan pertumbuhan dan jenis obat lainnya. Aflatoksin merupakan cemaran alami yang dihasilkan oleh beberapa spesies dari fungi *Aspergillus* yang banyak ditemukan di daerah beriklim panas dan lembab, terutama pada suhu 27- 40°C (80-104° F) dan kelembaban relatif 85%. Spesies *Aspergillus* yang paling banyak ditemukan adalah *Aspergillus flavus* yang memproduksi aflatoksin B, dan *A. parasiticus* yang menghasilkan aflatoksin B dan G. Aflatoksin M<sub>1</sub> dan M<sub>2</sub> merupakan metabolit hasil hidroksilasi aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) dan B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>) oleh sitokrom P450 1A2 pada manusia atau hewan yang mengkonsumsi makanan yang tercemar aflatoksin (Gürbay *et al*, 2006).

Metabolisme toksin setelah tertelan oleh hewan, toksin ditransformasikan menjadi metabolit yang berbeda dengan tingkat toksisitas berbeda. Beberapa metabolit dapat menumpuk dalam tubuh, sementara yang lain diekskresikan. Metabolit paling beracun adalah 8,9- *epoxide-AFB1* yang berikatan dengan DNA dan RNA (Hussain *et al*, 2008).

Proses biotransformasi yang terjadi di dalam organ hepar merupakan tahap awal yang sangat penting bagi aflatoksin. Aflatoksin mengalami bioaktivasi setelah melalui proses biotransformasi sehingga bersifat radikal, toksik dan memberikan efek hepatotoksik. Proses biotransformasi aflatoksin dimulai dengan terjadinya oksidasi di

dalam sitokrom P-450 dan selanjutnya akan menghasilkan berbagai metabolit aflatoksin dengan tingkat toksisitas yang tidak lebih rendah dari senyawa awalnya (Balogh *et al*, 2016).

Di dalam mitokondria, aflatoksin B1 mengalami biotransformasi menjadi berbagai senyawa erat hubungannya dengan efek toksis. AFB mengalami biotransformasi menjadi metabolit yang terhidroksilasi dan mengalami oksidasi menjadi *8,9- epoksida aflatoksin B1* yang reaktif. Metabolit terhidroksilasi yang terbentuk, berkonjugasi dengan glukuronida dan sulfat. Konjugat yang terbentuk ini bersifat polar dan diekskresikan melalui urine. Senyawa *8,9-epoksida aflatoksin B1* yang reaktif tersebut, disamping dapat berikatan secara kovalen dengan DNA pada N nomor 7 basa guanine, juga dapat berkonjugasi dengan glutathion tereduksi dan dapat mengalami hidrolisis menjadi dihidrodiol AFB (Prabawati, 2006) .

Suatu mikotoksia pada umumnya mempunyai lebih dari satu macam organ sasaran, misalnya organ sasaran aflatoksin B<sub>1</sub> ialah hepar, ginjal, jantung, dan sistem syaraf. Menurut Makfoeld (1993), dalam Hastuti (2006). Mikotoksin yang bersifat hepatotoksik dapat menyebabkan kerusakan struktur hepatosit dan gangguan fungsi hepar. Kerusakan struktur hepatosit dapat terjadi pada hepatosit - hepatosit yang terdapat pada lobulus hepar (Hastuti, 2006).

Paparan aflatoksin B1 ke dalam tubuh mengakibatkan terjadinya respons toksik. Intensitas respons toksik tersebut dipengaruhi oleh dosis paparan, cara masuknya, lama waktu mengkonsumsi, jenis kelamin dan jenis organisme yang mengkonsumsi.. Makin tinggi dosis paparan suatu zat yang bersifat toksik, makin tinggi respons toksik yang diakibatkannya. Konsep *dose-response relationship* juga mengemukakan bahwa ada hubungan antara dosis paparan suatu toksik dengan

respons toksik yang diakibatkannya. Pengaruh aflatoksikosis pada binatang dapat bersifat akut, subakut dan kronis. Pengaruh akut maupun kronis terutama terjadi di hati, sebab organ sasaran (target) utama efek toksisitas adalah hati (Amdar *et al*, 1991., Ballantyne *et al*, 1995., dalam Hastuti, 2001 ; Prabawati, 2006).

Respon terhadap paparan AFB1 melalui perubahan tingkat ekspresi gen penyandi protein dan gen RNA. Beberapa data dilaporkan tentang gen/protein/RNA yang dapat digunakan penanda kerusakan karena paparan AFB1 (Shi *et al*, 2016), Peneliti melakukan analisis bioinformatika berdasarkan pada jaringan interaksi dan prediksi untuk mengidentifikasi panel gen protein yang dapat digunakan sebagai target dalam penelitian lebih lanjut mengevaluasi efek dari kerusakan yang disebabkan oleh AFB1 dan kapasitasnya menginduksi inisiasi jejas hepatic (Shi *et al*, 2016).

Pada dasarnya senyawa-senyawa kimia, racun, dan radiasi dapat mempengaruhi perkembangan sel. Metabolit hasil biotransformasi AFB1 yang dapat membentuk ikatan kovalen dengan DNA di N7 guanin dapat mengakibatkan mutasi gen mengakibatkan RNA yang terbentuk dan translasinya menjadi protein dalam sitoplasma memberikan gambaran sitologis tidak sama dengan sel normal. Pengaruh aflatoksin B1 terhadap sel dapat mengakibatkan kematian sel (Prabawati, 2006).

AFB1 masuk ke dalam tubuh dapat memicu sebuah protein kunci untuk menginisiasi terjadinya hepatotoksik, protein target yang teraktivasi AFB1 terdapat beberapa protein kinase, yaitu Gsk3b, Mtor, Egfr, Akt1, Mapk1, Mapk3, dan Raf1. AFB1 melakukan interferensi secara langsung terhadap protein tersebut dapat memicu aktivasi gen, sehingga diketahui ketika AFB1 masuk ke dalam tubuh berpotensi besar pengaruhnya terhadap gen jenis tertentu sehingga mampu memicu terjadinya

hepatotoksik (Cervello *et al*, 2017; Song *et al*, 2017; Chen *et al*, 2018; Lin and Chuang, 2017).

Protein-protein sebagai target pengikatan AFB1 keseluruhan termasuk dari golongan protein kinase. Terdapat tujuh jenis protein kinase yaitu Gsk3b, Mtor, Egfr, Akt1, Mapk1, Mapk3, dan Raf1 diprediksi berperan penting dalam regulasi patologis sel. *Alpha Kinase Threonin 1 (RAC-alpha serine/threonine protein Kinase 1)* (AKT1) merupakan satu dari 3 jenis protein itu sendiri yang mencakup Akt1, Akt2, dan Akt3 yang disebut dengan Akt kinase, protein ini meregulasi proses yang terlibat dalam metabolisme, proliferasi, sel survival, pertumbuhan, dan angiogenesis. Mapk1 dan Mapk3 termasuk jenis *serine/threonine kinase* yang berperan dalam regulasi sinyal transduksi MAP menghasilkan respon salah satunya pertumbuhan sel, adhesi, survival, diferensiasi (Marchese *et al*, 2018)

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa, famili protein kinase berperan penting dalam pertumbuhan kanker hepar dengan memicu sinyal transduksi faktor pertumbuhan, diferensiasi, survival, migrasi, dan imortalisasi siklus sel (Garnett *et al*, 2004; Leicht *et al.*, 2007). Protein-protein dalam penelitian ini yang diprediksi sebagai target pengikatan AFB1 keseluruhan termasuk dari golongan protein kinase.

Berdasarkan studi literatur bahwa protein Gsk3b (Cervello *et al.*, 2017), Mtor (Matter *et al.*, 2014), Egfr (Song *et al.*, 2017), Akt1 (Chen *et al.*, 2018), Mapk1 (Min *et al.*, 2011), Mapk3 (Lin & Chuang, 2017), dan Raf1 (Lei *et al.*, 2016), semuanya memiliki peranan penting dalam menginisiasi terjadi kanker hepar. Analisis lanjutan AFB1 perlu dilakukan untuk mengetahui saat intervensi secara langsung terhadap ketujuh protein tersebut untuk menentukan besarnya energi pengikatan yang memicu aktivasinya sehingga dapat diketahui ketika AFB1 masuk ke dalam tubuh *Mus*

*musculus* berpotensi besar pengaruhnya terhadap protein target jenis tertentu yang diprediksi dalam penelitian ini.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa, famili protein kinase berperan penting dalam jejas hepatic dengan memicu sinyal transduksi faktor pertumbuhan, diferensiasi, survival, migrasi, dan imortalisasi siklus sel (Garnett *et al*, 2004 ; Leichter *et al*, 2007).

Capsaicin (*8methyl-N-vanillyl-6-nonenamide*) merupakan senyawa utama yang memberikan rasa pedas dalam tanaman cabai. Jika dimakan akan memunculkan sensasi nyeri terbakar secara selektif mengaktifkan neuron sensorik yang menyampaikan informasi tentang rangsangan ke sistem saraf pusat. Ukuran pedas dari cabai tergantung pada kandungan capsaicin dan senyawa capsaicinoid lain yang dikandungnya mencapai 90% dari total capsaicinoid yang terdapat dalam cabai (Hidana dkk, 2015; Zhao *et al.*, 2016; Clark and Lee, 2016).

Pengetahuan terkini aktivitas capsaicin terkait penyakit, capsaicin memberikan efek menguntungkan pada fungsi analgesik, sistem kardiovaskuler, Diabetes, gastroproteksi, gangguan urogenital dan penurunan berat badan dan oleh karena itu, dapat berguna sebagai pengobatan pada *airway diseases* efek capsaicin masih kontroversial dan efek terapeutik dari agonis dan antagonis capsaicin dan transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) perlu penyelidikan lebih lanjut. Capsaicin menunjukkan *dual effect* (menguntungkan atau merugikan), pada efek yang menguntungkan dibutuhkan konfirmasi tentang khasiat (*efficacy*)(Fattori *et al*, 2016).

Capsaicin secara *in vitro* terbukti memiliki efek pada sel terhadap prostat (Mori *et al*, 2006; Sa'nchez *et al*, 2006), sel-sel proliferasi pada lambung (Lo *et al*, 2005),

dan pada sel hepar (hepatosit) (Jung *et al*, 2001) tanpa menimbulkan efek samping signifikan pada sel-sel normal. Anandakumar *et al* (2009) telah membuktikan capsaicin yang diberikan peroral dengan dosis 0,3 mg/0,5 mL bersifat kemopreventif terhadap sel pada paru-paru.

Penelitian Lin (2013), menyimpulkan bahwa Capsaicin mempunyai aktivitas :

1. Menginduksi apoptosis, 2. Menginduksi henti siklus sel fase G2 / M, 3. Mengurangi viabilitas sel (Regulasi faktor ekspresi transkripsi; Penghambatan *growth factor signal transduction pathways*.)

Capsaicin dapat mengurangi ekspresi PI3K, menunjukkan bahwa capsaicin memblokir jalur PI3K / Akt / mTOR. Namun, fosforilasi p38 tidak terpengaruh untuk mengklarifikasi efek capsaicin dan proliferasi sel pada jalur PI3K / Akt / mTOR, wortmannin (PI3K inhibitor) dan rapamycin (mTOR) (Yu *et al*, 2017).

Dengan cara memeriksa fosforilasi protein dalam jalur ini. Data menunjukkan bahwa fosforilasi Akt, ERK, p-GSK3- $\beta$ , dan mTOR dapat dihambat oleh capsaicin melalui mediasi oleh jalur PI3K / Akt / mTOR memainkan peran penting dalam mengatur siklus sel, apoptosis, dan *autophagy* (Yu *et al*, 2017).

Kemampuan capsaicin dapat menghambat proliferasi berbagai sel *line*, melalui Apoptosis dikaitkan dengan generasi reaktif oksigen spesies (ROS), aktivasi jalur JNK, penurunan depolarisasi mitokondria dan pelepasan sitokrom-c, sehingga mengarah pada aktivasi kaskade-3 caspase. Generasi ROS dimediasi capsaicin menyebabkan pengaktifan jalur protein kinase (MAPK3) yang bergantung pada mitogen yang diaktifkan *apoptotic signaling kinase*. Capsaicin memodulasi fosforilasi protein pensinyalan kaskade MAPK. Efek capsaicin pada jalur sinyal MAPK, yang sangat penting untuk kelangsungan hidup dan pertumbuhan sel. Capsaicin

menurunkan ekspresi ERK 1/2 terfosforilasi. Kompleks dua molekul yang terdiri atas ligan dengan target protein ligan dapat berupa senyawa kimia atau *small molecule* (AFB1) sedangkan target dapat berupa makromolekul atau protein utama (AKT1 dan MAPK1) (Park *et al.*, 2014).

Cabai (*Capsicum Annum L*) memiliki rasa yang pedas dan memiliki aroma yang sangat tajam, pemberi rasa pedas cabai adalah senyawa capsaicinoid. Capsaicinoid meliputi nordihydrocapsaicin, capsaicin, dihydrocapsaicin, norcapsaicin, homodihydrocapsaicin, homocapsaicin, nonivamide. Salah satu senyawa paling berperan dalam tanaman cabai adalah capsaicin, capsaicin merupakan metabolit sekunder dari tanaman cabai. Dalam bidang farmasi selain untuk meredakan rasa sakit atau nyeri, capsaicin juga dikenal memiliki menghambat gen protein tertentu (Surh, 2002).

Dibutuhkan *screening* lebih lanjut antara senyawa Capsaicin terhadap protein. *Screening* komponen yang berada dalam *Capsicum Annum L* terhadap protein target MAPK1 dan AKT1 merupakan tahap awal *drug discovery*. *Screening* biasanya menggunakan metode komputasi atau biasa dikenal dengan *in silico*. *In silico* terdiri dari berbagai metode di antaranya *molecular dynamic stimulation*, BLAST, dan paling sering digunakan untuk penemuan obat dan prediksi efek obat adalah *Molecular Docking* (Kharisma, 2018).

Dari latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk melakukan *screening* secara *in silico* komponen bioaktif *Capsicum Annum L* terhadap protein target MAPK1 dan AKT1 menggunakan metode *Molecular Docking* guna mengetahui energi ikatan antara kompleks reseptor-ligan yang terbentuk dan dijadikan acuan untuk uji *in vivo* selanjutnya dilakukan pengujian komponen bioaktif *Capsicum Annum L* terhadap protein target MAPK1 dan AKT1 menggunakan metode

*Immunohistochemistry* (IHC) dan pemeriksaan histopatologis dengan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE) guna mengetahui reaksi antara kompleks reseptor-ligan (antigen-antibodi).

## **1.2. Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang penelitian diatas maka dapat dirumuskan beberapa masalah sebagai berikut :

1. Apakah capsaicin dapat menghambat ekspresi protein target AKT1 pada mencit karena interaksi AFB1 diamati secara in silico ?
2. Apakah capsaicin dapat menghambat ekspresi protein target MAPK1 pada mencit karena interaksi AFB1 diamati secara in silico ?
3. Apakah capsaicin dapat menghambat ekspresi protein target AKT1 pada hepar mencit karena induksi AFB1 diamati secara in vivo?
4. Apakah capsaicin dapat menghambat ekspresi protein target MAPK1 pada hepar mencit karena induksi AFB1 diamati secara in vivo?
5. Apakah capsaicin dapat menghambat terjadinya jejas hepatic pada hepar mencit karena induksi AFB1 diamati gambaran histopatologisnya ?

## **1.3. Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Secara umum penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek proteksi capsaicin dalam menghambat ekspresi protein target AKT1 dan MAPK1 yang disebabkan oleh interaksi AFB1 secara in silico dan in vivo.



### **1.3.2 Tujuan Khusus**

1. Membuktikan capsaicin dapat menghambat ekspresi protein target AKT1 pada mencit karena interaksi AFB1 diamati secara *in silico*.
2. Membuktikan capsaicin dapat menghambat ekspresi protein target MAPK1 pada mencit karena interaksi AFB1 diamati secara *in silico*.
3. Membuktikan capsaicin dapat menghambat ekspresi protein target AKT1 pada hepar mencit karena induksi AFB1 diamati secara *in vivo*.
4. Membuktikan capsaicin dapat menghambat ekspresi protein target MAPK1 pada hepar mencit karena induksi AFB1 diamati secara *in vivo*.
5. Membuktikan capsaicin dapat menghambat terjadinya jejas hepatic pada hepar mencit karena induksi AFB1 diamati gambaran histopatologisnya.

## **1.4. Manfaat Penelitian**

### **1.4.1 Manfaat Teoritis**

Hasil dari penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi ilmiah tentang mekanisme capsaicin dalam menghambat ekspresi protein target AKT1 dan MAPK1 karena induksi AFB1 secara *in silico* dan *in vivo*.

### **1.4.2. Manfaat Praktis**

Manfaat praktis hasil penelitian adalah : Institusi dan instansi terkait dapat menggunakan penelitian ini dalam pencegahan terjadinya jejas hepatic pada hepar disebabkan oleh mikotoksin, aflatoksin khususnya AFB1 dan dapat digunakan oleh kalangan usaha industri komersial dalam memproduksi anti AFB1 yang dapat menghambat ekspresi protein target.