

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Diabetes melitus merupakan penyakit kronis yang disebabkan oleh tingginya kadar gula darah (Wu *et al.*, 2018). Salah satu penyakit komplikasi yang ditimbulkan dari diabetes adalah luka terbuka pada kaki, atau disebut juga sebagai ulkus diabetikum. Luka ini dapat terjadi pada penderita diabetes dengan kemungkinan 15-25% pada masa hidupnya. Ulkus diabetikum merupakan infeksi yang umum terjadi pada permukaan plantar kaki dan berpeluang lebih besar diderita oleh pasien yang menderita diabetes melitus selama 5 tahun atau lebih (Fitria *et al.*, 2017). Kondisi tersebut tentu saja merugikan karena berdampak pada disabilitas, morbiditas, dan kematian.

Pada kasus penyembuhan luka normal, umumnya terbagi menjadi empat tahap yakni hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan pemodelan ulang. Pada proses hemostasis, fibrin dan trombosit darah akan mencegah pendarahan dari luka atau sayatan semakin parah dengan cara membekukan darah. Selanjutnya, migrasi fibroblast dan sel endothelial sel terjadi pada fase inflamasi. Pada proses ini, makrofag dikeluarkan untuk menghilangkan bakteri yang berhasil masuk ke dalam tubuh. Pada tahap proliferasi, terdapat deposisi kolagen dan terbentuknya pembuluh darah baru. Setelah beberapa minggu atau bulan, terjadi pemodelan ulang *Extracelullar Matrix* (ECM), dimana sintesis matriks baru dan matriks metalloproteinase (MMP) berada dalam keadaan seimbang (Mathew-Steiner *et al.*, 2021). Penyembuhan luka diabetes tentunya memiliki mekanisme berbeda karena terdapat gangguan pada fase inflamasi proliferasi.

Salah satu faktor yang menyebabkan luka dari diabetes tidak kunjung membaik adalah adanya gangguan dalam regulasi ECM. Kandungan glukosa yang tinggi dapat menyebabkan peningkatan produksi MMP dan menurunkan inhibitor MMP (TIMPs). MMP sendiri merupakan enzim yang berfungsi untuk mendegradasi ECM seperti kolagen dan elastin, sehingga gangguan pada penyembuhan luka akan terjadi ketika terjadi ketidakseimbangan antara MMP dan TIMP (Spampinato *et al.*, 2020).

Dari penelitian Nguyen *et al.* (2018), ditemukan bahwa MMP-9 aktif merupakan enzim utama MMP yang menyebabkan ulkus diabetikum. Pemilihan

MMP-9 sebagai enzim yang akan dikaji juga didasari atas sifat MMP-9 yang merugikan ketika jumlahnya meningkat, berbeda dengan MMP-8 yang justru bersifat menguntungkan ketika jumlahnya lebih tinggi (Jones *et al.*, 2019). Maka, salah satu cara untuk mempercepat penyembuhan luka diabetes adalah dengan mencari senyawa yang dapat berperan sebagai inhibitor dan mampu berikatan dengan MMP, khususnya MMP-9, sehingga aktivitas enzim dapat dihambat.

Di sisi lain, riset dalam ranah medis terus berkembang dengan mengidentifikasi berbagai metabolit tanaman terkait potensinya dalam aktivitas biologis. Walau begitu, terdapat senyawa potensial yang belum dikaji secara maksimal, salah satunya berasal dari sektor perikanan. Salmon (*Salmo salar*) merupakan salah satu spesies ikan yang banyak disukai dan dikonsumsi oleh berbagai kalangan karena cita rasanya yang kaya. Dibalik tingginya permintaan ikan salmon, Valencia *et al.* (2021) menyatakan bahwa lebih dari 50% produk ikan-ikanan dibuang menjadi limbah dan tidak dimanfaatkan lebih lanjut. Padahal, sumber protein yang melimpah layaknya kolagen terdapat pada bagian kepala, kulit, sisik, sirip, *frames*, dan jeroan ikan. Kolagen sendiri merupakan komponen protein dalam matriks ekstraseluler pada berbagai jaringan (Jafari *et al.*, 2020). Potensi dan sifat fungsional yang ditawarkan dari bagian kolagen pada ikan salmon ini akan semakin meningkat ketika diproses secara hidrolisis enzimatis. Dari reaksi tersebut akan dihasilkan komponen asam amino dan peptida yang tinggi sehingga dapat mempengaruhi sifat bioaktif yang dimiliki.

Kolagen tidak hanya ditemukan dari produk perikanan, namun dapat ditemukan pula pada mamalia seperti famili sapi dan babi. Walau begitu, terdapat beberapa faktor yang membuat kolagen laut lebih menjanjikan untuk dijadikan dan dipertimbangkan sebagai sumber kolagen. Kolagen yang berasal dari sapi dianggap kurang aman dikarenakan dapat menjadi media penyebaran sapie *spongiform encephalopathy* (BSE), *transmissible spongiform encephalopathy* (TSE), dan juga penyakit *foot-and-mouth* (flu Singapura) yang terjadi pada seluruh dunia, termasuk Asia. Selain itu, terdapat preferensi beberapa agama yang melarang konsumsi makanan yang berasal dari babi dan sapi (Coppola *et al.*, 2020). Selain itu, komponen asam amino yang lebih lengkap didapatkan pada ikan salmon. Ikan salmon juga memiliki kandungan asam amino triptopan sebesar 0,9% (Mente *et al.*,

2003) disaat silver carp tidak memiliki kandungan asam amino tersebut (Liu *et al.*, 2014) dan kulit babi (mamalia) hanya mengandung sebanyak 0.12% (Songchotikunpan *et al.*, 2008).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Hu *et al.* (2017), didapatkan bahwa peptida kolagen laut mampu meningkatkan penyembuhan luka pada konsentrasi 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ melalui pengujian *in vitro* sel HaCaT. Di sisi lain, kolagen memiliki potensi yang dapat didalami lebih lanjut dalam *wound healing* disebabkan strukturnya yang memiliki porositas matriks tinggi, sehingga dapat menimbulkan proliferasi fibroblast, vaskularisasi, dan penutupan kembali luka dengan epitelium yang baru. Hal ini dibuktikan dengan *Acid Soluble Collagen* (ASC) dari ikan Tilapia yang mampu meningkatkan penyembuhan luka, sintesis kolagen, re-epitalisasi, dan rekonstitusi dermis secara *in vivo* (Jingjing Chen *et al.*, 2019). Penelitian lain juga menemukan bahwa ekstrak kolagen dari ikan Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) berhasil meningkatkan tingkat penyembuhan luka. Analisis potensi kolagen dari ikan tilapia dikaji berdasarkan kemampuannya dalam pengembangan regulasi ekspresi gen alpha SMA, TGF, bFGF, dan VEGF (Elbialy *et al.*, 2020). Salah satu persamaan ikan tilapia dengan salmon adalah lingkungan tempat hidup yang sama-sama berasal dari air tawar.

Matriks metalloproteinase-9 merupakan salah satu enzim dalam kelompok MMP yang cukup banyak dikaji. Walau begitu, penyelidikan terkait aktivitas MMP-9 masih didominasi dengan kontribusinya terhadap penyakit kanker. Sementara, komplikasi yang berujung pada luka akut terbuka ini kurang mendapatkan perhatian yang sama dengan penyakit diabetes. Kolagen yang diteliti untuk penutupan luka diabetes juga dilihat dari sisi sel dan belum banyak yang dikaji dari sisi penghambatan enzim. Sehingga, tujuan dari penelitian ini adalah untuk melihat potensi kolagen dari ikan salmon salar berdasarkan aktivitas enzim yang memicu terhambatnya penyembuhan luka tersebut. Melalui penelitian ini, hasil penghambatan enzim secara *in vitro* akan didukung dan diperkuat dengan data *in silico* dimana sisi pengikatan, afinitas pengikatan, dan prediksi sifat inhibisi dari ekstrak kolagen terhadap enzim MMP-9 dapat diketahui.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan sebelumnya maka rumusan masalah umum dari penelitian ini adalah “Bagaimana aktivitas ekstrak kolagen ikan Salmon secara *in vitro* dan *in silico* dalam menghambat MMP-9?”. Dari rumusan masalah umum tersebut didapatkan rumusan masalah secara spesifik sebagai berikut:

1. Bagaimana karakteristik ekstrak kolagen kulit ikan *Salmo salar*?
2. Bagaimana aktivitas ekstrak kolagen kulit ikan salmon (*Salmo salar*) terhadap enzim matriks metalloproteinase-9 (MMP-9) secara *in vitro*?
3. Bagaimana afinitas dan sisi pengikatan kolagen tipe-1 ikan Salmon (*Salmo salar*) terhadap enzim matriks metalloproteinase-9 (MMP-9) secara *in silico*?
4. Bagaimana afinitas pengikatan, interaksi molekuler, dan sifat inhibisi peptida aktif hasil hidrolisis kolagen tipe-1 ikan Salmon (*Salmo salar*) terhadap enzim matriks metalloproteinase-9 (MMP-9) secara *in silico*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan utama dari penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi ekstrak kolagen dari ikan *Salmo salar* dalam menghambat enzim MMP-9 berdasarkan studi *in vitro* dan *in silico*. Maka, penelitian ini secara khusus bertujuan untuk mengidentifikasi:

1. Mengetahui karakteristik ekstrak kolagen kulit ikan *Salmo salar*.
2. Mengetahui aktivitas ekstrak kolagen kulit ikan salmon (*Salmo salar*) terhadap enzim matriks metalloproteinase-9 (MMP-9) secara *in vitro*.
3. Mengetahui afinitas dan sisi pengikatan kolagen tipe-1 ikan Salmon (*Salmo salar*) terhadap enzim matriks metalloproteinase-9 (MMP-9) secara *in silico*.
4. Mengetahui afinitas pengikatan, interaksi molekuler, dan sifat inhibisi peptida aktif hasil hidrolisis kolagen tipe-1 ikan Salmon (*Salmo salar*) terhadap enzim matriks metalloproteinase-9 (MMP-9) secara *in silico*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk memberikan wawasan mengenai potensi kolagen hidrolisat tipe-1 dari ikan *Salmo salar* dalam menghambat enzim matriks metalloproteinase-9 berdasarkan studi *in silico* dan *in vitro*. Hasil dari

penelitian ini juga dapat dikembangkan sebagai masukan pada riset lanjutan terkait pengobatan luka diabetes. Melalui penelitian ini pun senyawa potensial dari limbah, khususnya limbah ikan, dapat dikaji lebih spesifik sehingga menjadi bernilai dan bermanfaat.

1.5 Struktur Organisasi Skripsi

Skripsi ini memuat lima bab utama. Bab I terdiri dari pendahuluan yang memiliki latar belakang, rumusan masalah, tujuan penelitian, manfaat penelitian, dan struktur organisasi skripsi. Bab II yaitu kajian pustaka yang menjabarkan informasi yang berhubungan dengan penelitian. Beberapa diantaranya adalah luka diabetes, enzim MMP-9, ikan *Salmo salar*, kolagen, peptida hasil hidrolisis kolagen, dan *molecular docking* beserta perangkatnya. Bab III membahas tentang metode penelitian yang berisi waktu, tempat penelitian, alat, dan juga bahan yang digunakan dalam penelitian. Selain itu, dijelaskan pula alur kerja dari masing-masing prosedur maupun pengujian. BAB IV merupakan temuan dan pembahasan, yang menguraikan dan menjelaskan hasil penelitian kajian *in vitro* maupun *in silico*. *In vitro* memuat hasil dan penjelasan mengenai karakterisasi dari ekstrak kolagen kulit ikan salmon dan aktivitasnya dalam menghambat MMP-9. Sementara, kajian *in silico* berisi validasi *molecular docking*, afinitas dan interaksi molekuler dari kolagen terhadap enzim MMP-9, dan afinitas dan interaksi molekuler dari peptida aktif terhadap enzim MMP-9. Bab V terdiri dari kesimpulan dan saran yang memaparkan jawaban dari rumusan masalah dan usulan maupun saran untuk penelitian selanjutnya.