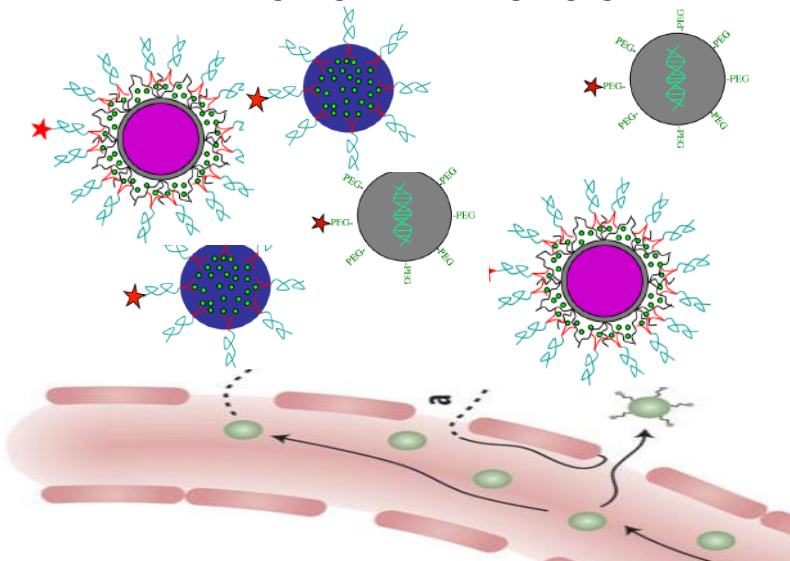


Strategi Meningkatkan Penghantaran Obat Di Dalam Tubuh



Prof. Dr. Ernawati Sinaga, MS., Apt.

UNAS Press

Strategi Meningkatkan Penghantaran Obat Di Dalam Tubuh

Prof. Dr. Ernawati Sinaga, MS., Apt.

UNAS Press

**Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 19 Tahun 2002
Tentang Hak Cipta**

Pasal 2

(1) Hak Cipta merupakan hak eksklusif bagi Pencipta atau Pemegang Hak Cipta untuk mengumumkan atau memperbanyak Ciptaannya, yang timbul secara otomatis setelah suatu ciptaan dilahirkan tanpa mengurangi pembatasan menurut peraturan perundang-undangan yang berlaku.

(2) Pencipta atau Pemegang Hak Cipta atas karya sinematografi dan Program Komputer memiliki hak untuk memberikan izin atau melarang orang lain yang tanpa persetujuannya menyewakan Ciptaan tersebut untuk kepentingan yang bersifat komersial.

Pasal 72

(1) Barangsiapa dengan sengaja dan tanpa hak melakukan perbuatan sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 ayat (1) atau Pasal 49 ayat (1) dan ayat (2) dipidana dengan pidana penjara masing-masing paling singkat 1 (satu) bulan dan/atau denda paling sedikit Rp1.000.000,00 (satu juta rupiah), atau pidana penjara paling lama 7 (tujuh) tahun dan/atau denda paling banyak Rp5.000.000.000,00 (lima miliar rupiah).

(2) Barangsiapa dengan sengaja menyiarkan, memamerkan, mengedarkan, atau menjual kepada umum suatu Ciptaan atau barang hasil pelanggaran Hak Cipta atau Hak Terkait sebagaimana dimaksud pada ayat (1) dipidana dengan pidana penjara paling lama 5 (lima) tahun dan/atau denda paling banyak Rp500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).

Kupersembahkan untuk

*Ayah Bundaku tercinta, yang senantiasa
mengiringi langkahku dengan doa
Untuk beliau berdua cintaku selamanya*

*Suami, anak-menantu dan cucu-cucuku tersayang
yang sapa, senyum, canda dan tawanya selalu
membuat hari-hariku jadi ceria*

*Allah Subhanahu wa Taala
Satu-satunya tempat
'ku bergantung dan bersandar
Terima kasih atas segala Nikmat dan Hidayah
yang Kau limpahkan dalam hidupku
Ridhailah amal ibadahku
ya Rabb ya Alim ya Rasyid*

Strategi Meningkatkan Penghantaran Obat Di Dalam Tubuh

Prof. Dr. Ernawati Sinaga, MS, Apt.

Hak Cipta Dilindungi oleh Undang-undang

Diterbitkan pertama kali oleh

UNAS Press

Jalan Sawo Manila Pejaten Pasar Minggu Jakarta Selatan

Telp. 021-7806700, Fax 7802719

Tahun terbit 2013

Editor

Adinda Arifiah

Disain sampul dan tata letak

Aziz Rahimy

Katalog Dalam Terbitan (KDT)

Cetakan 1, Jakarta, UNAS Press 2013

viii + 194 halaman; 16 x 21 cm

ISBN 978-602-14335-5-3

KATA PENGANTAR

Salah satu tantangan dalam penemuan dan pengembangan obat baru dewasa ini adalah bagaimana menghantarkan molekul obat dari *administration site* ke jaringan sasaran tempat obat tersebut diharapkan bekerja, dalam jumlah yang cukup untuk memberikan efek terapi yang diharapkan. Dari beberapa catatan diketahui bahwa lebih kurang 60% dari kandidat obat gagal pada saat uji klinis karena terbentur berbagai masalah, antara lain masalah farmakokinetik, sifat metabolik yang tak diinginkan, dan masalah-masalah penghantaran obat (drug delivery).

Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang biologi sel, biologi molekuler, kimia kombinatorial, genomik dan proteomik yang sangat pesat telah mendorong penemuan berbagai senyawa makromolekul yang memiliki potensi terapeutik, misalnya berbagai senyawa protein, peptida dan peptidomimetika yang memiliki berbagai aktivitas biologis kuat, namun pengembangan senyawa-senyawa ini sebagai obat seringkali terbentur pada kesulitan transpor atau penghantaran molekul-molekul senyawa tersebut ke situs sasarannya.

Rintangan utama dalam penghantaran obat adalah adanya sawar-sawar biologis yang tersebar di berbagai organ dan jaringan tubuh, yang efektivitasnya dipengaruhi oleh sifat intrinsik molekul obat atau/dan oleh lingkungan fisiologis terkait di dalam tubuh. Pemahaman tentang hal ini, yaitu bagaimana sawar-sawar biologis ini mempengaruhi perjalanan molekul obat di dalam tubuh, mempengaruhi absorpsi dan distribusi obat, yang akhirnya akan

mempengaruhi jumlah atau konsentrasi molekul obat di jaringan sasaran, merupakan hal yang sangat penting, sebab konsentrasi obat di jaringan sasaran merupakan faktor penting yang menentukan efektivitas farmakologis suatu senyawa obat. Penemuan dan pengembangan obat baru tidak akan pernah menghasilkan produk final yang bermutu tanpa studi tentang penghantaran obat. Hal ini menjadi tantangan yang serius bagi industri farmasi dalam proses penemuan obat baru.

Dalam beberapa dekade terakhir ini penelitian tentang penghantaran obat atau *drug delivery* sangat banyak dilakukan. Berbagai teknik baru, mulai dari modulasi junction antar sel, strategi prodrug, sampai dengan disain nanopartikel untuk memfasilitasi penghantaran molekul obat ke jaringan sasaran telah diteliti dengan sangat ekstensif.

Di dalam buku ini akan diuraikan berbagai faktor yang menjadi penghambat penghantaran obat dan dasar-dasar biologi molekuler tentang membran sel dan junction antar sel yang menjadi konstruksi utama berbagai sawar biologis. Setelah itu akan diuraikan hasil-hasil penelitian terbaru tentang berbagai strategi yang diharapkan akan dapat mengatasi rintangan tersebut, antara lain dengan modulasi junction antar sel, strategi prodrug dan formulasi fosfolipid.

Semoga buku ini bermanfaat bagi mahasiswa, dosen, dan para peneliti yang memiliki minat di bidang penghantaran obat. Sebagaimana layaknya sebuah karya manusia, buku ini tak luput dari keurangan dan kelemahan. Tak ada gading yang tak retak. Untuk itu penulis memohon maaf yang sebesar-besarnya, dan sangat mengharap kritik dan saran

yang membangun untuk perbaikan buku ini di masa mendatang.

Billahittaufik wal Hidayah
Wassalamualaikum wr. wb.

Jakarta, September 2013

Ernawati Sinaga

DAFTAR ISI

PENGANTAR	v
RINTANGAN DALAM PENGHANTARAN OBAT	1
• Membran sel	5
• Junction antar sel	7
• Enzim-enzim pengurai	53
MODULASI JUNCTION ANTAR SEL	62
• Modulasi junction antar sel menggunakan peptida Kadherin	68
• Modulasi junction ketat menggunakan Zot dan peptida Zot	88
• Modulasi junction ketat menggunakan modulator Okludin	103
• Modulasi junction ketat menggunakan modulator Klaudin	107
STRATEGI PRODRUG	112
• Prodrug ester untuk meningkatkan lipofilisitas	114
• Prodrug mimikri senyawa endogen	122
• Prodrug peptida siklik	130
FORMULASI FOSFOLIPID	133
• Liposom	133
• Fitosom	158
DAFTAR PUSTAKA	

RINTANGAN DALAM PENGHANTARAN OBAT

Di dalam organisasi tubuh manusia dan hewan terdapat berbagai struktur dan faktor yang berperan melindungi tubuh atau jaringan-jaringan tertentu dari masuknya senyawa-senyawa *xenobiotic* yang kemungkinan dapat membahayakan, tetapi pada saat yang bersamaan tetap dapat melintaskan zat-zat nutrisi yang diperlukan. Obat adalah senyawa *xenobiotic*, oleh sebab itu untuk dapat mencapai jaringan sarannya, molekul obat harus melintasi berbagai penghambat tersebut, walau diaplikasikan melalui rute administrasi yang manapun. Rintangan penghantaran obat ini secara garis besar dapat dibedakan menjadi dua, yaitu rintangan fisik berupa jaringan epitel atau endotel yang umum ditemukan melapisi atau menyelaputi jaringan atau organ-organ tertentu, dan rintangan berupa enzim-enzim yang dapat merusak atau mengubah molekul-molekul obat menjadi zat lain yang berbeda aktivitas dan toksisitasnya.

Rintangan atau sawar biologis yang paling luas permukaannya adalah jaringan kulit, melapisi dan melindungi seluruh permukaan luar tubuh dari pengaruh-pengaruh eksternal. Namun demikian, jaringan kulit bukan merupakan sawar yang paling ketat, dalam arti paling sukar ditembus oleh berbagai molekul *xenobiotic*. Sawar biologis yang paling ketat yang dikenal sampai saat ini adalah sawar darah otak atau *blood-brain barrier* (BBB) yang merintangi penghantaran molekul dari darah ke jaringan otak. Sawar

darah otak ini merupakan salah satu penghambat dalam penghantaran obat untuk mengobati berbagai penyakit di jaringan syaraf pusat, dan saat ini menjadi salah satu topik yang diteliti secara intensif di berbagai laboratorium dalam upaya penemuan dan pengembangan obat baru. Obat-obat yang diberikan per oral juga harus melintasi berbagai sawar biologis untuk sampai ke dalam peredaran darah dan mencapai jaringan sasarannya, di antaranya adalah lapisan epitel saluran pencernaan dan lapisan endotel dinding pembuluh darah. Suatu senyawa obat harus memiliki sifat-sifat fisikokimia yang optimal agar dapat mengatasi berbagai sawar biologis yang harus dilintasinya dan mencapai jaringan sasarannya dengan *selamat*.

Dalam uraian berikut ini, sawar-sawar biologis yang merintang atau dapat menjadi masalah dalam penghantaran obat dibedakan menjadi sawar fisik dan sawar metabolisme. Yang dimaksud dengan sawar fisik adalah jaringan atau lapisan sel yang menghambat transpor molekul obat untuk melintasinya, sedangkan yang dimaksud dengan sawar metabolisme adalah enzim-enzim yang kemungkinan dapat mengubah atau merusak molekul obat sehingga kehilangan aktivitas farmakologisnya.

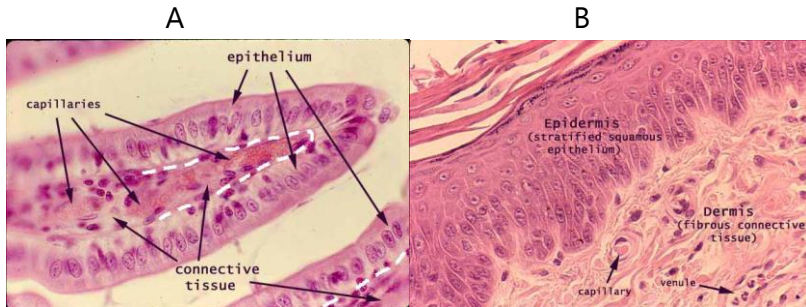
Sebagaimana yang sudah dikemukakan, sawar fisik adalah jaringan atau lapisan sel yang menghambat transpor molekul obat untuk melintasinya. Penghantaran obat dari saluran pencernaan ke dalam darah misalnya harus melintasi sawar fisik berupa lapisan sel epitel yang terdapat di dinding usus dan lapisan sel endotel yang ada pada dinding pembuluh darah. Jika obat tersebut dimaksudkan untuk bekerja di jaringan otak, maka dari peredaran darah, molekul

obat harus melakukan perjalanan menembus sawar darah-otak, sawar yang sampai saat ini dianggap sawar fisik yang paling ketat. Sawar darah otak terdiri dari beberapa lapis sel endotel yang sangat rapat (akan dijelaskan lebih inci pada bagian lain dari buku ini), sehingga hanya molekul-molekul tertentu saja yang dapat melintasinya. Saat ini berbagai penelitian gencar dilakukan untuk mempermudah penghantaran obat menembus sawar darah-otak. Jika obat dimaksudkan untuk bekerja di jaringan paru, misalnya, maka dari peredaran darah molekul obat harus berjalan menembus berbagai jaringan yang membatasi paru dari peredaran darah.

Sel-sel yang membentuk sawar-sawar fisik umumnya merupakan sel-sel epitel atau endotel. Lapisan sel epitel merupakan jaringan yang melapisi permukaan tubuh, organ tubuh atau permukaan luar saluran tubuh. Jaringan epitel dapat tersusun oleh selapis atau lebih dari satu lapis sel-sel epitel. Sel epitel dinding usus misalnya, tersusun oleh satu lapisan sel-sel epitel, sedangkan jaringan epitel kulit terdiri dari beberapa lapis sel (Gambar 1-1). Sel endotel merupakan salah satu bentuk khusus dari sel epitel. Sel endotel melapisi seluruh permukaan dalam dari dinding pembuluh darah (Gambar 1-2).

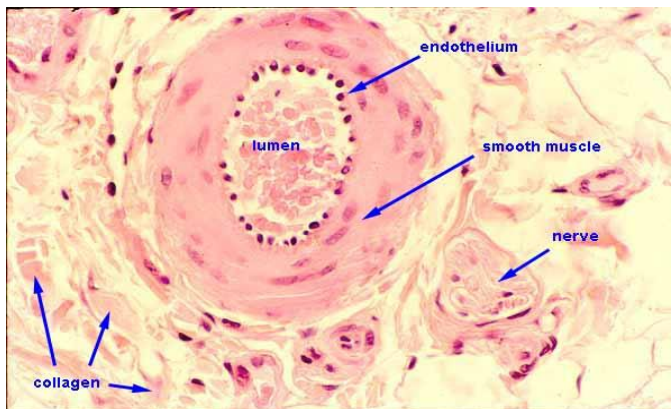
Konstruksi membran sel yang bersifat hidrofobik dan adanya *junction* antar sel yang mempersempit ruang antar sel yang bersifat hidrofilik merupakan sawar fisik yang membatasi penghantaran obat dari satu rongga tubuh ke rongga tubuh yang lain atau dari rongga ke jaringan atau sebaliknya. Obat-obat yang bersifat hidrofilik tidak dapat melintasi membran sel yang bersifat hidrofobik, kecuali

memiliki sistem transportasi yang sesuai, demikian pula penghantarannya melalui jalur paraseluler juga terbatas karena walaupun jalur paraseluler bersifat hidrofilik tetapi diameternya sangat kecil sehingga hanya molekul-molekul berukuran kecil saja yang dapat melintasinya.



Gambar 1-1. Jaringan epitel usus halus tersusun oleh satu lapis sel-sel epitel (A), sedangkan jaringan kulit tersusun oleh beberapa lapis sel-sel epitel (B).

Gambar dikutip dari <http://www.siumed.edu/~dking2/index.htm>

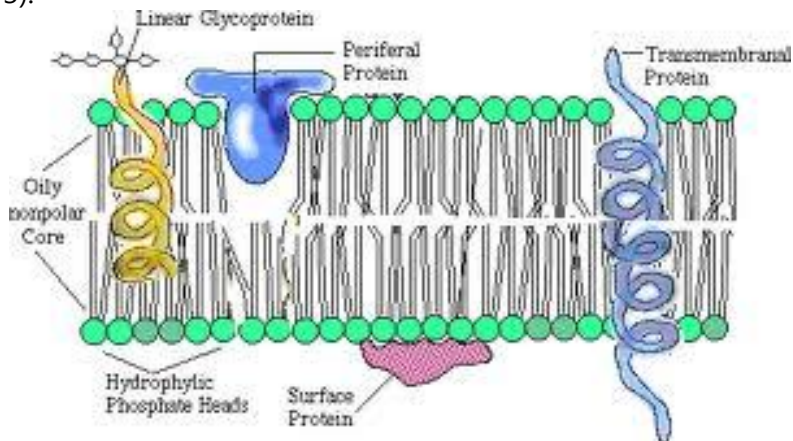


Gambar 1-2. Jaringan endotel pada dinding pembuluh darah.

Gambar dikutip dari <http://www.siumed.edu/~dking2/index.htm>

Membran sel

Membran sel-sel epitelium, sebagaimana membran sel lain, tersusun oleh dua lapisan lipid yang membuatnya bersifat sangat hidrofobik. Hanya zat-zat yang berukuran kecil dan bersifat hidrofobik yang dapat melalui dua lapis lipid tersebut secara difusi pasif. Zat-zat lain tidak dapat melintasinya, kecuali memiliki protein transporter yang khas untuknya di membran sel. Protein-protein ini terbenam di dalam membran sebagai protein transmembran (Gambar 1-3).

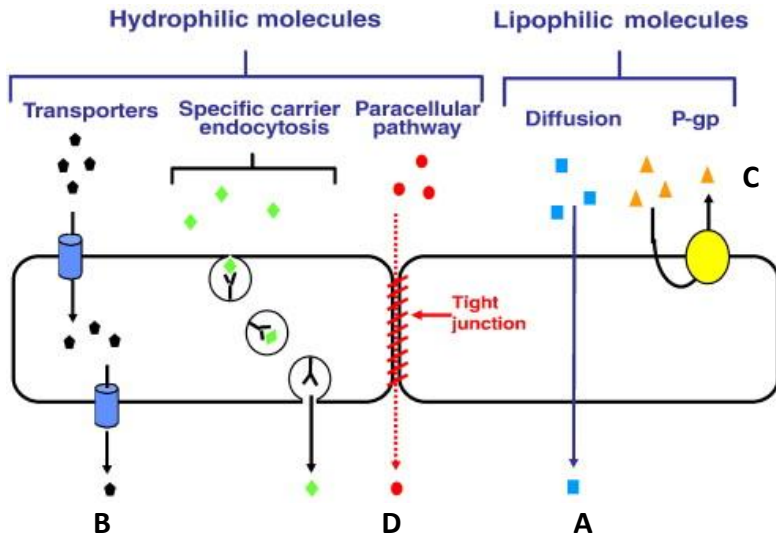


Gambar 1-3. Struktur membran sel, tersusun oleh dua lapis lipid.

Di samping protein-protein transmembran, di membran sel juga terdapat protein-protein permukaan atau disebut juga protein perifer. Protein-protein perifer umumnya bukan merupakan transporter, tetapi merupakan protein-protein pemberi signal atau marker dari sel.

Transpor melintasi membran sel dapat berlangsung dengan berbagai mekanisme, yaitu secara difusi sederhana,

difusi terfasilitasi, dan transpor aktif dengan bantuan berbagai protein transporter di membran sel. Di samping itu transpor transmembran juga dapat berlangsung dengan dengan mekanisme khusus yang disebut endositosis (Gambar 1-4).



Gambar 1.4. Skema transpor molekul melintasi jaringan epitel. Transpor transmembran dapat berlangsung melalui difusi sederhana (A), transpor dengan bantuan transporter, baik aktif maupun pasif (B), dan transpor yang dimodifikasi oleh pompa efluks (C). Transpor paraseluler (D) berlangsung melalui ruang antar sel. Di samping itu juga dapat terjadi transpor molekul dengan mekanisme khusus yang disebut endositosis

Difusi sederhana ion atau molekul melintasi membran plasma berlangsung tanpa bantuan molekul transpor (transporter), hanya didorong oleh adanya gradien konsentrasi molekul di dalam dan di luar sel. Difusi terfasilitasi dan transpor aktif merupakan mekanisme

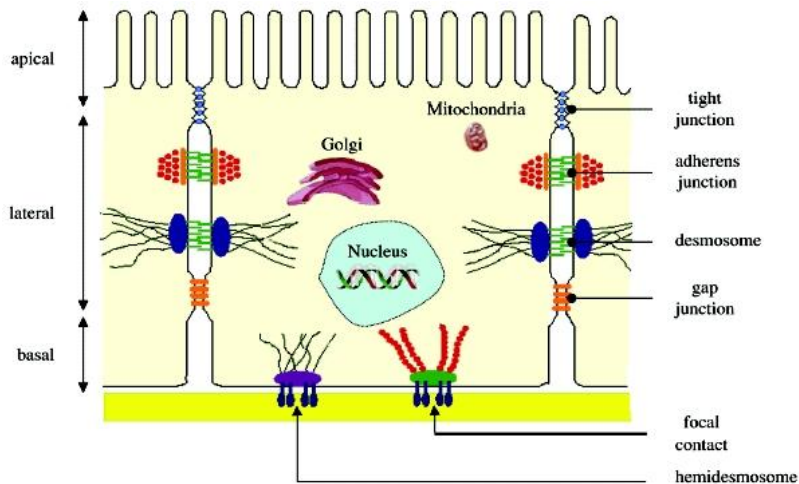
transpor yang berlangsung dengan bantuan protein-protein spesifik yang berada pada membran plasma. Perbedaannya, pada difusi terfasilitasi transpor berlangsung tanpa memerlukan energi dan molekul bergerak sesuai dengan gradient konsentrasi, yaitu dari konsentrasi tinggi ke konsentrasi rendah. Pada transpor aktif molekul atau ion bergerak melawan gradien konsentrasi, jadi dari kompartemen berkonsentrasi rendah ke kompartemen berkonsentrasi tinggi, serta memerlukan energi sebagai pendorong. Di samping itu juga dikenal transpor transmembran yang dimodifikasi oleh pompa efluks, yang menyebabkan senyawa-senyawa tertentu dikeluarkan kembali dari sitoplasma ke lingkungan ekstraseluler. Pompa efluks juga dikenal sebagai pompa "multi drug resistance" (MDR) yang terdapat pada sel-sel tumor.

Junction antar sel

Junction antar sel merupakan salah satu faktor yang membentuk sawar biologis. *Junction* antar sel ini merupakan faktor pembatas utama dari transpor paraseluler. Selain pada sel-sel epitel, *junction* antar sel juga ditemukan pada sel-sel endotel yang menyusun sawar darah otak.

Kompleks *junction* interselular tersusun oleh 3 zona utama yang terletak sangat berdekatan satu sama lain bahkan kadang-kadang hampir tak dapat ditentukan batasnya, yaitu zonula okluden (zonula occludens atau tight junction), zonula adheren (zonula adherens atau intermediate junction) dan makula adheren (macula adherens atau desmosom). *Junction ketat* atau zonula

okluden adalah komponen *junction* antar sel yang berada paling dekat dengan bagian apikal dari sel-sel epitel, desmosom terletak pada bagian yang paling dekat dengan bagian basolateral, sedangkan zonula adheren terletak diantara zonula okluden dan desmosom. Itu sebabnya zonula adheren sering juga disebut *junction* intermediet (Gambar 1-5).



Gambar 1-5. Junction antar sel pada sel-sel epitel

Junction ketat merupakan struktur utama yang diyakini memiliki peran sentral membatasi transpor molekul melalui jalur paraseluler, sedangkan junction adheren dan desmosom membentuk ikatan yang kuat yang diperlukan untuk menjaga proksimitas sel dan integritas junction ketat. Junction adheren juga berperan penting untuk polarisasi dan diferensiasi epitel, morfogenesis, dan supresi tumor, proses-proses biologi yang berlangsung dengan melibatkan berbagai protein lain, misalnya aktin dan beta-katenin.

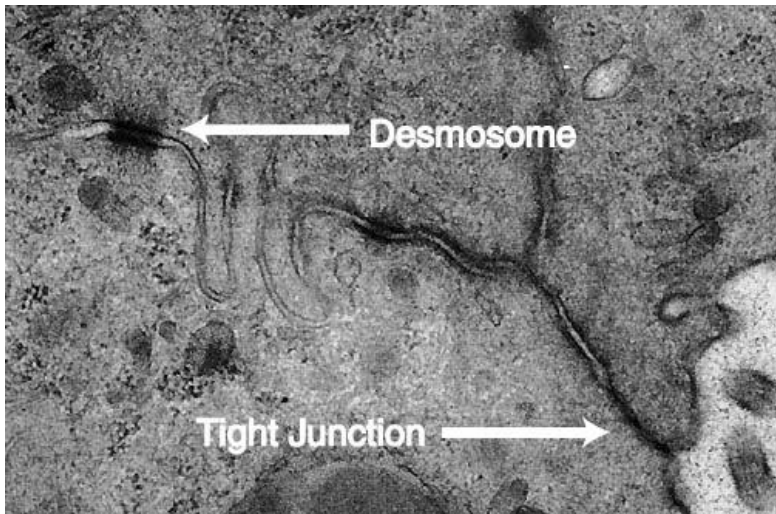
Selain ketiga zona tersebut, pada bagian basolateral seringkali terdapat satu junction lain yang disebut *gap junction*. Gap junction memiliki struktur dan fungsi yang berbeda dengan junction sel yang lain, karena gap junction membentuk semacam kanal pada dua sel yang terletak bersebelahan, yang menyebabkan zat-zat di dalam sitoplasma sel yang satu dapat berpindah ke sitoplasma sel lainnya.

1. *Junction ketat*

Junction ketat (tight junction), disebut juga zonula okluden, adalah bagian paling apikal dari struktur yang menyusun *junction* antar sel. Zonula ini merupakan pembatas utama dari transpor molekul melalui jalur paraseluler. Walaupun para ahli telah memperkirakan adanya sawar-sawar biologis sejak lebih dari seratus tahun yang lalu, namun deskripsi yang lebih jelas dari zonula okluden ini baru diperoleh setelah Farquhar dan Palade (1) mempelajarinya melalui mikroskop elektron. Zonula okluden merupakan struktur yang dinamis. Pembentukan, pertumbuhan, reorganisasi dan penguraiannya dapat berlangsung melalui proses-proses alamiah fisiologis ataupun karena pengaruh lingkungan. Morfologi, permeabilitas dan selektivitas ionik dari zonula okluden bervariasi antar jaringan dan antar spesies organisme.

Melalui mikroskop elektron, zonula okluden tampak sebagai tonjolan-tonjolan yang membentuk kontak antar membran sel yang berdekatan (Gambar 1-6). Materi-materi fibrilar, termasuk filamen aktin, tampak berinteraksi dengan permukaan sitoplasma dari membran *junction*. Tonjolan-

tonjolan inilah yang menyebabkan ruang antar sel di daerah zonula okluden menyempit, sehingga sering disebut sebagai *junction* ketat atau *tight junction*. Melalui mikroskopi elektron 'freeze-fracture' zonula okluden tampak sebagai sederet serabut (fibril) yang bercabang dan berkelok-kelok, terletak pada bidang datar membran sel. Jumlah serabut pada *junction* ketat ini bervariasi, antara 1 sampai dengan 10 serabut yang menduduki daerah perimeter sel. Jumlah serabut yang membentuk kontak antar sel ini mempengaruhi keketatan dan permeabilitas *junction*, namun tidak selalu berbanding lurus dengan nilai resistansi listrik transepitel atau TEER (2).

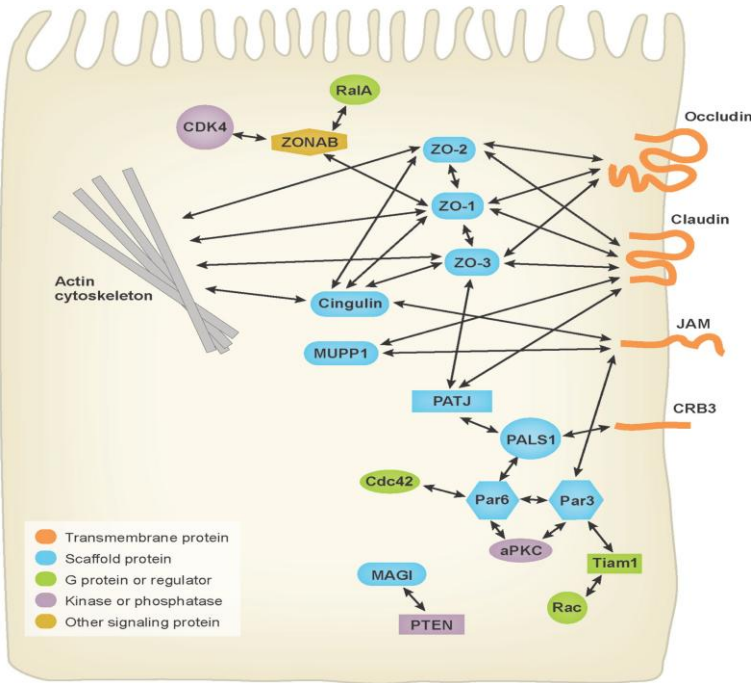


Gambar 1-6. Junction ketat tampak sebagai tonjolan-tonjolan yang membentuk kontak antar membran sel yang berdekatan (3)

Dengan teknik antibodi monoklonal dan teknik-teknik lain telah berhasil diidentifikasi beberapa molekul protein

yang menyusun zonula okluden. Sejak ditemukannya protein pertama yang berperan pada *junction ketat*, yaitu okludin, pada tahun 1986 (4), sampai saat ini sudah lebih dari 50 protein lagi yang diidentifikasi terkait dengan junction ketat. Protein-protein tersebut ada yang merupakan protein transmembran, ada pula protein perifer. Protein-protein ini saling berinteraksi sedemikian rupa membentuk jaringan protein yang kompleks (Gambar 1-7). Rangkaian protein perifer berikatan dengan protein-protein transmembran yang menghubungkannya dengan sitoskeleton. Beberapa dari protein-protein ini berperan dalam transduksi signal untuk meregulasi polaritas dan proliferasi.

Protein-protein transmembran merupakan komponen penting dari *junction ketat* yang menghubungkan dua membran sel yang terletak bersebelahan. Ada tiga kelompok protein transmembran yang ditemukan pada junction ketat, yaitu: okludin, kladin, dan molekul-molekul adhesi junction atau JAM (junctional adhesion molecules). Pada saat ini, salah satu protein *junction ketat* transmembran yang paling dikenal dan paling banyak menarik perhatian adalah kladin. Protein-protein transmembran berikatan dengan protein-protein perifer melalui domain intraselulernya. Protein-protein perifer pada junction ketat yang sudah diidentifikasi dan dipelajari antara lain protein-protein ZO (zonula okluden), MAGI (Membrane-associated guanylate kinase inverted), singulin (Cingulin), ZONAB (ZO-1-associated nucleic acid-binding Protein) dan Rab13.

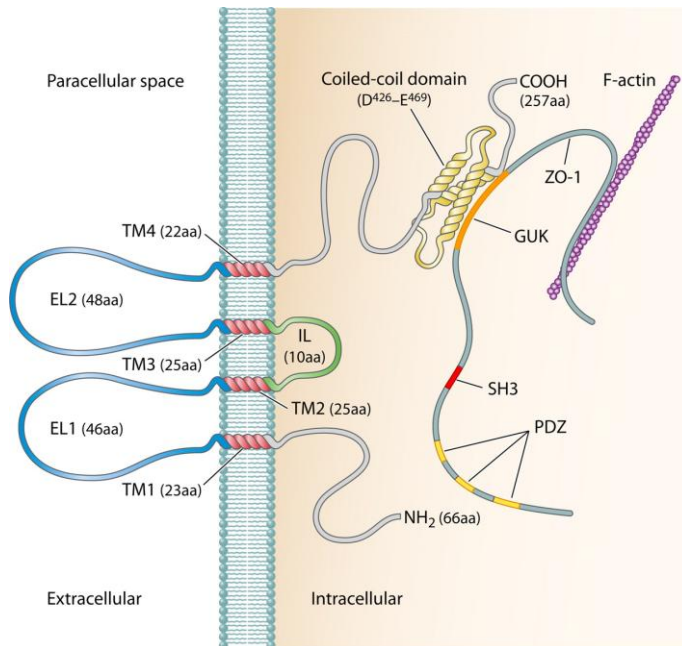


Gambar 1-7. Jaringan kerja protein-protein yang berperan pada junction ketat (5)

Okludin

Okludin merupakan protein junction ketat yang pertama kali diidentifikasi. Fosfoprotein berukuran lebih kurang 65 kDa (polipeptida dengan 504 residu asam amino) ini mula-mula diidentifikasi dengan skringing menggunakan antibodi monoklonal terhadap fraksi antarmembran yang mengandung zonula okluden dan adheren dari sel-sel hati ayam (6). Setelah itu, okludin ditemukan juga pada sel-sel manusia, mencit, anjing, dan berbagai mamalia lainnya (6-8).

Analisis sekuens okludin mengungkapkan bahwa okludin merupakan protein yang unik, memiliki 4 domain transmembran, dengan kedua ujung N dan C nya mengarah ke dalam sitoplasma (Gambar 1-8). Bagian ekstraseluler okludin terdiri dari dua loop, yaitu loop-1 (OCC1 atau EC-1) dan loop-2 (OCC2 atau EC-2). Domain EC-1 okludin mengandung lebih kurang 60% residu tirosin dan glisin, yang diperkirakan berperan penting pada interaksi antar sel (7,8).



Gambar 1-8. Skema struktur okludin (8)

Ekspresi eksogen okludin pada fibroblas meningkatkan adhesi sel-sel fibroblas, adhesi ini dapat dihambat oleh peptida sintetik yang sekuensnya diturunkan dari domain EC-

1 okludin. Namun demikian domain EC-1 tampaknya tidak banyak berperan pada pembentukan *junction* antar sel. Peptida sintetik yang sekuensnya diturunkan dari domain EC-1 ini tidak efektif meningkatkan permeasi paraseluler. Sebaliknya, peptida sintetik yang diturunkan dari domain EC-2 dapat meningkatkan permeabilitas sel-sel epitel secara *in vitro*. Dari data ini diperkirakan bahwa fungsi adhesi sel dan fungsi pembentukan *junction* pada protein okludin tidak terletak pada sekuens yang sama. Fungsi adhesi sel lebih terlihat pada domain EC-1, sedangkan fungsi pembentukan sawar paraseluler pada domain EC-2 (9,10).

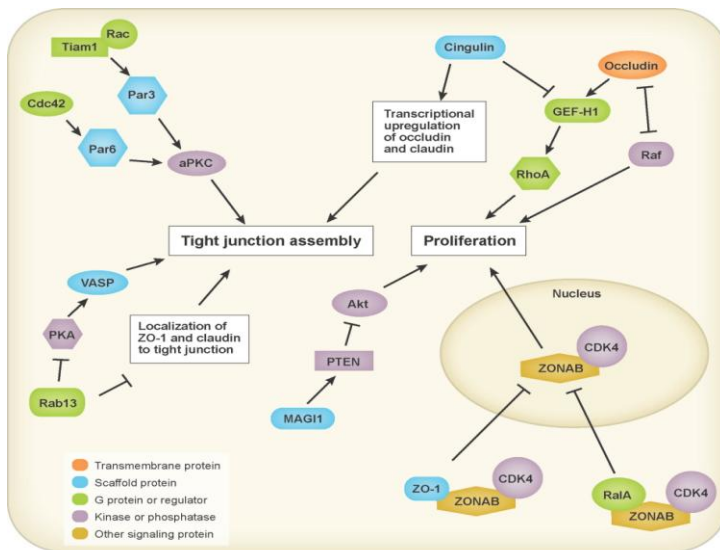
Peran okludin pada *junction ketat* cukup banyak dipelajari. Okludin berinteraksi langsung dengan protein-protein zonula okluden, yaitu ZO-1, ZO-2, dan ZO-3 pada *junction ketat* (Gambar 1-7). Diperkirakan, interaksi ini diperlukan untuk menstabilkan lokalisasi okludin pada *junction ketat*. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa setengah sekuens okludin yang mengarah ke ujung karboksil, yang tersusun dari lebih kurang 250 residu asam amino, berperan pada interaksi okludin dengan ZO-1 dan ZO-2. Okludin juga berinteraksi secara tidak langsung dengan sitoskeleton aktin dan JAM melalui interaksinya dengan protein-protein ZO (Gambar 1-7). (11,12).

Berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa sekuens okludin yang mengarah ke ujung karboksil memiliki peran yang sangat penting untuk fungsinya. Balda et al (13) menunjukkan bahwa ekspresi okludin utuh/sempurna (full length) ataupun mutan (C-terminal truncated) pada sel-sel MDCK2 menyebabkan peningkatan resistansi listrik transepitel (TEER), yang diyakini merupakan refleksi dari penurunan

permeabilitas ionik transepitel. Namun bersamaan dengan itu ternyata pada lapis tunggal sel-sel yang mengekspresikan okludin mutan terjadi peningkatan permeasi paraseluler, sedangkan hal ini tidak terjadi pada lapis sel yang mengekspresikan okludin utuh. Bukti ini menunjukkan peran penting fungsional bagian ujung karboksil dari okludin. Chen (14) juga membuktikan peran penting bagian ujung karboksil okludin ini pada pembentukan junction ketat embrio *Xenopus* pada masa perkembangannya. Injeksi mRNA yang mengkode okludin mutan (C-terminal truncated), ternyata meningkatkan kemampuan penetrasi pereaksi biotinilasi melintasi *junction* antar sel.

Domain ekstraseluler okludin juga terbukti berperan pada pembentukan junction ketat. Ekspresi okludin pada fibroblast nihil okludin (occluding-null fibroblast) ternyata meningkatkan adhesi antar sel. Demikian pula, peptida sintetik yang sekuensnya diturunkan dari loop ekstraseluler terbukti dapat menghambat adhesi sel yang diinduksi oleh okludin. Bukti-bukti ini menunjukkan bahwa domain ekstraseluler okludin berperan pada proses adhesi sel (9). Wong dan Gumbiner (10) juga membuktikan bahwa beberapa peptida sintetik yang sekuensnya diturunkan dari bagian ekstraseluler ini dapat merusak permeabilitas junction ketat sel-sel epitel. Namun, penelitian pada *occludin knockout mice* yang dilakukan Saitou et al (15) menunjukkan bahwa morfologi *junction ketat* tidak terpengaruh, demikian pula fungsi sawar epitel intestinal tampak normal, walaupun terlihat adanya gambaran histologis abnormal pada epitel lambung.

Okludin diperkirakan juga memiliki peran yang penting pada berbagai proses signaling yang terkait junction ketat (Gambar 1-9). Raf-1 merusak junction ketat melalui downregulation okludin, dan overekspresi okludin dapat menekan pertumbuhan tumor yang diinduksi oleh Raf-1 melalui loop kedua dari domain ekstraseluler okludin (16, 17).



Gambar 1-9. Peran okludin pada transduksi signal yang melibatkan junction ketat (5)

Okludin juga diperkirakan berperan pada aktivasi RhoA melalui GEF-H1/Lfc, faktor penukar nukleotida guanine terkait junction ketat. Okludin juga memiliki peran penting pada *targeting* reseptor TGF- β pada junction ketat. Hal ini penting untuk proses transisi epitel-mesenkim yang

dimediasi oleh TGF- β . Dari uraian di atas dapat difahami bahwa walaupun peran okcludin pada pembentukan junction ketat sampai sekarang belum jelas seluruhnya, namun beberapa hasil penelitian sudah berhasil mengungkapkan makin banyak peran okcludin pada regulasi proses signaling yang terkait junction ketat (18, 19).

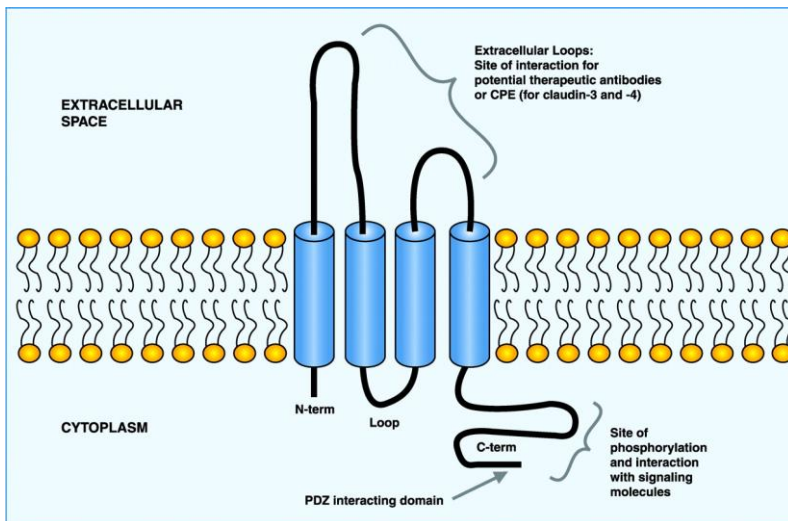
Klaudin

Klaudin adalah sekelompok protein transmembran yang beranggotakan sedikitnya 24 protein. Klaudin-1 dan klaudin-2 pertama kali diidentifikasi dari fraksi sel-sel hati ayam. Pada saat ini diketahui bahwa setiap sel paling tidak mengekspresikan 2 jenis protein klaudin. Beberapa jenis klaudin, misalnya klaudin-5 dan klaudin-11, diketahui bersifat spesifik jaringan (20,21).

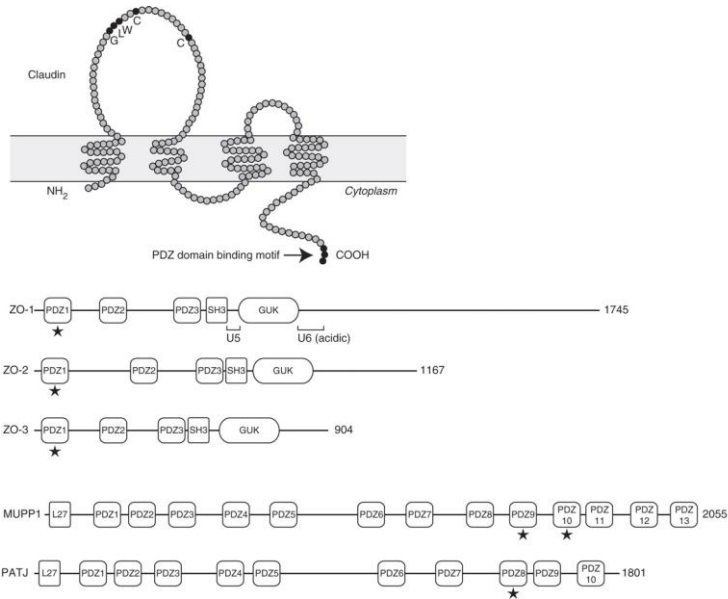
Sama seperti okcludin, klaudin memiliki empat heliks domain transmembran, dua loop ekstraseluler, dan dua domain intraseluler (Gambar 1-10), namun demikian sama sekali tidak ada kesamaan atau kemiripan sekuens antara kedua kelompok protein ini. Loop ekstraseluler pertama terdiri dari lebih kurang 50 residu asam amino, ada variasi panjang loop pertama ini pada berbagai anggota protein klaudin. Variasi sekuens pada loop ekstraseluler pertama ini menentukan selektivitas muatan junction ketat (22), konsisten dengan pendapat yang menyatakan bahwa susunan protein klaudin yang diekspresikan pada tipe sel tertentu menentukan besar pori junction ketat (23).

Loop ekstraseluler kedua dari klaudin lebih pendek dibandingkan dengan yang pertama, berkisar antara 16-33 residu asam amino, dan masih belum banyak dipelajari.

Domain intraselular ujung amino kladin sangat pendek, sedangkan sekuens intraselular ujung karboksilnya jauh lebih panjang. Sekuens sitoplasmik ujung karboksil claudin panjangnya bervariasi berkisar antara 21-63 residu asam amino, bagian ini merupakan sekuens yang paling tidak dikonservasi. Hal ini membawa dugaan bahwa kemungkinan bagian sitoplasmik ujung karboksil ini merupakan situs regulasi fungsional. Satu hal yang penting, hampir semua protein kladin memiliki ujung karboksil dengan motif tiga asam amino yang dapat berikatan dengan domain PDZ (24), ini merupakan sekuens yang sangat dikonservasi pada semua famili protein kladin. Melalui motif pengikatan PDZ ini, kladin berikatan langsung dengan protein-protein perifer yang memiliki domain PDZ, termasuk ZO-1, ZO-2, dan ZO-3 (Gambar 1-7, 1-11).



Gambar 1-10. Skema struktur kladin (25)



Gambar 1-11. Struktur kladuin dengan motif pengikatan PDZ di ujung karboksilnya (26)

Protein-protein kladuin memediasi adhesi sel yang tidak bergantung kalsium (calcium-independent cell-cell adhesion). Ekspresi kladuin-1 dan kladuin-2 dalam sel-sel fibroblast yang tidak memiliki junction ketat menginduksi agregasi sel dan pembentukan plana kontak antar sel dimana kladuin terakumulasi. Gambaran *freeze-fracture* mikroskop elekton menunjukkan bahwa plana kontak sel ini tersusun oleh jaringan serabut-serabut partikel, strukturnya sangat mirip dengan junction ketat. Apabila okladuin dan kladuin diekspresikan bersama-sama di dalam sel fibroblast, maka okladuin akan ditarik bersama kladuin ke serabut mirip

junction ketat ini. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kladuin merupakan protein utama yang berperan pada pembentukan struktur serabut mirip junction ketat ini. Molekul-molekul kladuin akan berinteraksi sesamanya pada serabut junction ketat yang berbeda atau pada serabut yang sama baik secara homotipik maupun heterotipik. Perbedaan keketatan junction ketat yang bersifat spesifik sel nampaknya ditentukan oleh kombinasi isoform kladuin yang diekspresikan pada sel tersebut. Sel-sel MDCK II yang memiliki resistansi transepitel (TEER) rendah mengekspresikan kladuin-2 dalam jumlah banyak, tetapi MDCK I dengan nilai TEER tinggi mengekspresikan kladuin-2 dalam jumlah sedikit (27, 28).

Mutasi pada kladuin-16 dilaporkan menyebabkan permeabilitas normal sel terhadap kalsium dan magnesium terganggu. van Itallie dan kawan-kawan (29) juga telah membuktikan bahwa ekspresi kladuin-4 pada sel-sel epitel menyebabkan penurunan konduktans paraseluler melalui penurunan permeabilitas sel terhadap natrium. Furuse dan kawan-kawan (28) juga mengungkapkan kematian mencit *claudin-1-knockout* satu hari setelah dilahirkan karena dehidrasi yang disebabkan oleh kerusakan fungsi sawar epidermal. Hasil-hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kladuin merupakan protein yang sangat penting untuk pembentukan dan kestabilan fungsi sawar junction ketat

Ada beberapa mekanisme yang potensial menyangkut regulasi fungsi kladuin. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa WNK4, sebuah enzim kinase serin/treonin, melakukan hiperfosforilasi kladuin 1-4 dan menurunkan TEER dengan jalan meningkatkan permeabilitas

terhadap ion klorida (30). Pada sel-sel kanker ovarium, kladin-3 terfosforilasi oleh protein kinase A (PKA), dan fosforilasi ini ternyata meningkatkan permeabilitas paraseluler dan merusak atau menurunkan fungsi sawar junction ketat. Penelitian menggunakan lapis tunggal sel-sel epitel intestinal menunjukkan bahwa interferon gamma (IFN- γ) meningkatkan permeabilitas paraseluler dan merusak sawar epitel dengan jalan menginduksi endositosis protein-protein junction ketat seperti misalnya kladin-1 dan okludin (31-33).

JAM (Junctional adhesion molecules)

JAMs adalah anggota keluarga superfamily immunoglobulin yang ditemukan pada sel-sel epitel. JAM juga ditemukan pada berbagai macam sel lain, misalnya pada sel-sel endotel, leukosit, dan platelet. Sampai saat ini telah diidentifikasi 4 kelompok protein JAM, yaitu JAM-A, JAM-B, JAM-C, dan JAM4/JAML. JAM4 merupakan kelompok JAM pada mencit, sedangkan JAML adalah kelompok protein JAM pada manusia yang homolog dengan JAM. Pada sel-sel epitel, JAM-A dan JAM-C terdapat di junction ketat, sedangkan JAM-B ditemukan di sepanjang membran lateral membrane (12, 34, 35)

Berbeda dengan okludin dan kladin, protein JAM hanya memiliki satu domain transmembran, sebuah domain ekstraseluler yang mengandung dua motif seperti imunoglobulin (Ig-like motifs), dan sebuah ekor yang terdapat di sitoplasma. Domain ekstraseluler JAM-A, JAM-B, dan JAM-C memiliki motif dimerisasi yang berperan pada interaksi molekul-molekul JAM ini (12,35,36)

Protein ZO

Protein-protein ZO (zonula occluden) adalah salah satu kelompok protein perifer yang ditemukan pada *junction ketat*. Analisis sekuens terhadap cDNA dari protein ZO-1 menunjukkan bahwa protein ini termasuk dalam sekelompok protein yang dikenal dengan nama MAGUK (Membrane Associated Guanylate Kinase). Hampir semua protein MAGUK terdapat pada tempat-tempat spesifik di sel, misalnya di junction antar sel atau sinaps, dan berperan sebagai protein perifer penghubung bagi protein-protein transmembran.

Secara umum protein-protein MAGUK ditandai dengan adanya struktur inti domain interaksi protein-protein dan lokalisasi di permukaan sitoplasma dari membran plasma. Semua protein yang termasuk kelompok MAGUK memiliki mosaik domain protein tripartit yang terdiri dari satu atau lebih domain PDZ, sebuah domain SH3 (Src homology 3) dan sebuah domain GUK (homolog guanilat kinase), yang selalu tersusun berurutan (37-46). (Gambar 1-12).



Gambar 4-12. Sekuens protein MAGUK

Ada tiga isoform protein ZO yang dikenal, yaitu ZO-1, ZO-2, dan ZO-3. ZO-1 adalah protein ZO yang pertama kali diidentifikasi. ZO-1 ditemukan pada junction ketat sel-sel epitel dan endotel, tetapi juga dapat ditemukan pada *cytoplasmic undercoat* dari zonula adheren sel-sel non-epitel misalnya pada fibroblast, astrosit, dan sel-sel Schwan.

ZO-1 merupakan fosfoprotein membran perifer dengan massa molekul bervariasi antara 210-225 kDa, bergantung pada jaringan dan spesies. Molekul ini memiliki homologi dengan sekelompok protein yang berperan pada transduksi signal pada daerah kontak antar sel-sel tertentu [86]. Di samping memiliki struktur inti protein MAGUK, yaitu domain PDZ, SH3, dan GUK, protein ZO-1 juga memiliki dua *nuclear localization signals* dan daerah karboksil yang kaya prolin. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ZO-1 terakumulasi di nukleus pada saat maturasi lapis tunggal epitel dan mengatur proliferasi dengan jalan berinteraksi dengan faktor transkripsi Y-box, suatu protein ZONAB (ZO-1-associated nucleic acid-binding protein).

ZO-1 memegang peran penting pada pembentukan struktur dan fungsi junction ketat. Menggunakan paradigma modulasi konsentrasi kalsium, Rajasekaran dan kawan-kawan berhasil menunjukkan bahwa protein ZO-1 ini terlebih dahulu mengadakan asosiasi dengan protein-protein di *junction* adheren sebelum berkumpul di junction ketat. Pada kondisi fisiologis dan eksperimental tertentu yang ditandai dengan penyusunan ulang dinamis dari kontak antar sel, protein ZO-1 ditemukan terakumulasi di nukleus. Hal ini mengindikasikan multi-peran dari protein ZO-1 di dalam sel. Analisis biokimia menunjukkan bahwa ZO-1 terfosforilasi pada residu serin pada kondisi *steady-state*, namun terfosforilasi pada residu tirosin pada kondisi stimulasi ekstraseluler tertentu.

ZO-2 dan ZO-3 merupakan protein pasangan ikatan ZO-1. Protein ZO-2 merupakan fosfoprotein perifer berukuran 160 kDa, memiliki homologi yang kuat dengan ZO-1, sekitar

51%, yang terutama terletak pada domain GUK. Seperti ZO-1, ZO-2 memiliki 3 domain PDZ, sebuah domain SH3 dan sebuah domain GUK. ZO-2 juga memiliki dua *nuclear localization signals* pada domain PDZ-pertama dan domain GUK. Berbeda dengan protein-protein MAGUK lainnya namun serupa dengan ZO-1, ZO-2 memiliki sebuah daerah basa antara PDZ1 dan PDZ2 yang kaya akan residu arginin dan sebuah daerah asam yang kaya prolin yang berada di daerah terminal C dari domain GUK. Beberapa hasil penelitian mengungkapkan bahwa ZO-2 berkumpul di nukleus sel-sel epitel yang belum konfluen (subconfluent) dan berinteraksi secara langsung dengan beberapa protein inti, antara lain Fos, Jun, CCAAT/enhancer binding protein, dan DNA-binding protein scaffold attachment factor-B.

Protein ZO-3 berukuran 130 kDa, ditemukan terkoimmunopresipitasi bersama kompleks ZO-1/ZO-2. Dalam kompleks tersebut, ZO-3 terdapat dalam jumlah yang jauh lebih sedikit dibandingkan dengan ZO-1 dan ZO-2. Apakah ini disebabkan oleh ekstraktibilitas yang terbatas, perbedaan afinitas, atau mencerminkan perbedaan kuantitatif ekspresi protein-protein tersebut di dalam sel, masih belum dapat dijelaskan. ZO-3 memiliki homologi yang kuat dengan ZO-1 dan ZO-2, terutama pada domain GUK. Seperti ZO-1 dan ZO-2, ZO-3 memiliki 3 domain PDZ, sebuah daerah basa yang kaya arginin di antara PDZ1 dan PDZ2, sebuah domain SH3, dan sebuah domain GUK yang diikuti oleh sebuah domain bersifat asam. Berbeda dengan ZO-1 dan ZO-2 yang memiliki domain kaya prolin pada daerah C terminal, domain kaya prolin pada ZO-3 terletak di antara PDZ2 dan PDZ3. Secara keseluruhan dapat dikatakan,

bahwa tingkat homologi antara ZO-1 dan ZO-2 lebih tinggi dari pada tingkat homologi keduanya terhadap ZO-3.

Protein-protein ZO berperan sebagai protein *scaffolding* dan berinteraksi dengan berbagai protein di junction ketat, di antaranya protein-protein transmembran dan sitoskeleton (Gambar 1-7). ZO-1 dapat berikatan dengan ZO-2 dan ZO-3 melalui domain PDZ-2 nya. Kompleks ZO-1 dan ZO-2 dapat terbentuk di dalam sel-sel yang ditumbuhkan dalam media yang rendah kadar Ca^{2+} nya. Hasil penelitian imunopresipitasi mengindikasikan bahwa ZO-1, ZO-2 dan ZO-3 membentuk kompleks yang stabil. Kompleks ini ternyata juga dapat ditemukan pada sel-sel epitel yang *junction ketat* nya dirusak. Hasil-hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kompleks ZO-1/ZO-2/ZO-3 sudah terbentuk di situs *junctional* sebelum *junction* ketat terbentuk, dan setelah itu, masih ada mekanisme lain yang diperlukan untuk membentuk *junction* ketat.

Semua protein ZO dapat berinteraksi langsung dengan domain ujung karboksil dari kladin. Ujung C (karboksil) kladin ini berikatan dengan protein-protein ZO melalui domain PDZ pertama dari masing-masing protein ZO (Itoh, 1999). Protein-protein ZO kni juga dapat berikatan dengan singulin, protein sitoplasmik yang ditemukan di junction ketat. ZO-1 berikatan dengan ZONAB melalui domain SH3-nya.

Protein-protein ZO juga dapat berinteraksi dengan protein-protein sitoskeleton, misalnya dengan F-aktin dan protein pengikat aktin (actin-binding protein), serta menghubungkan protein-protein transmembran *junction ketat* dengan sitoskeleton aktin. Protein ZO-1 juga

ditemukan berinteraksi dengan protein-protein di junction adheren misalnya E-kadherin dan katenin. Begitu pula ZO-1 ditemukan termobilisasi ke kompleks adhesi sel yang dimediasi oleh nektin melalui interaksinya dengan afadin, suatu protein yang berikatan dengan F-aktin. Di samping itu ZO-2 juga dapat berikatan dengan protein membran lateral, hScrib, pada sel-sel epitel. Temuan-temuan ini mengindikasikan bahwa protein-protein ZO membentuk kompleks dengan protein-protein junction adheren pada sel-sel yang belum terpolarisasi dimana junction ketat belum terbentuk, tetapi ketika sel terpolarisasi, protein ZO akan terlepas dari junction adheren dan termobilisasi ke junction ketat, dimana protein-protein ini akan berikatan dengan protein-protein junction ketat, antara lain klaudin dan okludin.

Protein MAGI (Membrane-associated guanylate kinase inverted)

Protein-protein MAGI termasuk dalam kelompok MAGUK, tetapi memiliki 3 sifat yang membedakannya dengan protein-protein anggota MAGUK lainnya, yaitu: 1) domain GUK pada protein-protein MAGI berada di ujung amino (ujung N) bukan di ujung C seperti protein-protein MAGUK lainnya, 2) domain SH3 tidak ada tetapi digantikan oleh dua domain WW, modul interaksi protein-protein tipe lain yang mengikat peptide-peptida kaya prolin, dan 3) protein-protein MAGI memiliki lima domain PDZ, bukan satu atau tiga seperti protein-protein MAGUK lainnya.

Protein MAGI-1 dan MAGI-3 ditemukan dalam jumlah besar di jaringan-jaringan tubuh dewasa, sedangkan MAGI-2

terutama ditemukan di jaringan otak walaupun tetap ada ditemukan di jaringan-jaringan lain. Walaupun MAGI-1 ditemukan di junction ketat, tetapi protein ini juga berikatan dengan β -katenin dan ditemukan terikat dengan β -katenin di junction adheren dimana E-kadherin sebagai protein utamanya. Ikatan MAGI-1 dengan β -katenin ini makin kuat dalam sel-sel epitel yang tidak terpolarisasi karena kekurangan kalsium. Temuan-temuan ini mengindikasikan bahwa, sama seperti protein-protein ZO, protein MAGI-1 memiliki peran baik dalam junction adheren maupun junction ketat, dan bahwa interaksinya dengan protein-protein junction diregulasi oleh proses polarisasi sel. MAGI-1 juga dapat berikatan dengan dua protein pengikat aktin, yaitu synaptopodin dan α -actinin-4, dan interaksi ini dimediasi oleh domain WW-2 dan PDZ-5 dari MAGI-1. Hal ini merupakan indikasi bahwa MAGI-1 memainkan peran penting dalam dinamika aktin-skeleton pada sel-sel epitel terpolarisasi (47-50).

Protein-protein MAGI berperan pada berbagai peristiwa transduksi signal (Gambar 1-9). Protein-protein MAGI berinteraksi dengan protein supresor tumor PTEN melalui domain PDZ-2 nya dan membawa PTEN ke junction sel. Interaksi MAGI-2 dengan PTEN diregulasi melalui fosforilasi ujung C (karboksil) PTEN dan distabilkan oleh protein sitoskeleton, vinkulin. Rekrutmen PTEN oleh MAGI ke junction adheren E-kadherin tampaknya berperan menstabilkan junction ini dan menekan daya invasif sel yang diinduksi oleh Akt. Hal ini membawa dugaan bahwa protein MAGI berperan pada proses tumorigenesis. Keterlibatan protein MAGI dalam tumorigenesis dikuatkan oleh hasil

penelitian yang menunjukkan bahwa beberapa protein virus onkogen, misalnya E4-ORF dan E6 dari adenovirus tipe 9 dan juga dari human papillomavirus risiko tinggi, berinteraksi dengan protein-protein MAGI untuk menghancurkannya. Penelitian yang dilakukan Ohashi et al. pada tahun 2004 menunjukkan bahwa MAGI-3 berikatan dengan protein Tax1 dari human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1), interaksi ini diduga memainkan peran penting dalam pathogenesis penyakit-penyakit terkait HTLV-1 (51,52).

Singulin

Protein sitoplasma lain yang juga berperan dalam regulasi *junction ketat* adalah singulin. Singulin diidentifikasi pertama kali dengan teknik monoklonal antibodi dan kemudian dikarakterisasi lebih lanjut dengan pendekatan biokimia dan imunolokalisasi oleh Citi dan kawan-kawan. Singulin merupakan fosfoprotein berukuran 140-160 kDa, ditemukan secara spesifik pada permukaan sitoplasma *junction ketat* sel-sel epitel dan endotel. Melalui imunoelektron mikroskopi diketahui bahwa singulin terlokalisasi pada jarak yang lebih jauh dari membran *junctional* dibandingkan dengan ZO-1. Namun kehadirannya diperlukan pada zonula okluden fungsional. Diperkirakan, singulin berperan mengikatkan kompleks protein *junction ketat* ke sitoplasma (53-55).

Struktur singulin (diisolasi dari *Xenopus laevis*) memiliki domain kepala yang globular (residu 1-439), domain ekor (residu 1326-1368), dan domain batang heliks alfa (residu 440-1325) yang berada di tengah-tengah antara domain kepala dan ekor. Dari analisis sekuens dan mikroskopi

elektron diketahui bahwa domain batang ini berperan pada pembentukan dimer paralel coiled-coil, yang selanjutnya dapat teragregasi melalui interaksi intermolekuler. Singulin dapat berinteraksi dengan berbagai protein junction ketat dan sitoskeleton, antara lain including ZO-1, ZO-2, ZO-3, JAM-A, aktin, miosin, dan AF-6, menunjukkan bahwa singulin merupakan komponen *junction ketat* dan menghubungkan protein-protein junction ketat tersebut dengan sitoskeleton aktin-miosin.

Singulin memainkan peran penting pada regulasi transkripsi dan proliferasi sel. *Embryoid bodies* yang diturunkan dari *knockout mice* singulin menunjukkan perubahan tingkat ekspresi mRNA dari beberapa protein junction ketat, termasuk kladin dan okcludin. Singulin juga dapat menghambat aktivitas RhoA, yang diperlukan untuk progresi siklus sel, dengan jalan berikatan dengan protein RhoA GEF, yaitu GEF-H1/Lfc. Fakta ini menunjukkan bahwa singulin berperan pada pembentukan junction ketat melalui regulasi transkripsi ekspresi protein junction ketat dan melalui downregulasi aktivitas RhoA menghambat progresi fase G1/S (18,56).

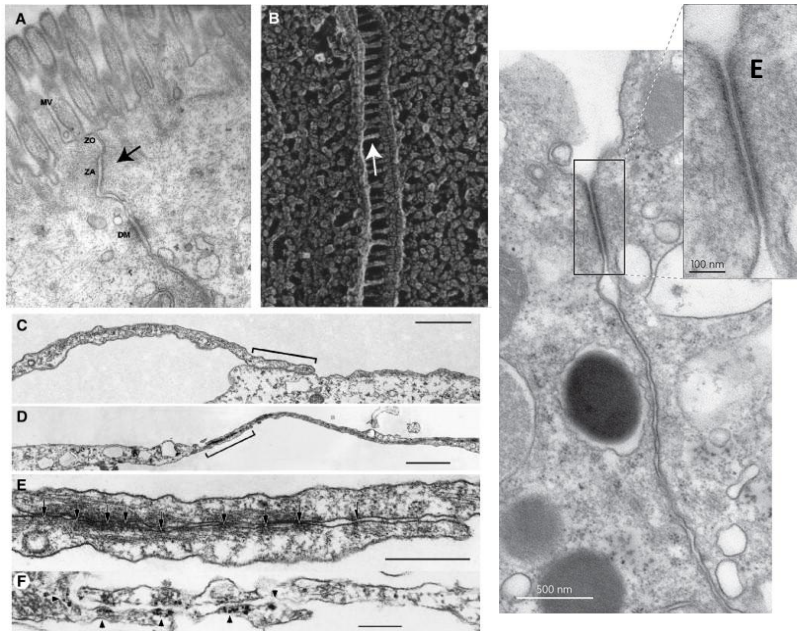
Beberapa protein lain yang terasosiasi pada kompleks zonula okluden telah pula diidentifikasi, antara lain protein 7H6 (155-175 kDa), RAB3B (25 kDa), simplekin (150 kDa), AF-6 (180-195 kDa), 19B1 (210 kDa), serta protein-protein sitoskeleton, aktin dan spektrin. Beberapa dari protein-protein ini, misalnya 7H6 dan simplekin hanya ditemukan pada *junction ketat* sel-sel epitel yang terpolarisasi, namun tidak terdapat pada sel-sel endotel. Kehadiran masing-masing protein ini di *junction* antar sel

mempunyai korelasi positif dengan fungsi sawar biologis dari jaringan epitel [108].

2. *Junction adheren*

Junction adheren adalah salah satu bagian dari *junction* antar sel, terletak di antara *junction ketat* dan desmosom (Gambar 1-5 dan 1-13). *Junction* ini terdapat pada berbagai tipe sel, dan ditemukan pada berbagai spesies hewan termasuk manusia. Zonula ini memegang peran penting dalam berbagai proses biologis embriogenesis dan homeostasis jaringan, antara lain inisiasi dan stabilisasi adhesi sel, regulasi sitoskeleton aktin, signaling intraseluler, dan regulasi transkripsi. Gangguan pada pembentukan kompleks zonula adheren akan menyebabkan sel-sel epitel atau endotel gagal membentuk jaringan atau lapis sel yang kokoh (1,57-61).

Beberapa hasil penelitian menunjukkan secara konklusif bahwa *junction ketat* sangat dipengaruhi oleh *junction adheren*. Antibodi terhadap E-kadherin, salah satu protein yang membentuk kompleks zonula adheren, ternyata dapat menghambat pembentukan *junction ketat*. Diperkirakan, setelah kontak membran sel berlangsung, proses adhesi sel akan berlangsung terlebih dahulu, baru kemudian diikuti oleh pembentukan *junction* ketat. Setelah *junction* ketat terbentuk pun, integritasnya masih tetap sangat bergantung pada integritas zonula adheren. Gangguan terhadap integritas zonula adheren atau terhadap sistem adhesi sel, akan berakibat pada terganggunya integritas *junction ketat*.



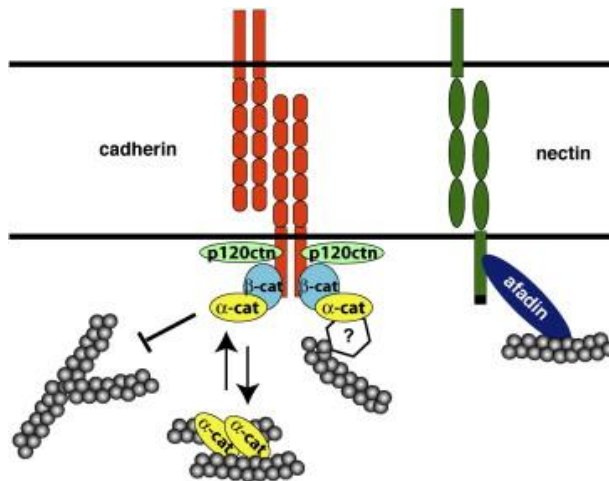
Gambar 1-13. Gambaran ultrastruktur junction adheren. A. Mikrograf electron transmisi zonula adheren (ZA) dikemukakan oleh Farquhar dan Palade (1) sebagai bagian dari kompleks junction tripartit dimana ZA (panah hitam) berada di antara *junction ketat* atau zonula okluden (ZO) dan desmosom (DM). B. Gambaran quick-freeze dari junction adherens. C. Kontak tanpa struktur plak electron. D dan E. Daerah kontak pada perbesaran rendah (D) dan tinggi (E) mengungkapkan adanya junction adherens. F. Pelabelan *immunogold* memperlihatkan β -katenin dalam jumlah besar pada junction adherens.

Ultrastruktur junction adheren pertama kali dikarakterisasi oleh Farquhar dan Palade (1) sebagai struktur khas membran plasma yang terdapat pada kontak antar sel. Melalui mikroskop elektron kedua peneliti ini

memperlihatkan junction adheren sebagai daerah dimana membran sel tampak berada paralel pada daerah interseluler selebar $\sim 200 \text{ \AA}$ (10-20 nm) dan membentang sepanjang 0,2-0,5 μm (Gambar 1-13A). Mikroskopi elektron dengan teknik "deep-etch" mengungkapkan bahwa pada daerah antar sel di junction adheren terdapat banyak struktur seperti batang atau silinder yang muncul dari membran sel dan menghubungkan kedua sel yang bersebelahan (Gambar 1-13B). Pada sel-sel epitel, junction adheren tampak seperti sabuk yang melingkari membran sel, oleh sebab itu junction adheren pada sel epitel seringkali disebut zonula adheren, artinya sabuk tempat adhesi sel (zonula = sabuk). Tetapi pada tipe sel yang lain, morfologinya dapat berbeda, misalnya pada fibroblast tampak seperti titik-titik (spotty) dan diskontinyu, sedangkan pada sel-sel neuron tampak seperti titik kecil sebagai bagian dari junction sinaps.

Secara struktural junction adheren tersusun oleh dua unit dasar, yaitu kompleks kadherin-katenin dan kompleks nektin-afadin (Gambar 1-14). Unit junction adheren yang mula-mula ditemukan dan sudah banyak dipelajari adalah kompleks kadherin-katenin. Kompleks ini berperan dalam adhesi sel tergantung kalsium. Dahulu, sebelum tahun 2000-an para ahli mengira bahwa junction adheren hanya disusun oleh kompleks kadherin-katenin. Namun, pada tahun 2000-an banyak penelitian mengungkapkan peran satu kompleks protein lagi dalam junction adheren, yaitu kompleks nektin-afadin. Walaupun peran dan mekanisme interaksinya dalam junction adheren belum sepenuhnya dapat dijelaskan, namun penelitian tentang kompleks nektin-afadin ini makin banyak dilakukan karena fungsi biologisnya yang cukup

signifikan. Kompleks nektin-afadin ini berperan pada adhesi sel yang tidak tergantung kalsium. Baik kadherin maupun nektin merupakan kelompok protein yang memiliki banyak anggota. Ekspresi spesifik-sel dari kadherin dan nektin sudah dibuktikan menentukan kekuatan dan spesifisitas adhesif junction adheren.



Gambar 1-14. Dua kompleks utama junction adheren, yaitu kompleks kadherin-katenin dan kompleks nektin-afadin, serta potensi interaksi masing-masing dengan aktin (Niessen, 2007).

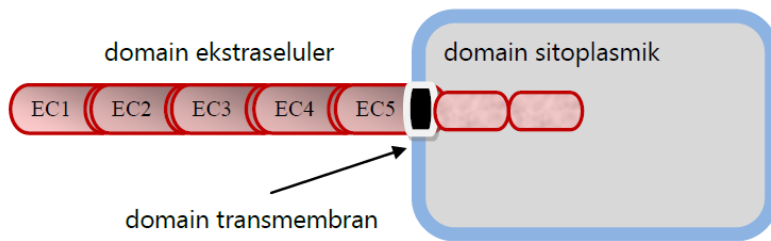
Kompleks kadherin-katenin

Protein utama yang berperan dalam kompleks ini adalah kadherin. Kadherin merupakan satu kelompok glikoprotein transmembran, yang secara umum dapat dibagi menjadi 4 subkelompok, yaitu: kadherin klasik, protokadherins, desmoglein, dan desmokolin. Kadherin yang berperan dalam junction adheren adalah kadherin klasik. Semua protein anggota kelompok kadherin ini memiliki ciri khas, yaitu

adanya "*cadherin-repeat*" pada tiap-tiap protein tersebut. "*Cadherin-repeat*" ini adalah sekuens berulang yang merupakan domain pengikatan untuk ion kalsium, dan berada pada domain ekstraseluler. Golongan kadherin klasik meliputi senyawa-senyawa kadherin yang lebih dahulu dikenal, yaitu E-kadherin, N-kadherin dan P-kadherin. Molekul-molekul kadherin klasik mempunyai peran yang penting dalam berbagai proses biologi, antara lain dalam pembentukan *junction* antar sel, morfogenesis dan diferensiasi sel, adhesi sel dan bahkan juga berperan dalam invasi bakterial, serta perkembangan tumor dan metastasis. E-kadherin ditemukan pada *junction* antar sel berbagai jenis sel, antara lain sel intestinal, hepar, ginjal, pada hampir semua sel-sel epitel dan pada sel-sel endotel kapiler, sedangkan N-kadherin ditemukan pada akson optik, sel-sel neuroepitel, jaringan otot dan beberapa jaringan epitel lainnya. N-kadherin berperan dalam pertumbuhan neurit pada astrosit, pada promosi ekstensi akson retinal serta pada pertumbuhan dan perkembangan sistem saraf pusat. Dalam jaringan susunan saraf pusat vertebrata ditemukan lebih dari 10 jenis kadherin, termasuk E-kadherin (61-66).

Senyawa-senyawa kadherin klasik, tersusun oleh 723-748 asam amino (120 KD). Rantai polipeptidanya dapat dibagi menjadi 3 domain, yaitu domain ekstraselular yang berada pada ujung amino peptida, domain sitoplasmik yang berada pada ujung karboksil dan satu domain transmembran yang terdapat di antara dua domain yang disebutkan terdahulu. Bagian ekstraseluler kadherin ini yang umumnya tersusun oleh 3 sampai 5 *repeat* ("pengulangan sekuens"). Masing-masing *repeat* tersebut biasanya diberi nama EC-1 sampai

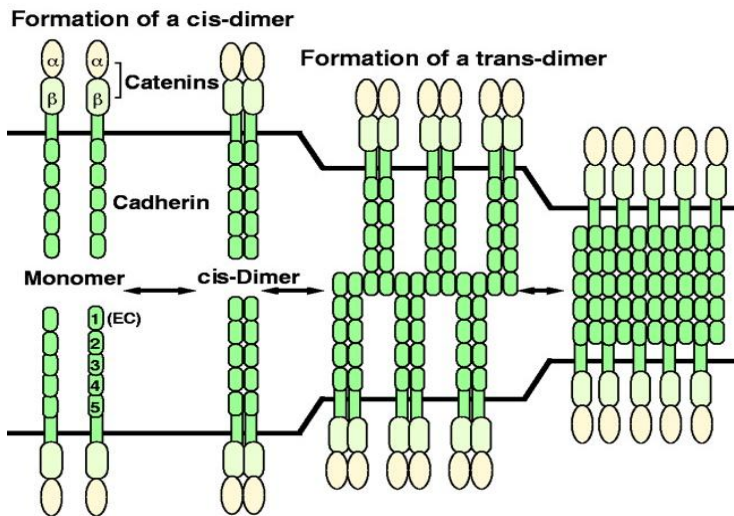
EC-5, EC-1 adalah domain yang berada paling ujung amino dari rantai polipeptida (Gambar 1-15). Pada kadherin fungsional, domain ekstraseluler ini mula-mula berinteraksi membentuk dimer *cis* antar molekul-molekul kadherin yang terdapat dalam satu sel, dan kemudian membentuk dimer *trans* antar molekul-molekul kadherin yang terdapat pada dua sel yang berdekatan (Gambar 1-16). Pembentukan dimer *cis* ini esensial bagi pembentukan dimer *trans*.



Gambar 1-15. Struktur primer kadherin dapat dibagi menjadi 3 domain, yaitu domain ekstraseluler yang terdiri dari 3-5 *repeat*, domain transmembran dan domain sitoplasmik

Molekul-molekul kadherin berbagai tipe atau satu tipe kadherin yang terdapat pada berbagai spesies memiliki homologi yang tinggi satu sama lain, yaitu sekitar 50%. Bagian yang paling dikonservasi adalah domain sitoplasmik, diikuti oleh bagian ujung amino dari domain ekstraseluler. Konservasi sekuens ini diperkirakan ada hubungannya dengan fungsi biologis kadherin. Pada domain ekstraseluler ditemukan beberapa *repeat* yang khas, misalnya sekuens LDRE (lisin-aspartat-arginin-glutamat) dan DXDN (aspartat-apartat-asparagin). Sekuens ini ditemukan baik pada domain EC-1, EC-2, maupun EC-3, tanpa atau hanya dengan sedikit modifikasi. Sekuens LDRE dan DXDN merupakan situs

pengikatan kalsium. Domain EC-1 juga mengandung sekuens HAV (histidin-alanin-valin) yang sangat dikonservasi pada berbagai tipe kadherin. Beberapa hasil penelitian telah membuktikan pentingnya peran sekuens HAV ini pada manifestasi fungsi kadherin. Selain itu juga ditemukan sekuens yang tersusun oleh empat residu sistein yang sangat dikonservasi pada semua tipe kadherin. Sekuens ini berada pada domain ekstraseluler yang berada di dekat membran plasma.



Gambar 1-16. Pembentukan dimer *cis* antar molekul-molekul kadherin yang terdapat dalam satu sel, dan dimer *trans* antar molekul-molekul kadherin yang terdapat pada dua sel yang berdekatan (63)

Di junction adheren, molekul-molekul kadherin membentuk kompleks dengan α - dan β -katenin, serta

dengan p120-katenin. Baik p120-katenin maupun β -katenin berinteraksi langsung dengan kadherin melalui "repeat armadillo", sedangkan α -katenin berinteraksi melalui β -katenin (Gambar 1-14). Plakoglobin, yang juga dikenal sebagai γ -katenin, adalah senyawa yang strukturnya sangat mirip dengan β -katenin, sekitar 60% homologi. Plakoglobin dapat menggantikan β -katenin dalam pembentukan kompleks kadherin-katenin, walaupun peran utamanya adalah dalam pembentukan desmosom.

Pengikatan β -katenin pada kadherin diperkirakan sangat penting artinya dalam adhesi sel, terutama karena β -katenin merupakan jembatan penghubung interaksi antara kompleks kadherin dengan sitoskeleton aktin yang berlangsung melalui α -katenin. Kemampuan ini menyebabkan β -katenin memiliki fungsi yang penting dalam mediasi perubahan-perubahan yang diinduksi oleh signal pada kontak adhesi kadherin. β -katenin dapat berikatan langsung dengan berbagai protein signal, misalnya: reseptor EGF atau enzim-enzim fosfatase tirosin. Demikian pula, fosforilasi tirosin dari kompleks kadherin-katenin yang diinduksi oleh *growth factor* (GF) diperkirakan memiliki hubungan dengan perubahan adhesi antar sel seiring dengan perubahan komposisi kompleks. Studi *in vitro* menggunakan mutan fusi kadherin- α -katenin juga menunjukkan peran β -katenin dalam regulasi motilitas antar sel. Namun demikian, ternyata baik studi *in vitro* maupun *in vivo* tidak dapat membuktikan peran β -katenin dalam regulasi adhesi sel. Sehingga, signifikansi peran β -katenin dalam regulasi adhesi sel masih diperdebatkan. Karena β -katenin merupakan pemeran utama dalam Wnt signaling, suatu jalur signaling yang meregulasi

determinasi nasib sel, maka beberapa peneliti berspekulasi bahwa peran β -katenin dalam junction adheren kemungkinan berkaitan dengan koordinasi pergerakan morfogenetik dengan determinasi nasib sel. Hal ini dikuatkan oleh beberapa hasil penelitian yang menunjukkan saling pengaruh dan hubungan yang dekat antara adhesi antar sel dan Wnt signaling.

P120-katenin adalah anggota keluarga protein yang memiliki *repeat* Armadillo, termasuk di antaranya δ -katenin, ARVCF (Armadillo-Repeat gene deleted in Velo-Cardio Facial syndrome), dan plakofilin. Interaksi kadherin dengan p120-katenin sangat penting untuk stabilitas permukaan sel melalui regulasi endositosis. Tanpa p120-katenin ekspresi permukaan sel akan sangat direduksi. P120-katenin juga terbukti berperan sebagai regulator dan integrator utama dalam proses signaling oleh kelompok protein Rho dan GTPase kecil, dan ini paling tidak secara parsial bergantung pada interaksinya dengan kadherin. Jadi, secara spesifik dapat dikatakan bahwa pembentukan ikatan p120-katenin dan kadherin berperan sangat penting dalam mengubah adhesi sel yang lemah menjadi adhesi sel yang lebih kuat dan kompak, kemungkinan melalui efeknya terhadap *clustering* kadherin dan penyusunan aktin. Berbeda dengan α -katenin yang dapat langsung mempengaruhi aktin dengan jalan berikatan langsung, p120-katenin tidak dapat berikatan langsung dengan aktin, sehingga mekanisme regulasinya terhadap dinamika aktin berlangsung melalui penghambatan Rho. Secara ringkas dapat disimpulkan bahwa kompleks inti kadherin-katenin terdiri dari komponen-komponen yang memediasi pengenalan homofilik melalui celah antar sel

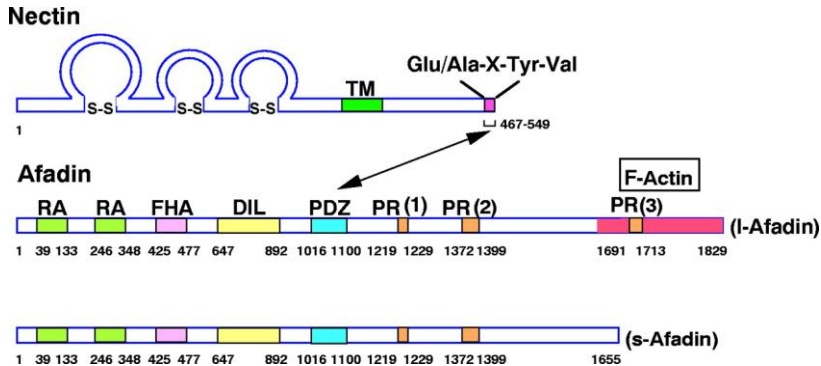
(kadherin), asosiasi aktin (α -katenin) dan/atau regulasi dinamika aktin (p120-katenin/ α -katenin), dan stabilisasi kompleks pada permukaan sel (p120-katenin/ β -katenin) (67-71).

Kompleks nektin-afadin

Nektin adalah satu keluarga besar protein adhesi sel yang strukturnya menyerupai imunoglobulin (IgG-like protein). Berbeda dengan kadherin yang adhesi selnya bergantung pada ion kalsium, nektin memediasi adhesi sel yang tidak bergantung ion kalsium. Keluarga protein nektin dibagi menjadi empat kelompok, yaitu, Nektin-1 sampai Nektin-4. Nektin-1, nektin-2 dan nektin-3 ditemukan di berbagai tipe sel, termasuk fibroblast, sel-sel epitel, dan neuron. Nektin-2 dan nektin-3 juga diekspresikan oleh sel-sel yang tidak mengekspresikan kadherin, misalnya sel-sel B, monosit, dan spermatida. Nektin-4 terutama diekspresikan di sel-sel plasenta. Semua protein nektin memiliki tiga domain ekstraseluler yang menyerupai imunoglobulin - itu sebabnya kelompok protein ini dimasukkan dalam keluarga *Ig-like protein* -, satu domain heliks transmembran, dan satu domain intraseluler yang memiliki motif pengikatan PDZ pada ujung karboksilnya (Gambar 1-17).

Sekuens protein nektin dikonservasi mulai dari manusia sampai hewan pengerat (rodents). Protein ini juga memiliki holomogi yang tinggi dengan reseptor poliovirus manusia (human PVR = human poliovirus receptor). Semua protein anggota keluarga nektin, kecuali nektin-1 β , nektin-1 γ , nektin-3 γ dan nektin-4, memiliki motif empat residu asam amino (Glu/Ala-X-Tyr-Val) yang dapat berikatan dengan

domain PDZ afadin yang berada di ujung karboksil sitoplasmiknya (Gambar 1-17). Walaupun nektin-4 tidak memiliki motif ini, tetapi ternyata juga tetap dapat mengikat afadin pada domain PDZ nya (63,72-76).

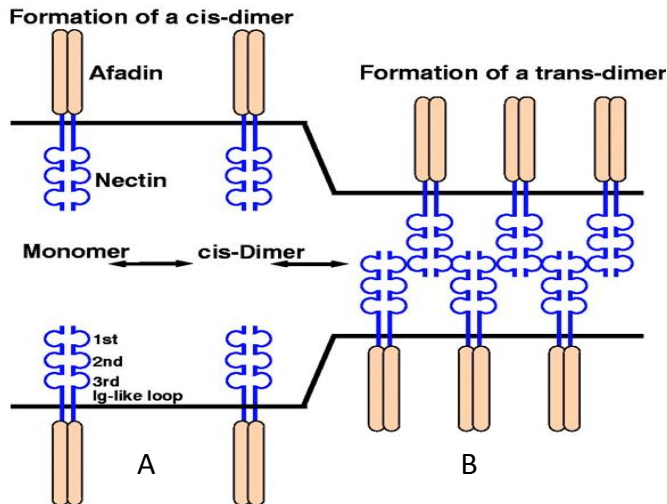


Gambar 1-17. Struktur molekul nektin dan afadin (63)

Domain ekstraseluler nektin dapat membentuk homodimer lateral (dimer cis homofilik) yang kemudian dapat membentuk dimer trans, baik secara homofilik maupun heterofilik, dengan molekul nektin yang lain atau dengan reseptor yang strukturnya menyerupai nektin (Gambar 1-18). Interaksi trans heterofilik lebih kuat ikatannya dibandingkan dengan interaksi trans homofilik (77).

Domain intraseluler nektin dapat berikatan dengan *scaffold protein* yang disebut afadin, yang kemudian menghubungkannya dengan sitoskeleton (Gambar 1-14). Afadin mula-mula dikenal sebagai partner fusi dari ALL-1, protein translokasi yang ditemukan dalam beberapa tipe leukemia myeloid akut. Di samping memiliki domain PDZ

(Gambar 1-17), afadin juga memiliki dua domain pengikat Ras/Rap, sebuah *dilute domain*, sebuah forkhead-associated domain, dan tiga daerah kaya prolin (pada manusia dua), yang menunjukkan fungsi integrator sinyal pada junction adheren. Sebuah varian afadin yang berukuran kecil, S-Afadin, tidak memiliki domain pengikat aktin. Tidak seperti protein afadin yang berukuran lebih panjang, *knockdown* dari varian kecil ini tidak berpengaruh pada adhesi antar sel (78).



Gambar 4-18. Pembentukan homodimer lateral (dimer cis homofilik) yang diikuti oleh pembentukan dimer trans, baik secara homofilik (A) maupun heterofilik (B), dengan molekul nektin yang lain atau dengan reseptor yang strukturnya menyerupai nektin

Adhesi sel yang dimediasi oleh nektin berperan dalam berbagai tipe junction sel, tidak saja berdiri sendiri tetapi juga bekerja sama dengan molekul-molekul adhesi sel yang

lain. Misalnya, sudah terbukti bahwa adhesi sel yang dimediasi oleh nektin menginduksi pembentukan junction adheren pada fibroblast dan sel-sel epitel serta pada junction sinaps di sel-sel syaraf, dengan bekerja sama dengan kadherin. Nektin juga berperan dalam pembentukan junction ketat sel-sel epitel. Ekor sitoplasmik dari molekul nektin berikatan langsung dengan afadin, sebuah protein pengikat filament aktin (F-aktin), dan protein polaritas sel Par-3. Secara tidak langsung domain sitoplasmik nektin berinteraksi dengan berbagai protein perifer, antara lain α -katenin, protein-protein ZO, aneksin II, dan IQGAP1. Interaksi nektin dengan berbagai protein ini merupakan hal yang penting dan mutlak dalam pembentukan junction adheren dan *junction ketat* ((62,63,77,79).

Interaksi kompleks kadherin-katenin dan nektin-afadin dalam pembentukan junction adheren

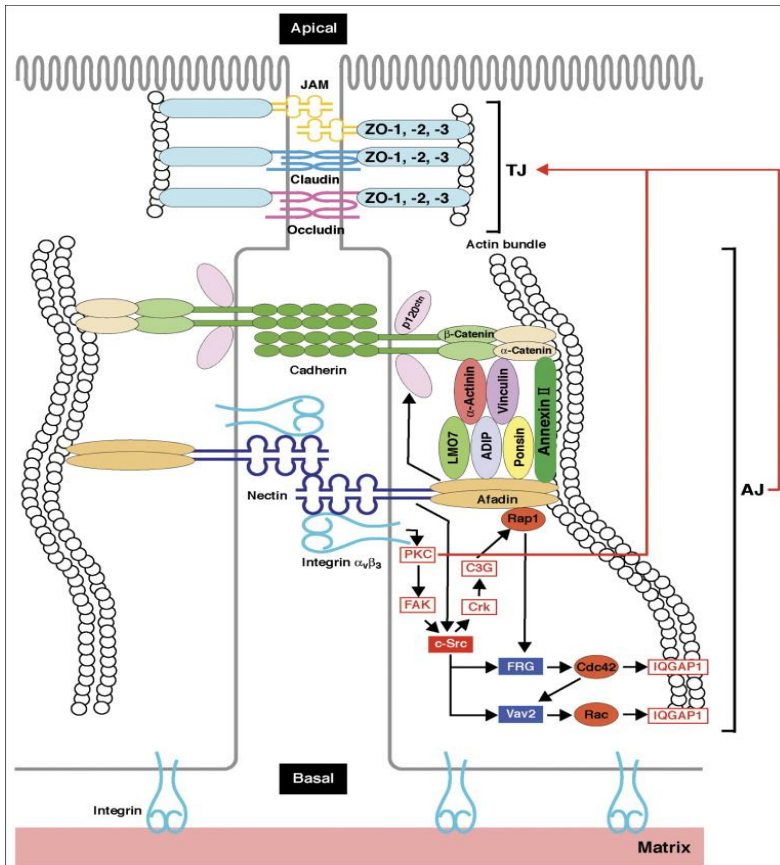
Kerjasama atau interaksi kedua kompleks utama di junction adheren sampai saat ini masih merupakan hal yang sangat menarik untuk diteliti, karena belum sepenuhnya terungkap. Namun demikian berbagai hasil penelitian sudah mulai dapat mengungkapkan interaksi kedua kompleks protein pada junction adheren ini. Diperkirakan mula-mula kompleks nektin-afadin akan terbentuk dan memediasi terjadinya adhesi sel. Kompleks nektin-afadin ini yang kemudian akan membawa atau merekrut kadherin ke situs adhesi yang dimediasinya, dan akhirnya membentuk junction adheren. Interaksi antara nektin dengan afadin merupakan faktor esensial untuk rekrutmen kadherin ke situs adhesi sel.

Mekanisme molekuler interaksi fisik antara kadherin dan nektin memang belum sepenuhnya difahami, tetapi baik afadin maupun α -katenin tampaknya merupakan faktor esensial untuk terjadinya interaksi ini. Beberapa hasil penelitian membuktikan bahwa secara *in vitro* afadin dapat berikatan langsung dengan α -katenin (62,74,79,80). Juga telah diidentifikasi tiga unit konektor untuk asosiasi kadherin dan nektin, yaitu unit ponsin-vinkulin, ADIP- α -aktinin, dan LMO7- α -aktinin. Ponsin tampaknya berinteraksi dengan kompleks kadherin-katenin melalui vinkulin, sebab vinkulin adalah protein pengikat F-aktin dan α -katenin. ADIP diduga berikatan dengan kompleks kadherin-katenin melalui α -aktinin, sebab α -aktinin adalah protein pengikat F-aktin dan α -katenin. LMO7 juga diperkirakan berikatan dengan kompleks kadherin-katenin melalui α -aktinin. Sebaliknya, nektin menginduksi aktivasi Rap1, Cdc42, dan *Rac small G proteins* melalui c-Src. Cdc42 dan Rac menyusun ulang sitoskeleton aktin yang bergantung IQGAP1 (IQGAP1-dependent actin cytoskeleton), yang kemudian akan merekrut molekul kadherin yang belum membentuk dimer trans ke situs adhesi sel yang dimediasi oleh nektin. Rap1 akan berikatan dengan afadin, dan kemudian berikatan dengan p120-katenin yang terikat pada kadherin yang belum membentuk dimer trans. Interaksi afadin dengan p120-katenin ini akan mencegah terjadinya endositosis molekul kadherin yang belum membentuk dimer trans dan memacu akumulasi kadherin tersebut di situs adhesi sel yang dimediasi nektin dan situs aktivitas adhesi sel kadherin, dan akhirnya membentuk junction adheren (77,81,82). Cdc42 yang diaktifkan dengan cara ini akan meningkatkan jumlah

filopodia dan situs adhesi sel, sedangkan aktivasi Rac akan menginduksi pembentukan lamellipodia dan secara efisien akan mengunci adhesi sel antara filopodia seperti sebuah ritsleting (77). Jadi nektin meregulasi organisasi sitoskeleton aktin perifer melalui dua cara: pertama melalui protein pengikat F-aktin yang berasosiasi dengan nektin dan kadherin, seperti afadin, α -katenin, α -aktinin, dan vinkulin; yang kedua melalui Rap1, Cdc42, dan Rac melalui efektor *downstream*-nya. Sitoskeleton aktin yang direorganisasi dengan cara ini selanjutnya akan memfasilitasi pembentukan junction adheren dan memperkuat aktivitas adhesi sel pada junction adheren. Skema jaringan kerja protein-protein pada junction adheren ini diperlihatkan pada gambar 1-19.

Desmosom

Desmosom atau macula adheren berada di arah basolateral dari junction adheren (Gambar 1-5). Selain pada sel-sel epitel, desmosom juga ditemukan pada sel-sel Purkinje dan otot jantung, pada sel-sel meningeal dan pada sel-sel retikulum dendrit folikular nodus limfe. Desmosom merupakan bagian *junction* interselular yang berfungsi memperantarai proses adhesi sel yang kuat. Beberapa laporan penelitian menyebutkan bahwa adhesi sel desmosomal sebenarnya lebih kuat dari pada yang diperantarai oleh zonula adheren. Akan tetapi ada pula yang berpendapat bahwa ada kemungkinan pembentukan desmosom harus didahului oleh pembentukan zonula adheren. Selain berperan dalam adhesi sel, desmosom juga berperan pada transduksi signal antar sel (83-85).

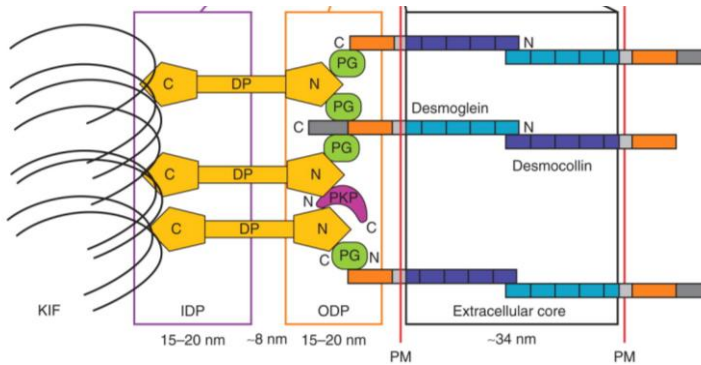


Gambar 1-19. Skema jaringan kerja protein-protein di junction adheren. Pembentukan dan stabilisasi junction adherens selanjutnya akan menstabilkan pembentukan junction ketat (77)

Berbeda dengan adhesi sel yang diperantari oleh kadherin, adhesi desmosomal tampaknya tidak sepenuhnya bergantung pada ketersediaan Ca^{2+} ekstraseluler. Pada jaringan atau lapis sel yang konfluen, penurunan konsentrasi Ca^{2+} ekstraseluler sampai batas tertentu tidak merusak

desmosom, walaupun kompleks-kompleks *junction* antar sel lainnya sudah rusak. Namun demikian, pembentukan desmosom tetap membutuhkan ketersediaan Ca^{2+} . Tampaknya, ketergantungan pada Ca^{2+} hanya terjadi pada masa inisiasi adhesi. Setelah konfluensi tercapai, adhesi sel yang diperantarai oleh desmosom tampaknya tidak lagi bergantung pada Ca^{2+} . Perubahan sifat ketidaktergantungan-ketergantungan desmosom pada Ca^{2+} yang menarik ini tampak pada proses penyembuhan luka. Apabila terjadi luka, sel-sel epitel yang berada di tepi (di tempat luka) akan segera mengubah sifat dari tidak bergantung menjadi bergantung pada Ca^{2+} untuk membentuk kompleks desmosom.

Komposisi protein pada desmosom bervariasi antar jaringan dan antar spesies. Namun demikian, dapat dikatakan bahwa komponen utama kompleks desmosom adalah glikoprotein-glikoprotein transmembran yang termasuk subfamili desmoglein (Dsg) dan desmokolina (Dsc), serta protein-protein sitoplasma seperti desmoplakin dan plakoglobin (Gambar 1-20). Setiap desmosom pasti mengandung desmoplakin, plakoglobin dan paling tidak satu isoform plakofilin dan satu isoform kadherin desmosom yang disebut desmokolina dan desmoglein. Desmosom juga dapat memiliki beberapa protein tambahan/asesoris. Beberapa protein asesoris esensial untuk fungsi adhesifnya pada jaringan tertentu, misalnya protein Perp dan korneodesmosin, sedangkan yang lain tidak atau belum diketahui fungsinya, misalnya protein armadillo p0071 (86-88).



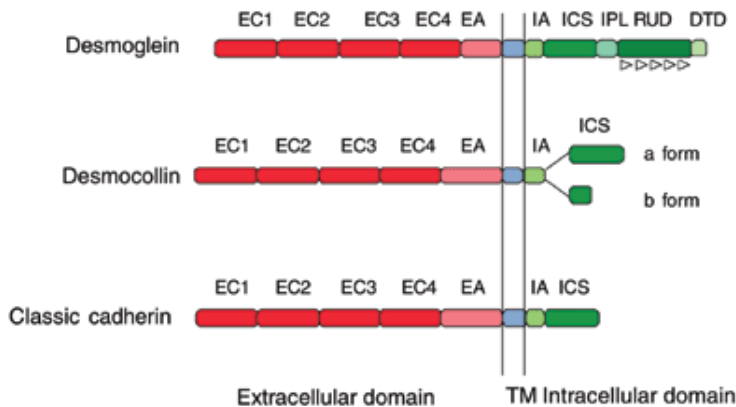
Gambar 1-20. Jaringan protein-protein penyusun desmosom (Dikutip dari Delva et al, 2009)

Desmoglein dan desmokolin

Desmoglein dan desmokolin dimasukkan ke dalam superfamili kadherin, sebab struktur domain ekstraselulernya mirip dengan struktur kadherin (89). Sama seperti kadherin klasik N- atau E-kadherin, desmoglein dan desmokolin merupakan protein transmembran dengan satu domain ekstraseluler yang merupakan ujung amino (ujung N), satu domain transmembran, dan satu domain intraseluler yang merupakan ujung karboksil (ujung C) (Gambar 1-21).

Baik desmoglein dan desmokolin maupun kadherin klasik memiliki lima repeat pada domain ekstraselulernya, yaitu EC-1 sampai EC-5 (EC-5 = EA = extracellular anchor domain), yang merupakan situs pengikat kalsium. Namun demikian, domain intraseluler ketiga kelompok protein ini berbeda, domain intraseluler desmoglein jauh lebih panjang dibandingkan dengan desmokolin ataupun kadherin klasik. Selain memiliki sekuens IA (intracellular anchorage) dan ICS (intracellular cadherin-like sequence) yang homolog di antara ketiganya, desmoglein juga memiliki sebuah linker kaya

prolin (intracellular proline-rich linker=IPL), sebuah domain unit berulang atau repeating unit domain (RUD) yang berada di dekat ujung karboksil, dan sekuens DTD yang kaya glisin yang berada di ujung karboksil intraseluler. RUD tersusun oleh beberapa unit berulang yang masing-masingnya terdiri dari 29 asam amino. RUD pada Dsg1 tersusun oleh 5 unit berulang, sedangkan Dsg2 6 unit, Dsg3 2 unit, dan Dsg4 3 unit. Walaupun domain ICS sudah diketahui merupakan tempat pengikatan berbagai protein, antara lain plakoglobin, namun fungsi dari domain-domain yang lain pada desmoglein belum diketahui dengan jelas. Empat dari lima unit berulang pada Dsg1 manusia diketahui mengandung sekuens yang memiliki potensi kuat untuk fosforilasi PKC, yang sekuensnya dikonservasi pada sapi, tikus, dan anjing.



Gambar 1-21. Perbandingan struktur protein-protein kadherin desmosom (desmoglein dan desmokolin) dengan kadherin klasik (Ishii, 2007). (EC=cadherin repeat, EA= extracellular anchorage, IA=intracellular anchorage, ICS= intracellular cadherin-like sequence, IPL= intracellular proline-rich linker, RUD= repeating unit domain, DTD= desmoglein terminal domain, TM=transmembrane domain).

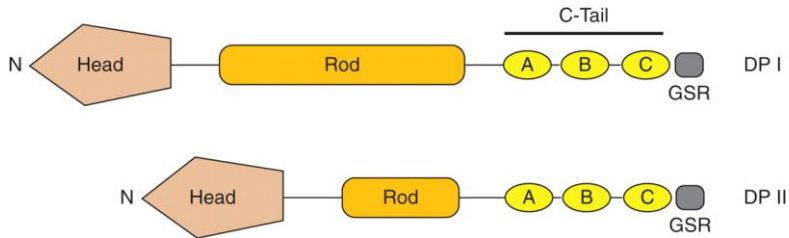
Dari subfamili desmoglein telah dapat diisolasi dan diidentifikasi 4 isoform, yaitu Dsg1 sampai dengan Dsg4, sedangkan dari subfamili desmokolin telah diidentifikasi 3 isoform, yaitu Dsc1 sampai dengan Dsc3. Masing-masing gen desmokolin mengkode sepasang protein yang berbeda pada panjang sekuens ekor ujung karboksilnya, yaitu "bentuk a" dan "bentuk b" (Gambar 1-20). Kedua bentuk ini masing-masing memiliki sekuens IA, tetapi hanya bentuk a yang memiliki domain ICS. Dsc2 dan Dsg2 diekspresikan oleh semua sel-sel yang mengekspresikan desmosom, tetapi protein-protein desmoglein dan desmokolin lainnya terutama ditemukan pada sel-sel epitel berlapis. Jadi, desmosom pada sel-sel usus dan jantung misalnya, hanya memiliki Dsg2 dan Dsc2. Di dalam jaringan epidermis, ketujuh macam protein kadherin desmosom ini dapat ditemukan (84,89,90).

Desmoplakin

Desmoplakin adalah protein sitoplasma yang bertanggung-jawab pada interaksi kompleks desmosom dengan filamen intermediet pada sitoskeleton. Saat ini paling tidak ada dua isoform yang sudah diidentifikasi, yaitu DpI dan DpII (90).

Struktur desmoplakin dapat dibagi menjadi 3 bagian, yaitu bagian kepala yang globular, bagian ekor yang tersusun dari 3 repeat, dan bagian tengah berupa batang (Gambar 1-22). Bagian tengah dari struktur desmoplakin diperkirakan merupakan tempat ikatan terjadinya dimerisasi molekul-molekul desmoplakin. Struktur DpI dan DpII hanya

berbeda pada panjang sekuens pada domain batang yang terdapat di bagian tengah ini.



Gambar 1-22. Desmoplakin memiliki 3 domain repeat (A, B, dan C). Dua isoform desmoplakin, DPI dan DPII, hanya berbeda pada panjang sekuens batang (rod) yang terletak ditengah. GSR=sekuens kaya glisin-serin-arginin (dikutip dari Delva et al, 2009)

Domain bagian kepala desmoplakin yang globular, atau disebut juga domain plakin, merupakan sekuens yang penting untuk interaksi antar protein, domain ini terdiri dari dua pasang repeat spektrin yang dipisahkan oleh domain Src-homology-3 (91). Bagian ujung karboksil desmoplakin terdiri dari tiga domain repeat plakin (PRD=plakin repeat domain), yaitu domain A, B, dan C. Masing-masing repeat ini terdiri dari 4,5 kopi motif 38 asam amino. Domain B dan C, yang memiliki kesamaan sekuens 29%, merupakan struktur globular yang masing-masing memiliki struktur cekungan yang tampaknya merupakan tempat pengikatan filament intermediate. Pada bagian ujung karboksil desmoplakin terdapat domain GSR, yaitu domain yang kaya akan glisin-serin-arginin. Fosforilasi serin pada domain ini dapat meregulasi kemampuan desmoplakin untuk berinteraksi dengan filament intermediate (90,91). Desmoplakin diketahui

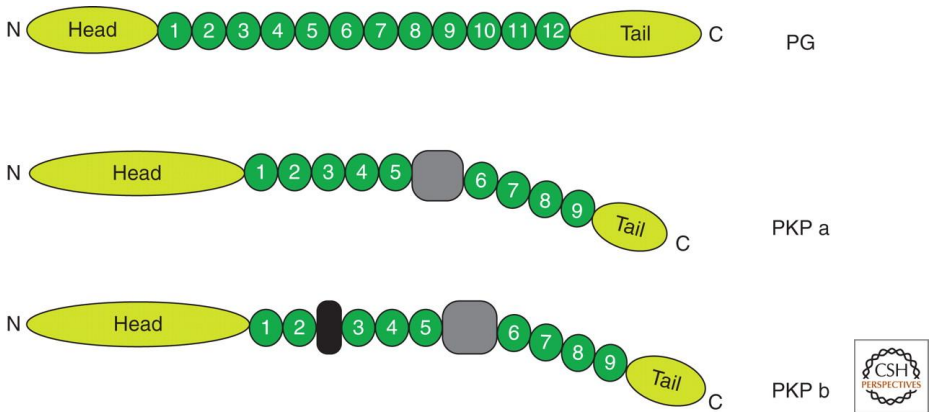
dapat berinteraksi dengan filamen intermediat keratin dalam sel-sel epitel, filamen intemediat desmin di sel-sel kardiomiosit, dan filamen intermediat vimentin di sel-sel dendrit folikuler. Domain ujung karboksil dari desmoplakin berikatan dengan filamen intermediat, oleh sebab itu diperkirakan ujung aminonya akan berikatan dengan domain sitoplasmik dari glikoprotein-glikoprotein desmosom yang berada di membran plasma.

Plakoglobin dan plakofilin

Plakoglobin (γ -katenin) dan plakofilin dimasukkan dalam kelompok protein-protein Armadillo, yaitu protein-protein yang memiliki beberapa repeat yang masing-masing mengandung 42 asam amino. Plakoglobin memiliki 12 domain repeat, sedangkan plakofilin memiliki 9 domain repeat dengan sebuah sekuens sisipan di antara repeat 5 dan 6 (Gambar 1-23).

Plakoglobin, selain ditemukan pada zonula adheren juga ditemukan pada kompleks desmosom. Walaupun demikian, hampir di semua sel plakoglobin lebih banyak ditemukan di desmosom daripada di junction adheren, kemungkinan karena afinitasnya dengan kadherin desmosom lebih besar dibandingkan dengan kadherin klasik di junctionn adheren. Protein ini dapat berinteraksi baik dengan kadherin maupun desmoglein, dan diperkirakan juga dapat berinteraksi dengan Dsc 1 yang memiliki domain sitoplasma mirip dengan kadherin. Kehadiran plakoglobin, yang memiliki homologi dengan β -katenin, dalam kompleks desmosom ini memperkuat dugaan berperannya desmosom pada transduksi signal. Sebagaimana yang sudah djelaskan pada

bagian lain buku ini, plakoglobin dapat menggantikan kedudukan β -katenin dalam pembentukan junction adheren. Ada beberapa bukti yang menunjukkan bahwa plakoglobin berperan dalam asosiasi komponen-komponen desmosom. Delesi plakoglobin pada mencit menyebabkan rusaknya organisasi junction adheren dan desmosom yang ditandai dengan bercampurnya protein-protein kedua junction ini. Plakoglobin juga diperkirakan berperan dalam komunikasi kedua junction tersebut (90-94).



Gambar 1-23. Struktur protein-protein Armadillo dalam desmosom, plakoglobin (PG) dan plakofilin (PKP). Plakoglobin memiliki 12 domain repeat (1-12), sedangkan plakofilin memiliki 9 domain repeat (1-9) dengan sebuah sekuens sisipan di antara repeat 5 dan 6. (86)

Plakofilin, sampai saat ini dikenal ada 3 isoform, Pkp-1, Pkp-2 dan Pkp-3. Pkp-1 dan Pkp-2 masing-masing memiliki dua varian, a dan b. Varian a memiliki sekuens yang lebih

pendek dibandingkan varian b (Gambar 1-21). PKP1a dan 1b berbeda dengan adanya sekuens sisipan sepanjang 21 asam amino di antara repeat 3 and 4, sedangkan PKP2a dan 2b berbeda dengan adanya sekuens sisipan sepanjang 44 asam amino di antara repeat 2 dan 3. Sampai saat ini hanya satu varian Pkp-3 yang diketahui. Ketiga isoform plakofilin ini memperlihatkan lokalisasi di dua tempat, yaitu di desmosome dan di nucleus. PKP1b hanya ditemukan di nucleus, sehingga diperkirakan tambahan sekuens asam amino pada varian b ini berperan sebagai alat targeting molekul ini ke nukleus.

Enzim-enzim pengurai

Di samping penghalang berupa membran sel dan junction antar sel, molekul obat yang memasuki tubuh juga akan menghadapi berbagai rintangan metabolisme berupa enzim-enzim pengurai yang diproduksi oleh berbagai kelenjar yang dilalui oleh molekul obat. Enzim-enzim ini, sesuai sifatnya, dapat bekerja menguraikan atau menginaktifkan molekul-molekul obat. Obat yang diaplikasikan per oral misalnya, sudah harus menghadapi enzim-enzim sejak di rongga mulut, di usus, di dalam peredaran darah, sampai di jaringan tempat ia didistribusikan. Obat yang ditujukan untuk mengarah pada jaringan otak misalnya, harus menghadapi enzim-enzim yang diproduksi oleh sel-sel yang dilintasinya. Misalnya: L-DOPA adalah asam amino yang merupakan prekursor untuk berbagai neurotransmitter, senyawa ini dapat keluar masuk jaringan otak menggunakan sistem transport untuk L-

fenilalanin. Akan tetapi, begitu sampai di endotel, L-DOPA akan dikonversi oleh enzim-enzim asam amino aromatik-L dekarboksilase (L-aromatic amino acid decarboxylase) dan MAO (monoamin oksidase) menjadi dopamin dan DOPAC (Dihydroxyphenylacetic acid), yang keduanya tidak dapat ditransportkan menembus membran antiluminal, sehingga tidak dapat memasuki jaringan otak. Di samping itu, enzim-enzim pemetabolisme obat yang terutama terdapat di sel-sel hati juga merupakan hal yang akan dihadapi oleh molekul-molekul obat di dalam tubuh, sehingga harus dipertimbangkan dalam mendisain obat baru. Enzim-enzim ini dikenal sebagai enzim-enzim sitokrom oksidase (enzim metabolisme obat tahap I) dan enzim-enzim konjugasi (enzim metabolisme obat tahap II). Sawar metabolisme atau sawar enzimatis di dalam tubuh yang harus dilalui suatu molekul obat dapat dibagi menjadi dua bagian, yaitu metabolisme presistemik dan metabolisme sistemik.

Yang dimaksud dengan metabolisme presistemik adalah biotransformasi yang terjadi pada molekul obat sebelum molekul obat ini mencapai peredaran darah. Umumnya terjadi di hepar, tetapi juga dapat terjadi dalam kecepatan yang lebih rendah di saluran pencernaan, jaringan kulit, paru, sel-sel otot rangka, dan lain-lain. Metabolisme presistemik di hati terjadi setelah obat diangkut ke hati melalui peredaran portal, sering disebut *first-pass hepatic metabolism*. Metabolisme sistemik adalah biotransformasi yang terjadi setelah obat diabsorpsi masuk ke dalam peredaran darah, kemudian dihantarkan ke jaringan-jaringan tubuh, antara lain jaringan hepar, dan mengalami biotransformasi yang ekstensif di jaringan tersebut.

Metabolisme presistemik di saluran pencernaan

Metabolisme presistemik di saluran pencernaan dapat terjadi karena hidrolisis yang dilakukan oleh enzim-enzim yang terdapat di saluran pencernaan, misalnya amilase, lipase, nuklease, dan protease seperti tripsin dan kimotripsin, tetapi juga dapat terjadi karena aktivitas enzim-enzim yang berada di membran *brush border* (brush border membrane-bound enzymes), misalnya berbagai enzim aminopeptidase dan karboksipeptidase, demikian pula enzim-enzim intraseluler seperti esterase dan enzim-enzim sitokrom oksidase yang terdapat di sel-sel usus. Metabolisme presistemik seperti ini lazim disebut *first pass intestinal metabolism* (95-97).

Di samping enzim-enzim yang berasal dari sel-sel tubuh sendiri, mikroflora yang ada di dalam saluran pencernaan juga dapat menyumbangkan enzim yang dapat menguraikan atau merusak senyawa obat. Mikroflora ini terutama berada di bagian bawah saluran pencernaan, yaitu di usus besar, mensekresi enzim-enzim yang dapat mengkatalisis reaksi-reaksi deglukuronidasi, dekarboksilasi, reduksi ikatan rangkap, hidrolisis ester, hidrolisis amida, dan dehidroksilasi (95).

Enzim-enzim saluran pencernaan dapat memetabolisme molekul obat, terutama yang memiliki struktur mirip atau menyerupai senyawa-senyawa nutrisi, misalnya polipeptida, nukleotida, karbohidrat, atau asam lemak. Cairan lambung mengandung enzim-enzim proteolitik yang bekerja pada pH sangat rendah (sekitar 2-5). Sebagian besar protein dan polipeptida dengan ukuran besar akan terhidrolisis oleh pepsin cairan lambung ini, namun demikian ternyata

beberapa oligopeptida berukuran kecil cukup stabil dan tahan terhadap pepsin. Di usus halus bagian atas terdapat berbagai enzim proteolitik yang diproduksi oleh kelenjar pankreas dan disekresikan ke duodenum, antara lain tripsin dan kimotripsin serta elastase dan karboksipeptidase A dan B. Enzim-enzim ini bekerja optimal pada pH alkalis (sekitar 8), dan dapat menghidrolisis hampir sebagian besar polipeptida dan oligopeptida yang terdapat di duodenum menjadi molekul-molekul asam amino atau peptida kecil dengan 2-6 residu asam amino (96).

Obat-obat berbentuk poli- atau oligopeptida seperti insulin, vancomisin, oksitosin, siklosporin, akan terdegradasi di saluran pencernaan apabila diberikan per oral. Bioavailabilitas senyawa-senyawa peptida ini, misalnya analog okta- dan nonapeptida dari oksitosin, akan meningkat sampai 10 kali lipat jika cairan pankreas dihilangkan. Namun demikian, beberapa peptida kecil ternyata dapat mengatasi rintangan enzimatik ini dan tidak terhidrolisis oleh enzim-enzim proteolitik saluran pencernaan. Beberapa contoh yang cukup dikenal adalah hepta-, okta-, dan dekapeptida siklik dari jamur beracun *Amanita sp.* Peptida-peptida ini tidak terdegradasi di saluran pencernaan sehingga dapat terabsorpsi secara utuh ke dalam peredaran darah dan menimbulkan keracunan. Selain itu analog heksa- dan oktapeptida sintetik dari somatostatin, vasopressin, dan siklosporin A juga stabil terhadap enzim-enzim proteolitik saluran pencernaan. Hal ini tentu merupakan informasi yang berharga untuk penemuan dan pengembangan obat baru, karena walaupun hampir semua protein dan peptida rentan terhadap degradasi protease

saluran pencernaan, tetapi peptida dengan sifat-sifat tertentu yang khas dapat mengatasi rintangan ini. Ini merupakan tantangan untuk mendisain struktur peptida terapeutik yang dapat diaplikasikan per oral.

Enzim-enzim proteolitik saluran pencernaan yang mungkin merupakan rintangan terberat bagi molekul obat yang diberikan per oral adalah enzim-enzim peptidase yang berada di membran *brush border* (brush border membrane-bound enzymes) dan sitoplasma sel-sel enterosit, yaitu enzim-enzim aminopeptidase dan karboksipeptidase. Enzim-enzim ini merupakan eksopeptidase yang dapat menghidrolisis peptida menjadi asam-asam amino. Di membran *brush border* terutama terdapat enzim-enzim peptidase selektif untuk tripeptida, sedangkan di sitosol peptidase selektif untuk dipeptida. Aktivitas enzim-enzim eksopeptidase di saluran pencernaan tampaknya meningkat dari bagian atas duodenum ke bagian bawah ileum, seiring dengan meningkatnya jumlah peptida-peptida pendek yang dihasilkan dari hidrolisis peptida-peptida yang lebih panjang di bagian atas saluran pencernaan (97).

Di samping enzim-enzim hidrolitik, metabolisme presistemik di saluran pencernaan juga dapat berlangsung karena aktivitas enzim-enzim sitokrom oksidase, atau lazim disebut sitokrom P450, atau CYP450, yaitu kelompok enzim utama dalam metabolisme obat. Enzim-enzim ini terutama diproduksi oleh sel-sel hati, tetapi juga diekspresikan dalam jumlah bervariasi di berbagai jaringan tubuh lainnya. Di sel-sel saluran pencernaan, aktivitas tertinggi enzim-enzim CYP450 terlihat di bagian proksimal, dan makin menurun ke arah distal. Konsentrasi terbesar enzim-enzim CYP450 di

saluran pencernaan ditemukan di ujung-ujung vili dari usus bagian atas dan dua pertiga ke atas.

Salah satu enzim CYP yang memiliki distribusi dan spektrum luas adalah CYP3A4, enzim ini diekspresikan dalam jumlah besar di dalam sel-sel mukosa usus halus manusia. Hampir 70% dari seluruh enzim CYP450 yang ditemukan di sel-sel usus adalah CYP3A4. Enzim ini sudah dibuktikan memainkan peran utama dalam biotransformasi berbagai senyawa obat di saluran pencernaan yang menyebabkan turunnya biavailabilitas obat-obat tertentu yang diberikan per oral, misalnya felodipin, midazolam, siklosporin, klozapin, dan sasquinavir. Metadon, LAAM, dan nor-LAAM dimetabolisme di mikrosom sel-sel usus manusia, terutama oleh enzim CYP3A4. Berberin, salah satu obat bahan alam, ternyata juga dimetabolisme dengan sangat intensif di sel-sel mukosa usus, dan ini merupakan penyebab utama rendahnya bioavailabilitas berberin apabila diberikan per oral (97-100). Liu et al, 2010).

Di samping enzim-enzim sitokrom oksidase, enzim-enzim transferase di dalam sel-sel usus juga dapat memetabolisme obat yang dikonsumsi per oral. Raloksifen misalnya, suatu modulator reseptor estrogen yang digunakan untuk penanganan osteoporosis pasca menopause, bioavailabilitas per oralnya sangat rendah, yaitu sekitar 2%. Ternyata penyebab utama rendahnya bioavailabilitas raloksifen tersebut adalah metabolisme presistemik yang terjadi di usus oleh enzim-enzim UDP-glukuronosiltransferase. Bazedoksifen (BZA) asetat, juga sebuah modulator reseptor estrogen yang digunakan untuk pencegahan dan penanganan osteoporosis pasca menopause diketahui

mengalami metabolisme ekstensif setelah pemberian per oral. Ternyata BZA mengalami presistemik metabolisme oleh enzim-enzim UDP-glukuronosiltransferase baik di usus maupun di hati, dan jalur metabolisme glukuronidasi ini merupakan jalur utama metabolisme BZA, bukan oleh enzim-enzim CYP (101,102) Shen et al, 2010).

Aktivitas enzim-enzim pemetabolisme obat dapat dipengaruhi oleh berbagai obat, suplemen, dan zat-zat makanan yang dikonsumsi dalam waktu bersamaan. Beberapa dari bahan-bahan tersebut dapat meningkatkan aktivitas enzim, sedangkan sebagian lagi justru menghambatnya. Oleh sebab itu konsumsi suatu obat bersamaan dengan obat lain, atau dengan suplemen, fitofarmaka, ataupun makanan dapat sangat mempengaruhi efek metabolismenya. Penghambatan proses metabolisme presistemik ini juga merupakan salah satu faktor yang menyebabkan kenaikan bioavailabilitas nifedipin pada pasien yang mengonsumsi jus grapefruit.

Metabolisme presistemik di jaringan kulit

Metabolisme presistemik di jaringan kulit tentu dapat mengurangi bioavailabilitas obat yang diaplikasikan transdermal. Berbagai macam enzim diproduksi oleh sel-sel epidermis, termasuk enzim-enzim sitokrom P450. Salah satu zat yang mengalami presistemik metabolisme di jaringan kulit adalah nitrogliserin. "*Cutaneous first-pass effect*" untuk nitrogliserin dapat mencapai 15–20%. Namun demikian, kapasitas metabolisme sel-sel epidermis sebetulnya sangat rendah dibandingkan dengan sel-sel di saluran pencernaan,

oleh sebab itu rintangan metabolisme untuk obat-obat yang diberikan transdermal sebenarnya cukup kecil.

Metabolisme presistemik di hati

Metabolisme presistemik di hati atau juga sering disebut *First-pass metabolism* merupakan masalah yang sering dihadapi oleh obat-obat yang diberikan per oral. Molekul obat yang diabsorpsi dari saluran pencernaan umumnya akan masuk ke dalam peredaran darah portal dan langsung dibawa ke hati. Hati adalah jaringan utama tempat metabolisme zat-zat xenobiotic termasuk obat. Di dalam hati terdapat berbagai macam enzim yang bekerja memetabolisme molekul-molekul obat, antara lain enzim-enzim sitokrom oksidase atau enzim-enzim CYP450, dan enzim-enzim transferase seperti glutation-transferase, N-asetiltransferase, UDP-glukuronosiltransferase, dan lain-lain. Berkurangnya konsentrasi obat yang disebabkan oleh *first-pass metabolism* ini disebut *first-pass effect*. Dalam beberapa kasus, *first-pass effect* dapat menyebabkan hilangnya seluruh molekul obat asal (parent compound).

First-pass effect terutama menjadi masalah yang cukup berarti bagi bioavailabilitas obat-obat bersifat lipofilik yang diberikan per oral. Beberapa obat yang mengalami *first-pass metabolism* antara lain gliseril trinitrat, propranolol, asam asetilsalisilat, morfin, nalokson, verapamil, klormetiazol,

Secara umum *first pass effect* tentu saja merupakan satu masalah besar dalam penghantaran obat, tetapi hal ini justru diinginkan dalam kasus *prodrug*. Sebagaimana diketahui *prodrug* adalah molekul "bakal obat" yang belum aktif, tetapi akan dimetabolisme menjadi obat yang aktif di dalam tubuh.

Metabolisme ini dapat terjadi setelah atau sebelum obat diabsorpsi ke dalam peredaran darah.

Strategi Meningkatkan Penghantaran Obat Di Dalam Tubuh

Prof. Dr. Ernawati Sinaga, MS., Apt.

UNAS Press

**Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 19 Tahun 2002
Tentang Hak Cipta**

Pasal 2

(1) Hak Cipta merupakan hak eksklusif bagi Pencipta atau Pemegang Hak Cipta untuk mengumumkan atau memperbanyak Ciptaannya, yang timbul secara otomatis setelah suatu ciptaan dilahirkan tanpa mengurangi pembatasan menurut peraturan perundang-undangan yang berlaku.

(2) Pencipta atau Pemegang Hak Cipta atas karya sinematografi dan Program Komputer memiliki hak untuk memberikan izin atau melarang orang lain yang tanpa persetujuannya menyewakan Ciptaan tersebut untuk kepentingan yang bersifat komersial.

Pasal 72

(1) Barangsiapa dengan sengaja dan tanpa hak melakukan perbuatan sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 ayat (1) atau Pasal 49 ayat (1) dan ayat (2) dipidana dengan pidana penjara masing-masing paling singkat 1 (satu) bulan dan/atau denda paling sedikit Rp1.000.000,00 (satu juta rupiah), atau pidana penjara paling lama 7 (tujuh) tahun dan/atau denda paling banyak Rp5.000.000.000,00 (lima miliar rupiah).

(2) Barangsiapa dengan sengaja menyiarkan, memamerkan, mengedarkan, atau menjual kepada umum suatu Ciptaan atau barang hasil pelanggaran Hak Cipta atau Hak Terkait sebagaimana dimaksud pada ayat (1) dipidana dengan pidana penjara paling lama 5 (lima) tahun dan/atau denda paling banyak Rp500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).

Kupersembahkan untuk

*Ayah Bundaku tercinta, yang senantiasa
mengiringi langkahku dengan doa
Untuk beliau berdua cintaku selamanya*

*Suami, anak-menantu dan cucu-cucuku tersayang
yang sapa, senyum, canda dan tawanya selalu
membuat hari-hariku jadi ceria*

*Allah Subhanahu wa Taala
Satu-satunya tempat
'ku bergantung dan bersandar
Terima kasih atas segala Nikmat dan Hidayah
yang Kau limpahkan dalam hidupku
Ridhailah amal ibadahku
ya Rabb ya Alim ya Rasyid*

Strategi Meningkatkan Penghantaran Obat Di Dalam Tubuh

Prof. Dr. Ernawati Sinaga, MS, Apt.

Hak Cipta Dilindungi oleh Undang-undang

Diterbitkan pertama kali oleh

UNAS Press

Jalan Sawo Manila Pejaten Pasar Minggu Jakarta Selatan

Telp. 021-7806700, Fax 7802719

Tahun terbit 2013

Editor

Adinda Arifiah

Disain sampul dan tata letak

Aziz Rahimy

Katalog Dalam Terbitan (KDT)

Cetakan 1, Jakarta, UNAS Press 2013

viii + 194 halaman; 16 x 21 cm

ISBN 978-602-14335-5-3

KATA PENGANTAR

Salah satu tantangan dalam penemuan dan pengembangan obat baru dewasa ini adalah bagaimana menghantarkan molekul obat dari *administration site* ke jaringan sasaran tempat obat tersebut diharapkan bekerja, dalam jumlah yang cukup untuk memberikan efek terapi yang diharapkan. Dari beberapa catatan diketahui bahwa lebih kurang 60% dari kandidat obat gagal pada saat uji klinis karena terbentur berbagai masalah, antara lain masalah farmakokinetik, sifat metabolik yang tak diinginkan, dan masalah-masalah penghantaran obat (drug delivery).

Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang biologi sel, biologi molekuler, kimia kombinatorial, genomik dan proteomik yang sangat pesat telah mendorong penemuan berbagai senyawa makromolekul yang memiliki potensi terapeutik, misalnya berbagai senyawa protein, peptida dan peptidomimetika yang memiliki berbagai aktivitas biologis kuat, namun pengembangan senyawa-senyawa ini sebagai obat seringkali terbentur pada kesulitan transpor atau penghantaran molekul-molekul senyawa tersebut ke situs sasarannya.

Rintangan utama dalam penghantaran obat adalah adanya sawar-sawar biologis yang tersebar di berbagai organ dan jaringan tubuh, yang efektivitasnya dipengaruhi oleh sifat intrinsik molekul obat atau/dan oleh lingkungan fisiologis terkait di dalam tubuh. Pemahaman tentang hal ini, yaitu bagaimana sawar-sawar biologis ini mempengaruhi perjalanan molekul obat di dalam tubuh, mempengaruhi absorpsi dan distribusi obat, yang akhirnya akan

mempengaruhi jumlah atau konsentrasi molekul obat di jaringan sasaran, merupakan hal yang sangat penting, sebab konsentrasi obat di jaringan sasaran merupakan faktor penting yang menentukan efektivitas farmakologis suatu senyawa obat. Penemuan dan pengembangan obat baru tidak akan pernah menghasilkan produk final yang bermutu tanpa studi tentang penghantaran obat. Hal ini menjadi tantangan yang serius bagi industri farmasi dalam proses penemuan obat baru.

Dalam beberapa dekade terakhir ini penelitian tentang penghantaran obat atau *drug delivery* sangat banyak dilakukan. Berbagai teknik baru, mulai dari modulasi junction antar sel, strategi prodrug, sampai dengan disain nanopartikel untuk memfasilitasi penghantaran molekul obat ke jaringan sasaran telah diteliti dengan sangat ekstensif.

Di dalam buku ini akan diuraikan berbagai faktor yang menjadi penghambat penghantaran obat dan dasar-dasar biologi molekuler tentang membran sel dan junction antar sel yang menjadi konstruksi utama berbagai sawar biologis. Setelah itu akan diuraikan hasil-hasil penelitian terbaru tentang berbagai strategi yang diharapkan akan dapat mengatasi rintangan tersebut, antara lain dengan modulasi junction antar sel, strategi prodrug dan formulasi fosfolipid.

Semoga buku ini bermanfaat bagi mahasiswa, dosen, dan para peneliti yang memiliki minat di bidang penghantaran obat. Sebagaimana layaknya sebuah karya manusia, buku ini tak luput dari keurangan dan kelemahan. Tak ada gading yang tak retak. Untuk itu penulis memohon maaf yang sebesar-besarnya, dan sangat mengharap kritik dan saran

yang membangun untuk perbaikan buku ini di masa mendatang.

Billahittaufik wal Hidayah
Wassalamualaikum wr. wb.

Jakarta, September 2013

Ernawati Sinaga

DAFTAR ISI

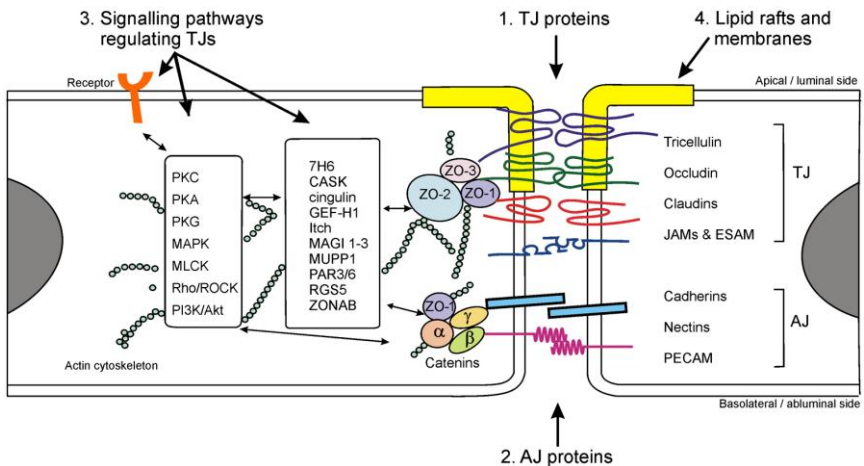
PENGANTAR	v
RINTANGAN DALAM PENGHANTARAN OBAT	1
• Membran sel	5
• Junction antar sel	7
• Enzim-enzim pengurai	53
MODULASI JUNCTION ANTAR SEL	62
• Modulasi junction antar sel menggunakan peptida Kadherin	68
• Modulasi junction ketat menggunakan Zot dan peptida Zot	88
• Modulasi junction ketat menggunakan modulator Okludin	103
• Modulasi junction ketat menggunakan modulator Klaudin	107
STRATEGI PRODRUG	112
• Prodrug ester untuk meningkatkan lipofilisitas	114
• Prodrug mimikri senyawa endogen	122
• Prodrug peptida siklik	130
FORMULASI FOSFOLIPID	133
• Liposom	133
• Fitosom	158
DAFTAR PUSTAKA	

MODULASI JUNCTION ANTAR SEL

Transpor molekul obat melintasi berbagai jaringan di dalam tubuh dapat berlangsung dengan menembus atau melintasi membran sel (transeluler) atau melalui jalur paraseluler. Jalur transpor mana yang digunakan, sangat bergantung pada sifat fisikokimia molekul obat yang bersangkutan. Molekul-molekul yang bersifat lipofilik dan berukuran kecil serta molekul-molekul yang memiliki transporter di membran sel akan menempuh jalur transmembran, sedangkan molekul-molekul yang bersifat hidrofilik dan tidak memiliki transporter akan menempuh jalur paraseluler. Akan tetapi, jalur transpor paraseluler ini seringkali terlalu kecil untuk dilalui molekul-molekul obat hidrofilik tersebut, karena adanya junction antar sel, terutama *junction ketat*, yang membuat jalur paraseluler menjadi sangat sempit. Hanya molekul-molekul berukuran sangat kecil, sekitar 4-15 Å yang dapat melintasinya (103,104). Oleh sebab itu dalam 3 dekade terakhir ini banyak penelitian dilakukan untuk meningkatkan permeasi paraseluler tersebut.

Pemahaman yang lebih mendalam tentang mekanisme molekuler pembentukan dan modulasi junction antar sel telah memunculkan berbagai teknik dan senyawa yang dapat digunakan untuk memodulasi junction antar sel. Banyak peneliti memusatkan perhatian pada protein-protein yang berperan langsung pada *junction ketat*, antara lain okcludin, kladuin, JAM (*Junctional adhesion molecules*), protein-protein

ZO, dan lain-lain (21,105,106). Siahaan dan kawan-kawan (107-118) memusatkan perhatian pada protein yang berada di junction adheren sebab banyak fakta membuktikan bahwa pembentukan dan stabilitas *junction ketat* sangat dipengaruhi oleh integritas junction adheren. Beberapa peneliti lain memusatkan perhatian pada jalur signaling yang meregulasi junction ketat atau jalinan lipid yang terdapat di membran sel (Gambar 2-1).



Gambar 2-1. Protein-protein sasaran pada modulasi junction antar sel (Deli, 2009)

Ada beberapa kelompok senyawa yang terbukti efektif meningkatkan permeabilitas paraseluler melalui modulasi *junction* antar sel ini, di antaranya adalah senyawa-senyawa pengkelat kalsium (EDTA, EGTA), surfaktan (natrium dodesilsulfat), garam-garam empedu, ester asam empedu (dodesilfosfokolin), asam-asam lemak (natrium kaprat), ester asam lemak (palmitoil karnitin), asilkarnitin, gliserida rantai

sedang, fosfolipid, asam-asam amino, beberapa jenis hormon dan neurotransmitter (vasopresin, angiotensin II, epinefrin), senyawa-senyawa sitokalin, senyawa-senyawa yang dapat menurunkan konsentrasi ATP intraseluler misalnya inhibitor-inhibitor glikolisis dan fosforilasi oksidatif, kitosan, polimer mukoadhesif, dan lain-lain. Peningkatan permeasi paraseluler yang dihasilkan cukup bermakna, bervariasi antara 4 kali sampai 10 kali lipat dibandingkan tanpa modulator, bergantung pada konsentrasi senyawa yang digunakan. Tetapi pada penelitian selanjutnya sebagian besar di antara cara-cara tersebut terbukti toksik dan merusak membran sel secara luas. Idealnya, modulasi junction ini harus bersifat segera, sementara, dan terlokalisasi pada jaringan tertentu yang dikehendaki saja. Senyawa modulator yang tampaknya cukup menjanjikan adalah dari golongan oligopeptida yang langsung membidik protein-protein di junction antar sel. Di samping akan mengurangi toksisitas karena sasarannya sudah tertentu, penggunaan peptida lebih aman karena dalam waktu tertentu akan dihidrolisis oleh enzim-enzim peptidase yang banyak terdapat di berbagai jaringan tubuh, sehingga meningkatkan reversibilitas proses modulasi.

Beberapa oligopeptida yang bekerja di *junction ketat* dan junction adheren sudah dilaporkan oleh beberapa peneliti memiliki efektivitas yang cukup tinggi dalam memodulasi junction antar sel dan meningkatkan permeasi molekul melintasi lapisan tunggal sel-sel epitel dan endotel (107,109,112,121,122), bahkan dapat meningkatkan permeasi molekul ke jaringan otak secara *in vivo* (118). Beberapa senyawa modulator ini bahkan sudah memasuki tahap uji

klinis. AT1001, suatu dekapeptida yang dapat menurunkan hiperpermeabilitas usus, sudah diuji efektivitas dan keamanannya untuk menangani *celiac disease* (Alba Therapeutics-NCT00492960, 2007), suatu penyakit otoimun yang disebut "*Gluten-sensitive enteropathy*". Demikian pula peptida PN-159, sedang dalam uji klinis tahap 2 untuk penghantaran insulin per nasal, dan peptida YY3-36 yang diusulkan untuk penanganan diabetes tipe 2 dan obesitas (119). Beberapa dari senyawa peptida yang dapat memodulasi junction antar sel diperlihatkan dalam tabel 2-1.

Tabel 2-1. Beberapa peptida yang dapat memodulasi junction antar sel

Peptida modulator	Sekuens asam amino	Rujukan
HAV-6 (heksapeptida kadherin/yang sekuensnya diturunkan dari kadherin)	Ac-SHAVSS-NH ₂	Makagiarsar et al, 2001; Sinaga et al, 2002, Kipptoo, 2010.
HAV-10 (dekapeptida kadherin)	Ac-LFSHAVSSNG-NH ₂	Sinaga et al, 2002
ADT-6 (heksapeptida kadherin)	Ac-ADTPPV-NH ₂	Sinaga et al, 2002
ADT-10 (dekapeptida kadherin)	Ac-QGADTPPVG-N H ₂	Sinaga et al, 2002
AT-1001 (FZI/0; sekuensnya diturunkan dari Zot/Zonula occluden toxin)	GGVLVQPG	Wang et al, 2000; DiPiero, 2001; Fasano dan Paterson, 2008
AT-1002 (sekuensnya diturunkan dari Zot)	FCIGRL	Eddington et al, 2007

Peptida modulator	Sekuens asam amino	Rujukan
Peptida 44-mer yang diturunkan dari sekuens okludin (loop ekstraseluler pertama)	¹⁸⁴ GVNPQAQMSSGYYY SPLLAM <u>C</u> SQAYGSTYLN QYIYHY <u>C</u> TVDPQE ²²⁷	Wong dan Gumbiner, 1997
Peptida 22-mer yang diturunkan dari sekuens okludin	²⁰⁹ NH ₂ - GSQIYTICSQFYTPGGTG L YVD-COOH	Francis et al, 1999; Wong et al, 2007
Peptida 10-mer yang diturunkan dari sekuens okludin	¹⁰⁰ SNYYGSGLSY	Lacaz-Vieira et al, 1999
Peptida 9-mer yang diturunkan dari sekuens okludin	¹⁰⁰ SNYYGSGLS	Lacaz-Vieira et al, 1999
Peptida 7-mer yang diturunkan dari sekuens okludin	FDWITP	Herman et al, 2007
Peptida 6-mer (siklik) yang diturunkan dari sekuens okludin	H-CLYHYC-OH	Oshima et al, 2003
Peptida OP ₉₀₋₁₃₅ (46-mer), sekuensnya diturunkan dari loop EC-1 okludin	⁹⁰ DRGYGTSLGGSGVYP YGGSGFGS.....GG YTDPR ¹³⁵ -NH ₂	Tavelin et al, 2003
Peptida OP ₉₀₋₁₁₃ (24-mer), sekuensnya diturunkan dari loop EC-1 okludin	⁹⁰ DRGYGTSLGGSGVYP YGGSGFGS ¹¹³	Tavelin et al, 2003
Peptida OP ₉₀₋₁₀₃ (14-mer), sekuensnya diturunkan dari loop EC-1 okludin	⁹⁰ DRGYGTSLGGSVG ¹⁰³	Tavelin et al, 2003
Lipopeptida yang sekuensnya diturunkan dari okludin (C ₁₄ -OP ₉₀₋₁₀₃)	H ₂ N-CHR-CONH- DRGYGTSLGGSVG	Tavelin et al, 2003; Everett et al, 2006

Peptida modulator	Sekuens asam amino	Rujukan
Peptida Cldn-1 ₅₃₋₈₀ , sekuensnya diturunkan dari loop ekstraseluler pertama dari kladin	Biotin- SCVSQSTGQIQCKV- Bpa-DSLLNLNSTLQAT- NH ₂ (BM 3211)	Mrsny et al, 2008
C-CPE (peptida yang sekuensnya diturunkan dari ujung karboksil enterotoksin <i>Clostridium perfringens</i> , reseptor kladin)	¹ DIEKEILDLA AATERLNLT ALNSNPAGNL YDWRSSNSYP WTQKLNHLT ⁵¹ ITATGQKYRI LASKIVDFNI YSNNFNLLVK LEQSLGDGVK DHYVDISLDA ¹⁰¹ GQYVLMKAN SSYSGNYPYS ILFQKF	Sonoda et al, 1999;
C-CPE184 (peptida yang sekuensnya diturunkan dari ujung karboksil enterotoksin <i>Clostridium perfringens</i> , reseptor kladin-4)		Kondoh et al, 2005; Uchida et al, 2010
C-CPE194 (analog C- CPE184 dengan pengurangan 10 residu asam amino pada ujung amino)		Uchida et al, 2010
C-CPE C-terminal 30-mer	NH ₂ -SLDAGQYVLV MKANSYSYSGN YPYSILFQKF-OH	Masuyama et al, 2005
C-CPE C-terminal 16-mer	NH ₂ -SSYSGNYPYS	Takashi et al,

Peptida modulator	Sekuens asam amino	Rujukan
	ILFQKF-OH	2005
Peptida YY (sekuensnya diturunkan dari klaudin 1-10)	4–25 contiguous amino acid peptides	Quay, 2007
Peptida yang sekuensnya diturunkan dari EC loop klaudin 23	8–20 contiguous amino acid peptides	Bird dan Youakim, 2008
PN 159	NH ₂ - KLALKLALKALKKAALKLA- amida	Cui et al, 2006; Cui et al, 2007
PN 393 (all d-substituted)	NH ₂ -KLALKLAL- KALKKAALKLA-amida	Cui et al, 2006
PN 407	NH ₂ -LKLLKLLKLLKLL- amida	Cui et al, 2006
PN 425	NH ₂ -KLAWKLAL- KALKKAALKLA-amida	Cui et al, 2006
PN 427	NH ₂ -KLAWKLALKAL- KAAWKLA-amida	Cui et al, 2006
PN 679	CNGRCGGKKKLLKLLKLL	Cui et al, 2007
PN 745	LRKLRKLLRLRKLKRLL R-amida	Cui et al, 2007

Keterangan: peptida-peptida PN tidak diketahui/disebutkan sekuensnya diturunkan dari protein apa

Modulasi junction antar sel menggunakan peptida kadherin

Peptida kadherin adalah peptida-peptida sintetik yang sekuensnya diturunkan dari sekuens protein kadherin, salah satu protein adhesi sel yang berperan dalam pembentukan

junction antar sel adalah kadherin. Kadherin berperan pada pembentukan dan stabilisasi junction adheren, sedangkan stabilitas junction adheren mempengaruhi pembentukan dan stabilitas junction ketat. Apabila integritas junction adheren terganggu, maka dapat dipastikan integritas junction ketat juga akan terganggu. Percobaan yang dilakukan oleh Gumbiner dan Simon pada tahun 1988 mengungkapkan bahwa antibodi terhadap E-kadherin dapat menghambat pembentukan *junction ketat*. Berarti jika fungsi E-kadherin dapat diganggu, maka pembentukan tight junction juga akan dapat diganggu atau dimodulasi. Hal inilah yang menimbulkan pemikiran Siahaan dan kawan-kawan untuk memanfaatkan protein-protein di junction adheren untuk memodulasi junction ketat.

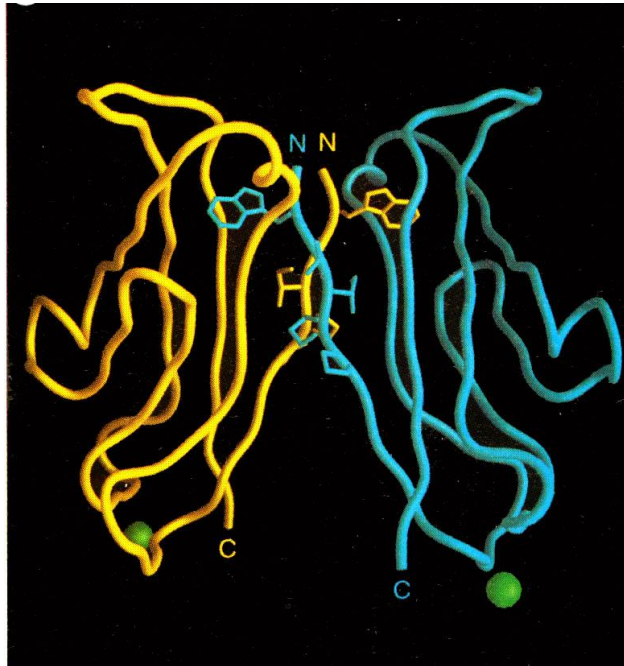
Protein kadherin klasik tersusun oleh 723-748 asam amino (120 KD). Pada gambar 2-2 disajikan struktur primer E-kadherin tikus. Struktur molekul kadherin secara garis besar dapat dibagi menjadi tiga domain, yaitu domain ekstraseluler yang berada pada ujung amino peptida, domain sitoplasmik yang berada pada ujung karboksil dan satu domain transmembran yang terdapat di antara dua domain yang disebutkan terdahulu (Gambar 1-15). Dalam pembentukan junction adheren, domain ekstraseluler kadherin membentuk dimer cis homofilik dengan molekul kadherin yang terdapat pada sel yang sama (dimer ini disebut „strand dimer“), dan kemudian membentuk dimer trans homofilik antar molekul kadherin yang terdapat pada sel yang berdekatan (disebut „adhesion dimer“) (Gambar 1-16). Dalam pembentukan dimer ini diperlukan adanya ion kalsium (117,123).

```
1  MGARCRSFSA LLLLLQVSSW LCQELEPESC SPGFSSEVYT FVPERHLER
51  GHVLGRVRF ECTGRPTAF FSEDSRFKVA TDGTITVKRH LKLHKLETSF
101 LVRARDSSHR ELSTKVTLKS MGHHRHRRHHH RDPASESNPE LLMFSPVYP
G
151 LRRQKR.DWVI PPISCPENEK GEFKPNLVQI KSNRDKETKV FYSITGQGAD
201 KPPVGVFIIE RETGWLKVTQ PLDREAIKY ILYSHAVSSN GEAVEDPMEI
251 VITVTDQNDN RPEFTQPVFE GFVAEGAVPG TSMVKVSATD ADDDVNTY
NA
301 AIAYTIVSQD PELPHKNMFT VNRDTGVISV LTSGLDRESY PTYTLVVQAA
351 DLQGEGLSTT AKAVITVKDI NDNAPVFNPS TYQGQVPENE VNARIATLKV
401 TDDAPNTPA WKAVYTVVND PDQQFVVVTD PTTNDGILKT AKGLDFEA
KQ
451 QYILHVRVEN EEPFEGSLVP STATVTVDVV DVNEAPIFMP AERRVEVPED
501 FGVGQEITSY TAREPDTFMD QKITYRIWRD TANWLEINPE TGAIFTRAEM
551 DREDAEHVKN STYVALIAT DDGSPATGT GTLLLVLVDV NDNAPIPEPR
601 NMQFCQRNPQ PHIITILDPD LPPNTSPFTA ELTHGASVNW TIEYNDAAQE
651 SLILQPRKDL EIGEYKIHLK LADNQNKDQV TTLDVHVCDC EGTVNNCMK
A
701 GIVAAGLQVP AILGILGGIL ALLILLLLL LFLRRRTVVK EPLPPDDDT
751 RDNVYYYDEE GGGEEDQDFD LSQLHRGLDA RPEVTRNDVA PTLMSVPQ
YR
801 PRPANPDEIG NFIDENLCAA DSDPTAPPYD SLLVFDYEGS GSEASLSSL
851 NSSESDQDQD YDYLNEWGNR FKKLADMYGG GEDD
```

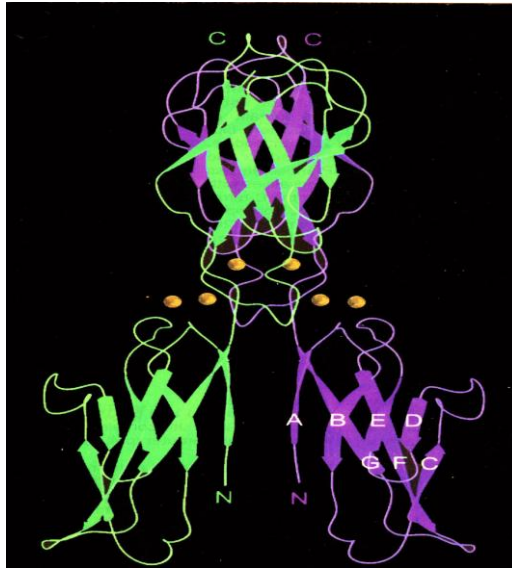
Gambar 2-2. Struktur primer E-cadherin tikus (Becker K, Luber B. UCSD-Nature Molecule Pages. Published online: 11 Jan 2010 | doi:10.1038/mp.a003905.01

Bagian ekstraseluler kadherin tersusun oleh 3 sampai 5 *repeat* ("pengulangan sekuens"). Masing-masing *repeat* tersebut diberi nama EC-1 sampai EC-5, EC-1 adalah domain yang berada paling ujung amino dari rantai polipeptida (Gambar 1-15). Pembentukan *strand-dimer* berlangsung pada domain EC-1 dengan terjadinya pertukaran pita β dari protomer-protomer yang berinteraksi. Pertukaran pita

(strand) ini diperantarai dan distabilkan oleh terjadinya interkalasi atau penyusupan gugus rantai samping residu Trp2 ke dalam kantung hidrofobik yang dibentuk oleh gugus-gugus rantai samping residu Ile⁹², Ile²⁴, Ala⁸⁰, Ala⁷⁸, Tyr³⁶ dan bagian alifatik dari Glu⁸⁹ pada protomer pasangannya [Gambar 2-3]. Lateralisasi kadherin membentuk *strand-dimer* berlangsung melalui interaksi sekuen-sekuen yang berada pada daerah *linker* antar domain EC1 dan EC-2, serta diperantarai oleh molekul-molekul kalsium dan air (Gambar 2-4).

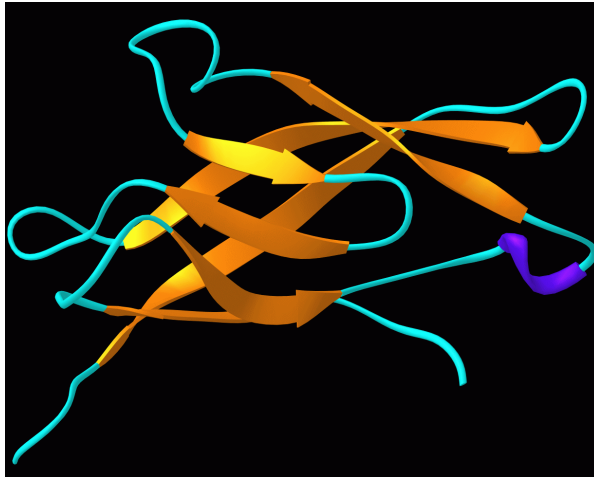


Gambar 2-3. Pembentukan *strand-dimer* pada domain EC-1 N-kadherin (Shapiro et al, 1995)

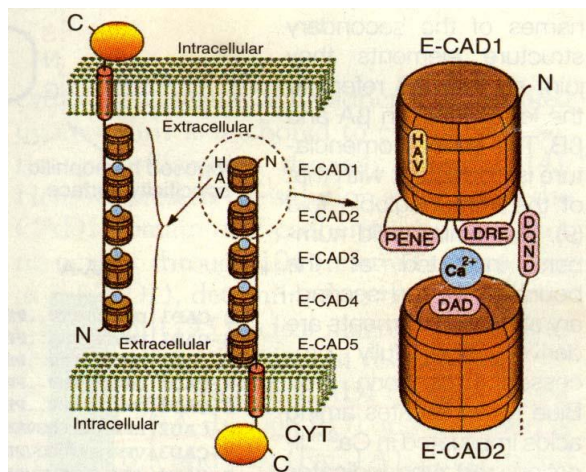


Gambar 2-4. Pembentukan dimer *cis* (*strand-dimer*) pada domain ECAD-1,2 (125)

Overduin dan kawan-kawan (124) mempelajari struktur domain EC-1 dari E-kadherin mencit (E-CAD1) menggunakan teknik spektroskopi resonansi magnet heteronuklir multidimensi. Mereka mengungkapkan bahwa E-CAD1 tersusun oleh tujuh pita β (β -strand), yaitu β A- β G dan sebuah heliks α_{310} yang pendek. Topografi skematik struktur kadherin tersebut disajikan pada Gambar 2-5. Semua pita β tersebut berpasangan secara antiparalel kecuali yang berada diantara β A'dan- β G. Bagian cembung yang terdapat pada β B dan- β G diperkirakan menyebabkan lekukan (*curling*) pada β -*sheet* sehingga membentuk struktur seperti silinder atau tong (Gambar 2-6).



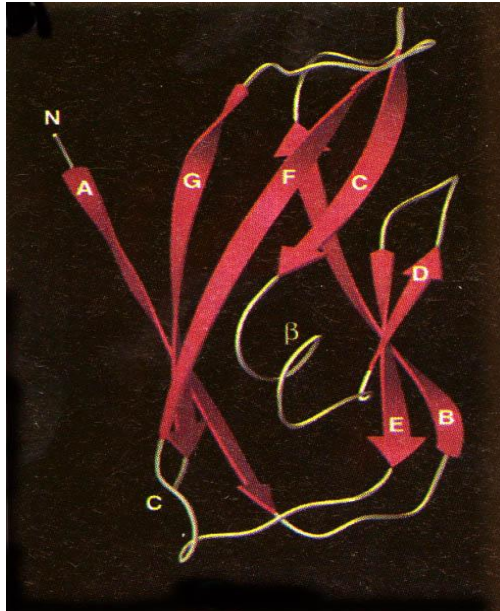
Gambar 2-5. Skema topologi struktur sekunder domain EC-1 E-kadherin mencit, tersusun oleh tujuh pita β warna kuning coklat dan sebuah heliks α_{310} yang pendek (warna ungu) (Overduin et, 1995)



Gambar 2-6. Arsitektur modular "barrel-shape" dari E-kadherin (Overduin et al, 1995)

Pita $\beta A/\beta A'$ terpisah menjadi dua bagian yang dihubungkan oleh residu Pro-Pro. Sekuens QGADKPPV yang menghubungkan βC dan βD diperkirakan membentuk struktur heliks, walaupun para peneliti ini mengakui bahwa data sudut dihedral pada sekuens tersebut tidak kompatibel dengan struktur heliks α (Overduin et al, 1995). Sekuens ET yang menghubungkan βD dan βE serta sekuens SNG yang menghubungkan βF dan βG membentuk struktur β -turn. Dalam struktur yang dikemukakan oleh Overduin dan kawan-kawan (124), pita βC , βF dan βG terletak pada satu bidang cekung (Gambar 2-5), yang diperkirakan berperan pada interaksi homofilik antar molekul kadherin. Sekuens HAV terdapat pada pita βF . Gugus rantai samping dari residu His⁷⁹ dan Val⁸¹ yang terpapar pada pelarut diduga terlibat dalam interaksi kadherin-kadherin. Selain residu His⁷⁹ dan Val⁸¹ yang terdapat pada βF , juga ditemukan residu-residu lain yang terpapar pada pelarut, yaitu Lys³³ yang terdapat sebelum βC , Phe³⁵ dan Ser³⁷ pada βC , residu Ser⁸³-Gly⁸⁵ pada turn FG yang terdapat diantara βF dan βG dan residu Glu⁸⁶-Pro⁹¹ pada βG .

Struktur domain EC-1 N-kadherin (NCAD-1) yang dikemukakan oleh Shapiro dan kawan-kawan (126) memberikan gambaran yang tidak jauh berbeda dengan struktur ECAD-1 (124). Kristal polipeptida rekombinan NCAD-1 tersusun oleh tujuh struktur pita β dan dua heliks α (Gambar 2-7). Dalam gambar 2-7 tampak tujuh pita β terbagi menjadi 2 *sheet*. Pita D, E dan B membentuk satu *sheet* dan pita A, G, F dan C membentuk satu *sheet* lainnya. Kedua *sheet* ini dihubungkan oleh sekuens GPGADQPPTG yang membentuk struktur heliks yang khas, yang dinamakan "kuasi heliks β ".



Gambar 2-7. Struktur domain EC-1 N-kadherin (Shapiro, 1995)

Siahaan dan kawan-kawan (107-118), sejak lebih dari dua dekade yang lalu memusatkan perhatiannya pada protein-protein yang berperan pada adheren junction, terutama kadherin. Kelompok peneliti ini berusaha mengembangkan metode untuk meningkatkan penghantaran obat menggunakan peptida-peptida kadherin. Prinsipnya, peptida kadherin, yaitu peptida-peptida sintetik yang sekuensnya diturunkan dari sekuens situs pengikatan (binding site) kadherin, akan berikatan dengan molekul kadherin di permukaan sel dan menghambat interaksi antar molekul-molekul kadherin. Penghambatan interaksi kadherin-kadherin ini akan mengganggu pembentukan *junction* antar sel secara reversibel, sehingga akan melonggarkan atau memperbesar

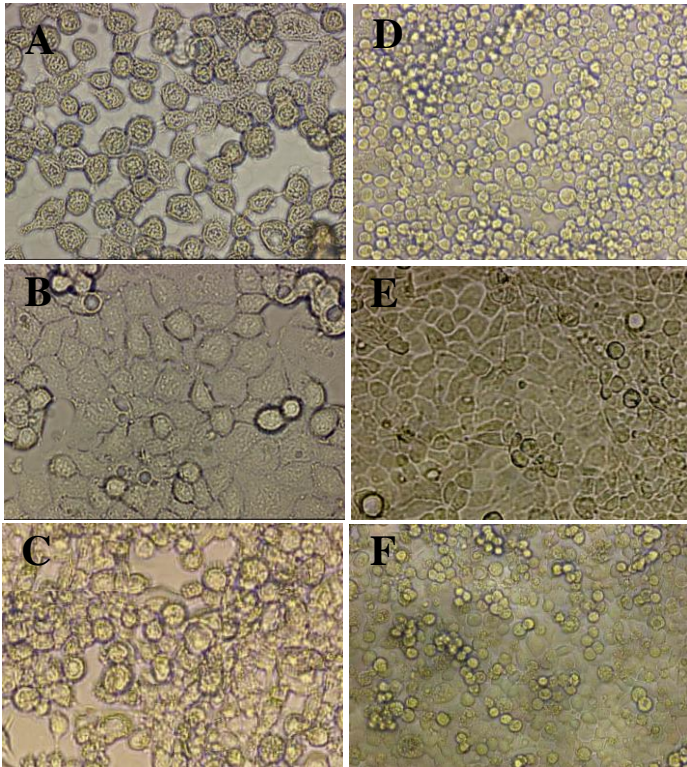
celah antar sel, dan akhirnya dapat meningkatkan permeasi paraseluler. Diharapkan, modulasi terhadap *junction* antar sel akan menyebabkan dapat diurnya besar celah paraseluler, sehingga memungkinkan untuk dilalui oleh molekul-molekul peptida atau protein yang berukuran relatif besar. Strategi ini sangat menarik perhatian sebab dapat dimanfaatkan tidak saja untuk penghantaran molekul-molekul protein atau peptida, tetapi juga dapat digunakan untuk molekul-molekul terapeutik hidrofilik lainnya.

Dari domain EC-1 kadherin, yaitu domain ekstraseluler kadherin yang diduga merupakan domain interaksi kadherin-kadherin, ada satu sekuens yang menarik, yang sangat dikonservasi pada berbagai tipe kadherin, yaitu sekuens HAV (histidin-alanin-valin). Beberapa hasil penelitian telah membuktikan pentingnya peran sekuens HAV ini pada manifestasi fungsi kadherin. Blaschuck dan kawan-kawan (127) membuktikan bahwa beberapa peptida sintetik yang mengandung sekuens HAV, diantaranya dekapeptida LRAHAVDVNG-NH₂, dapat menghambat proses kompaksi embrio mencit dan pertumbuhan neurit pada astrosit.

Untuk mencari sekuens penting dalam molekul kadherin yang terlibat dalam interaksi pembentukan dimer kadherin, Siahaan dan kawan-kawan melakukan pelacakan menggunakan studi pengenalan antibodi anti-E-kadherin (128,129). Dalam penelitian ini digunakan antibodi anti-E-kadherin, karena pada penelitian sebelumnya sudah terbukti bahwa antibodi anti-E-kadherin ini dapat mengganggu fungsi kadherin, sehingga diperkirakan antibodi ini dapat berikatan dengan domain aktif pengikatan E-kadherin, yaitu sekuens kadherin yang dicari. Para peneliti ini mensintesis

beberapa péptida yang sekuensnya diturunkan dari sekuens domain EC-1 E-kadherin dan N-kadherin mencit, lalu menguji sifat antigenisitasnya terhadap antibodi anti-E-kadherin. Peptida-peptida yang menunjukkan sifat antigenisitas kuat terhadap antibodi anti-E-kadherin dianggap merupakan péptida yang kemungkinan besar berperan dalam interaksi akdherin-kadherin. Dari hasil penelitian ditemukan dua sekuens yang dianggap penting dan diduga berperan dalam interaksi kadherin-kadherin, yaitu ILYSHAVSSN dan VITVTDQNDN (128). Dari hasil penelitian ini sekali lagi dibuktikan bahwa sekuens yang mengandung tripeptida HAV memang merupakan sekuens yang penting dalam interaksi kadherin-kadherin.

Siahaan dan kawan-kawan kemudian menkonstruksi beberapa péptida sintetik yang mengandung HAV dan menguji aktivitasnya dalam memodulasi junction antar sel. Sebuah péptida 24-mer Ac-DRERIATYTLFSHAVSSNGNAVED-NH₂ dan dua dekapeptida Ac-LYSHAVSSNG-NH₂ dan LRAHAVDVNG-NH₂ terbukti dapat memodulasi adhesi sel pada sel-sel BBME (Bovine Brain Microvessel Endothelial). Peptida HAV 24-mer tersebut dapat menghambat adhesi sel dengan IC₅₀ sebesar 0,008 µM, sedangkan peptida LRAHAVDVNG-NH₂ dengan IC₅₀ 31 µM (107,130). Peptida-peptida kadherin yang mengandung sekuens HAV ini juga dapat menghambat adhesi sel pada sel-sel CACO-2, yaitu dekapeptida Ac-LFSHAVSSNG-NH₂ (HAV-10) dan heksapeptida Ac-SHAVSS-NH₂ (HAV-6) (Gambar 2-8).



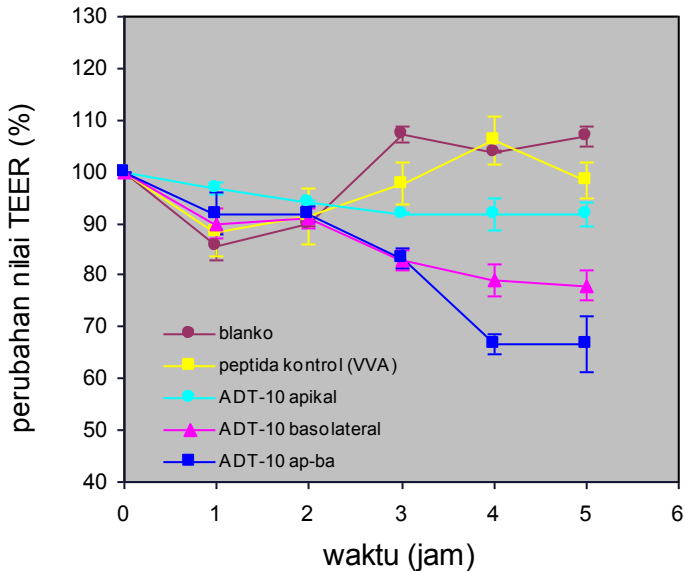
Gambar 2-8. Penghambatan adhesi sel-sel CACO-2 oleh peptida HAV-10 (A) dan HAV-6 (D) di dalam media yang mengandung 2 mM Ca^{2+} dan 0,74 mM Mg^{2+} . Tampak sel-sel mengapung di dalam media sebagai sel tunggal dan tidak dapat mengadakan adhesi walaupun di dalam media terdapat Ca^{2+} . Pada kontrol tanpa peptida (B dan E) tampak sel-sel mengadakan adhesi dan melekat di dasar wadah. Tetapi, penghambatan adhesi sel ini berlangsung reversibel, lima jam setelah inkubasi, walaupun di dalam medium tetap ada peptida, baik HAV-10 (C) ataupun HAV-6 (F), sel tampak mulai mengadakan adhesi sel kembali. Gambar A, B, dan C diambil dengan perbesaran 400x, sedangkan D, E, dan F 100x (112).

Di samping dapat menghambat adhesi sel, péptida-peptida HAV-10 dan HAV-6 juga dapat memodulasi junction antar sel pada sel-sel CACO-2 dan MDCK yang ditandai dengan penurunan nilai TEER (112). Begitu juga sebuah péptida HAV yang dikonstruksi dengan mengganti sebuah residu serin pada HAV-6 dengan alanin, Ac-SHAVAS-NH₂, ternyata juga dapat menurunkan nilai TEER sel-sel MDCK (131). Penurunan nilai TEER yang disebabkan oleh peptida HAV-10 (konsentrasi 1 mM dalam HBSS, diberikan dari kedua sisi, apikal dan basolateral sekaligus) sampai mencapai 27% (dari 100% turun menjadi 73%), sedangkan yang disebabkan HAV-6 mencapai 14% (dari 100% turun menjadi 86%). Nampak disini peptida yang lebih panjang menunjukkan efektivitas yang lebih besar dibandingkan dengan peptida pendek analognya.

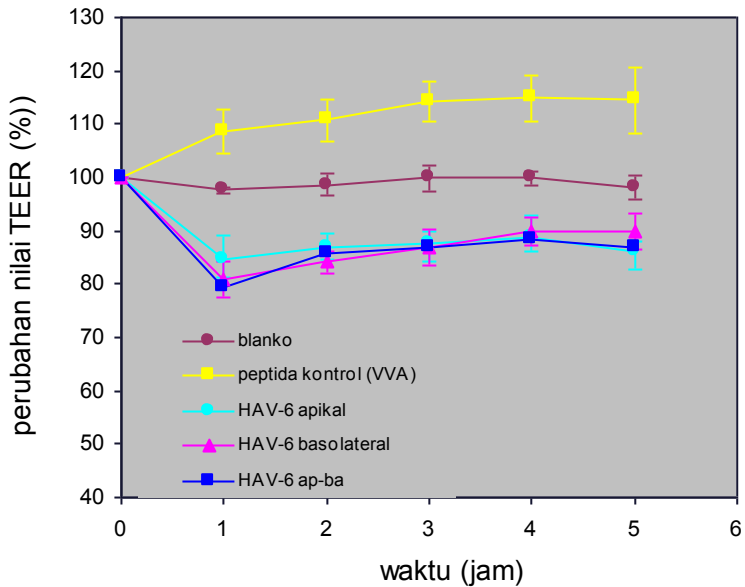
Ada banyak faktor yang mungkin dapat menjelaskan hal ini, antara lain kestabilan struktur peptida dan kekuatan interaksinya atau afinitasnya dengan protein (kadherin) di membran. Peptida yang lebih panjang kemungkinan lebih stabil strukturnya dan lebih kuat afinitasnya dengan protein pasangannya. Hal seperti ini tampak pada hasil pengujian daya penghambatan adhesi sel peptida Ac-DRERIATYTLFSHAVSSNGNAVED-NH₂ (24-mer) dan LRAHAVDVNG-NH₂ (10-mer). Kedua péptida ini dapat menghambat adhesi sel-sel BBMEC dengan IC₅₀ masing-masing sebesar 0,008 µM (peptida 24-mer) dan 31 µM (peptida 10-mer) (107,112,130).

Tetapi apabila peptida diaplikasikan dari bagian apikal lapis tunggal sel, ukuran molekul yang besar ternyata dapat menghambat atau mengurangi aktivitasnya. Peptida HAV-10

ternyata tidak dapat menurunkan TEER sel-sel MDCK apabila diberikan melalui bagian apikal sel (Gambar 2-9), sedangkan peptida HAV-6 analognya yang lebih kecil masih dapat menurunkan nilai TEER tersebut sampai 13%, tidak berbeda jauh dengan efeknya apabila diberikan melalui kedua sisi apikal dan basolateral sekali gus (Gambar 2-10). Ini merupakan data yang menarik untuk didiskusikan lebih jauh.



Gambar 2-9. Pengaruh dekapeptida Ac-LFSHAVSSNG-NH₂ (HAV-10) pada lapis tunggal sel MDCK (Madin-Darby Canine Kidney). Lapis tunggal sel diinkubasi dengan larutan peptida 1 mM, masing-masing dari bagian apikal, basolateral, serta dari apikal dan basolateral sekaligus (ap-ba). Penurunan nilai TEER mulai tampak setelah dua jam inkubasi, dan menurun terus sampai lima jam pengamatan (112).



Gambar 2-10. Pengaruh heksapeptida Ac-SHAVSS-NH₂ (HAV-6) pada lapisan tunggal sel MDCK (Madin-Darby Canine Kidney). Tampak efek peptida tidak berbeda, baik diberikan melalui sisi apikal saja, basolateral saja, ataupun dari kedua sisi (112).

Peptida HAV-10 menunjukkan aktivitas yang cukup signifikan apabila diberikan melalui sisi basolateral, tetapi aktivitasnya sama sekali tidak ada ketika diberikan melalui sisi apikal sel. Hipotesis yang dapat diajukan, kemungkinan, ukuran molekul peptida HAV-10 terlalu besar untuk dapat melintasi junction ketat untuk mencapai molekul kadherin di junction adheren. Harap diingat bahwa peptida-peptida kadherin ini diharapkan bekerja memodulasi junction antar sel dengan jalan berikatan dengan protein kadherin yang

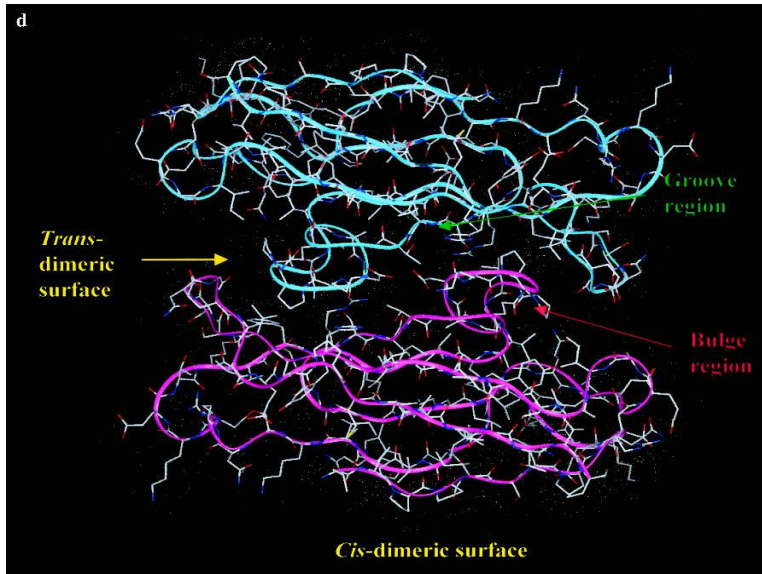
berada di junction adheren. Junction adheren berada di bagian basolateral dari junction ketat (lihat Gambar 1-5), sehingga jika diberikan melalui sisi apikal, peptida tersebut harus berjalan melintasi junction ketat terlebih dahulu baru mencapai junction adheren. Karena tidak dapat mencapai junction adheren, maka peptida HAV-10 tidak dapat berikatan dengan kadherin, sehingga efek modulasinya pun tidak ada.

Sebaliknya, jika diberikan melalui sisi basolateral, peptida ini praktis tidak menemui hambatan untuk mencapai junction adheren. Di junction adheren peptida akan berikatan dengan kadherin, sehingga menghambat interaksi kadherin-kadherin dan akhirnya mengganggu pembentukan junction antar sel. Pada peptida HAV-6 yang lebih kecil, pemberian dari sisi mana pun menyebabkan efek yang hampir tidak berbeda, sebab kemungkinan ukuran peptida ini cukup kecil sehingga tidak menemui hambatan dan sama cepatnya untuk mencapai junction adheren baik dari sisi apikal maupun basolateral.

Peptida-peptida HAV-10 dan HAV-6 juga terbukti dapat meningkatkan permeasi paraseluler ^{14}C -mannitol sampai lebih lima kali lipat dibandingkan kontrol. Sama dengan efeknya pada penurunan TEER, peptida HAV-10 menunjukkan aktivitas sedikit lebih kuat dibandingkan dengan HAV-6 (112). Lebih jauh lagi, baru-baru ini Kipptoo dan kawan-kawan (118) melaporkan bahwa peptida HAV-6 ternyata juga dapat meningkatkan permeasi ^{14}C -mannitol dan [^3H (G)]-daunomisin melintasi sawar darah otak pada model perfusi otak tikus *in situ*. Ini menunjukkan bahwa peptida-peptida kadherin memiliki prospek yang baik untuk

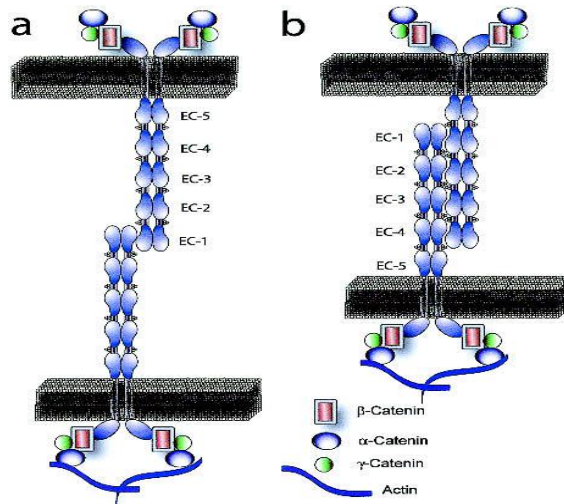
digunakan sebagai modulator junction antar sel untuk meningkatkan penghantaran obat ke berbagai jaringan tubuh termasuk ke jaringan otak yang sangat terlindung oleh sawar darah otak yang sangat ketat.

Dari struktur kristalografi sinar X dari domain EC-1 E-kadherin mencit (125) tampak sekuens yang mengandung HAV ini terletak pada bagian yang membentuk cekungan dangkal ("*groove region*"). Dari eksperimen *molecular docking* yang dilakukan antar domain EC-1 pada pembentukan dimer trans (Gambar 2-11), dengan asumsi interaksi homofilik trans kadherin berlangsung antar EC-1 dengan EC-1, tampak sekuens HAV ini (*groove región*) berinteraksi dengan satu bagian yang cembung atau "*bulge región*". Harap difahami bahwa sebenarnya interaksi homofilik trans kadherin belum sepenuhnya jelas terungkap. Domain ekstraseluler kadherin yang saling berinteraksi belum tentu hanya domain EC-1, tetapi juga mungkin domain-domain EC yang lain (EC1 sampai EC5) (Gambar 2-12). Untuk membatasi dan menyederhanakan, dalam eksperimen *molecular docking* ini diasumsikan interaksi homofilik trans kadherin berlangsung antar domain EC-1 molekul kadherin. Dari hasil eksperimen ini maka dicari bagian-bagian pada struktur EC-1 kadherin tersebut yang memiliki konformasi cembung (*bulge*). Diperoleh 3 daerah yang menunjukkan konformasi cembung, yaitu ⁴¹A-⁴²D-⁴³K-⁴⁴P-⁴⁵P-⁴⁶V, ²⁸K-²⁹E dan ¹²K-¹⁴E (Gambar 2-13), tetapi hanya ⁴¹A-⁴²D-⁴³K-⁴⁴P-⁴⁵P-⁴⁶V yang menunjukkan interaksi kuat dengan bagian cekung (*groove*) yang mengandung HAV.

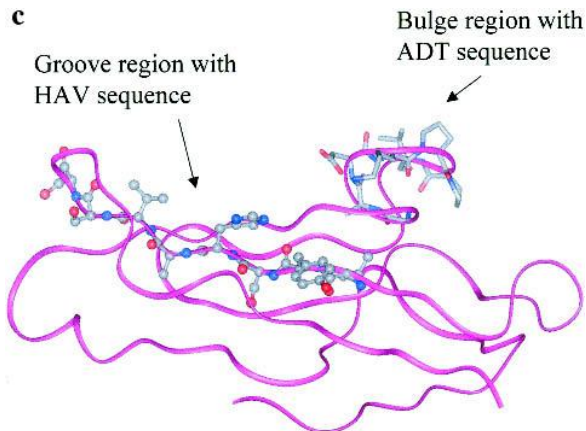


Gambar 2-11. Dimerisasi *cis*- dan *trans*- domain EC-1 kadherin pada junction antar sel. *Molecular docking* menunjukkan bahwa pada dimerisasi *trans*, bagian cekung EC-1 (mengandung HAV) berinteraksi dengan baik dengan bagian cembung EC-1 (mengandung ADT) (112).

Peptida sintetik ADKPPV yang sekuensnya diturunkan dari E-kadherin menciit, ternyata aktivitas penurunan TEER nya pada sel MDCK tidak cukup kuat, oleh sebab itu dicoba péptida dengan sekuens *bulge región* yang diturunkan dari E-kadherin manusia, yaitu ADTPPV. Ternyata heksapeptida Ac-ADTPPV-NH₂ dan dekapeptida analognya Ac-ADTPPV-NH₂ memiliki aktivitas modulasi junction yang sebanding dengan péptida-peptida HAV, bahkan ADT-6 lebih kuat dibandingkan dengan HAV-6.

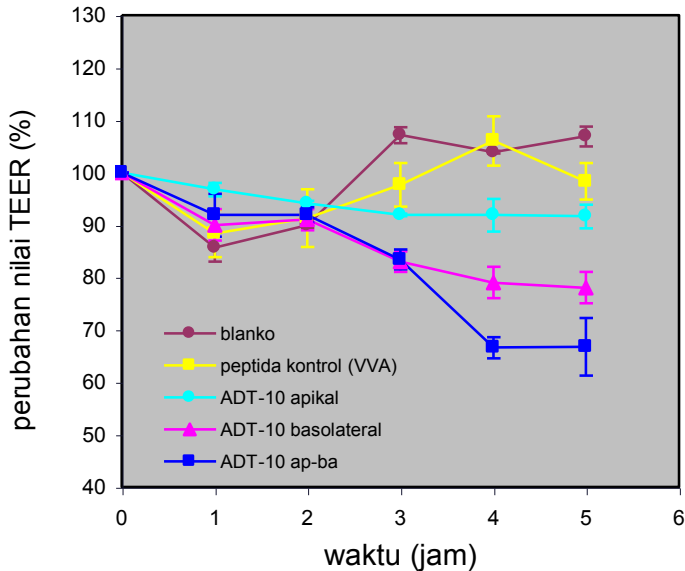


Gambar 2-12. Dalam pembentukan dimer trans kadherin, interaksi dapat terjadi antar EC-1 (a) atau juga melibatkan domain ekstraseluler lainnya (b).



Gambar 2-13. Struktur EC-1, sekuens HAV terletak pada bagian cekung (*groove region*), sedangkan sekuens ADK/ADT terletak pada bagian cembung (*bulge region*) (112).

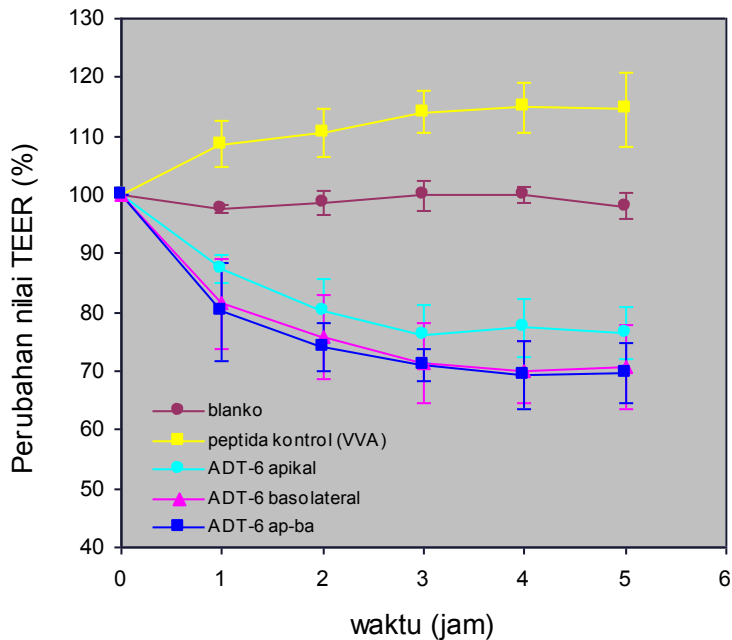
Kedua péptida dari bulge región E-kadherin manusia ini, yaitu heksapeptida Ac-ADTPPV-NH₂ dan dekapeptida analognya Ac-ADTPPV-NH₂, ternyata dapat menurunkan TEER lapis tunggal sel-sel MDCK masing-masing sampai 33% (dari 100% menjadi 67%) dan 27% (dari 100% menjadi 77%) (Gambar 2-14 dan 2-15).



Gambar 2-14. Pengaruh peptida ADT-10 terhadap nilai resistan listrik transepitel (TEER) sel MDCK (112).

Sama seperti yang sudah dijelaskan sebelumnya, ternyata ukuran molekul péptida mempengaruhi kecepatan dan kemudahannya mencapai junction adheren, sehingga pada aplikasi melalui sisi apikal, péptida ADT-10 hampir tidak memberikan efek, padahal pada pemberian melalui sisi basolateral dan dari kedua sisi (apikal dan basolateral sekali

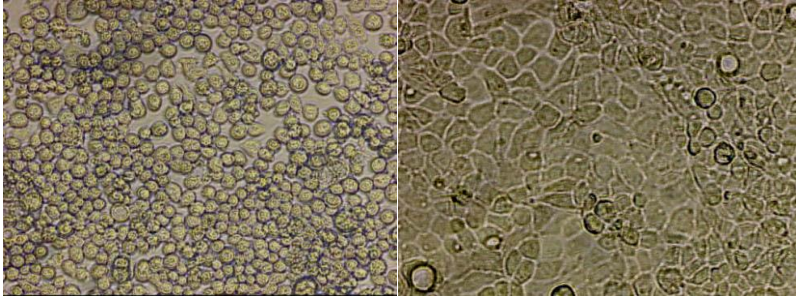
gus) efeknya sangat signifikan (Gambar 2-14). Sebaliknya, heksapeptida analognya yang lebih kecil, ADT-6, menunjukkan efektivitas yang hampir sama kuatnya, baik diberikan melalui sisi apikal, basolateral, ataupun dari kedua sisi (Gambar 2-15).



Gambar 2-15. Pengaruh peptida ADT-6 terhadap nilai resistan listrik transepitel (TEER) sel MDCK. Efek péptida tampak hampir tak berbeda, baik diberikan melalui sisi apikal saja, basolateral saja, ataupun dari kedua sisi (Sinaga et al, 2002).

Peptida dari *bulge region* ini juga menunjukkan aktivitas penghambatan adhesi sel (Gambar 2-16) dan peningkatan permeasi paraseluler seperti peptida-peptida kadherin

lainnya dengan tingkat efektivitas yang sedikit lebih tinggi (Tabel 2-2).



Gambar 2-16. Penghambatan adhesi sel-sel CACO-2 oleh péptida ADT-10 di dalam media yang mengandung 2 mM Ca^{2+} dan 0,74 mM Mg^{2+} (kiri). Gambar di sebelah kanan (kontrol, tanpa peptida) menunjukkan reagregasi sel sudah terjadi 1 jam setelah ke dalam médium kembali ditambahkan Ca^{2+} dan Mg^{2+} . Seluruh gambar direkam dengan perbesaran 100x (132)

Modulasi junction ketat menggunakan Zot dan peptida Zot

Zot (Zonula occluden toxin) adalah salah satu protein toksik bakteriofaga yang diproduksi oleh strain virulen dari *Vibrio cholerae*. Zot pertama kali diidentifikasi oleh Fasano dan kawan-kawan (133) di membran luar bakteri *Vibrio cholerae* "secara kebetulan" sewaktu mencari faktor lain yang berperan dalam diare tinggalan (residual diarrhea) pada kandidat vaksin kolera CT-V. Protein ini memiliki kemampuan mengganggu integritas junction ketat sel-sel epitel usus, sehingga dapat meningkatkan permeasi molekul melintasi sawar mukosa usus. Aktivitas Zot bersifat reversible, dapat dirusak oleh panas (heat-labile), peka terhadap

protease, dan ditemukan pada fraksi supernatant kultur bakteri yang mengandung molekul-molekul dengan berat antara 10-30 kDa.

Tabel 2-2. Perbandingan aktivitas peptida-peptida kadherin dalam meningkatkan permeasi paraseluler ^{14}C -manitol melintasi lapis tunggal sel CACO-2

Peptida	Koefisien Permeabilitas Aparen (cm/sec. x 10^{-6})		
	apikal	basolateral	apikal- basolateral
Kontrol	0.35 ± 0.04	0.35 ± 0.04	0.35 ± 0.04
Blanko	0.37 ± 0.05	0.37 ± 0.05	0.37 ± 0.05
HAV-10	0.61 ± 0.12	1.31 ± 0.13	1.88 ± 0.23
HAV-6	1.01 ± 0.11	1.59 ± 0.07	1.71 ± 0.12
ADT-10	0.60 ± 0.08	1.57 ± 0.34	2.31 ± 0.24
ADT-6	1.12 ± 0.26	1.70 ± 0.14	1.80 ± 0.17

Zot merupakan polipeptida rantai tunggal, dengan berat molekul 44,8 kDa, tersusun dari 399 residu asam amino dan pI 8,5 (134). Zot memiliki beberapa domain yang menyebabkannya memiliki fungsi ganda, sebagai protein faga morfogenetik sekaligus sebagai enterotoksin. Setelah terpotong pada residu asam amino ke-287, fragmen ujung karboksil dengan berat molekul 12 kDa diekskresikan, yang kemungkinan merupakan bagian yang menimbulkan efek biologis dari toksin Zot. Fragmen ujung amino yang tersisa, lebih kurang 33 kDa, kemungkinan berperan dalam penyusunan faga dan tetap terikat pada membran bakteri. Melalui beberapa studi menggunakan gen mutan Zot

diketahui bahwa domain aktif Zot terdapat pada bagian ujung karboksilnya, tepat pada produk pemutusan rantai yang terjadi secara alami di dalam sel-sel bakteri *V. cholerae*. Fragmen dengan berat molekul 12 kDa ini diberi nama fragmen ΔG (135).

Penelitian yang ekstensif terhadap aktivitas Zot mengungkapkan bahwa Zot dapat memfasilitasi absorpsi insulin per oral pada tikus yang diinduksi diabetik (136). Hal yang menarik, tak satupun dari tikus percobaan yang diberi perlakuan insulin per oral bersama Zot ini menderita diare, demam, dan gejala sistemik lainnya, dan juga tidak ditemukan perubahan struktural histopatologis pada usus halus. Percobaan yang dilakukan pada usus kelinci menunjukkan bahwa Zot tidak mempengaruhi transport aktif Na^+ -glukosa, tidak sitotoksik, tidak menurunkan TER (resistansi listrik transepitel), tetapi menginduksi peningkatan permeasi jaringan secara reversible. Percobaan *ex vivo* yang dilakukan menggunakan ileum kelinci menunjukkan bahwa Zot secara reversibel meningkatkan absorpsi insulin (BM 5733 Da) sebanyak 72% dan Immunoglobulin G (140-160 kDa) sebanyak 52%. Studi *in vitro* dan *in vivo* menunjukkan bahwa efek Zot terhadap permeabilitas jaringan mulai berlangsung lebih kurang 20 menit setelah pemberian Zot pada mukosa usus dan mencapai puncaknya pada menit ke 80. Uji efektivitas Zot pada kera yang diinduksi diabetik menunjukkan bahwa insulin yang diberikan intragastrik akan meningkat absorpsinya apabila diberikan bersama dengan Zot. Bioavailabilitas insulin meningkat dari 5,4% (kontrol, insulin tanpa Zot) menjadi 10,7% (insulin + Zot 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) dan 18% (insulin + Zot 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (137).

Uji *in vitro* yang dilakukan Cox dan kawan-kawan (138,139) menggunakan lapis tunggal sel Caco-2 membuktikan bahwa Zot dapat meningkatkan permeasi senyawa-senyawa dengan ukuran yang sangat variatif (mannitol, PEG4000, inulin), juga dengan bioavailabilitas per oral yang sangat rendah seperti doxorubicin, paclitaxel, acyclovir, cyclosporin A, dan anticonvulsant enaminones sampai 30 kali lipat, sebagaimana yang terjadi pada paclitaxel. Zot nampaknya juga menjanjikan untuk digunakan sebagai alat penghantaran obat ke jaringan otak. Karyekar dan kawan-kawan (140) melaporkan bahwa Zot meningkatkan permeabilitas beberapa senyawa petanda (sukrosa, inulin) dan beberapa senyawa kemoterapi (paclitaxel dan doxorubin) melintasi sel-sel endotel mikrovessel otak sapi. Dalam percobaan ini juga dibuktikan bahwa peningkatan permeasi tersebut bersifat reversibel, bergantung konsentrasi (*concentration dependant manner*), dan bukan disebabkan peningkatan transport transmembran. Dari percobaan ini dipastikan bahwa Zot meningkatkan permeasi molekul melalui jalur paraseluler.

Fragmen ΔG dari Zot, yaitu fragmen ujung karboksil sebesar 12 kDa, ternyata juga menunjukkan aktivitas sebagai modulator junction ketat. Salama dan kawan-kawan (141-143) membuktikan bahwa fragmen ΔG dapat meningkatkan permeasi berbagai molekul petanda (manitol, inulin), makromolekul (PEG4000), dan berbagai senyawa obat yang memiliki bioavailabilitas rendah seperti zidovudin (AZT), amprenavir, ritonavir, acyclovir, dan saquinavir melintasi lapis tunggal sel Caco-2. Demikian pula pada percobaan *in vivo* menggunakan tikus, pemberian fragmen ΔG intraduodenal

bersama inhibitor peptidase juga terbukti dapat meningkatkan bioavailabilitas molekul-molekul petanda berukuran kecil dan besar (manitol, inulin, PEG4000), juga senyawa-senyawa obat dengan sifat-sifat fisikokimia yang berbeda-beda, yaitu siklosporin, ritonavir, saquinavir, dan acyclovir. Peningkatan C_{max} ditemukan bervariasi antara 197-5700%, sedangkan nilai AUC (area under curve) meningkat sebesar 123-4990%. Peningkatan bioavailabilitas terbesar terjadi pada siklosporin, sedangkan saquinavir menunjukkan peningkatan terkecil karena rendahnya bioavailabilitas saquinavir terutama disebabkan oleh terjadinya metabolisme presistemik atau *first pass metabolism*. Menon dan kawan-kawan (144) juga membuktikan bahwa fragmen ΔG yang diberikan pada tikus melalui kanula intracarotid secara signifikan meningkatkan distribusi senyawa-senyawa antikanker metotreksat (hidrofilik) dan paclitaxel (lipofilik) di jaringan otak.

Wang dan kawan-kawan (145) menemukan sebuah protein yang diberi nama Zonulin di *junction ketat* sel-sel epitel usus. Zonulin ditemukan ketika para peneliti tersebut berusaha mengungkapkan mekanisme kerja Zot dalam mengganggu integritas *junction ketat*. Zonulin berperan dalam pembentukan dan stabilitas *junction ketat* pada sel-sel epitel dinding saluran cerna. Zonulin diperkirakan berperan dalam patogenesis *celiac disease* (146) dan diabetes mellitus tipe 2 (147). Zonulin dapat memodulasi (melonggarkan) *junction ketat* sel-sel epitel usus secara reversibel, setelah berikatan dengan reseptor yang sama dengan reseptor yang diaktifkan oleh Zot, sehingga dapat dikatakan Zonulin merupakan senyawa analog dari Zot. Zonulin memiliki berat

molekul 47 kDa, dengan domain aktif pengikatan reseptor berada di ujung amino (145), dan ujung karboksilnya kemungkinan terlibat dalam penyusunan ulang elemen-elemen sitoskeleton yang secara fungsional berhubungan dengan *junction ketat*. Di samping pada sel-sel epitel usus manusia, zonulin ternyata juga ditemukan di sel-sel jantung dan otak (148,149).

Hasil penelitian yang dilakukan melalui analisis proteomik serum manusia yang baru-baru dilaporkan oleh Tripathi dan kawan-kawan (150) menunjukkan bahwa zonulin manusia ternyata merupakan prekursor heptaglobin 2 (pre-HP2). Walaupun heptaglobin diketahui merupakan protein yang bekerja "membuang" (scavange) hemoglobin bebas untuk menghambat aktivitas oksidatifnya, namun belum ada informasi yang dilaporkan mengenai aktivitas bentuk prekursornya ini. Para peneliti ini menemukan rantai tunggal zonulin mengandung motif menyerupai EGF/epidermal growth factor (EGF-like motif) yang dapat men-transaktivasi reseptor EGF (EGFR) melalui aktivasi reseptor-2 yang diaktivasi oleh proteinase (proteinase-activated receptor 2 = PAR2). Aktivasi dua reseptor ini mengakibatkan (atau sejalan dengan) peningkatan permeabilitas usus. Sudah dibuktikan sebelumnya bahwa inaktivasi PAR dapat mencegah rusaknya integritas sawar usus. Hidrolisis rantai polipeptida zonulin menjadi subunit α 2- dan β - akan menghilangkan kemampuannya baik untuk mengaktivasi EGFR maupun untuk meningkatkan permeabilitas usus. Analisis kuantitatif ekspresi gen mengungkapkan bahwa pada penderita *celiac disease* terjadi overekspresi zonulin pada sel-sel mukosa usus (150). *Celiac disease* adalah suatu penyakit otoimun yang

ditandai dengan inflamasi kronis pada dan gangguan permeabilitas usus (151).

Mekanisme aktivitas modulasi junction ketat yang sama pada kedua protein ini, Zot dari bakteri *Vibrio cholerae* dan zonulin dari sel-sel epitel usus - keduanya dapat berikatan dengan reseptor yang sama di membran sel-sel epitel usus - membuat Di Pierro dan kawan-kawan (135) berupaya mencari kesamaan struktur dari keduanya dalam rangka mengungkapkan situs aktif pengikatan reseptor dari kedua protein tersebut. Perbandingan sekuens ujung amino fragmen peptida yang disekresikan oleh Zot setelah pemotongan, yaitu AA288-399 (fragmen yang mengandung residu asam amino ke 288 sampai ke 399 dari Zot), dengan analog eukariotiknya zonulin, dikombinasikan dengan eksperimen *site-directed mutagenesis* mengungkapkan satu sekuens motif analog pada kedua protein tersebut yang terdiri dari 8 residu asam amino. Pada Zot, motif oktapeptida ini terdapat pada AA291-298, yaitu GRLCVQDG, dan pada zonulin terdapat pada AA8-15 yaitu GGVLVQPG. Motif analog tersebut dapat diuraikan sebagai: nonpolar(G)-variabel-nonpolar-variabel-nonpolar(V)-polar(Q)-variabel-nonpolar(G). Sekuens ini berperan dalam pengikatan Zot ataupun zonulin pada reseptornya.

Dari motif oktapeptida yang ditemukan oleh Di Pierro dan kawan-kawan (135) tersebut, Alba Therapeutics Company mempatenkan peptida dengan sekuens GRLCVQDG dan diberi nama AT-1001 atau Larazotida, digunakan sebagai antagonis reseptor zonulin dalam pengobatan *celiac disease*. Diharapkan peptida ini akan berikatan dengan reseptor zonulin, sehingga interaksi

zonulin dengan reseptornya terhambat. Karena zonulin tidak bisa berinteraksi dengan reseptornya, diharapkan efek biologis dari adanya interaksi ini, antara lain peningkatan permeabilitas pada penderita *celiac disease*, dapat dicegah.

Drago dan kawan-kawan (152) membuktikan bahwa praperlakuan dengan peptida AT-1001, atau disebut juga FZI/0, dapat menghambat rangkaian proses biologis yang terjadi apabila lapis tunggal sel CaCo-2 (sebagai model sel-sel epitel usus) ataupun usus halus manusia secara *ex vivo*, dipaparkan dengan gliadin. Gliadin adalah protein yang terdapat pada gandum, yang dapat penelitian ini dibuktikan dapat menyebabkan meningkatnya jumlah zonulin di dalam sel, gangguan pada organisasi sitoskeleton aktin, dan redistribusi ZO-1, yang akhirnya menyebabkan peningkatan permeabilitas usus. Dalam penelitian ini terungkap bahwa praperlakuan dengan FZI/0 tetap dapat meningkatkan jumlah zonulin di dalam sel, tetapi efek biologis selanjutnya tidak. Kemungkinan hal ini disebabkan karena, walaupun jumlah zonulin meningkat, tetapi interaksinya dengan reseptornya tidak terjadi, karena dihalangi oleh peptida FZI/0 yang sebelumnya sudah menduduki reseptor tersebut. Hasil penelitian ini mengkonfirmasi sifat peptida FZI/0 atau AT-1001 sebagai antagonis zonulin.

Pada tahun 2007, Paterson dan kawan-kawan (153) melakukan uji klinis AT1001 pada pasien *celiac disease* yang dirawat inap dengan uji tersamar ganda (*doubleblind*), random, menggunakan plasebo sebagai kontrol. Hasil pengujian menunjukkan bahwa 70% dari pasien yang menerima plasebo mengalami peningkatan permeabilitas usus, sedangkan pasien yang mendapat perlakuan AT-1001

tidak satu pun yang mengalami hal tersebut (peningkatan permeabilitas usus). Kadar gamma interferon meningkat pada empat dari tujuh (4/7) pasien yang menerima plasebo, sedangkan pada pasien yang menerima AT-1001 hanya empat dari empatbelas pasien (4/14). Gejala gangguan pencernaan juga lebih banyak teramati pada pasien plasebo dibandingkan yang menerima AT-1001. Hasil penelitian ini mendorong Alba Therapeutics Company untuk melakukan uji klinik dalam skala yang lebih besar dimana efektivitas dan keamanan AT-1001 diamati dengan cara biopsi usus.

Walaupun Zot dan fragmen ΔG sudah terbukti efektif memodulasi junction ketat dan meningkatkan permeasi berbagai molekul melintasi sawar intestinal, baik secara *in vitro* (lapis tunggal sel Caco-2) maupun *in vivo* (pada tikus), namun penggunaan peptida yang sangat panjang tentu tidak efisien dalam aplikasinya. Makin pendek peptida yang efektif, tentu akan makin baik, sebab makin efisien dan mudah dalam sintesisnya, dan makin sedikit masalah yang harus diatasi dalam penggunaannya, misalnya masalah metabolisme oleh enzim, antigenisitas, dan masalah *stereochemical hindrance*. Jangan dilupakan bahwa aplikasi fragmen ΔG dalam eksperimen-eksperimen yang dilakukan harus selalu dikombinasi dengan inhibitor peptidase.

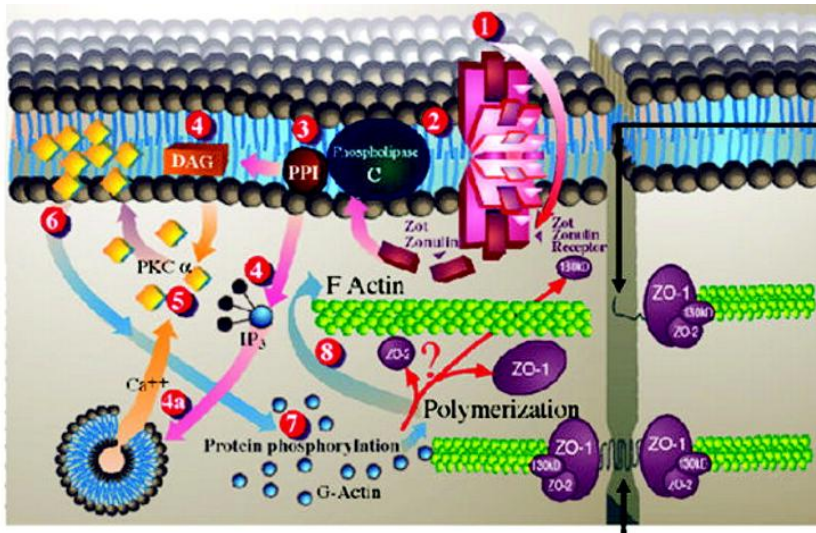
Dari sekuens fragmen peptida pada situs aktif pengikatan Zot dengan reseptornya ada satu hal yang menarik, yaitu sekuens ujung amino dari fragmen tersebut, yaitu FCIGRL, memiliki kesamaan motif dengan ligan PAR2 (PAR2-AP = PAR2-activating peptide), yaitu SLIGRL (154). PAR2 (proteinase- activated receptor 2) adalah salah satu reseptor yang terlibat dalam pembentukan junction ketat, oleh sebab

itu motif ini nampaknya mempunyai arti tertentu dalam modulasi *junction ketat*. Baru-baru ini memang terbukti bahwa peptida sintetik dengan sekuens FCIGRL ternyata memang dapat berikatan langsung dengan PAR2 pada sel-sel KNRK (rat kidney) yang mengekspresikan PAR2. Dan lebih menarik lagi, ternyata peningkatan permeabilitas ini memang bergantung PAR2. Pada sel-sel yang tidak mengekspresikan PAR2, pemberian peptida SLIGRL tidak menyebabkan peningkatan permeabilitas (122).

Motlekar dan kawan-kawan (121) mendisain heksapeptida sintetik FCIGRL, yang diberi nama AT-1002. Pengujian aktivitas AT-1002 ternyata membuktikan bahwa peptida ini dapat meningkatkan permeasi heparin (hidrofilik, bermuatan negatif, bioavailabilitas rendah) *in vitro* (melintasi lapis tunggal sel Caco-2) maupun *in vivo* (pada tikus). Peptida AT-1002 juga menyebabkan penurunan nilai TEER (transepithelial electrical resistance) dan peningkatan permeabilitas zat warna kuning Lucifer melintasi lapis tunggal sel-sel CACO-2. *Secara in vivo*, pemberian kalsitonin salmon bersama 1 mg AT-1002 pada tikus menyebabkan peningkatan AUC sebesar 5,2 kali dibandingkan kontrol (155). Peptida AT-1002 juga dapat meningkatkan absorpsi per oral gula-gula laktulosa dan rhamnosa secara *in vivo* pada mencit BALB/c (122). Song dan kawan-kawan (156) juga membuktikan bahwa peptida AT-1002 efektif meningkatkan absorpsi siklosporin A, suatu senyawa yang memiliki bioavailabilitas rendah, pada tikus yang diberi AT-1002 secara intraduodenal. Dalam percobaan ini AT-1002 dikombinasikan dengan suatu inhibitor peptidase, sebab jika tidak tampaknya AT-1002 akan dihidrolisis oleh enzim-enzim

peptidase dan tidak memperlihatkan efek yang diinginkan. Hasil-hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sekuens FCIGRL merupakan situs aktif Zot maupun fragmen ΔG dalam aktivitasnya memodulasi (melonggarkan) *junction ketat*.

Bagaimana mekanisme kerja protein Zot ataupun peptida-peptida sintetik yang sekuensnya diturunkan dari Zot dalam memodulasi (melonggarkan) *junction ketat*, masih belum sepenuhnya dapat dijelaskan. Tetapi beberapa hasil penelitian nampaknya sudah mulai dapat mengungkapkan beberapa hal tentang ini. Menurut Fasano (157), efek kerja Zot terjadi melalui rangkaian proses signaling intraseluler yang menyebabkan terjadinya polimerisasi mikrofilament aktin (PKC- α -dependent polymerization of actin microfilaments), dan akhirnya menyebabkan rusaknya struktur *junction ketat*. Dalam mekanisme hipotetis yang diajukan Fasano, zonulin/Zot akan berinteraksi dengan reseptor spesifik di permukaan sel. Protein tersebut kemudian mengalami internalisasi dan mengaktifkan fosfolipase C, yang kemudian menghidrolisis fosfatidil inositol, menyebabkan dilepaskannya inositol 1,4,5-tris fosfat (PPI-3) dan diasilgliserol (DAG). Kemudian terjadi aktivasi PKC α , baik secara langsung (melalui DAG) ataupun melalui pelepasan Ca⁺⁺ intraseluler (melalui PPI 3). PKC α kemudian mengkatalisis fosforilasi protein (protein-protein) sasaran, dan selanjutnya terjadi polimerisasi G-aktin yang larut menjadi F-aktin. Polimerisasi ini menyebabkan terjadi penyusunan ulang filament aktin dan selanjutnya terjadi perpindahan beberapa protein (termasuk ZO-1) dari kompleks junction. Akibatnya terjadi pelonggaran *junction ketat* (Gambar 2-17).

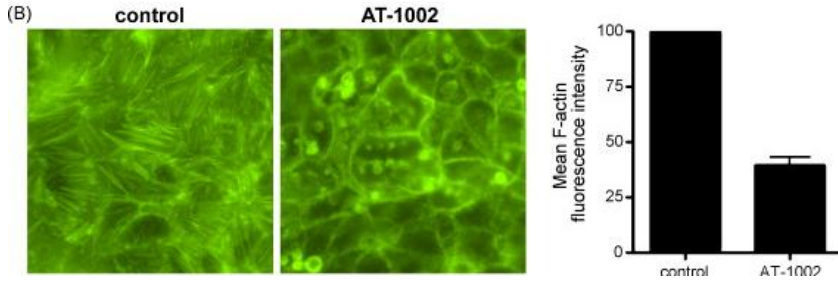


Gambar 2-17. Hipotesis mekanisme modulasi tight junction yang dimediasi oleh Zonulin/Zot (157)

Hasil-hasil penelitian selanjutnya yang diperoleh ternyata mendukung hipotesis ini. Heksapeptida FCIGRL (AT-1002) menyebabkan perubahan distribusi dari filament aktin dan miosin, yang disebabkan terjadinya fosforilasi terhadap filament-filamen sitoskeleton tersebut. Gopalakrishnan dan kawan-kawan (155) menunjukkan redistribusi filament aktin pada sel-sel IEC-6 dan CACO-2 BBE yang diberi perlakuan heksapeptida FCIGRL (AT-1002) sebagaimana yang tampak pada mikroskopi fluoresens pada Gambar 2-18.

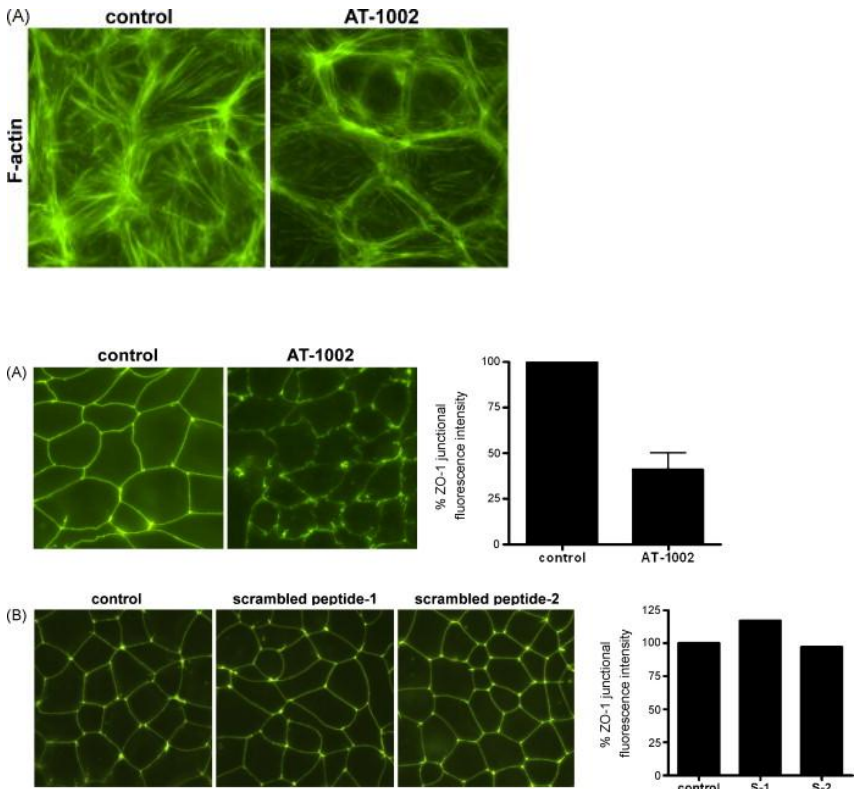
Penurunan jumlah sitoskeleton aktin di membran sel pada pemberian AT-1002 yang diukur dari intensitas fluoresensi terjadi sampai sebesar 40% dibandingkan kontrol. Goldblum dan kawan-kawan (122) juga berhasil

membuktikan bahwa pemberian T-1002 meningkatkan fosforilasi serin/treonin pada miosin 1C.

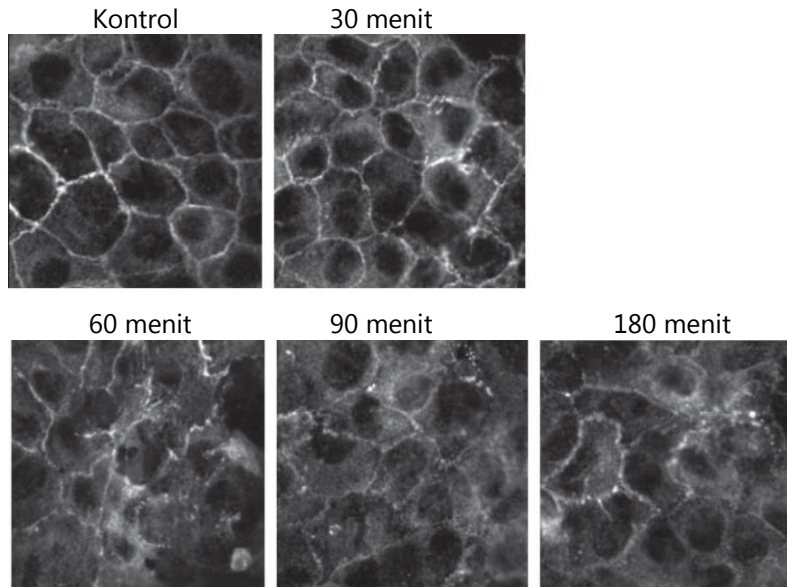


Gambar 2-18. Pengaruh AT-1002 terhadap sitoskeleton aktin pada sel IEC-6 (A) dan Caco-2 (B). Perlakuan AT-1002 menyebabkan penurunan jumlah F-aktin sampai sebesar 40% dibandingkan kontrol (155)

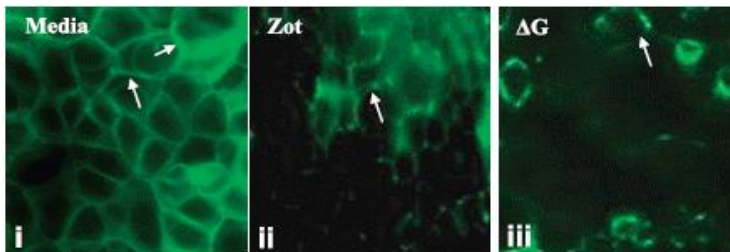
Sebagaimana hipotesis Fasano (157), penyusunan ulang filament aktin akan diikuti oleh perpindahan beberapa protein dari kompleks junction. Hal ini dibuktikan oleh Gopalakrishnan dan kawan-kawan (155) dan Goldblum dan kawan-kawan (122). Kelompok peneliti ini berhasil membuktikan bahwa perlakuan protein Zot, fragmen ΔG , ataupun peptida AT-1002 pada sel-sel IEC-6 dan CACO-2 menyebabkan redistribusi protein ZO-1 dan okcludin menjauh dari situs junction di membran sel, sebagaimana yang tampak dari mikroskopi fluoresens pada Gambar 2-19, 2-20, dan 2-21. Penurunan jumlah ZO-1 di situs junction sampai 40% dibandingkan kontrol, dan penurunan jumlah ZO-1 di situs junction sejalan dengan waktu (Gambar 2-20).



Gambar 2-19. Pengaruh AT-1002 terhadap distribusi protein ZO-1 pada sel CACO-2. Pada sel yang diberi perlakuan AT-1002 terjadi penurunan jumlah ZO-1 di junction antar sel sampai sebesar 40% (A). Perlakuan peptida-peptida kontrol tidak menunjukkan pengaruh yang signifikan (B) (Gopalakrishnan et al, 2009).



Gambar 2-20. Perlakuan AT1002 menyebabkan redistribusi ZO-1 dari situs junction antar sel IEC-6. Pada kontrol tampak ZO-1 terdistribusi pada membran sel, sedangkan pada perlakuan AT-1002 tampak ZO-1 di membran sel makin lama makin berkurang seiring dengan berjalannya waktu (Goldblum et al, 2011).



Gambar 2-21. Pengaruh Zot (ii) dan fragmen ΔG (iii) terhadap distribusi okcludin pada sel-sel CACO-2, dibandingkan dengan kontrol (i). Panah menunjukkan okcludin yang makin menghilang dari membran sel pada perlakuan Zot dan ΔG (Goldblum 2011).

Uji koimunopresipitasi mengungkapkan bahwa AT-1002 menurunkan interaksi protein ZO-1 dengan protein-protein pasangannya, yaitu okludin dan klaudin, dan bersamaan dengan itu terjadi peningkatan fosforilasi pada protein ZO-1, baik fosforilasi tirosin maupun serin/treonin bergantung PKC α (122,155). AT-1002 juga meningkatkan fosforilasi miosin IC, dan pada saat yang sama mengurangi interaksinya dengan ZO-1 secara sementara. Domain karboksil ZO-1 diperlukan untuk asosiasinya dengan miosin IC. Data ini menunjukkan bahwa bagian ujung amino dari protein Zot mengandung motif PAR2-AP, FCIGRL, yang meningkatkan fosforilasi serin/treonin bergantung PKC α dari ZO-1 dan miosin IC. Perubahan ini mendorong lepasnya ZO-1 dari protein pasangannya, okludin, klaudin 1, dan miosin IC, sehingga kemudian terjadi pelonggaran *junction ketat* (122).

Modulasi junction ketat menggunakan modulator okludin

Okludin adalah salah satu protein transmembran yang berada pada junction ketat (Gambar 1-7). Protein ini memiliki 4 domain transmembran, dengan kedua ujung N dan C nya mengarah ke dalam sitoplasma (Gambar 1-8). Okludin berperan dalam transduksi signal yang dimediasi oleh sitokin (158), sedangkan transduksi signal ini erat hubungannya dengan pembentukan dan integritas junction ketat (159). Berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa baik domain sitoplasmik maupun domain ekstraseluler okludin berperan penting pada fungsi okludin sebagai salah satu protein

junction ketat. Mutasi pada domain-domain tersebut dapat mengganggu keutuhan junction ketat (9,13,14).

Domain ekstraseluler okludin terdiri dari dua loop (Gambar 1-8). Wong dan Gumbiner (10) membuktikan bahwa peptida sintetik 44-mer yang diturunkan dari sekuens loop kedua okludin ayam (residu asam amino ke 184-227 (Gambar 2-22) dapat merusak permeabilitas junction ketat sel-sel epitel ginjal *Xenopus* (galur sel A6), sedangkan peptida 44-mer yang sekuensnya diturunkan dari loop pertama (Gambar 2-22) (residu asam amino ke 81-125) ternyata tidak efektif. Ini menunjukkan bahwa loop kedua kemungkinan lebih berperan dalam pembentukan junction ketat dibandingkan loop pertama. Tetapi hasil penelitian Lacaz-Vieira (160) menunjukkan bahwa peptida sintetik yang sekuensnya diturunkan dari loop pertama, yaitu SNYYGSGLSY (10-mer, residu 100-109) dan SNYYGSGLS (9-mer, residu 100-108), ternyata dapat menghambat resealing dari junction pada sel A6 (sel epitel *Xenopus*).

Dari loop EC-2

GVNPQAQMSSGYYYSPLLAMCSQAYGSTYLNQYIYHYCTVDPQE

Dari loop EC-1

DYGYGLGGAYGTGLGGFYGSSNYYGSGLSSYGYGGYYGGVNQRT

Peptida sintetik 10-mer SNYYGSGLSY

Peptida sintetik 9-mer SNYYGSGLS

Gambar 2-22. Sekuens peptida loop ekstraseluler pertama (EC-1) dan kedua (EC-2) okludin ayam

Tambahan lagi, penelitian yang dilakukan oleh Tavelin dan kawan-kawan (161) juga menunjukkan bahwa beberapa peptida sintetik yang sekuens diturunkan dari EC-1 okludin manusia ternyata efektif menurunkan TEER sel-sel CACO-2 dan meningkatkan permeasi paraseluler (manitol) melintasi lapis tunggal sel-sel CACO-2, sedangkan peptida yang diturunkan dari EC-2 tidak efektif.

Hal ini tampaknya bertentangan dengan hasil penelitian Wong dan Gumbiner (10). Tavelin dan kawan-kawan (161) menguji peptida-peptida sintetik yang sekuensnya diturunkan dari sekuens okludin manusia, dan diujikan pada sel-sel CACO-2 yang juga berasal dari manusia, sedangkan Wong dan Gumbiner (10) menggunakan sel Xenoplas (sel A6) sebagai model dan sekuens peptidanya diturunkan dari okludin ayam. Mungkin perbedaan ini yang menyebabkan eksperimennya menunjukkan hasil yang berbeda.

Dari eksperimen-eksperimen ini terungkap bahwa, perlakuan peptida-peptida okludin yang mengganggu integritas junction sel disertai dengan redistribusi okludin dari membran sel, tetapi tidak mengganggu ekspresi dan distribusi protein-protein junction sel yang lain, seperti ZO-1, ZO-2, singulin, kladin-1, kladin-4, dan E-kadherin (10,162). Penurunan jumlah okludin, terjadi baik di membran sel maupun secara total di seluruh sel.

Hal yang menarik dari hasil penelitian Tavelin dan kawan-kawan (161) adalah, peptida-peptida besar tersebut ternyata tidak efektif bila diberikan melalui sisi apikal, tetapi akan memberi pengaruh yang signifikan jika diberikan melalui sisi basolateral. Peptida OP90-103 (14-mer), misalnya, tidak memberikan efek peningkatan permeasi jika diberikan

melalui sisi apikal, padahal pemberian melalui sisi basolateral menyebabkan peningkatan permeasi sampai 11 kali lipat, bahkan jika diberikan dari kedua sisi (apikal dan basolateral sekali gus) dapat meningkatkan permeasi molekul sampai 68 kali lipat (161). Hal ini juga tampak pada peptida OP₉₀₋₁₁₃ (24-mer). Tavelin dan kawan-kawan memperkirakan hal ini disebabkan karena peptida mengalami hidrolisis oleh enzim-enzim yang berada di permukaan sel pada pemberian dari sisi apikal, sedangkan dari sisi basolateral tidak. Kemungkinan lain adalah karena ukurannya yang cukup besar, peptida ini tidak dapat melintasi junction ketat untuk dapat mencapai molekul sasarannya, yaitu okludin. Hal ini juga tampak pada modulasi junction adheren oleh peptida-peptida kadherin. Peptida 10-mer menunjukkan aktivitas yang kuat jika diberikan melalui sisi basolateral, tetapi tidak efektif jika diberikan dari sisi apikal. Namun konfirmasi tentang hal ini harus dilakukan dengan pembuktian yang akurat.

Untuk memperkecil kemungkinan hidrolisis peptida, maka dikonstruksi sebuah peptida lipoamida dengan mengkonjugasikan peptida OP₉₀₋₁₀₃ dengan asam lipoamino [H₂N-CH(C₁₂H₂₅)-COOH] pada ujung aminonya. Diharapkan juga, gugus lipoamina tersebut akan menyusup atau menyelip pada membran sel, sehingga peptida akan terkonsentrasi di permukaan sel. Ternyata peptida lipoamida ini memang dapat meningkatkan permeasi manitol melintasi sel-sel CACO-2 sampai 30 kali (C₁₄-OP₉₀₋₁₀₃) dan 35 kali lipat (C₁₄-OP₉₀₋₁₀₃) walaupun diberikan dari sisi apikal (161). Apakah ini disebabkan karena penurunan risiko hidrolisis oleh enzim-enzim peptidase atau karena memang gugus

lipoamina membantu konsentrasi peptida di permukaan sel seperti hipotesis Tavelin dan kawan, atau ada penyebab lain, masih harus dibuktikan. Peptida lipoamida sekuens OP90–103 ini juga dapat memodulasi junction ketat pada sel-sel epitel saluran nafas, dibuktikan dengan efektivitasnya meningkatkan permeasi paraselular dekstran dan vektor transfer gen (162). Bagaimana mekanisme kerja peptida-peptida okludin ini dalam memodulasi junction ketat masih belum diketahui. Ada kemungkinan, peptida-peptida ini bekerja menghambat interaksi antar molekul-molekul okludin yang berdekatan.

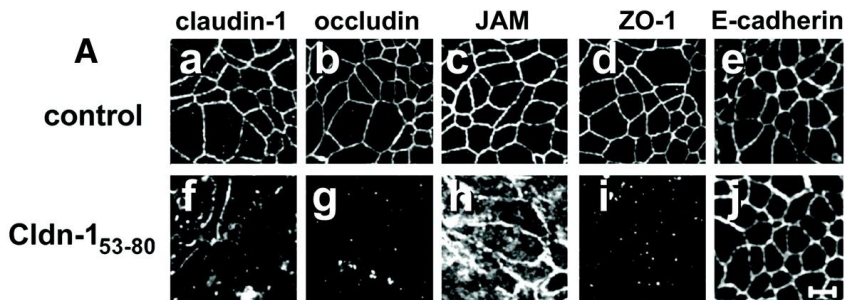
Modulasi junction ketat menggunakan modulator kladin

Kladin adalah salah satu protein yang memiliki peran penting pada junction antar sel, terutama di junction ketat. Protein-protein kladin memediasi adhesi sel yang tidak bergantung kalsium. Kladin memiliki empat heliks domain transmembran, dua loop ekstraseluler, dan dua domain intraseluler (Gambar 1-10). Hasil-hasil penelitian menunjukkan bahwa kladin merupakan protein utama yang berperan pada pembentukan struktur serabut junction ketat. Molekul-molekul kladin akan berinteraksi sesamanya pada serabut junction ketat yang berbeda atau pada serabut yang sama baik secara homotipik maupun heterotipik (20).

Sebagaimana protein-protein junction yang berada di permukaan, kladin juga menarik untuk dimodulasi dalam rangka meningkatkan permeasi paraselular. Salah satu hipotesis yang biasa diajukan adalah memodulasi junction

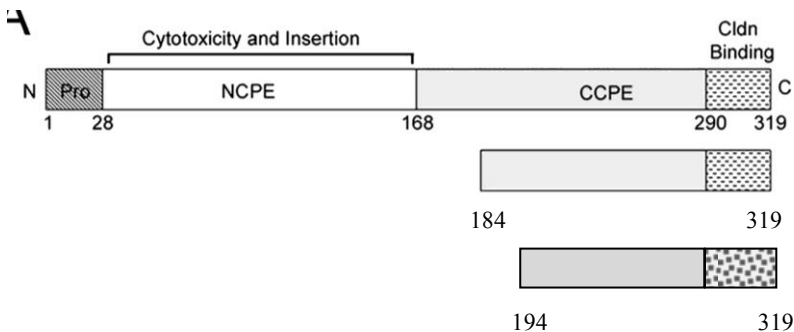
antar sel dengan menghambat interaksi protein-protein transmembran antar sesamanya. Oleh sebab itu selalu menarik untuk mengeksplorasi domain-domain aktif dalam sekuens protein tersebut.

Sebuah peptida 27-mer yang diturunkan dari sekuens loop ekstraseluler pertama kladin (Cldn-1₅₃₋₈₀) terbukti dapat mengganggu keutuhan sawar epitel usus secara *in vitro* (menggunakan model lapis tunggal sel T84) dengan jalan menginduksi redistribusi protein-protein yang berperan dalam junction ketat, yaitu okludin, kladin-1, JAM-A (junctional adhesion molecule-A), dan ZO-1, tetapi tidak mengganggu distribusi E-kadherin (Gambar 2-23). Peptida Cldn-1₅₃₋₈₀ ini berikatan dengan kladin-1 dan okludin. Pemberian peptida Cldn-1₅₃₋₈₀ per oral pada tikus meningkatkan permeabilitas paraselular lambung (163).



Gambar 2-23. Inkubasi lapis tunggal sel T84 dengan peptida Cldn53-80 (200 $\mu\text{mol/L}$) menyebabkan redistribusi kladin, okludin, JAM, dan ZO-1 dari membran sel, tetapi distribusi E-kadherin tidak terganggu. Pengamatan mikroskopi konfokal imunofluoresens ini dilakukan 24 jam setelah pemberian peptida (163).

Enterotoksin dari *Clostridium perfringens* (CPE = *Clostridium perfringens* enterotoxin), mikroba yang sering menjadi penyebab keracunan makanan, ternyata dalam aktivitasnya berikatan dengan salah satu kladin, yaitu kladin-3 melalui domain loop ekstraseluler kedua kladin-3 (164). CPE memiliki dua domain fungsional yang sangat berbeda fungsinya, yaitu sebuah domain ujung amino (N) berukuran lebih kurang 22-kDa yang memediasi aktivitas sitotoksitas CPE dan sebuah domain di ujung karboksil (C) berukuran lebih kurang 13-kDa yang memediasi pengikatan CPE pada reseptornya (Gambar 2-24).



Gambar 2-24. CPE (*Clostridium perfringens* enterotoxin) memiliki dua domain fungsional, domain ujung amino (N-CPE) yang memediasi aktivitas sitotoksitas CPE dan domain ujung karboksil (C-CPE) yang memediasi pengikatan CPE pada reseptornya. Dari ujung karboksil CPE ini dikonstruksi dua peptida, yaitu peptida C-CPE184 (mengandung sekuens CPE mulai dari asam amino 184 sampai dengan 319) dan C-CPE-194.

Polipeptida yang dikonstruksi dari bagian ujung karboksil CPE (C-CPE184) ternyata dapat meningkatkan absorpsi

dekstran (BM 4000) melalui jejunum (usus halus) tikus 400 kali lebih baik daripada natrium kaprat, suatu peningkat absorpsi yang sudah digunakan secara klinis. Efek ini tidak disertai dengan kerusakan pada mukosa usus ditandai dengan tidak adanya kebocoran enzim laktosa dehidrogenase, dan juga dikonformasi dengan pengamatan histopatologi (165). Dalam penelitian ini juga diperlihatkan bahwa C-CPE184 berikatan dengan klaudin-4, dan C-CPE184 mutan yang tidak memiliki bagian ujung karboksil ternyata tidak dapat berikatan dengan klaudin-4 dan juga tidak dapat meningkatkan permeasi paraseluler jejunum tikus. Berarti, C-CPE184 memodulasi junction ketat melalui interaksi dengan klaudin-4. Pada penelitian berikutnya dibuktikan bahwa C-CPE184 ini juga dapat meningkatkan absorpsi hPTH (senyawa peptida turunan hormon paratiroid manusia) melalui nasal, tetapi tidak absorpsi jejunum ataupun pulmoner. Tetapi ketika molekul C-CPE184 yang hidrofobik ini dibuat lebih hidrofilik (kelarutannya meningkat 30 x lipat) dengan memotong 10 residu asam amino di ujung aminonya, maka peptida baru ini (C-CPE194) dapat meningkatkan absorpsi hPTH dan dekstran, baik melalui nasal, jejunum, maupun pulmoner. Peptida ini juga dapat berikatan dengan klaudin-4. Baik peptida C-CPE184 maupun C-CPE194 dapat menurunkan TEER lapis tunggal sel CACO-2 pada pemberian melalui sisi apikal, dan pengukuran TEER dilakukan 18 jam setelah pemberian peptida (166).

Sebagaimana peptida-peptida modulator junction antar sel lainnya, mekanisme lengkap yang mendasari timbulnya efek peptida-peptida tersebut dalam memodulasi junction antar sel masih belum dapat dijelaskan dengan lengkap.

Tetapi yang sudah terungkap, peptida modulator kladin ini tampaknya berikatan dengan kladin (setidaknya yang sudah terbukti dengan kladin 1, 3, dan 4), dan kemudian dengan mekanisme tertentu menginduksi redistribusi protein-protein yang berperan dalam junction ketat, yaitu okludin, kladin-1, JAM-A (junctional adhesion molecule-A), dan ZO-1. Salah satu peptida modulator, yaitu Cldn-1₅₃₋₈₀ juga dapat berikatan dengan okludin (163,165,166).

STRATEGI PRODRUG

Istilah prodrug pertama kali diperkenalkan pada tahun 1958 oleh Adrien Albert untuk menyatakan suatu senyawa yang harus menjalani biotransformasi terlebih dahulu sebelum menunjukkan efek farmakologisnya. Sesuai dengan definisi ini, maka dapat dikatakan prodrug merupakan senyawa obat yang belum aktif, dan akan dimetabolisme menjadi metabolit yang aktif di dalam tubuh.

Prodrug didisain dengan tujuan untuk meningkatkan sifat-sifat fisikokimia, biofarmasetik, atau farmakokinetik suatu senyawa obat, dengan tujuan utama untuk meningkatkan penghantaran obat ke jaringan sasaran, mengatasi hambatan berbagai sawar biologis di dalam tubuh baik sawar fisik maupun sawar enzimatik dan meminimalkan toksisitas sistemik, sehingga dapat meningkatkan kebergunaan dan penggunaannya sebagai obat. Prodrug didisain antara lain untuk mengatasi kelarutan yang rendah, absorpsi yang rendah, ketidakstabilan senyawa, kerentanan terhadap metabolisme presistemik, hambatan distribusi ke jaringan sasaran, toksisitas sistemik yang tidak selektif (pada kasus obat kanker), dan lain sebagainya. Dalam kenyataannya, banyak obat-obat yang sekarang beredar sebenarnya merupakan prodrug. Sekitar 5-7% dari seluruh obat yang beredar saat ini dapat diklasifikasikan sebagai prodrug, dan lebih kurang 15% dari seluruh obat baru yang diberi izin edar pada tahun 2001 dan 2002 merupakan prodrugs (167).

Strategi yang digunakan dalam membuat prodrug bermacam-macam. Semuanya tentu mempertimbangkan keberadaan enzim di dalam tubuh yang diharapkan akan mengkonversi prodrug menjadi senyawa obat yang aktif. Walaupun demikian, pada kasus-kasus tertentu, enzim yang diharapkan mengubah prodrug menjadi zat aktifnya justru diberikan dari luar tubuh, misalnya pada pengobatan kanker dengan teknik ADEPT (*antibody-directed enzyme prodrug therapy*), atau bahkan dimasukkan dari luar dalam bentuk gen pengkode enzim tersebut, misalnya dalam pengobatan kanker dengan teknik GDEPT (*gene-directed enzyme prodrug therapy*).

Disain prodrug tentu juga harus mempertimbangkan rute administrasi obat, dengan perkataan lain harus mempertimbangkan sawar biologis yang harus dilalui oleh molekul obat. Misalnya untuk pemberian per oral, masalah utama yang dihadapi adalah molekul obat tidak larut dalam cairan saluran pencernaan, senyawa obat terlalu polar sehingga tidak dapat melintasi membran epitel sel-sel saluran cerna, senyawa obat merupakan substrat untuk pompa efluks yang berada di sel-sel enterosit, dan/atau senyawa obat mengalami metabolisme presistemik baik di saluran cerna maupun di hati (168).

Strategi disain prodrug yang paling banyak dilakukan adalah dengan mengubah gugus-gugus fungsi tertentu pada senyawa obat, misalnya gugus karboksil, hidroksil, amina, fosfat/fosfonat, dan gugus karbonil, menjadi gugus-gugus ester, karbonat, karbamat, amida, fosfat, dan oksim. Namun demikian, beberapa gugus-gugus lain yang tak lazim juga digunakan sebagai sasaran disain prodrug. Misalnya, gugus

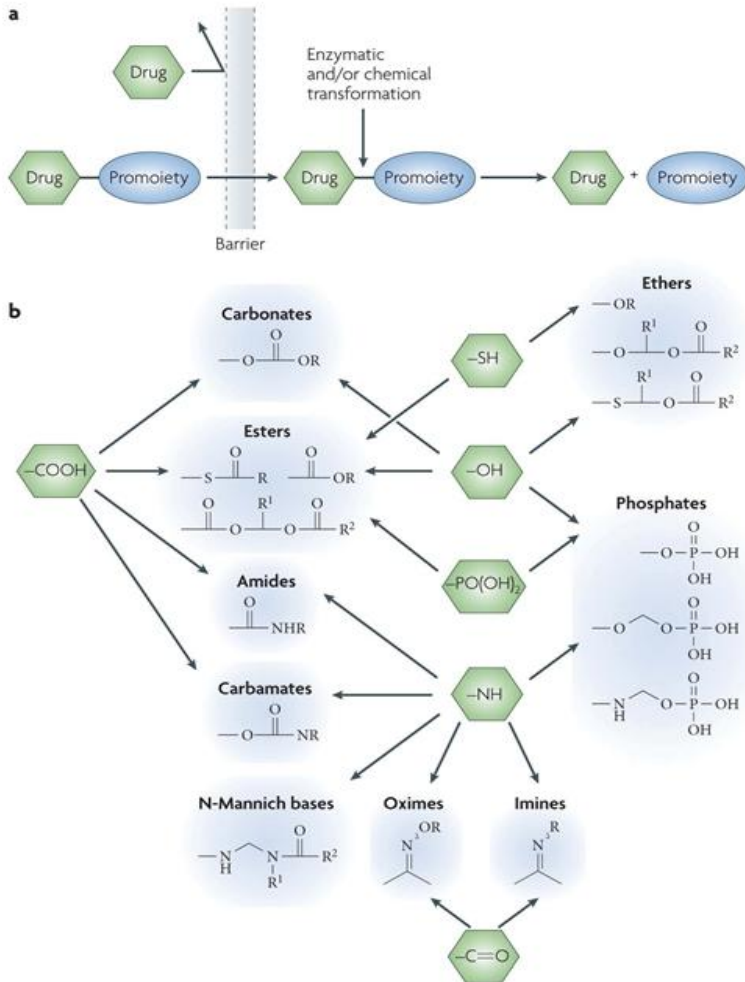
tiol diubah menjadi tioeter atau tioester, gugus amina diubah menjadi imina atau basa Mannich (167). Strategi perubahan gugus fungsi dalam disain prodrug secara umum digambarkan sebagaimana yang ditampilkan dalam gambar 3-1.

Prodrug ester untuk meningkatkan lipofilisitas

Pembentukan ester merupakan strategi prodrug yang paling banyak dipakai untuk meningkatkan bioavailabilitas obat, lebih kurang 49% prodrug yang sekarang beredar merupakan senyawa ester dari zat aktifnya (169). Ada beberapa alasan mengapa suatu prodrug ester memiliki bioavailabilitas yang jauh lebih tinggi dibandingkan *parent* drugnya, tetapi yang paling utama adalah karena dengan pembentukan ester, lipofilisitas senyawa akan meningkat. Penghilangan satu pasang ikatan hidrogen dari *parent compound* akan meningkatkan permeabilitas secara logaritmik (170). Ini tentu saja berlaku untuk senyawa-senyawa berukuran kecil yang dapat melintasi membran melalui difusi pasif sederhana. Oleh sebab itu strategi pembentukan prodrug ester terutama dipakai untuk meningkatkan lipofilisitas senyawa-senyawa berukuran kecil yang memiliki gugus hidroksil, atau gugus-gugus bermuatan seperti gugus karboksilat dan gugus fosfat.

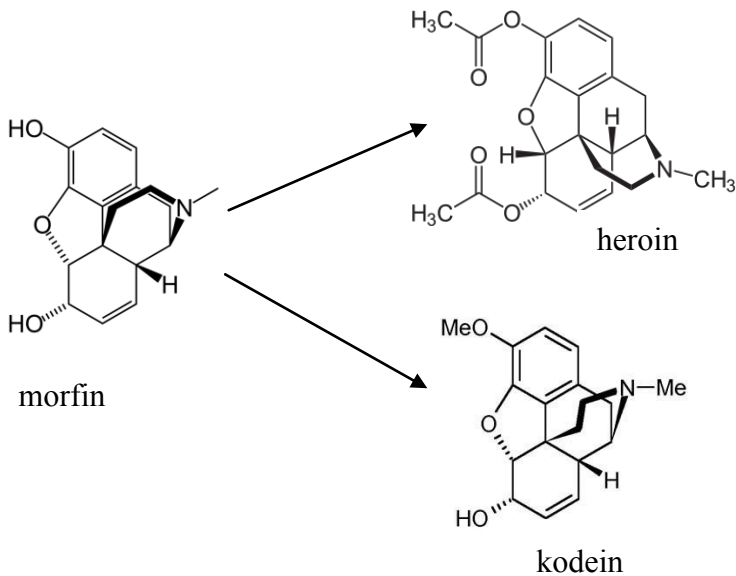
Contoh klasik pembentukan prodrug ester adalah perubahan morfin menjadi heroin atau kodein. Morfin adalah obat yang bekerja di susunan syaraf pusat, tetapi transpornya melintasi sawar darah otak sangat rendah. Oleh sebab itu morfin diubah menjadi senyawa esternya, O-

metilasi menjadi kodein, atau O-asetilasi menjadi heroin (Gambar 3-2).



Gambar 3-1. Strategi perubahan gugus fungsi dalam disain prodrug (167)

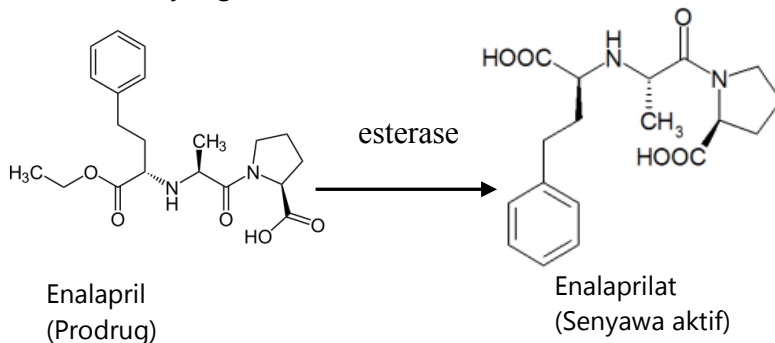
Pengubahan morfin menjadi kodein (metilmorfin) atau heroin (diasetilmorfin) meningkatkan permeabilitasnya masing-masing menjadi 10 kali dan 100 kali lipat. Begitu masuk ke dalam jaringan otak, heroin akan dihidrolisis oleh enzim-enzim hidrolase kembali menjadi morfin. Karena sifatnya yang sangat polar, maka morfin tidak dapat keluar lagi dari jaringan otak karena tak dapat menembus sawar darah otak (171).



Gambar 3-2. Pengubahan morfin menjadi kodein atau heroin meningkatkan permeabilitasnya masing-masing menjadi 10 kali dan 100 kali lipat.

Contoh sukses obat-obat yang beredar dalam bentuk prodrug adalah obat-obat penurun tekanan darah golongan penghambat ACE (angiotensin-converting enzyme) seperti

Enalapril (Vasotec®), Benazepril (Lotensin®), dan Ramipril (Altace®). Obat-obat ini merupakan prodrug ester yang diabsorpsi jauh lebih baik pada pemberian per oral dibandingkan dengan obat induknya (parent drug). Obat induk dari Enalapril, Benazepril, dan Ramipril, masing-masing adalah Enalaprilat, Benazeprilat, dan Ramiprilat, merupakan asam dikarboksilat yang tidak diabsorpsi dengan baik pada pemberian per oral, tetapi digunakan untuk pemberian intravena. Hampir semua obat-obat penghambat ACE lainnya, kecuali kaptopril dan lisinopril, termasuk di antaranya adalah erindopril, quinapril, cilazapril, spirapril, dan trandolapril, diberikan dalam bentuk prodrug ester seperti ini. Prodrug-prodrug ini akan dihidrolisis oleh berbagai enzim esterase di sel-sel hati menjadi senyawa asam dikarboksilat yang aktif (Gambar 3-3).



Gambar 3-3. Hidrolisis Enalapril dan Ramipril (prodrug) menjadi senyawa-senyawa aktifnya oleh enzim-enzim esterase di hati.

Enalaprilat dan Ramiplirat diabsorpsi sangat rendah pada pemberian per oral.

Beberapa prodrug ester yang beredar dan sudah digunakan secara luas disajikan dalam tabel 3-1. Begitu berada di dalam tubuh, senyawa-senyawa prodrug ini akan dihidrolisis oleh berbagai enzim esterase, termasuk karboksilesterase, asetilkolinesterase, butirilkolinesterase, paraoksonase, dan arilesterase yang tersebar di berbagai jaringan tubuh, di plasma darah, di hati, dan di berbagai jaringan tubuh lainnya menghasilkan senyawa obat yang aktif.

Tabel 3-1. Beberapa prodrug yang didisain untuk meningkatkan lipofilisitas dan/atau permeabilitas melintasi membran

Prodrug (efek farmakologis)	<i>Parent compound</i>	Strategi prodrug	Keterangan
Enalapril (penghambat ACE)	Enalaprilat	- Monoetil ester dari Enalaprilat - Biokonversi oleh esterase	Bioavailabilitas oral Enalaprilat pada manusia 36-44% meningkat menjadi 53-74%
Ramipril (penghambat ACE)	Ramiprilat	- Monoetil ester dari Enalaprilat - Biokonversi oleh esterase	
Benazepril	Benazeprilat		
Fosinopril (Fozilec®)			

Strategi Meningkatkan Penghantaran Obat Di Dalam Tubuh

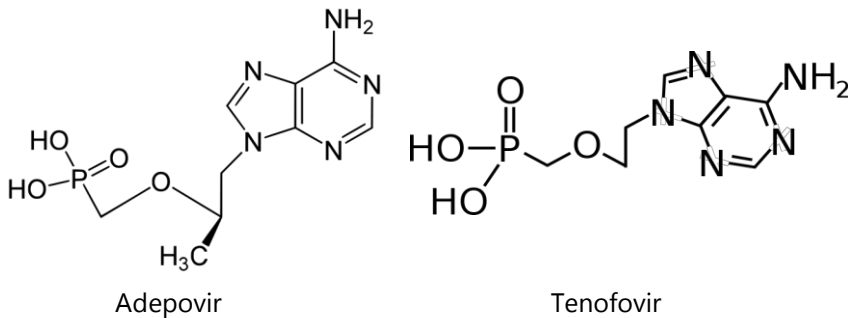
Prodrug (efek farmakologis)	<i>Parent compound</i>	Strategi prodrug	Keterangan
Famciclovir (antiviral)	Penciclovir	Biokonversi oleh esterase dan oksidasi dari purin menjadi guanida	Bioavailabilitas oral penciclovir pada manusia 5% meningkat menjadi 75% untuk famciclovir
Tenofovir disoprosil (antiviral)	Tenofovir	Biokonversi oleh esterase dan fosfodiesterase	analog nukleotida inhibitor reverse transcriptase (nucleotide analog reverse transcriptase inhibitor (ntRTI))
Adefovir dipivoksil (antiviral)	Adefovir	Biokonversi oleh esterase dan fosfodiesterase	Bioavailabilitas oral adefovir sekitar 10% meningkat menjadi 30-45% untuk adefovir dipivoksil
Oseltamivir (Etil ester dari Oseltamivir karboksilat) (anti influenza)	Oseltamivir karboksilat	Biokonversi oleh esterase	Bioavailabilitas oral oseltamivir karboksilat <5% (pada tikus) meningkat menjadi 79% pada manusia
Pivampisilin	Ampisilin	- Ester	Bioavailabilitas

Prodrug (efek farmakologis)	<i>Parent compound</i>	Strategi prodrug	Keterangan
(antibiotika β -laktam)		pivaloilmetil dari ampicilin - Biokonversi oleh esterase	oral ampicilin 32-55% meningkat menjadi 87-94% untuk pivampisilin
Ximelagatran (antikoagulan)	Melagatran	- Ester hidroksiamidin - Biokonversi oleh esterase dan enzim-enzim pereduksi	Bioavailabilitas oral melagatran 3-7% meningkat menjadi 20% untuk ximelagatran

Obat-obat antiviral analog nukleosida umumnya merupakan senyawa polar, sehingga absorpsi per oral nya sangat buruk, kurang dari 5% (167). Pada tenofovir dan adefovir, buruknya absorpsi per oral ini terutama disebabkan gugus asam fosfonatnya yang sangat hidrofilik (Tabel 3-2, Gambar 3-4).

Dari satu seri prodrug ester bis-karbonat tenofovir 74, telah dipilih satu kandidat untuk dikembangkan lebih lanjut, yaitu tenofovir disoproksil (Viread; Gilead). Pada uji klinis, tenofovir disoproksil dapat ditorelansi dengan baik, dengan bioavailabilitas oral lebih kurang 39%, dan sekarang disetujui diedarkan sebagai obat HIV (172-174). Begitu juga dengan adepovir, gugus asam fosfonatnya ditutup menjadi ester dipivoksil, dan absorpsi per oralnya meningkat menjadi 80%. Adepovir telah disetujui untuk diedarkan sebagai prodrug untuk menangani hepatitis B (175). Baik tenofovir disoproksil

maupun adefovir dipivoksil dengan cepat akan dibiokonversi kembali menjadi parent drugnya yang aktif oleh enzim-enzim esterase.



Gambar 3-4. Tenofovir dan adefovir memiliki bioavailabilitas per oral yang rendah terutama karena memiliki gugus fosfonat yang sangat hidrofilik

Osetamivir adalah prodrug dari osetamivir karboksilat, suatu inhibitor selektif glikoprotein neuramidase pada virus influenza A dan B. Sebagai ester etil, osetamivir diabsorpsi dengan cepat dan baik, sehingga bioavailabilitas per oralnya meningkat dari 5% menjadi 79%. Osetamivir dengan cepat akan mengalami biokonversi kembali menjadi osetamivir karboksilat terutama oleh enzim-enzim karboksilesterase-1 (CES 1) (176,177).

Satu contoh prodrug yang lain adalah ximelagatran (Exanta; AstraZeneca), prodrug etil ester dari melagatran, inhibitor thrombin pertama diberikan per oral (178). Sebagai zwitterion, bioavailabilitas per oral melagatran sangat rendah, sekitar 3-7%. Ximelagatran adalah prodrug ganda

(double prodrug), disamping memiliki gugus etil ester pada ujung karboksilatnya, ximelagatran juga mempunyai satu gugus *N*-hidroksi-amidin pada ujung amidin dari melagatran. Oleh sebab itu, pembentukan melagatran dari prodrug ximelagatran memerlukan dua reaksi metabolisme. Gugus *N*-hidroksiamidin direduksi kembali menjadi gugus amidin di hati, dan sebagian di usus, oleh enzim-enzim CYP450. Ester etilnya dihidrolisis kembali menjadi karboksilat bebas oleh enzim-enzim karbonilesterase di hati (178,179). Dengan pembentukan prodrug ganda tersebut bioavailabilitas melagatran dapat ditingkatkan sampai menjadi 20%. Ximelagatran diizinkan beredar di Eropa pada tahun 2004, tetapi kemudian ditarik kembali pada tahun 2006 karena terbukti dapat menyebabkan kerusakan hati yang parah (176).

Prodrug mimikri senyawa endogen

Protein-protein transporter yang terdapat di membran merupakan salah satu sasaran menarik dalam desain prodrug, sebab transporter-transporter ini tersebar di semua membran plasma, kapasitas transpornya tinggi, dan spesifisitas substratnya umumnya cukup lebar. Transpor molekul melintasi membran dapat berlangsung melalui difusi sederhana tanpa bantuan transporter (yang sesuai untuk senyawa-senyawa dengan lipofilisitas tinggi), juga dapat berlangsung dengan bantuan protein-protein transporter yang terdapat di membran sel. Umumnya protein-protein transpor ini tersedia untuk zat-zat endogen atau nutrisi, seperti misalnya gula-gula, asam-asam amino, oligopeptida, asam-asam lemak, nukleosida, dan lain-lain. Oleh sebab itu,

agar suatu molekul obat dapat memanfaatkan protein transporter ini, maka strukturnya harus dimodifikasi sedemikian rupa sehingga menyerupai atau merupakan mimikri dari senyawa-senyawa endogen tersebut.

Walaupun sistem transporter ini terdapat di semua sel, tetapi setiap sel memiliki spesifisitas sendiri. Artinya tidak semua sistem transporter tersebut diekspresikan sama banyaknya di semua sel. Begitu pula sebuah sel tidak memiliki semua transporter yang dikenal ada di jaringan tubuh satu spesies misalnya. Oleh sebab itu dalam mendisain prodrug untuk memanfaatkan sistem transporter ini, juga harus dikenali sistem transporter apa yang ada dan diekspresikan dalam jumlah cukup tinggi di sel-sel sasaran. Hilgendorf dan kawan-kawan (180) menganalisis ekspresi berbagai protein transporter di usus, hati, dan ginjal manusia serta di beberapa galur sel manusia. Dari 36 transporter yang dianalisis, 7 diantaranya ditemukan di ketiga organ yang diperiksa (usus, hati, dan ginjal), yaitu MDR1, MCT1, MCT5, MRP1, MRP5, OCTN2, dan OCTN1. Di usus halus (jejunum) ditemukan 26 dari 36 transporter yang dianalisis, sedangkan di kolon ditemukan 21 transporter. HPT1 merupakan transporter yang paling banyak diekspresikan di sel-sel mukosa usus, sedangkan PEPT1, BCRP, MRP2 dan MDR1 diekspresikan dalam jumlah besar di sel-sel usus halus. Di hati ditemukan 34 dari 36 transporter yang dianalisis, transporter yang diekspresikan paling tinggi adalah OCT1, MRP2, OATP-C, NTCP dan BSEP. Transporter yang diekspresikan dalam tingkat sedang di sel-sel hati adalah MDR1, MDR3, OATP8, MCT1, MRP3, UST3, BCRP, OAT2, OATP-A, MRP6, PepT1, dan OCT3. Di ginjal ditemukan

32 dari 36 transporter yang dianalisis, OAT1 diekspresikan paling tinggi, diikuti oleh OAT3, OAT4, MCT5, MDR1, MRP2, OCT2, dan OCTN2. Transporter yang diekspresikan dalam tingkat sedang di sel-sel ginjal adalah MCT5, OAT4, MDR1, MRP2, OATP-H, OCT2, OCTN2, MRP4, IBAT, MCT1. Ekspresi transporter di sel-sel CACO-2 (sel-sel kolon manusia) ternyata hampir sama dengan yang ditemukan di sel-sel kolon manusia. Di jaringan syaraf pusat (otak) ada beberapa sistem transporter yang sudah diketahui, antara lain LAT1, CAT1, hPEPT1, MCT1, GLUT1, CNT2, SMVT, dan SVCT2 (171). Pada tabel 3-2 disajikan beberapa sistem transporter yang sudah dimanfaatkan dalam mendisain prodrug.

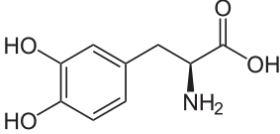
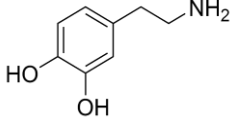
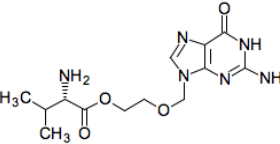
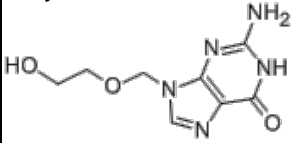
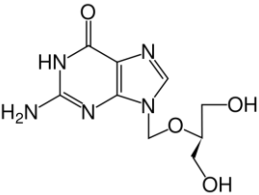
Penggunaan prodrug L-DOPA untuk menghantarkan dopamin ke dalam jaringan syaraf pusat adalah contoh klasik disain prodrug mimikri senyawa endogen. Dopamin adalah senyawa neurotransmitter yang digunakan untuk mengatasi penyakit Parkinson, dapat dikatakan tidak dapat menembus sawar darah otak. L-DOPA dihasilkan dengan melakukan α -karboksilasi dopamin. Karena L-DOPA atau levodopa (3,4-dihidroksi-L-fenilalanin) (tabel 3-3) merupakan turunan asam amino netral fenilalanin, maka dapat ditransportkan melintasi membran menggunakan sistem transporter LAT1, yaitu sistem transporter untuk asam-asam amino netral. Begitu memasuki jaringan syaraf pusat, L-DOPA akan segera dibiokonversi menjadi dopamin yang aktif oleh enzim dekarboksilase asam amino aromatik. Akan tetapi, konversi levodopa menjadi dopamin ini juga terjadi di jaringan perifer, sehingga menimbulkan efek obat yang tak diinginkan (drug adverse effect) dan juga mengurangi dopamin yang mencapai jaringan syaraf pusat. Oleh sebab itu, biasanya L-

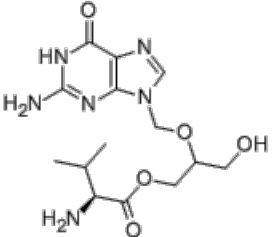
DOPA diberikan bersama-sama dengan suatu inhibitor dekarboksilasi jaringan perifer. L-DOPA juga dapat didisain menjadi prodrug ganda pGlu-L-DOPA-Pro. Prodrug ini diabsorpsi dengan sangat efisien dari saluran pencernaan, dan kemudian dimetabolisme menjadi L-DOPA yang aktif oleh piroglutamil aminopeptidase I dan prolidase. Setelah itu L-DOPA ditransportkan masuk ke jaringan syaraf pusat, dan segera diubah menjadi dopamin yang aktif oleh enzim dekarboksilase asam amino aromatik.

Tabel 3-2. Beberapa protein transpor yang dimanfaatkan dalam disain prodrug

Transporter	Substrat endogen	Keterangan
LAT1	Asam amino netral	L-DOPA
CAT1	Asam amino kationik	
hPEPT1	di- dan tripeptida	Valacyclovir, valganciclovir, Midodrin
MCT1	Asam monokarboksilat	XP13512 (prodrug karbamat gabapentin)
GLUT1	Glukosa	
CNT2	nukleosida	
SMVT (sodium-dependent multivitamin transporter)	multivitamin	XP13512
SVCT 2	Asam askorbat	

Tabel 3-3. Prodrug mimikri senyawa endogen memanfaatkan transporter spesifik

Prodrug (aktivitas)	Parent drug	Keterangan
<p>L-DOPA (Levodopa)</p> 	<p>Dopamin</p> 	<p>-</p>
<p>Valacyclovir (antiviral)</p> 	<p>Acyclovir</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Valacyclovir adalah ester valin dari acyclovir - Biokonversi oleh valacyclovirase (valacyclovir hydrolase) - Transpor terutama menggunakan hPEPT1 - Bioavailabilitas oral meningkat dari 12-20% (acyclovir) menjadi 54% (valacyclovir)
<p>Valganciclovir (antiviral)</p>	<p>Ganciclovir</p> 	

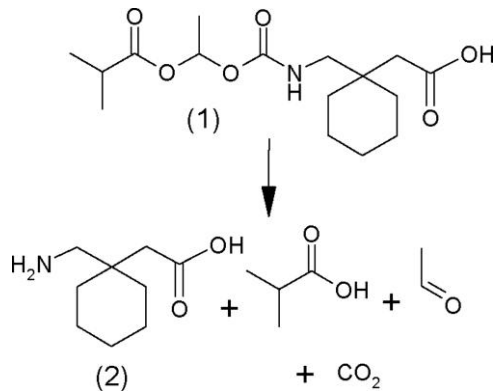
Prodrug (aktivitas)	Parent drug	Keterangan
		

Contoh lain prodrug yang didisain untuk mengeksploitasi sistem transpor di membran adalah valacyclovir (Valtrex; GlaxoSmithKline) dan valganciclovir (Valcyte; Roche) (Tabel 3-3). Kedua senyawa ini adalah ester L-valil dari acyclovir dan ganciclovir, dua senyawa antiviral yang kuat. Acyclovir merupakan *drug of choice* untuk penanganan herpes simplex. Baik acyclovir maupun ganciclovir memiliki bioavailabilitas oral yang rendah karena polaritasnya yang cukup tinggi, bioavailabilitas acyclovir pada manusia hanya 15-20%. Dengan pembentukan prodrug ester L-valil tersebut bioavailabilitas oralnya meningkat 3-10 kali lipat (Tabel 3-3), dan sudah dibuktikan bahwa transpor transmembrannya tidak lagi difusi sederhana melainkan difusi terfasilitasi terutama menggunakan sistem transpor di- dan tripeptida (hPEPT1) yang terdapat di membran sel-sel epitel usus. Setelah sampai di dalam sel, prodrug ini akan diubah menjadi *parent drug*nya melalui hidrolisis oleh enzim-enzim intraseluler (167,181).

Pendekatan prodrug yang sama juga dilakukan dalam mendisain produk obat oral dengan bahan aktif

desglimidodrin (DMAE), suatu agonis reseptor α_1 selektif yang digunakan untuk penanganan hipotensi ortostatik. DMAE sangat rendah bioavailabilitas per oralnya, sehingga dibuat prodrugnya dengan nama midodrin. Midodrin (Tabel 3-3) mengandung residu glisin yang terikat pada gugus amin DMAE, dan dikonversi menjadi parent drugnya terutama di hati dan di dalam peredaran darah sistemik enzim-enzim peptidase tertentu. Midodrin merupakan substrat hPEPT1, yang menyebabkan bioavailabilitasnya meningkat menjadi 93% dibandingkan 50% untuk DMAE (182).

Gabapentin (Neurontin; Pfizer) adalah analog struktural GABA (γ -aminobutyric acid) yang dipasarkan untuk penanganan epilepsi dan neuralgia pasca-herpes. Gabapentin memiliki keterbatasan dalam permeasi melintasi sel-sel epitel usus, di samping waktu paruhnya yang singkat. XP13512 (Gambar 3-5) adalah senyawa karbamat prodrug Gabapentin yang dikembangkan oleh Xenoport. Prodrug ini merupakan substrat dari transporter monokarboksilat tipe 1 (MCT1) yang terdapat dalam jumlah besar di membran sel-sel kolon dan saluran pencernaan bagian atas, serta transporter multivitamin bergantung natrium atau sodium-dependent multivitamin transporter (SMVT), yang berperan dalam absorpsi berbagai macam vitamin. Dengan prodrug XP13512 ini bioavailabilitas gabapentin meningkat dari 25% menjadi 84% pada kera, dan 36% menjadi 68-74,5% pada manusia. Uji klinik juga menunjukkan bahwa XP13512 segera dibiokonversi menjadi gabapentin (183-185).



Gambar 3-5. Struktur kimia XP13512 (1) dan gabapentin (2). XP13512 dibiokonversi menjadi gabapentin dengan melepaskan asam isobutirat, asetaldehida, dan karbondioksida (185)

Pengubahan molekul peptida terapeutik untuk meningkatkan permeasinya juga dapat dilakukan dengan mengkonjugasikan molekul peptida terapeutik tersebut dengan vektor-vektor tertentu yang memiliki *transporter* spesifik di membran sel. Teknik ini dengan istilah "strategi peptida chimera". Peptida chimera yang dimaksud adalah konjugasi dari peptida terapeutik yang sukar ditransportkan tersebut dengan vektor transpor tertentu yang secara alamiah dapat ditransportkan melintasi jalur transelular, baik melalui sistem "*carrier-mediated transport*", "*adsorptive-mediated endocytosis*", maupun "*receptor-mediated transcytosis*". Vektor transpor di sawar darah otak dapat berupa antibodi monoklonal spesifik reseptor atau protein-protein tertentu yang memiliki *transporter* di membran sel, seperti insulin dan transferin. Konjugasi vektor-peptida dapat

dilakukan dengan *linker* kimia, polietilenglikol, liposom, atau dengan teknologi avidin-biotin (186,187).

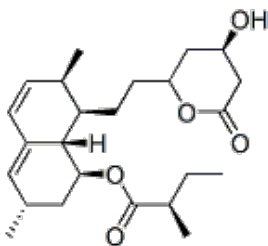
Prodrug peptida siklik

Obat-obat berupa peptida atau protein umumnya memiliki bioavailabilitas pe oral yang sangat rendah karena mudah didegradasi oleh enzim-enzim pencernaan dan sukar melintasi membran epitel usus. Gugus-gugus fungsi yang terdapat pada struktur peptida merupakan penghalang bagi senyawa tersebut untuk melintasi berbagai membran biologis. Gugus karboksil dan gugus amina, baik yang terdapat pada rantai utama maupun pada rantai samping, membuat senyawa tersebut sangat polar sehingga tidak dapat menempuh jalur transmembran, kecuali jika peptida tersebut cukup kecil sehingga dapat menjadi substrat transporter oligopeptida yang terdapat di membran sel. Ikatan peptida yang terdapat pada senyawa tersebut juga merupakan sasaran dari berbagai enzim-enzim peptidase yang terdapat intra maupun ekstraseluler.

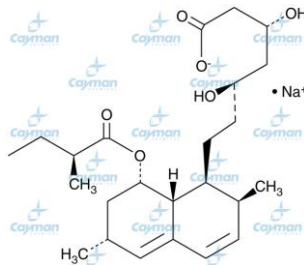
Salah satu cara yang dapat digunakan untuk meningkatkan penghantaran molekul-molekul peptida adalah dengan melakukan siklisasi. Siklisasi akan melindungi gugus-gugus amin dan karboksil terminal yang tadinya terbuka menjadi tertutup. Siklisasi tulang punggung peptida juga akan memperkuat ikatan hidrogen intramolekuler dan menurunkan potensi terjadinya ikatan hidrogen intermolekuler dengan molekul-molekul air di sekitarnya, sehingga dengan demikian akan menurunkan hidrofilitasnya. Prodrug peptida siklik ini diharapkan akan

terurai kembali di dalam sel menjadi peptida liniernya yang memiliki aktivitas biologis yang diharapkan. Oleh sebab itu pada saat mendisain peptida siklik harus dipertimbangkan agar *linker* yang digunakan, kelak harus dapat diuraikan oleh enzim esterase yang terdapat di situs sasaran. Keuntungan lain dari konstruksi peptida siklik adalah menjadi lebih stabilnya peptida-peptida tersebut terhadap degradasi enzim eksopeptidase (188-189).

Beberapa polipeptida siklik, seperti siklosporin dan analog siklik dari somatostatin, dilaporkan sangat permeabel melintasi sawar-sawar biologis. Contoh lain, obat-obat statin seperti misalnya Lovastatin (Mevacor®) dan Simvastatin (Zocor®), merupakan prodrug dengan rantai samping berbentuk cincin tertutup (lakton), yang akan dimetabolisme oleh enzim-enzim karboksierase di hati dan plasma menjadi bentuk β -hidroksi yang linier yang aktif menghambat HMGCoA reduktase (hydroxymethylglutaric acid coenzyme A reduktase) (Gambar 3-6).



bentuk lakton



bentuk asam hidroksi yang linier

Gambar 3-6. Struktur Lovastatin

Begitu juga, semua obat yang merupakan penghambat pompa proton, seperti misalnya Prilosec®, Prevacid®, dan Nexium®, merupakan prodrug yang secara kimia akan diaktivasi oleh lingkungan asam di dalam sel-sel parietal lambung. Allegra® dan Clarinex® dua senyawa antihistamin yang digunakan untuk mengatasi alergi, juga merupakan prodrug (direview dalam (190)).

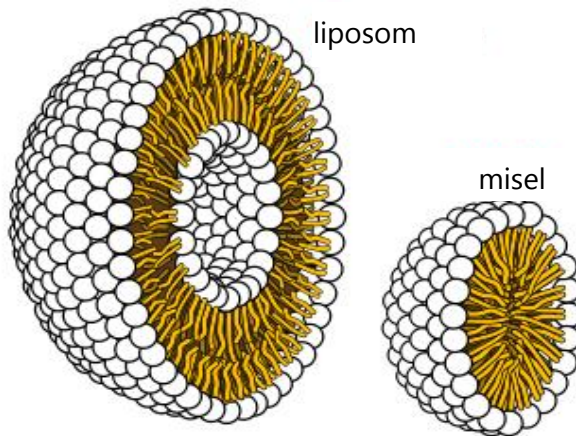
Walaupun strategi ini tampaknya cukup prospektif, namun tidak sedikit kendala yang harus dihadapi dalam menggunakannya (191). Salah satu permasalahan adalah, afinitas suatu prodrug dengan molekul *transporter* belum berarti prodrug tersebut akan dapat ditransportkan dengan baik. Oleh sebab itu dalam mendisain prodrug tidak dapat hanya bergantung pada studi kompetisi afinitas seperti yang sekarang banyak dilakukan, tetapi juga harus mempertimbangkan korelasi antara struktur peptida dengan sistem transpor transeluler.

FORMULASI FOSFOLIPID

Formulasi fosfolipid yang banyak digunakan dalam meningkatkan penghantaran obat adalah liposom. Tetapi satu dekade terakhir ini berkembang satu formulasi fosfolipid lain yang terutama digunakan untuk menghantarkan senyawa-senyawa alami yang terdapat di berbagai tumbuhan obat, karena itu disebut fitosom atau herbosom. Senyawa-senyawa ini, misalnya kurkumin (dari *Curcuma domestica* dan *Curcuma xanthorrhiza*) dan andrografolid (dari *Andrographis paniculata*), terlalu hidrofilik sehingga sulit ditransportkan melintasi membran sel. Dengan memformulasikannya dalam bentuk fitosom diharapkan bioavailabilitasnya akan meningkat.

Liposom

Liposom adalah vesikula artifisial yang terbentuk dari dua lapis fosfolipid. Liposom dapat tersusun oleh fosfolipid alami dengan berbagai residu asam lemak dan alkohol yang berbeda, atau surfaktan. Liposom berbeda dengan misel, misel tersusun hanya oleh satu lapis fosfolipid, sedangkan liposom oleh dua lapis. Oleh sebab itu, ruang di dalam liposom tetap bersifat hidrofilik, sedangkan pada misel bersifat hidrofobik (Gambar 4-1). Liposom juga dapat dibuat dengan menghancurkan membran biologis alami, misalnya dengan jalan sonikasi.

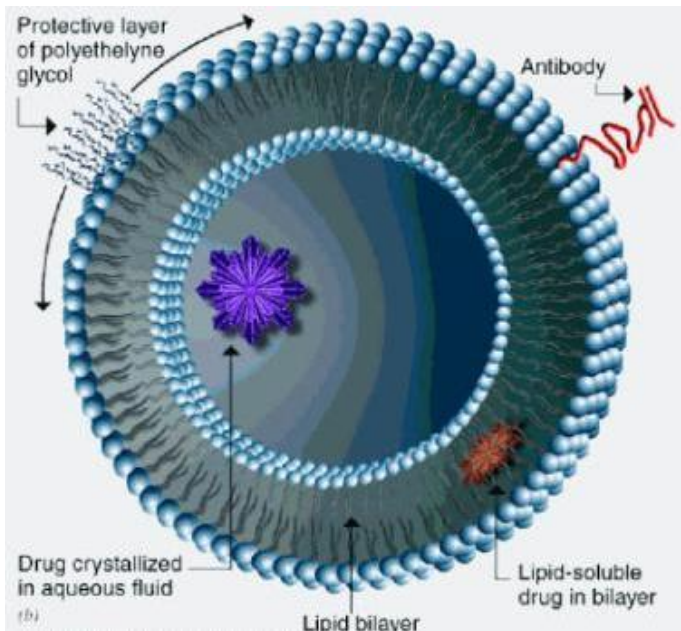


Gambar 4-1. Struktur misel dan liposom

Karena strukturnya yang unik, sebagai partikel lipid yang rongga dalamnya bersifat hidrofilik, maka liposom dapat membawa berbagai molekul obat yang bersifat hidrofilik melintasi membran sel, baik molekul-molekul obat berukuran kecil, peptida, protein, nukleotida, bahkan plasmid. Sebagaimana yang diketahui, senyawa-senyawa hidrofilik umumnya sulit melintasi membran sel, karena membran sel bersifat lipofilik. Senyawa yang bersifat lipofilik juga dapat dihantarkan menggunakan liposom. Molekul-molekul dengan lipofilisitas tinggi akan terperangkap di antara dua lapis fosfolipid penyusun liposom, sedangkan yang lipofilisitasnya agak rendah akan terpartisi antara fase lipid dan fasa air, baik pada dwilapis fosfolipid maupun di rongga dalam liposom yang bersifat aqueous (Gambar 4-2).

Keuntungan penghantaran obat menggunakan liposom adalah, molekul obat tidak perlu mengalami perubahan

kimiawi, sehingga terhindar dari kemungkinan kehilangan aktivitasnya. Keuntungan lain yang dapat diperoleh dengan penghantaran menggunakan liposom adalah molekul-molekul obat terhindar dari serangan enzim-enzim metabolik selama penghantarannya ke jaringan sasaran. Di samping itu, liposom mempunyai kelebihan karena inert, tidak toksik dan mudah didegradasi di dalam tubuh karena komposisinya yang sama dengan membran sel (192-195).



Gambar 4-2. Liposom sebagai pembawa molekul. Molekul dapat terperangkap di antara dua lapis fosfolipid penyusun liposom, atau terpartisi antara fase lipid dan fasa air

Liposom dapat diklasifikasikan berdasarkan banyaknya lamella (unilamella, oligolamella, atau multilamella),

berdasarkan ukuran (kecil, sedang, atau besar), berdasarkan metode pembuatannya (misalnya: reverse phase evaporation vesicles, VET, dan lain-lain). Vesikel unilamella hanya tersusun oleh satu dwilapis lipid dan umumnya memiliki diameter sekitar 50-250 nm. Liposom unilamella ini mempunyai rongga hidrofilik yang besar dan sesuai untuk digunakan membawa molekul-molekul senyawa hidrofilik yang mudah larut dalam air. Vesikel multilamella tersusun dari beberapa dwilapis lipid yang tersusun seperti umbi lapis, diameternya lebih besar daripada vesikel unilamella, yaitu berkisar antara 0,1–5 μm . Kandungan dwilapis lipidnya yang banyak membuat vesikel multilamella dapat dengan mudah membawa molekul-molekul bersifat hidrofobik atau larut lemak di antara dwilapis lipidnya. Di samping itu juga ada liposom yang memiliki beberapa vesikel (Tabel 4-1 dan Gambar 4-3).

Liposom konvensional atau liposom generasi pertama, merupakan liposom yang tersusun dari dua lapis fosfolipid tanpa modifikasi apa-apa di permukaannya. Di dalam peredaran darah, liposom akan segera di"tangkap" oleh sistem fagosit mononuklir (mononuclear phagocyte system, MPS) dan dikeluarkan dari peredaran darah. Sifat ini dimanfaatkan untuk menghantarkan obat-obat antiparasit atau antimikrobal untuk mengobati infeksi yang terdapat di MPS, misalnya obat-obat antimonial untuk mengobati leishmaniasis. Tetapi, jika sasarannya bukan berada di MPS, maka sifat ini justru merugikan, sebab obat akan segera dikeluarkan dari peredaran darah dan diekskresikan keluar tubuh. Oleh sebab itu dilakukan beberapa strategi untuk mengatasi pengenalan oleh MPS yang selanjutnya akan

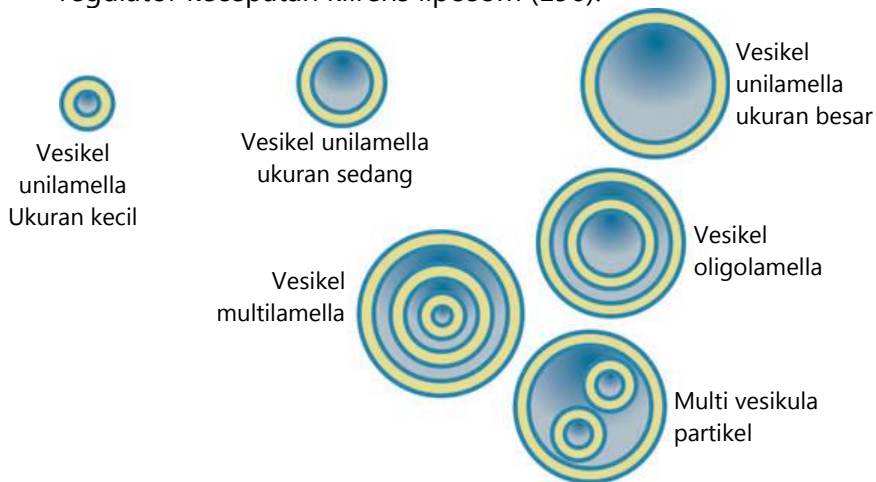
berakibat pada penghancuran liposom dan pengeluaran isi liposom pada tempat dan waktu yang tidak diinginkan.

Tabel 4-1. Jenis liposom dan ukurannya

Jenis	Jumlah dwilapis lipid	Diameter
Vesikel unilamella kecil	satu	20-50 nm
Vesikel unilamella sedang	satu	50-100 nm
Vesikel unilamella besar	satu	100-250 nm
Vesikel unilamella raksasa	satu	Lebih dari 1 μm
Vesikel oligolamella	lebih kurang 5	0,1-1 μm
Vesikel multilamella	5-25	0,5-5 μm
Vesikel multivesikular		Lebih dari 1 μm

Signal pertama pengenalan liposom oleh MPS adalah pengikatan suatu protein yang disebut opsonin pada permukaan liposom. MPS tidak mengenali liposom, tetapi mengenali opsonin yang terdapat di permukaannya (192). Komponen komplemen juga merupakan salah satu faktor yang dapat mengenali liposom dan menghancurkannya. Sistem ini bekerja melalui inisiasi lisis membran dan peningkatan *uptake* oleh sel-sel MPS (neutrofil, monosit, makrofag). Pembentukan kompleks C5b-9 (kompleks

penghancuran membran = membrane attack complex: MAC) dari sistem komplemen dapat menyebabkan pori lisis, yang akan menginduksi lisis sel, atau jika terjadi pada liposom, akan menghancurkan liposom dan mengeluarkan isinya. Pengeluaran isi liposom yang disebabkan oleh sistem komplemen ini tampaknya merupakan faktor dominan yang menentukan nasib biologis dari liposom. Namun demikian, komponen serum yang menghambat fagositosis patogen atau partikel juga ada, yaitu disopsonin. Albumin serum manusia dan Imunoglobulin A memiliki sifat-sifat disopsonin ini, dan adanya albumin serum manusia atau IgA dipermukaan partikel dapat mereduksi pengenalan oleh sistem MPS dan fagositosis. Keseimbangan antara protein-protein opsonin dan disopsonin di dalam darah merupakan regulator kecepatan klirens liposom (196).

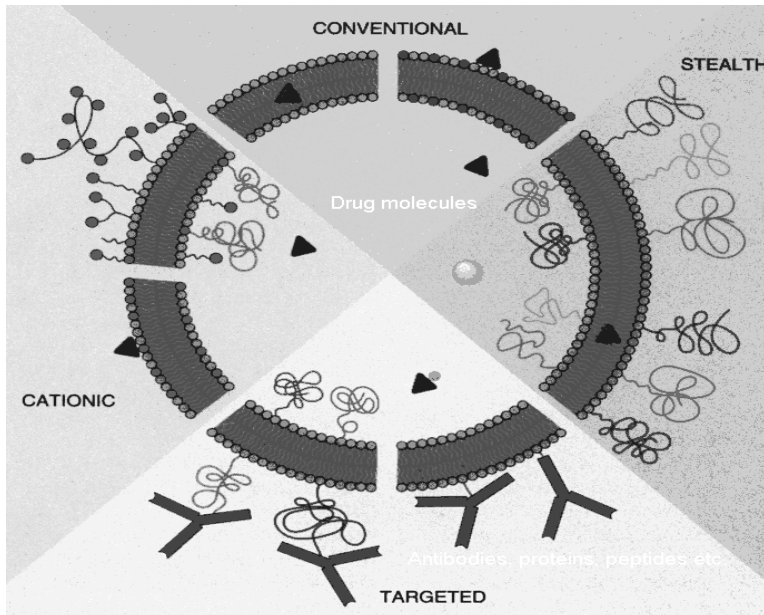


Gambar 4-3. Struktur liposom unilamella, oligolamella, dan multilamella

Satu hal lagi yang menyebabkan instabilitas liposom adalah interaksinya dengan HDL (high density lipoprotein) dan LDL (low density lipoprotein). Interaksi ini meningkatkan kecepatan pengeluaran obat dari dalam liposom ke dalam plasma.

Untuk mengatasi kelemahan-kelemahan liposom sebagaimana diuraikan di atas, maka dikonstruksi berbagai struktur liposom yang diharapkan lebih stabil serta lebih efektif dan efisien menghantarkan berbagai senyawa-senyawa obat (197,198). Liposom generasi pertama hanya merupakan vesikula yang terbentuk dari dua lapis fosfolipid sebagaimana yang digambarkan dalam gambar 4-1 dan 4-3. Dalam perkembangannya saat ini dikenal berbagai jenis liposom generasi kedua, antara lain LCL (long-circulating liposome) atau dikenal juga sebagai *stealth liposome*, yaitu liposom yang residu fosfolipidnya dikonjugasikan dengan poli PEG (polietilen glikol) (Gambar 4-4). Lapisan PEG di permukaan liposom membuat liposom terhindar dari pengenalan oleh MPS, sehingga dapat lebih lama berada di dalam sirkulasi. Di samping itu sekarang juga dikenal liposom kationik, yaitu liposom yang dibuat dari lipid bermuatan positif. Liposom kationik banyak diteliti untuk penggunaannya dalam menghantarkan gen karena mudah berinteraksi dengan asam deoksiribonukleat (DNA) yang bermuatan negatif. Liposom kationik disebut juga lipopleks kationik (Gambar 4-4). Pada penghantaran terarah, liposom dikonjugasikan dengan berbagai peptida, antibodi, atau senyawa pengarah lainnya, untuk membawa molekul-molekul obat agar terkonsentrasi ke jaringan atau sel tertentu saja, sehingga pengobatan menjadi efisien dan obat

tidak meracuni jaringan lain yang bukan merupakan sasaran. Misalnya untuk penghantaran terarah obat-obat kanker dan rematoid artritis. Berbagai-macam liposom tersebut secara skematik digambarkan dalam gambar 4-4.



Gambar 4-4. Berbagai tipe liposom yang dikenal saat ini, liposom konvensional, liposom-PEG (stealth liposome), liposom kationik, dan liposom yang dikonjugasikan dengan molekul-molekul pengarah berupa antibodi ataupun peptida (targeted liposome).

Berbagai formula obat dalam liposom sudah diizinkan beredar dan digunakan secara luas, dan sebagian lagi sedang dalam fase uji klinik (Tabel 4-2). Ambisome® (Gilead Sciences, Foster City, CA, USA) yang merupakan formula

amfoterisin B (antifungi) dalam liposom (199), Myocet® (Elan Pharmaceuticals Inc., Princeton, NJ, USA) merupakan enkapsulasi doksorubisin (antikanker) dalam liposom (200), dan Daunoxome® (Gilead Sciences), formula daunorubisin (antikanker) dalam liposom (201), merupakan contoh produk obat dengan formulasi liposom yang sudah diizinkan beredar. Untuk meningkatkan stabilitas liposom dilakukan berbagai strategi. Ambisome® misalnya, diliofilisasikan, Myocet® disuplai dalam tiga wadah yang terpisah, satu wadah berisi doksorubisin dalam bentuk serbuk kering, satu wadah berisi larutan liposom kosong dalam dapar sitrat, dan satu wadah lagi berisi larutan natrium karbonat. Pencampuran untuk mengenkapsulasi doksorubisin dalam liposom dilakukan sesaat sebelum digunakan. Daunoxome® diedarkan dalam bentuk formulasi liposom khusus yang sudah diinkorporasikan dengan kolesterol (CHOL). Inkorporasi kolesterol, dengan jalan meningkatkan pemadatan atau pengepresan fosfolipid pada struktur dwilapis lipid, dapat mereduksi transfer fosfolipid ke HDL.

Penambahan residu sfingomielin dan asam lemak jenuh dalam rantai fosfolipid penyusun liposom dapat meningkatkan stabilitas liposom. Marqibo® (Inex Pharm) diproduksi dengan cara ini menghasilkan vesikel unilamellar berisi vinkristin (Tabel 4-2), dibuktikan efektivitasnya terhadap limfoma non-Hodgkin's yang kambuh kembali. Inex Pharmaceuticals Co. juga memproduksi dua formula obat liposom lain yaitu INX-0125™ (liposomal vinorelbine) (202) dan INX-0076™ (liposomal topotecan) (203), yang juga menggunakan formula campuran sfingomielin-kolesterol. Peningkatan formula produk liposom juga dilakukan dengan

fosfatidilkolin kedelai yang dihidrogenasi (hydrogenated soy phosphatidylcholine = HSPC). OSI Pharmaceuticals, Inc. (Melville, NY, USA) menggunakan HSPC dan kolesterol untuk membuat liposom dan digunakan mengenkapsulasi lurtotecan (obat kanker), produknya diberi nama OSI-211™. Hasil uji klinik menunjukkan bahwa inorporasi OSI-211 dalam rongga hidrofilik liposom yang bersifat asam dapat lebih menstabilkan cincin lakton dari lurtotecan dan meningkatkan efektivitas sitotoksiknya terhadap sel-sel tumor (204).

Tabel 4-2. Beberapa formulasi liposom yang sudah diizinkan beredar dan sedang dalam fase uji klinik

Zat aktif (nama dagang)	Komposisi	Penggunaan	Fase uji klinik
Daunorubicin (DaunoXome [®] , Nexstar Pharmaceuticals)	DSPC/CHOL	Kaposi's sarcoma	Disetujui beredar tahun 1995
Doksorubisin (DOXIL [®] /Caelyx [®] , Sequus Pharmaceuticals)	HSPC/CHOL/D SPE-PEG (stealth liposome)	Kaposi's sarcoma, kanker ovarium dan payudara	Disetujui beredar tahun 1997
Doksorubisin (MCC-465)	PEG-imunoliposom	Berbagai jenis kanker, terutama kanker lambung	Fase I
Doksorubisin (Myocet [®] /Evacet [®] , Elan Pharma)	EPC/CHOL	Metastatic breast cancer	Disetujui beredar tahun 2000
Cisplatin (SPI-077, Sequus Pharmaceuticals)	SoyHPC/CHOL /DSPE-PEG (stealth liposome)	Head and neck cancer, Lung cancer	Fase II

Strategi Meningkatkan Penghantaran Obat Di Dalam Tubuh

Zat aktif (nama dagang)	Komposisi	Penggunaan	Fase uji klinik
Cisplatin (Lipoplatin™, Regulon Inc.)	SoyPC/DPPG/C HOL (stealth liposome)	Several cancer type	Fase II/III
Analog Camptothecin (S- CKD602, Alza Co.)	— (stealth liposome)	Beberapa jenis kanker	Fase I
Analog Oxaliplatin (Aroplatin, Antigenics Inc.)	DMPC/DMPG	Colorectal cancer	Fase II
Depocyt, SkyePharma	DOPC/DPPG/C HOL/triolein	Lymphomatous meningitis	Disetujui beredar tahun 1999
Paclitaxel (LEP-ETU, NeoPharm Inc (I))	DOPE/CHOL/c ardiolipin	Kanker solid stadium lanjut, terutama kanker paru, ovarium, dan payudara	Fase I/II
Mitoxantrone (LEM-ETU, NeoPharm Inc.)	DOPE/CHOL/c ardiolipin	leukemia, kanker payudara, rahim, lambung, dan hati	Fase I
Irinotecan (LE-SN38, NeoPharm Inc.)	DOPE/CHOL/c ardiolipin	Kanker stadium lanjut	Fase I
Paclitaxel (MBT-0206, MediGene AG)	DOPE/DO- trimethylamm oniumpropane	Anti-angiogenic proprieties Breast cancer	Fase I
Lurtotecan (OSI-211, OSI	HSPC/CHOL	Ovarian cancer Head and neck	Fase II

Formulasi Fosfolipid

Zat aktif (nama dagang)	Komposisi	Penggunaan	Fase uji klinik
Pharmaceuticals, Inc. Melville, NY, USA; Enzon Co.)		cancer	
Vincristine (Marqibo [®] , Inex Pharm)	DSPPC/CHOL/sphingosine	Non-Hodgkin's lymphoma	Fase II/III
Asam t-retinoat Atragen [®] , Aronex Pharm)	DMPC, and soybean oil	advanced renal cell ca, acute pro-myelocytic leukemia	Fase I/II
Vinorelbine (INX-0125, Inex Pharm)	DSPPC/CHOL/sphingosine	breast, colon and lung cancer	Fase praklinik
Topotecan (INX-0076, Inex Pharm)	DSPPC/CHOL/sphingosine	advanced cancer	Fase praklinik
Liposomal-Annamycin [®] , MD Anderson CC	DSPC/DSPG/Tween	breast cancer	Fase II
Interleukin 2 (Oncolipin)	liposom	Imunostimulan	Fase II
Inhibitor timidilate sintase (OSI-7904L)	liposom	Kanker solid stadium lanjut	Fase II
Amphotericin (Ambisome [®] , Fujisawa USA Inc. and Nexstar Pharm)	HSPC/DSPPC/CHOL	Fungal infections in immuno-compromised patients	Disetujui beredar tahun 1997
Nistatin (Nyotran [®] ,	DMPC/DMPG/CHOL	Fungal infections in	Fase II/III

Zat aktif (nama dagang)	Komposisi	Penggunaan	Fase uji klinik
Aronex Pharm)		immuno-compromised patients	

Keterangan: CHOL: kolesterol; DMPC: dimyristoyl phosphatidylcholine; DMPG: dimyristoyl phosphatidylglycerol; DOPC: dioleoyphosphatidyl choline; DOPE: HSPC: hydrogenated soy phosphatidylcholine; PEG: polyethylenglicol.

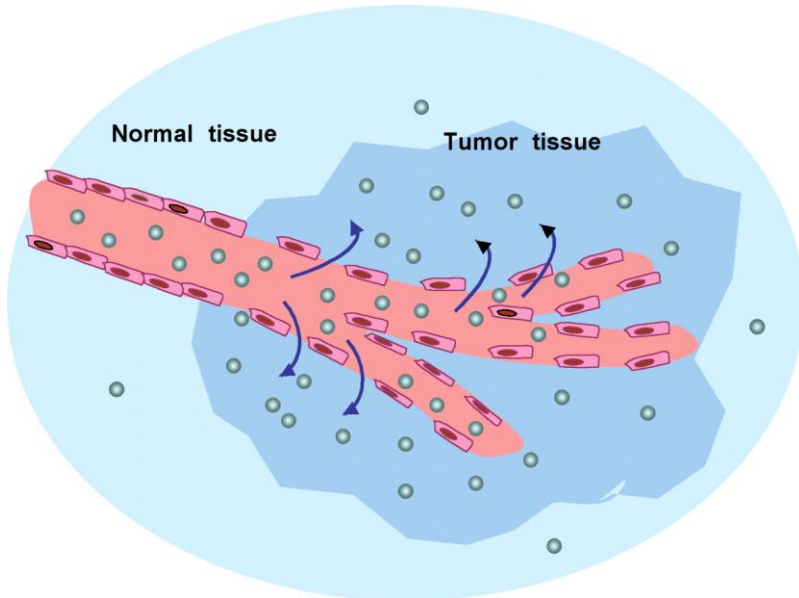
Long-circulating liposome (Stealth liposome)

Untuk penghantaran obat dengan sasaran MPS (mononuclear phagocyte system), misalnya obat-obat antiparasit atau antimikrobal untuk mengobati infeksi yang terdapat di MPS, *uptake* dan penghancuran liposom oleh MPS merupakan suatu hal yang diharapkan. Dengan demikian, obat-obat yang dibawa oleh liposom akan dikeluarkan dari liposom dan bekerja di jaringan sasarannya, yaitu sel-sel MPS. Tetapi untuk penghantaran obat-obat dengan sasaran non-MPS, misalnya obat-obat kanker, maka fagositosis liposom oleh MPS merupakan hal yang tidak diinginkan. Ini merupakan salah satu kelemahan penggunaan liposom konvensional untuk terapi kanker.

Untuk mengatasinya dilakukan berbagai strategi yang pada dasarnya adalah untuk menghindari *uptake* MPS dan memperpanjang waktu sirkulasi liposom di dalam peredaran darah. Dengan mereduksi *uptake* oleh MPS dan memperpanjang masa sirkulasinya di dalam peredaran sistemik, diharapkan liposom memiliki kesempatan lebih besar untuk terakumulasi di dalam jaringan, terutama yang memiliki jaringan endotel dikontinyu seperti jaringan tumor.

Lapisan sel-sel endotel neovaskulatur jaringan tumor bersifat diskontinyu, memiliki pori atau gap yang cukup besar dibandingkan dengan endotel jaringan normal, yaitu sekitar 100–4700 nm (205,206), sedangkan pada jaringan normal hanya sekitar <6 nm. Pori atau gap endotel ini memfasilitasi ekstravasasi liposom ke ruang antar sel, dan liposom terakumulasi di tempat tersebut karena jaringan tumor tidak memiliki saluran limfatik yang efisien. Fenomena ini disebut EPR (enhanced permeation and retention effect = efek retensi dan permeasi yang diperkuat). Liposom tidak dapat melakukan ekstravasasi dari peredaran darah dan terakumulasi di jaringan normal, sebab sel-sel endotel pembuluh darah jaringan normal memiliki junction ketat dengan gap selebar kurang dari 6 nm sebagaimana yang tadi sudah disebutkan (Gambar 4-5). Fenomena ini disebut *passive targeting* (penghantaran terarah secara pasif) ke vaskular atau pembuluh darah tumor. Mekanisme ini menyebabkan senyawa-senyawa antikanker yang dienkapsulasi dalam liposom-PEG lebih terakumulasi di jaringan tumor, lebih efektif, dan toksisitasnya lebih rendah dibandingkan dengan senyawa bebasnya.

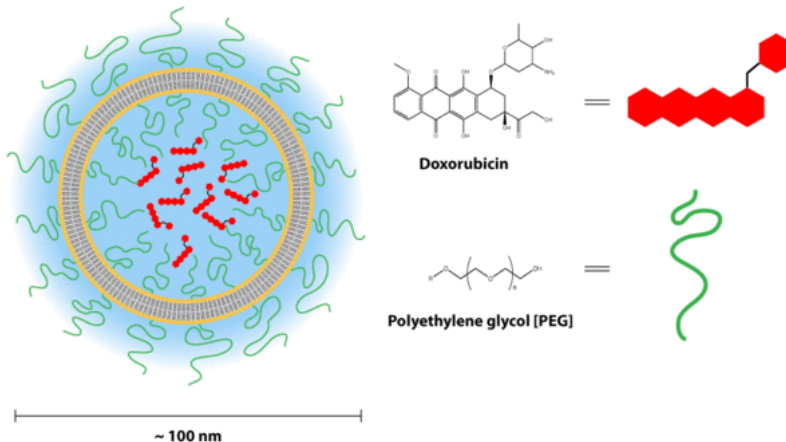
Long circulating liposome (LCL) dapat dikonstruksi dengan berbagai teknik, antara lain dengan menggunakan glikolipid (misalnya gangliosida) atau konjugat lipid dengan poli[N-(2-hidroksipropil) metakrilamida, poli-N-vinil pirrolidon ampifilik, polimer asam L-amino, polivinil alkohol, asam sialat, asam glukuronat, atau polietilenglikol (196,207-210). Residu molekul-molekul ini akan menutupi permukaan liposom, sehingga liposom terhindar dari pengenalan oleh MPS. Karena itu LCL ini disebut juga *Stealth liposome*.



Gambar 4-5. Dinding pembuluh darah pada jaringan tumor ditandai dengan lapisan endotel yang diskontinyu, ini menyebabkan liposom dapat melakukan ekstravasasi keluar dari pembuluh darah dan terakumulasi di jaringan tumor. Liposom tidak dapat terakumulasi di jaringan normal sebab endotel pembuluh darah jaringan normal memiliki junction ketat yang membuat liposom tidak dapat melakukan ekstravasasi ke jaringan normal

Di antara berbagai teknik tersebut tampaknya yang paling efektif dan efisien adalah liposom-PEG (Gambar 4-6). PEG dapat diinkorporasikan pada permukaan liposom dengan berbagai cara, tetapi cara yang paling umum digunakan adalah melalui *cross-linked lipid*, misalnya dengan menggunakan DSPE-PEG (distearoilfosfatidiletanolamin-polietilenglikol). PEG adalah poli-eter-diol yang memiliki banyak sifat yang menguntungkan untuk digunakan dalam

pembuatan obat, antara lain biokompatibel, relatif tidak toksik, larut dalam air dan dalam pelarut organik, imunogenisitas dan antigenisitasnya rendah, serta kinetika ekskresinya bagus.



Gambar 4-6. Gambaran liposom-PEG. Permukaan liposom diselubungi oleh lapisan residu polietilenglikol yang terikat pada gugus fosfat dari fosfolipid. PEG ini menutup daerah pengenalan liposom oleh MPS sehingga terhindar dari fagositosis. Molekul obat yang bersifat hidrofilik (doksorubisin) terbungkus di dalam rongga liposom yang bersifat aqueous.

Di samping itu struktur dan berat molekulnya mudah divariasikan dengan membuat poli-PEG dengan jumlah residu sesuai kebutuhan. Reaksi konjugasinya dengan lipid juga mudah dan murah. PEG juga sudah digunakan dalam mensintesis turunan peptida dan protein terapeutik, yang dimaksudkan untuk meningkatkan stabilitas dan kelarutan obat, memperpanjang waktu paruh, serta menurunkan

toksistas dan imunogenisitas. Di samping memperpanjang waktu sirkulasinya di dalam peredaran darah karena terhindar dari pengenalan oleh MPS, liposom-PEG juga lebih stabil secara sterikal, dan menurunkan kemungkinan agregasi liposom sehingga meningkatkan kestabilan formula (197).

Ada beberapa teori yang mencoba menjelaskan mengapa PEG di permukaan liposom dapat menghindarkan liposom dari pengenalan oleh MPS. Salah satu penjelasan yang cukup beralasan adalah timbulnya *steric hindrance effect* yang ditimbulkan oleh residu metoksi-PEG di permukaan liposom. Fiksasi komplemen pada liposom yang memiliki PEG pada permukaannya nampaknya menjadi sulit terjadi karena residu-residu PEG kemungkinan menutupi reseptor sehingga tidak terjangkau oleh komplemen. Namun demikian beberapa penelitian mengungkapkan bahwa penghindaran pengenalan MPS dengan adanya PEG di permukaan liposom tidak bersifat total atau 100%, bergantung pada jenis lipid dan berat molekul PEG yang digunakan (211).

Akumulasi liposom-PEG di ruang antar sel jaringan tumor merupakan salah satu keuntungan yang diharapkan dalam penggunaan liposom-PEG. Namun demikian, liposom-PEG ternyata tidak dapat memasuki sel-sel tumor. Begitu sudah sampai di ruang antar sel-sel tumor, liposom-PEG yang membawa obat kanker akan terakumulasi sampai kemudian liposom terdegradasi dan obat kanker yang ada di dalamnya terbebas dan secara difusi pasif memasuki sel-sel tumor. Jadi, molekul-molekul obat kanker bebas tidak dilepaskan di dalam sel tumor melainkan di luar sel (212). Hal ini dianggap sesuatu yang kurang menguntungkan. Untuk mengatasi hal tersebut saat ini sedang dilakukan penelitian-penelitian

untuk mengkonstruksi liposom-PEG yang bersifat reversibel, artinya konjugasi antara lipid dan PEG dapat terlepas dalam kondisi tertentu. Diharapkan, setelah liposom-PEG sampai dan terakumulasi di ruang antar sel jaringan sasaran (misalnya jaringan tumor), kondisi lingkungan patologis di tempat tersebut, misalnya pH yang rendah di jaringan tumor, akan melepaskan lapisan PEG dari partikel liposom. Liposom yang sudah tidak memiliki mantel PEG akan diendositososis oleh sel-sel kanker, masuk ke dalam sel, dan kemudian obat atau zat aktif dilepaskan di dalam sitoplasma. Beberapa penelitian sudah dilakukan untuk mendisain liposom-PEG yang reversibel (213).

Walaupun memiliki banyak kelemahan, sampai saat ini liposom-PEG masih dianggap memiliki manfaat dalam penghantaran terarah obat-obat kanker secara pasif. Walaupun tidak banyak, ada beberapa formula obat-obat kanker (doksorubisin, analog camptotecin) dalam liposom-PEG yang sudah diizinkan beredar dan sebagian lagi sedang dalam fase uji klinis (Tabel 4-2). Doxil[®] (Sequus Pharmaceuticals) merupakan formulasi doksorubisin yang dienkapsulasi dalam liposom-PEG dan telah diizinkan untuk digunakan sebagai obat kanker Kaposi (Kaposi's sarcoma) (214) dan kanker ovarium (215). Doxil[®] juga sudah diuji klinik untuk digunakan dalam terapi kanker yang lain, misalnya mieloma multipel (216), kanker payudara (217), dan glioma stadium lanjut (218). Formula doksorubisin dalam liposom-PEG ini menunjukkan eliminasi yang sangat lambat dan volume distribusi yang rendah. Seluruh (100%) obat yang disuntikkan terdapat dalam bentuk terbungkus liposom di dalam peredaran darah. Sifat farmakokinetikanya ini menyebabkan efek samping toksisitasnya terhadap jantung,

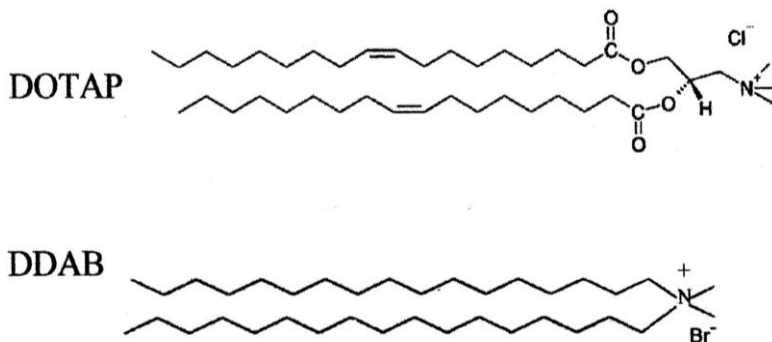
mielosupresi, kebotakan (alopecia) dan mual (nausea) menjadi berkurang atau lebih rendah dibandingkan dengan pemberian doksorubisin konvensional dalam dosis yang setara (219). Tetapi formula liposom-PEG ini juga menimbulkan efek samping baru yang tidak ditemukan pada pemberian doksorubisin bebas, yaitu sindroma kaki dan tangan yang lazim disebut *palmar-plantar erythrodysesthesia* dan stomatitis (215). Sampai sekarang belum diketahui mekanisme timbulnya efek samping ini, tetapi tampaknya dipengaruhi oleh dosis. Tetapi secara umum, performansi formula liposom PEG doksorubisin ini lebih baik dibandingkan doksorubisin bebas, dengan efektivitas lebih tinggi dan toksisitas lebih rendah.

Perusahaan ini juga sedang mengadakan uji klinis untuk produk liposom-PEG yang berisi cisplatin (SPI-077, Sequus Pharmaceuticals), yang dimaksudkan untuk terapi kanker leher dan kepala serta kanker paru. Walaupun toksisitasnya cukup rendah dibandingkan dengan cisplatin non-liposom, tetapi efikasinya belum memuaskan (220,221). Begitu juga sebuah produk liposom-PEG berisi analog Camptothecin (S-CKD602, Alza Co.) tengah dalam fase uji klinis untuk penggunaannya sebagai obat kanker (222-224). Formula liposom-PEG analog camptothecin lebih efektif dari pada camptothecin bebas dalam membunuh sel-sel kanker manusia yang di xenotransplantasikan pada mencit. Distribusi S-CKD602 pada lemak tampak lebih tinggi dibandingkan dengan otot, sedangkan pada pemberian camptothecin bebas, camptothecin lebih banyak terakumulasi di otot dibandingkan lemak. Hasil ini menunjukkan bahwa komposisi

lemak tubuh pasien juga menentukan disposisi S-CKD602 dan pelepasan zat aktifnya.

Liposom kationik

Salah satu hasil pengembangan modifikasi liposom untuk penghantaran obat adalah liposom kationik. Liposom ini dikonstruksi menggunakan lipid kationik, yaitu lipid yang bagian kepalanya bermuatan positif. Sebuah molekul lipid kationik memiliki bagian ekor yang hidrofobik, sebuah linker, dan bagian kepala yang polar dan bermuatan positif (Gambar 4-7).



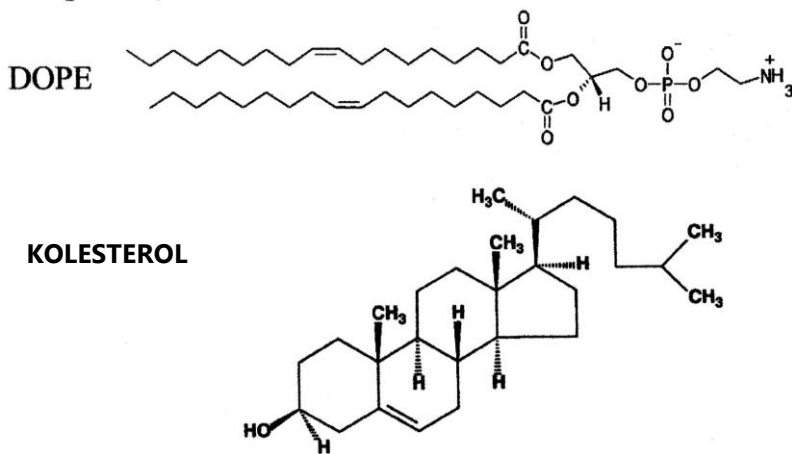
Gambar 4-7. Dua contoh lipid kationik, DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoiloksi)]-N,N,N-trimetilammonium propan) dan DDAB (Didesildimetilammonium bromida)

Bagian ekor lipid kationik yang bersifat hidrofobik ini dapat berupa residu asam lemak, misalnya residu asam oleat atau miristat, atau dapat juga berupa residu kolesterol. Bagian ini berperan dalam pembentukan liposom dan

menentukan sifat fisika dari dwilapis lipidnya, misalnya rigiditas membran dan kecepatan pertukaran antar membran lipid. Gugus *linker* antara bagian ekor yang hidrofobik dengan bagian kepala yang polar merupakan komponen yang penting yang menentukan stabilitas kimiawi dan biodegradabilitas dari lipid kationik. Bagian kepala yang polar merupakan bagian yang penting untuk transfeksi dan sitotoksitas formulasi liposom tersebut. Ampifil kationik ini bervariasi terutama dalam hal struktur dan muatannya, dapat bermuatan tunggal atau ganda, sebagai gugus amina primer, sekunder, tersier, atau kuarternar, contohnya lipospermin, kolesterol kationik, lipopolisin atau deterjen kationik (225-227).

Umumnya dalam formulasi liposom, lipid kationik dikombinasi dengan ko-lipid atau "lipid helper" yang netral atau bersifat *zwitterion*, misalnya DOPE (dioleoilfosfatidil-etanolamin) atau kolesterol (Gambar 4-8). Liposom kationik pertama dikembangkan oleh Felgner dan kawan-kawan (228) lebih dari dua dekade yang lalu. Saat itu liposom kationik dikonstruksi bukan untuk penghantaran obat melainkan untuk memperbaiki metode penghantaran DNA. Campuran sama banyak w/w lipid kationik DOTMA (N-1-(2,3-dioleiloksi) propil]-N,N,N-trimetilammonium klorida) dikombinasikan dengan DOPE (dioleoilfosfatidil-etanolamin), formula ini disebut Lipofectin, 5-100 kali lebih efektif dalam transfeksi DNA dibandingkan dengan metode *in vitro* lainnya. Saat ini pun liposom kationik paling banyak digunakan untuk penghantaran DNA dalam terapi gen karena dianggap sebagai vektor transfeksi yang paling sesuai dibandingkan dengan vektor-vektor transfeksi sintetik lainnya. DNA (asam

deoksiribonukleat) yang bermuatan negatif dapat berinteraksi secara elektrostatik dengan liposom kationik. Enkapsulasi gen dalam vesikel liposom memudahkan kondensasi plasmid DNA ke dalam struktur gen yang lebih kompleks, juga melindungi DNA dari enzim-enzim yang dapat mendegradasi DNA selama penghantaran di dalam peredaran darah.

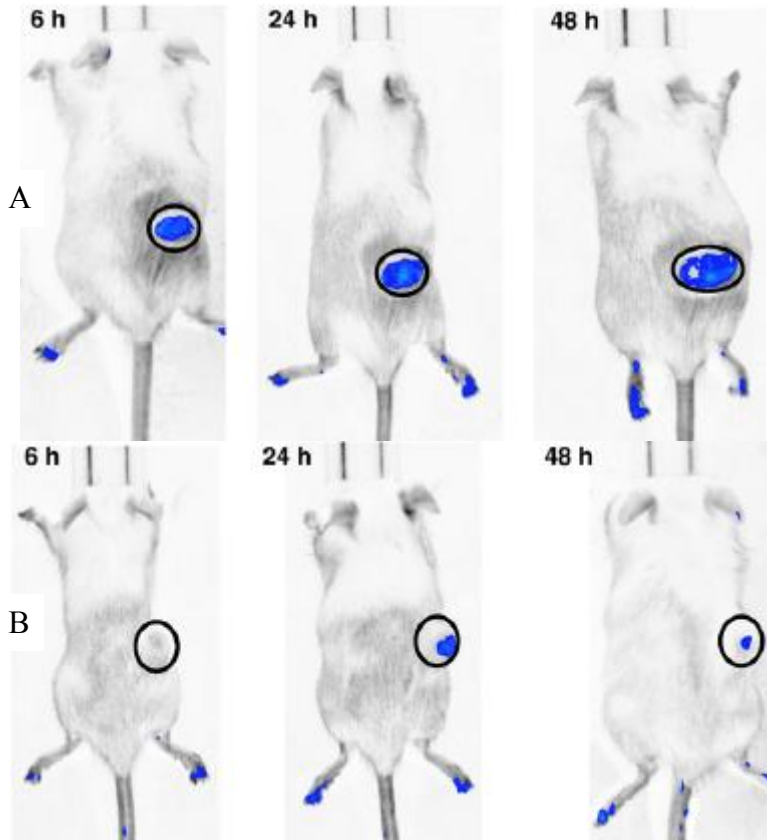


Gambar 4-8. Struktur *lipid helper* DOPE (dioleoilfosfatidil-etanolamin) dan kolesterol

Saat ini pemanfaatan liposom kationik berkembang dan banyak diteliti untuk penghantaran obat-obat kanker ke vaskular jaringan tumor. Hal ini disebabkan karena sel-sel endotel neovaskulatur tumor ternyata memiliki densitas muatan negatif yang cukup padat di permukaannya yang disebabkan oleh banyaknya fosfolipid anionik terutama

fosfatidilserin, sedangkan sebaliknya, endotel jaringan normal tidak. Dengan demikian liposom kationik dapat digunakan untuk menghantarkan senyawa-senyawa secara selektif dengan sasaran endotel neovaskulatur jaringan tumor. Abu Lila dan kawan-kawan (229) membuktikan dalam sebuah eksperimen bahwa liposom kationik secara signifikan terakumulasi jauh lebih besar di jaringan tumor dibandingkan dengan liposom netral (Gambar 4-9). Dalam eksperimen ini digunakan liposom-PEG (liposom-PEG netral dan liposom-PEG kationik) untuk menghindari fagositosis oleh MPS. Namun demikian, di samping jaringan tumor, fosfolipid anionik pada permukaan sel juga ditemukan pada sel-sel yang sedang apoptosis, nekrosis, dan pada saat aktivasi sel.

Liposom kationik generasi pertama dikonstruksi dari stearylamina (oktadekilamina), sebuah monoalkilamin dan sudah dibuktikan dapat membawa gen ataupun senyawa-senyawa sitotoksik ke sel-sel manusia. Tetapi liposom monoalkilamina tidak direkomendasikan untuk penghantaran obat sebab residu stearylaminanya terlalu cepat bertukar dengan fosfolipid sel, di samping itu juga karena dapat menyebabkan hemaglutinasi dan hemolisis eritrosit. Generasi kedua liposom kationik terbuat dari lipid diasil, di samping kemampuannya dalam membawa gen ataupun obat lebih baik dibandingkan liposom kationik generasi pertama, juga inkorporasi obat-obat sitotoksik, misalnya paklitaksel, etoposida, dan doksorubisin, ke dalam liposom ini lebih baik di dalam liposom yang terbuat dari lipid diasil ini (230). Beberapa contoh lipid diasil adalah DOTMA, DOTAP dan DDAB (Gambar 4-7).



Gambar 4-9. Akumulasi liposom-PEG kationik (A) dibandingkan dengan liposom-PEG netral (B) di jaringan tumor setelah pemberian liposom secara intravena (iv) melalui vena ekor. Tampak liposom kationik (A) yang terakumulasi jauh lebih banyak dibandingkan liposom netral (B). Liposom diberikan pada hari ke-8 setelah inokulasi sel-sel tumor LLCC secara subkutan (sc) pada mencit C57BL/6, yaitu ketika volume tumor mencapai volume 100-120 mm³. Untuk visualisasi liposom dilabel dengan Dil, suatu zat warna fluoresens. (229)

Pada tabel 4-3 disajikan beberapa produk obat kanker yang diformulasikan menggunakan liposom kationik.

Tabel 4-3. Beberapa produk obat kanker menggunakan liposom kationik

Zat aktif	Liposom kationik	Tumor	Rujukan
Paclitaxel	DOTAP/DOP C (25/23.5)	Humanized A-375 melanoma	Kunstfeld et al, 2003
Paclitaxel	DOTAP/DOP C (25/23.5)	Melanoma amelanotik (A-Mel-3)	Schmitt-Sody et al, 2003
Paclitaxel	DOTAP/DOP C (100/94)	A-Mel-3	Strieth et al, 2004
Paclitaxel	DOTAP/DOP C (100/94)	A-Mel-3	Strieth et al, 2008
Etoposide	Lecithin/CHOL/Stearylamine/ α -tocopherol	Solid fibrosarcoma	Sengupta et al, 2000
Cisplatin	HSPC/CHOL/TRX-20 (50/42/8)	Osteocarcinoma	Lee et al, 2002
Doksorubicin	EPC/CHOL/DAB (40/40/20)	Karsinoma oral manusia	Wu et al, 2007
Doksorubisin	DOPC/DOTAB/CHOL/DOP E-PEG (50/35/10/5)	Kanker pankreas manusia	Kalra dan Campbell, 2006
Camptothecin	DOTAP	Lewis lung carcinoma (LLC)	Eichhorn et al, 2007

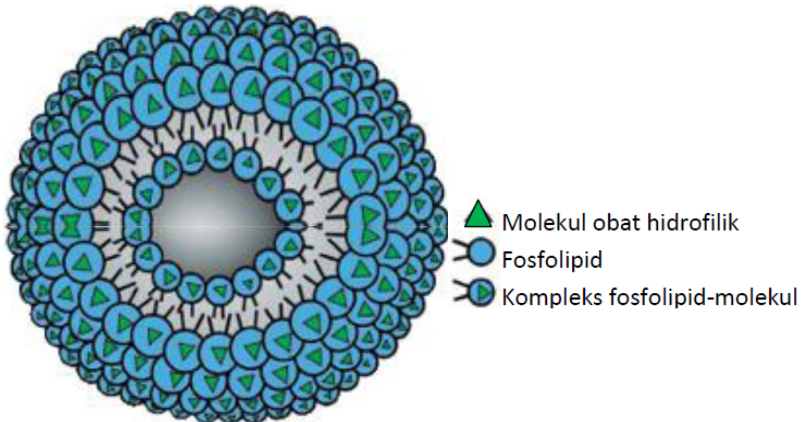
Zat aktif	Liposom kationik	Tumor	Rujukan
Oxaliplatin	HSPC/CHOL/ DC-6-14/m PEG2000- DSPE (2/1/0.2/0.2)	Mouse melanoma B16Bl6	Abu-Lila et al, 2009b
Oxaliplatin	HSPC/CHOL/ DC-6-14/m PEG2000- DSPE (2/1/0.2/0.2)	LLC	Abu-Lila et al, 2009c

Fitosom

Fitosom adalah suatu kompleks molekuler yang hidrofobik (kompatibel lipid), tersusun dari suatu senyawa aktif yang berasal dari tumbuhan dan satu atau beberapa jenis fosfolipid. Istilah fitosom atau "phytosome" berasal dari kata "phyto" berarti tumbuhan, dan "some" berarti "cell-like" atau menyerupai sel (231,232). Kompleks ini memang dikonstruksi untuk meningkatkan absorpsi senyawa-senyawa aktif yang terdapat di dalam obat-obat herbal atau obat-obat yang berasal dari tumbuhan, terutama yang memiliki polaritas atau hidrofilisitas tinggi dan berukuran cukup besar sehingga sukar ditransportasikan melintasi sawar-sawar biologis, seperti senyawa-senyawa flavonoida, polifenol, dan terpenoid. Contoh senyawa-senyawa tersebut antara lain kurkumin (dari *Curcuma domestica*), silibin (dari *Sylibum marianum*), senyawa-senyawa ginsenosida dari rimpang

Panax ginseng, senyawa-senyawa polifenol dari teh hijau dan biji anggur, dan lain sebagainya.

Fitosom dikonstruksi dengan menginkorporasikan senyawa-senyawa aktif dalam suatu ekstrak tumbuhan ke dalam molekul-molekul fosfolipid, sehingga menghasilkan struktur mikro menyerupai sel. Dalam struktur fitosom ini molekul-molekul obat hidrofilik akan terperangkap di dalam molekul fosfolipid (Gambar 4-10), sehingga dapat melindunginya dari faktor-faktor perusak dari luar, misalnya enzim-enzim pengurai. Lebih jauh lagi, struktur ini menyebabkan molekul obat yang bersifat hidrofilik dapat menjadi fitosom yang bersifat hidrofobik, sehingga lebih mudah ditransportasikan melintasi membran sel yang *notabene* bersifat hidrofobik. Meningkatnya transpor molekul melintasi membran akan meningkatkan absorpsi senyawa-senyawa obat tersebut, sehingga ketersediaan hayati atau bioavailabilitas pun akan meningkat.



Gambar 4-10. Struktur fitosom.

Fitosom pertama kali dipatenkan dan diperdagangkan secara luas oleh Indena, sebuah perusahaan Italia yang memproduksi dan mengembangkan senyawa-senyawa aktif yang berasal dari tumbuhan untuk digunakan sebagai bahan farmasetikal, makanan kesehatan dan lain-lain. Fitosom tersebut merupakan konstruksi dari flavonolignan silibin, zat aktif utama dari silimarin, campuran senyawa-senyawa flavonol yang diekstrak dari biji *Silybum marianum*, sejenis tumbuhan keluarga Asteraceae/Compositae. Fitosom generasi pertama dibuat dengan mengombinasikan ekstrak polifenolik tertentu dengan fosfolipid dalam pelarut nonpolar, namun fitosom generasi yang lebih baru dikembangkan menggunakan pelarut hidroetanol agar memenuhi persyaratan sebagai makanan atau bahan makanan (233).

Saat ini beberapa fitosom telah dipatenkan dan diedarkan secara komersil, baik yang diproduksi oleh Indena maupun perusahaan-perusahaan lain, antara lain yang mengandung kurkuminoid, senyawa-senyawa triterpen dari pegagan, senyawa-senyawa polifenol dari teh hijau, dan lain-lain (Tabel 4-4).

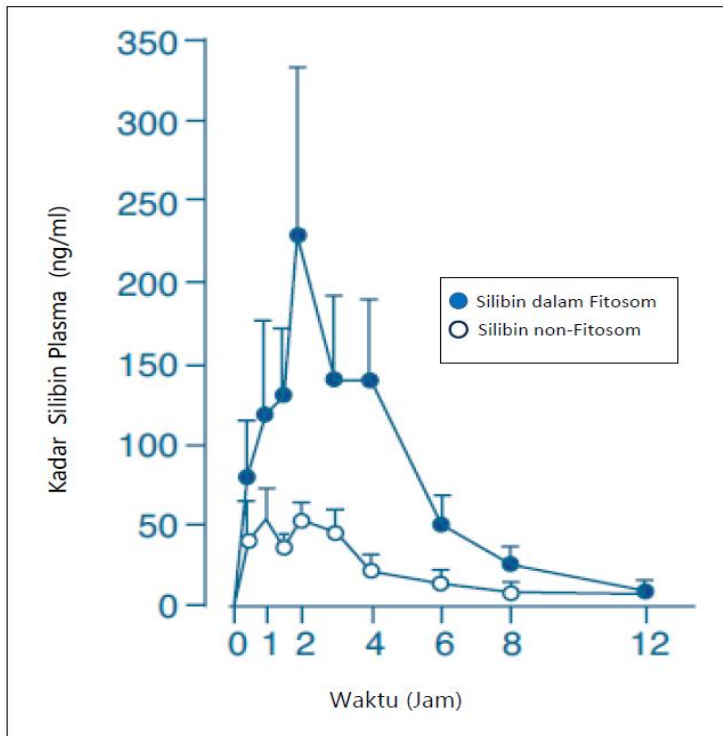
Tabel 4-4. Beberapa jenis fitosom yang sudah beredar secara komersil

Nama dagang	Kandungan zat aktif	Indikasi
Meriva®	Senyawa-senyawa kurkuminoid dari rimpang kunyit (<i>Curcuma domestica</i>)	Imunostimulan
Centella	Senyawa-senyawa	Restrukturan

Phytosome [®]	triterpen dari daun pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	kolagen, mencegah/mengurangi kerut wajah (antiwrinkles agent)
Greenselect [®] Phytosome [®]	Senyawa-senyawa polifenol dari teh hijau (<i>Camelia sinensis</i>)	Antioksidan
Boswellia Phytosome [®]	Asam boswelat dari resin <i>Boswellia serrata</i>	Respon inflamasi sehat
Crataegus Phytosome [®]	Vitexin-2"-O-rhamnoside from Hawthorn flower	Antioksidan
Ginkgoselect [®] Phytosome [®]	Senyawa-senyawa ginkgoflavonoglukosida, ginkgolida, bilobalida dari daun <i>Ginkgo biloba</i>	Antioksidan, vasokinetika (meningkatkan sirkulasi darah)
Virtiva [®]	Senyawa-senyawa ginkgoflavonoglukosida, ginkgolida, bilobalida dari daun <i>Ginkgo biloba</i>	Vasokinetika
Ginselect [®] Phytosome [®]	Senyawa-senyawa ginsenosida dari rimpang <i>Panax ginseng</i>	Adaptogen, Tonikum
Leucoselect [®] Phytosome [®]	Senyawa-senyawa polifenol dari biji anggur (<i>Vitis vinifera</i>)	Antioksidan, kapilatropik
Sericoside Phytosome [®]	Senyawa-senyawa serikosida dari kulit akar <i>Terminalia sericea</i>	Anti-wrinkles
Siliphos [®]	Silyiin dari biji <i>Sylibum marianum</i>	hepatoprotektif
Silymarin Phytosome [®]	Silimarin dari biji <i>Sylibum marianum</i>	Antioksidan, hepatoprotektan

Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa konstruksi fitosom memang dapat meningkatkan ketersediaan hayati senyawa-senyawa aktif yang berasal dari bahan alam, terutama yang bersifat hidrofilik. Absorpsi senyawa-senyawa kurkuminoid yang diberikan per oral ternyata meningkat jauh lebih besar apabila diformulasikan dalam bentuk fitosom (menggunakan lesitin) dibandingkan dengan tanpa diformulasikan menjadi fitosom (234). Percobaan ini dilakukan pada manusia. Sebelumnya juga telah dibuktikan bahwa ketersediaan hayati (bioavailabilitas) kurkumin dalam formulasi fosfolipid (fitosom) yang diberikan per oral pada tikus percobaan meningkat lima kali lebih besar dibandingkan dengan yang diberikan tanpa fosfolipid (235). Penetrasi transdermal dari kurkumin dalam formulasi fitosom juga meningkat 60% dibandingkan dengan kurkumin bebas (236).

Contoh lain adalah silibin, zat aktif utama dari silimarin, campuran senyawa-senyawa flavonol yang diekstrak dari biji *Silybum marianum*, sejenis tumbuhan keluarga Asteraceae. Silibin memiliki aktivitas antioksidan dan hepatoprotektif yang sangat kuat, namun absorpsi per oralnya sangat rendah. Konstruksi fitosom dari silibin (kompleks silibin-fosfolipid) ternyata dapat meningkatkan absorpsi dan ketersediaan hayatinya dengan sangat signifikan, yaitu 4,6 kali lebih besar dibandingkan jika diberikan dalam bentuk asli tanpa konstruksi fitosom (Gambar 4-11).

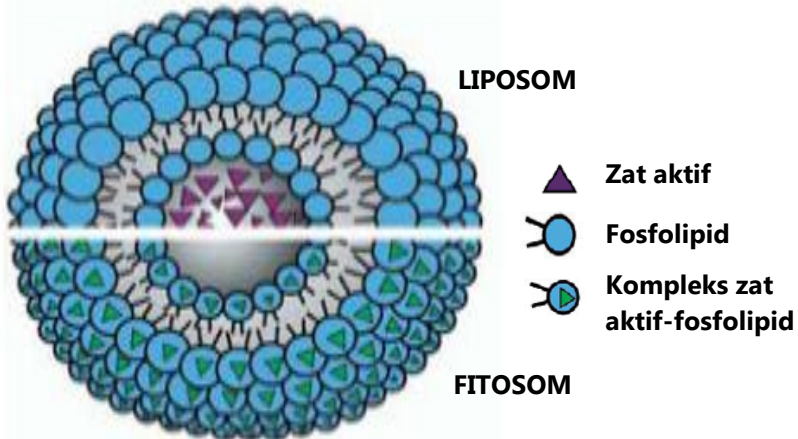


Gambar 4-11. Perbedaan absorpsi silibin dalam bentuk fitosom (komplek silibin-fosfolipid) dan non-fitosom (235)

Sifat fisikokimia Fitosom

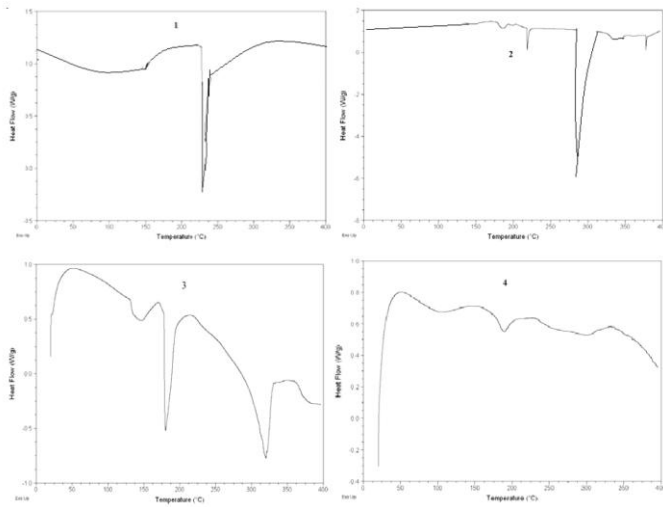
Walaupun dalam konstruksinya sama-sama menggunakan lipid, namun fitosom memiliki sifat fisikokimia yang berbeda dengan liposom. Pada liposom, inkorporasi molekul zat aktif ke dalam liposom merupakan peristiwa fisika, artinya tidak terjadi pembentukan senyawa baru antara liposom dengan molekul zat aktif yang diinkorporasikan. Dalam liposom, molekul zat aktif terkandung di dalam kantung

internal dan/atau terbenam dalam lapisan membran di antara bagian kepala molekul-molekul fosfolipid tanpa terjadi ikatan kimia. Dalam liposom, satu molekul zat aktif akan dikelilingi oleh ratusan atau bahkan ribuan molekul fosfolipid (Gambar 4-12).

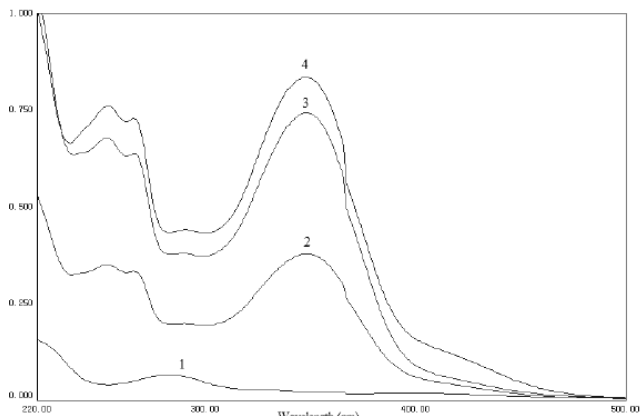


Gambar 4-12. Perbedaan antara liposom dan fitosom

Sebaliknya pada fitosom, inkorporasi molekul zat aktif pada fosfolipid akan membentuk senyawa baru, yaitu kompleks zat aktif-fosfolipid, yang memiliki sifat fisikokimia dan karakter spektroskopik yang berbeda dengan senyawa-senyawa asalnya, yaitu fosfolipid bebas dan zat aktif bebas (237). Hal ini jelas terlihat pada Gambar 4-13 dan 4-14 yang masing-masing menunjukkan perbedaan termogram DSC (Differential Scanning Calorimetry) dan spektra ultraviolet dari Kompleks Fitosom Asam Gallat-Fosfolipid dengan senyawa-senyawa asalnya yaitu Asam Gallat dan Fosfolipid, maupun dengan campuran fisikak Asam Gallat dan Fosfolipid.



Gambar 4-13. Termogram DSC dari Asam Gallat (1), Fosfolipid (2), Campuran Asam Gallat-Fosfolipid (3), dan Kompleks Fitosom Asam Gallat-Fosfolipid (4).



Gambar 4-14. Spektra uv dari Fosfolipid (1), Campuran Asam Gallat-Fosfolipid (2), Kompleks Fitosom Asam Gallat-Fosfolipid (3), dan Asam Gallat bebas (4)

Pada konstruksi fitosom, molekul zat aktif akan terikat melalui ikatan hidrogen dengan bagian kepala fosfolipid yang bersifat polar dan menjadi bagian integral dari membran (Gambar 4-12). Misalnya pada kompleks katechin-distearoilfosfatidilkolin, ikatan hidrogen terbentuk antara ujung hidroksil fenolik bagian flavon dengan ion fosfat dari fosfatidilkolin.

Ukuran partikel fitosom berkisar antara 50 nm sampai beberapa ratus μm . Apabila dimasukkan ke dalam air, fitosom akan mengambil bentuk misel menyerupai liposom, sebagaimana yang terungkap melalui data Photon Correlation Spectroscopy (PCS). Fitosom merupakan hasil reaksi stoikiometrik antara fosfolipid, umumnya yang digunakan adalah fosfatidilkolin, dengan ekstrak herbal terstandar dalam pelarut aprotik tertentu. Fosfatidilkolin adalah senyawa bifungsional, gugus fosfatidil-nya bersifat lipofilik sedangkan bagian kepalanya yang merupakan gugus fosfat dan bagian kolin-nya yang terdapat pada bagian ekor fosfolipid bersifat hidrofilik. Bagian kolin ini akan berikatan dengan molekul-molekul zat aktif bersifat hidrofilik yang terdapat dalam ekstrak herbal, sedangkan bagian rantai asam lemak yang panjang dan bersifat lipofilik akan membentuk selubung yang membungkus bagian kolin-zat aktif yang hidrofilik tersebut. Hal ini diindikasikan dari data ^1H NMR dan ^{13}C NMR yang menunjukkan bahwa rantai karbon asam lemak memberikan signal yang sama atau tidak berubah baik ketika berada dalam keadaan bebas (sebagai molekul fosfolipid bebas) maupun dalam bentuk kompleks (dengan zat aktif). Hal ini mengindikasikan bahwa di dalam kompleks, rantai karbon asam lemak yang panjang

membungkus zat aktif sedemikian rupa sehingga membentuk selubung lipofilik yang melindungi bagian kepala fosfat yang polar dari fosfolipid dan molekul flavonoid, sehingga kompleks ini bersifat lebih hidrofobik (kompatibel lipid).

DAFTAR PUSTAKA

1. Farquhar M, Palade G. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 1963; 17: 375-412.
2. Tang VW and Goodenough DA. Paracellular Ion Channel at the Tight Junction. *Biophysical Journal* Volume 2003; 84: 1660-1673.
3. Mills SE dan Sternberg S. *Histology for Pathologists 3rd Edition*, 2007. Lippincott Williams & Wilkins
4. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 1986; 103: 755-766.
5. Shin K, Fogg VC, Margolis B. Tight Junctions and Cell Polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006; 22: 207-235.
6. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tstlkita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 1993; 123:1 777-788.
7. Cummins PM. Occludin: One Protein, Many Forms. *Mol Cell Biol* 2012; 32(2): 242-250.
8. Feldman GJ, Mullin JM, Ryan MP. Occludin: Structure, function and regulation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2005; 57: 883- 917.
9. Van Itallie CM, Anderson JM. Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts. *J Cell Sci* 1997; 110(Pt. 9): 1113-1121.
10. Wong V, Gumbiner BM. A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. *J Cell Biol* 1997; 136: 399-409.
11. Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Avila-Flores A. MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin Cell Dev Biol* 2000; 11: 315-324.

12. Mandell KJ, Parkos CA. The JAM family of proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57: 857–867.
13. Balda MS, Whitney JA, Flores C, Gonzalez S, Cereijido M, Matter K. Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol* 1996; 134: 1031–1049
14. Chen Y, Merzdorf C, Paul DL, Goodenough DA. COOH terminus of occludin is required for tight junction barrier function in early *Xenopus* embryos. *J Cell Biol* 1997; 138: 891–899.
15. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 2000; 11: 4131–4142.
16. Li D, Mrsny RJ. Oncogenic Raf-1 disrupts epithelial tight junctions via downregulation of occludin. *J Cell Biol* 2000; 148: 791–800.
17. Wang Z, Mandell KJ, Parkos CA, Mrsny RJ, Nusrat A. The second loop of occludin is required for suppression of Raf1-induced tumor growth. *Oncogene* 2005; 24: 4412–4420.
18. Aijaz S, D'Atri F, Citi S, Balda MS, Matter K. Binding of GEF-H1 to the tight junction associated adaptor cingulin results in inhibition of Rho signaling and G1/S phase transition. *Dev Cell* 2005; 8: 777–786.
19. Benais-Pont G, Punn A, Flores-Maldonado C, Eckert J, Raposo G, et al. Identification of a tight junction-associated guanine nucleotide exchange factor that activates Rho and regulates paracellular permeability. *J Cell Biol* 2003; 160: 729–740.
20. Furuse M, Tsukita S. Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol* 2006; 16: 181–188.
21. Van Itallie CM, Anderson JM. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* 2006; 68: 403–429.

22. Van Itallie CM, Fanning AS, Anderson JM. Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285: F1078–1084.
23. Yu ASL, ChengMH, Angelow S, Gunzel D, Kanzawa SA, et al. Molecular basis for cation selectivity in claudin-2-based paracellular pores: identification of an electrostatic interaction site. *J. Gen. Physiol.* 2009; 133: 111–127.
24. Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 1999; 147: 1351–1363.
25. Morin PJ. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res* 2005; 65(21): 9603-9606.
26. Furuse M. Molecular Basis of the Core Structure of Tight Junctions. *CHS Perspective in Biology* 2010.
27. Singh AB, Sharma A, Dhawan P. Claudin Family of Proteins and Cancer: An Overview. *Journal of Oncology* 2010; Article ID 541957, 11 pages.
28. Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S. Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol* 2001; 153(2): 263-272.
29. Hou J, Paul DL, Goodenough DA. Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions. *J Cell Sci* 2005; 118: 5109–5118.
30. Yamauchi K, Rai T, Kobayashi K, Sohara E, Suzuki T, Itoh T, Suda S, Hayama A, Sasaki S, Uchida S. Disease-causing mutant WNK4 increases paracellular chloride permeability and phosphorylates claudins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 March 30; 101(13): 4690–4694.
31. Agarwal R, D'Souza T, Morin PJ. Claudin-3 and Claudin-4 Expression in Ovarian Epithelial Cells Enhances Invasion and Is

- Associated with Increased Matrix Metalloproteinase-2 Activity. *Cancel Res* 2005; 65:7378-7385.
32. D'Souza T, Agarwal R, Morin PJ. Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 2005; 280(28):26233-2640.
 33. Utech M, Ivanov AI, Samarín SN, Bruewer M, Turner JR, Mrsnyll RJ, Parkos CA, Nusrat A. Mechanism of IFN- γ -induced Endocytosis of Tight Junction Proteins: Myosin II-dependent Vacuolarization of the Apical Plasma Membrane. *Mol Biol Cell* 2005; 16(10): 5040-5052.
 34. Ichikawa-Tomikawa N, Sugimoto K, Satohisa S, Nishiura K, Chiba H. Possible Involvement of Tight Junctions, Extracellular Matrix and Nuclear Receptors in Epithelial Differentiation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011; Article ID 253048, 10 pages.
 35. Jia W, Martin TA, Zhang G, Jiang WG. Junctional adhesion molecules in cerebral endothelial tight junction and brain metastasis. *Anticancer Res.* 2013; 33(6): 2353-2539.
 36. Weber C, Fraemohs L, Dejana E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nature Reviews Immunology* 2007; 7: 467-477.
 37. Bauer Zweimueller-Mayer HJ, Steinbacher P, Lametschwandtner A, Bauer HC. The Dual Role of Zonula Occludens (ZO) Proteins. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010; Article ID 402593: 11 pages.
 38. Zhu J, Shang Y, Chen J, Zhang M. Structure and function of the guanylate kinase-like domain of the MAGUK family scaffold proteins. *Front Biol* 2012; 7(5): 379-396.
 39. Fanning AS, Anderson JM. Zonula Occludens-1 and -2 Are Cytosolic Scaffolds That Regulate the Assembly of Cellular Junctions. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1165: 113-120.

40. González-Mariscal L. , Ponce A, Alarcón L, Jaramillo BE. The tight junction protein ZO-2 has several functional nuclear export signals. *Experimental Cell Res* 2006; 312: 3323-3335,
41. Betanzos A, Huerta M, Lopez-Bayghen E, Azuara E, Amerena J, González-Mariscal L. The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells. *Exp Cell Res*. 2004;292(1): 51-66.
42. Jaramillo BE, Ponce A, Moreno J, Betanzos A, Huerta M, Lopez-Bayghen E, Gonzalez-Mariscal L. Characterization of the tight junction protein ZO-2 localized at the nucleus of epithelial cells. *Experimental Cell Research* 2004; 297: 247-258.
43. Ooshio T, Kobayashi R, Ikeda W, Miyata M, Fukumoto Y, Matsuzawa N, Ogita H, Takai Y. Involvement of the Interaction of Afadin with ZO-1 in the Formation of Tight Junctions in Madin-Darby Canine Kidney Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2010; 285: 5003-5012.
44. Birukova AA, Fu P, Wu T, Dubrovskiy O, Sarich N, Poroyko V, Birukov KG. Afadin controls p120-catenin – ZO-1 interactions leading to endothelial barrier enhancement by oxidized phospholipids. *J Cell Physiol* 2012; 227(5): 1883-1890.
45. Métais J, Navarro C, Santoni M, Audebert S, Borg J. hScrib interacts with ZO-2 at the cell–cell junctions of epithelial cells. *FEBS Letters* 2005; 579(17): 3725–3730.
46. Raleigh DR, Boe DM, Yu D, Weber CR, Marchiando AM, Bradford EM, Wang Y, Wu L, Schneeberger EE, Shen L, Turner JR. Occludin S408 phosphorylation regulates tight junction protein interactions and barrier function. *J Cell Biol* 2012; 193(3): 565-582.
47. Ainsworth J, Thomas M, Banks L, Coutlee F, Matlashewski G. Comparison of p53 and the PDZ domain containing protein MAGI-3 regulation by the E6 protein from high-risk human papillomaviruses
48. Guillemot L, Paschoud S, Pulimeno P, Foglia A, Citi S. The cytoplasmic plaque of tight junctions: A scaffolding and

- signalling center. *Biochimica et Biophysica Acta* 2008; 1778: 601-613.
49. Hirabayashi S, Tajima M, Yao I, Nishimura W, Mori H, Hata Y. JAM4, a Junctional Cell Adhesion Molecule Interacting with a Tight Junction Protein, MAGI-1. *Molecular and Cellular Biology* 2003: 4267-4282.
 50. Sakurai A, Fukuhara S, Yamagishi A, Sako K, Kamioka Y, Masuda M, Nakaoka Y, Mochizuki N. MAGI-1 Is Required for Rap1 Activation upon Cell-Cell Contact and for enhancement of Vascular Endothelial Cadherin-mediated Cell Adhesion. *Molecular Biology of the Cell* 2006; 17: 966-976.
 51. Zaric J, Joseph JM, Tercier S, Sengstag T, Ponsonnet L, Delorenzi M, Rüegg C. Identification of MAGI1 as a tumor-suppressor protein induced by cyclooxygenase-2 inhibitors in colorectal cancer cells. *Oncogene* 2012;31(1): 48-59.
 52. Ohashi M, Sakurai M, Higuchi M, Mori N, Fukushi M, Oie M, Coffey RJ, Yoshiura K, Tanaka Y, Uchiyama M, Hatanaka M, Fujii M. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein induces and interacts with a multi-PDZ domain protein, MAGI-3. *Virology*. 2004 Mar 1;320(1):52-62.
 53. Citi S, Pulimeno P, Paschoud S. Cingulin, paracingulin, and PLEKHA7: signaling and cytoskeletal adaptors at the apical junctional complex. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1257:125-132.
 54. Guillemot L, Schneider Y, Brun P, Castagliuolo I, Pizzuti D, Martines D, Jond L, Bongiovanni M, Citi S. Cingulin is dispensable for epithelial barrier function and tight junction structure, and plays a role in the control of claudin-2 expression and response to duodenal mucosa injury. *Journal of Cell Science* 2012; 125, 5005-5014.
 55. Citi S, Paschoud S, Pulimeno P, Timolati F, Robertis F, Jond L, Guillemota L. The Tight Junction Protein Cingulin Regulates Gene Expression and RhoA Signaling. *Molecular Structure and Function of the Tight Junction*. *Ann NY Acad Sci* 2009; 1165: 88-98.

56. Guillemot L, Paschoud S, Jond L, Foglia A, Citi S. Paracingulin Regulates the Activity of Rac1 and RhoA GTPases by Recruiting Tiam1 and GEF-H1 to Epithelial Junctions. *Molecular Biology of the Cell* 2008; 19: 4442-4453.
57. Harris TJC, Tepass U. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2010; 11: 502-514.
58. Niessen CM. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol.* 2007;127(11): 2525-2532.
59. Wallez Y, Huber P. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778(3): 794-809.
60. Lampugnani MG, Dejana E. Adherens junctions in endothelial cells regulate vessel maintenance and angiogenesis. *Thromb Res* 2007;120 Suppl 2:S1-6.
61. Michels C, Aghdam SY, Niessen CM. Cadherin-mediated regulation of tight junctions in stratifying epithelia. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1165:163-8.
62. Nakanishi H, Takai Y. Roles of nectins in cell adhesion, migration and polarization. *Biol Chem* 2004; 385: 885-892.
63. Takai Y, Nakanishi H. Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions, *J Cell Sci* 2003; 116: 17-27.
64. Nelson WJ. Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochem Soc Trans* 2008;36(2):149-55.
65. Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton, *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778: 660-669.
66. Bertocchi C, Rao MV, Zaidel-Bar R. Regulation of Adherens Junction Dynamics by Phosphorylation Switches. *Journal of Signal Transduction* 2012; Article ID 125295, 14 pages.
67. Xiao K, Oas RG, Chiasson CM, Kowalczyk AP. Role of p120-catenin in cadherin trafficking. *Biochim Biophys Act* 2007; 1773(1): 8-16.

68. Soto E, Yanagisawa M, Marlow LA, Copland JA, Perez EA, Anastasiadis PZ. p120 catenin induces opposing effects on tumor cell growth depending on E-cadherin expression. *J Cell Biol* 2008; 183(4): 737-749.
69. Niessen CM, Gottardi CJ. Molecular components of the adherens junction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 2008; 1778(3): 562-571.
70. Wildenberg GA, Dohn MR, Carnahan RH, Davis MA, Lobdell NA, Settleman J, Reynolds AB. p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho. *Cell* 2006; 127: 1027-1039).
71. Smith AL, Dohn MR, Brown MV, Reynolds AB. Association of Rho-associated protein kinase 1 with E-cadherin complexes is mediated by p120-catenin. *Molecular Biology of the Cell* 2012; 23: 99-110.
72. Harrison OJ, Vendome J, Brasch J, Jin X, Hong S, Katsamba PS, Ahlsen G, Troyanovsky RB, Troyanovsky SM, Honig B, Shapiro L. Nectin ectodomain structures reveal a canonical adhesive interface. *Nat Struct Mol Biol* 2012;19(9):906-15.
73. Samanta D, Ramagopal UA, Rubinstein R, Vigdorovich V, Nathanson SG, Almo SC. Structure of Nectin-2 reveals determinants of homophilic and heterophilic interactions that control cell-cell adhesion. *PNAS* 2012: 1-5.
74. Takai Y, Ikeda W, Ogita H, Rikitake Y. The Immunoglobulin-Like Cell Adhesion Molecule Nectin and Its Associated Protein Afadin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2008; 24: 309-342.
75. Kurita S, Ogita H, Takai Y. Cooperative Role of Nectin-Nectin and Nectin-Afadin Interactions in Formation of Nectin-based Cell-Cell Adhesion. *J Biol Chem* 2011; 286(42): 36297-36303.
76. Rehm K, Panzer L, van Vliet V, Genot E, Linder S. Drebrin preserves endothelial integrity by stabilizing nectin at adherens junctions. *J Cell Sci* 2013;126(Pt 16):3756-3769.

77. Sakisaka T, Ikeda W. Curr Opin Cell Biol 2007;19(5):593-602. W, Ogita H, Fujita N, Takai Y. The roles of nectins in cell adhesions: cooperation with other cell adhesion molecules and growth factor receptors. Curr Opin Cell Biol 2007; 19(5):593-602.
78. Loriger M, Moelling K. J Cell Sci 2006; 119, 3385-3398
79. Takai Y, Irie K, Shimizu K, Sakisaka T, Ikeda W. Nectins and nectin-like molecules: roles in cell adhesion, migration, and polarization. Cancer Sci 2003; 94: 655-667.
80. Sakisaka T, Takai Y. Biology and pathology of nectins and nectin-like molecules, Curr Opin Cell Biol 2004; 16: 513-521.
81. Hoshino T, Sakisaka T, Baba T, Yamada T, Kimura T, Takai Y. Regulation of Ecadherin endocytosis by nectin through afadin, Rap1, and p120ctn. J Biol Chem 2005; 280: 24095-24103.
82. Sato T, Fujita N, Yamada A, Ooshio T, Okamoto R, Irie K, Takai Y. Regulation of the assembly and adhesion activity of E-cadherin by nectin and afadin for the formation of adherens junctions in Madin–Darby canine kidney cells. J Biol Chem 2006; 281: 5288-5299.
83. Nekrasova O, Green KJ. Desmosome assembly and dynamics. Trends in Cell Biology 2013;
84. Thomason HA, Scothorn A, McHarg H, Garrod DR. Desmosomes: adhesive strength and signalling in health and disease. Biochem J 2010; 429: 419-433.
85. Desai BV, Harmon RM, Green KJ. Desmosomes at a glance. J Cell Sci 2009; 122(24): 4401-4407.
86. Delva E, Tucker DK, Kowalczyk AP. The desmosome. Cold Spring Harb Perspect Biol 2009;1(2): a002543.
87. Ihrie RA, Marques MR, Nguyen BT, Horner JS, Papazoglu C, Bronson RT, Mills AA, Attardi LD. Perp is a p63-regulated gene essential for epithelial integrity, Cell 2005; 120: 843-856.
88. Yang T, Liang D, Koch PJ, Hohl D, Kheradmand F, Overbeek PA. Epidermal detachment, desmosomal dissociation, and

- destabilization of corneodesmosin in Spink5^{-/-} mice. *Genes Dev* 2004; 18: 2354-2358.
89. Ishii K. Identification of desmoglein as a cadherin and analysis of desmoglein domain structure. *J Invest Dermatol* 2007; 127: E6-E7.
 90. Garrod D, Chidgey M. Desmosome structure, composition and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2008; 1778(3): 572-587.
 91. Jefferson JJ, Ciatto C, Shapiro L, Liem RK. Structural analysis of the plakin domain of bullous pemphigoid antigen1 (BPAG1) suggests that plakins are members of the spectrin superfamily. *J Mol Biol* 2007; 366: 244-257.
 92. Choi HJ, Weis WI. Structure of the armadillo repeat domain of plakophilin 1. *J Mol Biol* 2005; 346: 367-376.
 93. Neuber S, Mühmer M, Wratten D, Koch PJ, Moll R, Schmidt A. The Desmosomal Plaque Proteins of the Plakophilin Family. *Dermatol Res Pract* 2010; 2010: 101452.
 94. Acehan D, Petzold C, Gumper I, Sabatini DD, Muller EJ, Cowin P, Stokes DL. Plakoglobin Is Required for Effective Intermediate Filament Anchorage to Desmosomes. *Journal of Investigative Dermatology* 2008; 128: 2665-2675.
 95. Hamman JH, Enslin GM, Kotz'e AF. Oral Delivery of Peptide Drugs. *Barriers and Developments. Biodrugs* 2005; 19 (3): 165-177.
 96. Shaji J, Patole V. Protein and Peptide Drug Delivery: Oral Approaches. *Indian J Pharm Sci* 2008; 70(3): 269-277.
 97. Suzuki H, Sugiyama Y. Role of metabolic enzymes and efflux transporters in the absorption of drugs from the small intestine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2000; 12(1): 3-12.
 98. van Herwaarden AE, van Waterschoot RA, Schinkel AH. How important is intestinal cytochrome P450 3A metabolism? *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30(5): 223-7.

99. Oda Y, Kharasch ED. Metabolism of Methadone and *levo*-_-Acetylmethadol (LAAM) by Human Intestinal Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4): Potential Contribution of Intestinal Metabolism to Presystemic Clearance and Bioactivation. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2001; 298(3): 1021-1032.
100. Liu Y, Hao H, Xie H, Lai L, Wang Q, Liu C, Wang G. Extensive Intestinal First-Pass Elimination and Predominant Hepatic Distribution of Berberine Explain Its Low Plasma Levels in Rats. *Drugs Metabolism & Disposition* 2010; 15.
101. Mizuma T. Intestinal glucuronidation metabolism may have a greater impact on oral bioavailability than hepatic glucuronidation metabolism in humans: A study with raloxifene, substrate for UGT1A1, 1A8, 1A9, and 1A10. *International Journal of Pharmaceutics* 2009; 378(1-2): 140-141.
102. Shen L, Ahmad S, Park SH, DeMaio W, Oganessian A, Hultin T, Scatina J, Bungay P, Chandrasekaran A. In Vitro Metabolism, Permeability, and Efflux of Bazedoxifene in Humans. *Drug Metabolism and Disposition* 2010; 38(9): 1471-1479.
103. Linnankoski J, Makela J, Palmgren J, Mauriala T, Vedin C, Ungell A, Lazorova L, Artursson P, Urtti A, Yliperttula M. Paracellular Porosity and Pore Size of the Human Intestinal Epithelium in Tissue and Cell Culture Models. *Journal Of Pharmaceutical Sciences* 2010; 99(4): 2166-2175.
104. Van Itallie CM, Holmes J, Bridges A, Gookin JL, Coccaro MR, Proctor W, Colegio OR, Anderson JM. The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2. *J Cell Sci* 2008; 121(Pt 3): 298-305.
105. Kondoh M, Yagi K. Progress in absorption enhancers based on tight junction. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2007; 4(3): 275-286.

106. Kondoh M, Yoshida T, Kakutani H, Yagi K. Targeting tight junction proteins-significance for drug development. *Drug Discovery Today* 2008; 13(3-4): 180-186.
107. Pal D, Audus KL, Siahaan TJ. Modulation of cellular adhesion in bovine brain microvessel endothelial cells by a decapeptide. *Brain Res* 1997; 747: 103-113.
108. Siahaan TJ, Makagiansar IT, Yusuf-Makagiansar H, Sinaga E, Audus KL. Utilization of cell-adhesion peptides to improve drug delivery. Dalam: *Peptides for the Millenium*. Fields GB, Tam JP, Barany G (eds.). Kluwer Academic Publisher, Boston, 2000 : 209-211.
109. Makagiansar IT, Avery M, Hu Y, Audus KL, Siahaan TJ. Improving the selectivity of HAV-peptides in modulating E-cadherin-E-cadherin interactions in the intercellular junction of MDCK cell monolayers. *Pharmaceutical Research* 2001; 18(4): 446-
110. Yusuf-Makagiansar H, Makagiansar IT, Siahaan TJ. Inhibition of the adherence of T lymphocytes to epithelial cells by a cyclic peptide derived from inserted domain of lymphocyte function-associated antigen-1. *Inflammation* 2001; 25: 203-214.
111. Yusuf-Makagiansar H, Siahaan TJ. 2001. Binding and internalization of an LFA-1-derived cyclic peptide by ICAM receptors on activated lymphocyte: A potential ligand for drug targeting to ICAM-1-expressing cells. *Pharm Res* 2001; 18: 329-335.
112. Sinaga E, Jois DDS, Avery M, Makagiansar IT, Tambunan USF, Audus KL, Siahaan TJ. Increasing paracellular porosity by E-cadherin peptides: discovery of bulge and groove regions in the EC1-domain of E-cadherin. *Pharm Res* 2002; 19: 1170-1179.
113. Yusuf-Makagiansar H, Anderson ME, Yakovleva TV, Murray JS, Siahaan TJ. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as

- a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Med Res Rev* 2002; 22: 146-167.
114. Sinaga E, Jois SDS, Avery M, Makagiansar IT, Tambunan USF, Audus KL, Siahaan TJ. Modulasi Junction Antar Sel Menggunakan Peptida Kadherin: Upaya Meningkatkan Penghantaran Obat. *Makara Seri Sains (jurnal terakreditasi)* 2004; 8(1): 25-34.
115. Calcagno AM, Fostel JM, Reyner EL, Sinaga E, Alston JT, Mattes WB, Siahaan TJ, Ware JA. Effects of an E-cadherin –Derived Peptide on the Gene Expression of CACO-2 Cells. *Pharmaceutical Research* 2004; 21(11):
116. Calcagno AM, Fostel JM, Orchekowski RP, Alston JT, Mattes WB, Siahaan TJ, *et al.* Modulation of cell adhesion molecules in various epithelial cell lines after treatment with PP2. *Mol Pharm* 2005; 2: 170-184.
117. Zhao H, Buyuktimkin B, Calcagno AM, Sinaga E, Siahaan TJ. Modulation of cell-cell adhesion by cadherin peptides. Dalam: Yoshida K (ed.). *Molecular and Functional Diversities of Cadherin and Protocadherin*, 2010: ISBN: 978-81-308-0395-1. Research Signpost 37/661 (2), Fort P.O. Trivandrum-695 023, Kerala, India
118. Kiptoo P, Sinaga E, Calcagno AM, Zhao H, Kobayashi N, Tambunan USF, Siahaan TJ. Enhancement of Drug Absorption through the Blood-Brain Barrier and Inhibition of Intercellular Tight Junction Resealing by E-Cadherin Peptides. *Molecular Pharmaceutics* 2011; 8(1);,239-249.
119. Deli MA. Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2009; 1788(4): 892-910.
120. Salama NN, Eddington ND, Fasano A. Tight junction modulation and its relationship to drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2006; 58(1): 15-28.

121. Motlekar NA, Fasano A, Wachtel MS, Youan BB. Zonula occludens toxin synthetic peptide derivative AT1002 enhances in vitro and in vivo intestinal absorption of low molecular weight heparin. *J Drug Target* 2006; 14(5): 321-329.
122. Goldblum SE, Rai U, Tripathi A, Thakar M, De Leo L, Di Toro N, Not T, Ramachandran R, Puche AC, Hollenberg MD, Fasano A. The active Zot domain (aa 288–293) increases ZO-1 and myosin 1C serine/threonine phosphorylation, alters interaction between ZO-1 and its binding partners, and induces tight junction disassembly through proteinase activated receptor 2 activation. *Faseb Journal* 2011; 25: 1-15.
123. Brasch J, Harrison OJ, Honig B, Shapiro L. Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion. *Trends in Cell Biology* 2012; 22(6): 299-310.
124. Overduin M, Harvey TS, Bagby S, Kit IT, Yau P, Takeichi M, Ikura M. Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science* 1995, 267: 172-189.
125. Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini JM. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* 1996, 380: 360-364
126. Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grubel G, Legrand J-F, Als-Nielsen J, Colman DR, Hendrickson WA. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 1995, 374: 327-337.
127. Blaschuk OW. Discovery and development of N-cadherin antagonists. *Cell Tissue Res* 2012; 348:309-313.
128. Lutz KL, Siahaan TJ. E-cadherin peptide sequence recognition by anti-E-cadherin antibody. *Biochem Biophys Res Com* 1995, 211(1): 21-27.
129. Lutz KL, Szabo LA, Thompsons DL, Siahaan TJ. Antibody recognition of peptide sequences from the cell-cell adhesion proteins: N- and E-cadherins. *Peptide Res* 1996; 9(5): 233-239.

130. Lutz KL, Siahaan TJ. Modulation of the cellular junction protein E-cadherin in bovine brain microvessel endothelial cells by cadherin peptides. *Drug Delivery* 1997b, 4: 187-193.
131. Makagiansar IT, Lutz KL, Audus KL, Siahaan TJ. 16th American Peptide Symposium, Minnesota, USA, A527, 1999.
132. Sinaga E, Tambunan USF, Siahaan TJ. Aktivitas beberapa peptida kadherin sintetik dalam menghambat reagrerasi sel. *Vis Vitalis* 2008;01(2): .
133. Fasano A, Baudry B, Pumpkin DW, Wasserman SS, Tall BD, Ketley JM, Kaper JB. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(12): 5242-5246
134. Baudry B, Fasano A, Ketley J, Kaper JB. Cloning of a gene (zot) encoding a new toxin produced by *Vibrio cholerae*, *Infect Immun* 1992; 60: 428-434.
135. Di Pierro M, Lu R, Uzzau S, Wang W, Margaretten K, Pazzani C, Maimone F, Fasano A. Zonula Occludens toxin structure-function analysis: identification of the fragment biologically active on tight junctions and of the Zonulin receptor binding domain. *J Bio. Chem* 2001; 276(22): 19160-19165.
136. Fasano A, Uzzau S. Modulation of intestinal tight junctions by Zonula Occludens toxin permits enteral administration of insulin and other macromolecules in an animal model. *J Clin Invest* 1997; 99(6): 1158-1164.
137. Watts TL, Alexander T, Hansen B, *et al.*, Utilizing the paracellular pathway: a novel approach for the delivery of oral insulin in diabetic rhesus macaques. *J Invest Med* 2000; 48: 185.
138. Cox D, Gao H, Raje S, *et al.* Enhancing the permeation of marker compounds and enaminone anticonvulsants across Caco-2 monolayers by modulating tight junctions using Zonula Occludens toxin. *Eur J Pharm Biopharm* 2001; 52(2): 145-150.

139. Cox D, Raje S, Gao H, et al. Enhanced permeability of molecular weight markers and poorly bioavailable compounds across Caco-2 cell monolayers using the absorption enhancer, Zonula Occludens toxin. *Pharm Res* 2002; 19(11): 1680-1688.
140. Karyekar CS, Fasano A, Raje S, et al. Zonula Occludens toxin increases the permeability of molecular weight markers and chemotherapeutic agents across the bovine brain microvessel endothelial cells. *J Pharm Sci* 2003; 92(2): 414-423.
141. Salama NN, Fasano A, Lu R, et al. Effect of the biologically active fragment of Zonula Occludens toxin, ΔG , on the intestinal paracellular transport and oral absorption of mannitol. *Int J Pharm* 2003; 251(1-2): 113-121.
142. Salama NN, Fasano A, Thakar M et al. The effect of ΔG on the transport and oral absorption of macromolecules. *J Pharm Sci* 2004; 93(5): 1310-1319.
143. Salama NN, Fasano A, Thakar M et al. The effect of ΔG on the oral bioavailability of low bioavailable therapeutic agents. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312(1): 199-205.
144. Menon D, Karyekar CS, Fasano A, Lu R, Eddington ND. Enhancement of brain distribution of anticancer agents using ΔG , the 12 kDa active fragment of ZOT. *International Journal of Pharmaceutics* 2005; 306(1-2): 122-131.
145. Wang W, Uzzau S, Goldblum SE, Fasano A. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J Cell Sci* 2000; 113: 4435-4440.
146. Thomas KE, Sapone A, Fasano A, Vogel SN. Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in Celiac disease. *Journal of immunology* 2006; 176(4): 2512-2521.
147. Sapone A, De Magistris L, Pietzak M, Clemente MG, Tripathi A, Cucca F, Lampis R, Kryszak D, et al. Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with

- type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes* 2006; 55(5): 1443-1449.
148. Fasano A. Regulation of Intercellular Tight Junctions by Zonula Occludens Toxin and Its Eukaryotic Analogue Zonulin. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000; 915: 214-222.
149. Fasano A. Intestinal Zonulin: open sesame!. *Gut* 2001; 49(2): 159-162.
150. Tripathi A, Lammers KM, Goldblum S, Shea-Donohue T, Netzel-Arnett S, Buzza MS, Antalis TM, Vogel SN, Zhao A, Yang S, Arrietta M, Meddings JB, Fasano A. Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2. *PNAS (Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America)* 2009; 106(39): 16799-16804.
151. Zingone F, Capone P, Ciacci C. Celiac disease: Alternatives to a gluten free diet. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2010; 1(1): 36-39.
152. Drago S, El-Asmar R, Di Pierro M, Clemente MG, Tripathi A, Sapone A, Thakar M, Iacono G, Carroccio A, D'agate C, Not T, Zampini L, Catassi C, Fasano A. Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2006; 41: 408-419.
153. Paterson BM, Lammers KM, Arrieta MC, Fasano A, Meddings JB. The safety, tolerance, pharmacokinetic and pharmacodynamics effects of single doses of AT-1001 in coeliac disease subjects: a proof of concept study. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26(5): 757-766.
154. Hollenberg MD. Proteinase-mediated signaling: Proteinase-activated receptors (PARs) and much more. *Life Sciences* 2003; 74(2-3): 237-246.
155. Gopalakrishnan S, Pandey N, Tamiz AP, Vere J, Carrasco R, Somerville R, Tripathi A, Ginski M, Paterson BM, Alkan SS. Mechanism of action of ZOT-derived peptide AT-1002, a tight

- junction regulator and absorption enhancer. *International Journal of Pharmaceutics* 2009; 365(1-2): 121-130.
156. Song K, Fasano A, Eddington ND. Effect of the six-mer synthetic peptide (AT1002) fragment of zonula occludens toxin on the intestinal absorption of cyclosporin A. *International Journal of Pharmaceutics* 2008; 351(1-2): 8-14.
157. Fasano A. Physiological, Pathological, and Therapeutic Implications of Zonulin-Mediated Intestinal Barrier Modulation. *Living Life on the Edge of the Wall. American Journal of Pathology* 2008; 173: 1243-1252.
158. Van Itallie CM, Fanning AS, Holmes J, Anderson JM. Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers. *Journal of Cell Science* 2010; 123: 2844-2852.
159. Capaldo CT, Nusrat A. Cytokine regulation of tight junctions. *Biochim. Biophys. Acta* 2009; 1788: 864-871.
160. Lacaz-Vieira F, Jaeger MM, Farshori P, Kachar B. Small synthetic peptides homologous to segments of the first external loop of occludin impair tight junction resealing, *J Membr Biol* 1999; 168: 289-297.
161. Tavelin S, Hashimoto K, Malkinson J, Lazorova L, Toth I, Artursson P. A new principle for tight junction modulation based on occludin peptides. *Mol Pharmacol* 2003; 64: 1530-1540.
162. Everett RS, Vanhook MK, Barozzi N, Toth I, Johnson LG. Specific modulation of airway epithelial tight junctions by apical application of an occludin peptide. *Mol Pharmacol* 2006; 69: 492-500.
163. Mrsny RJ, Brown GT, Gerner-Smidt K, Buret AG, Meddings JB, Quan C, Koval M, Nusrat A. A Key Claudin Extracellular Loop Domain is Critical for Epithelial Barrier Integrity. *American Journal of Pathology* 2008; 172: 905-915.
164. Fujita K, Katahira J, Horiguchi Y, Sonoda N, Furuse M, Tsukita S. *Clostridium perfringens* enterotoxin binds to the second

- extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein, *FEBS Lett* 2000; 476: 258–261.
165. Kondoh M, Masuyama A, Takahashi A, Asano N, Mizuguchi H, Koizumi N, Fujii M, Hayakawa T, Horiguchi Y, Watanabe Y. A novel strategy for the enhancement of drug absorption using a claudin modulator, *Mol. Pharmacol* 2005; 67: 749–756.
166. Uchida H, Kondoh M, Hanada T, Takahashi A, Hamakubo T, Yagi K. A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of a biologically active peptide. *Biochemical Pharmacology* 2010; 79(10): 1437-1444.
167. Rautio J, Kumpulainen H, Heimbach T, Oliyai R, Oh D, Järvinen T, *et al.* Prodrugs: design and clinical applications. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7: 255-270.
168. Stella VJ, Borchardt RT, Hageman MJ, Oliyai R, Maag H, Tilley JW. *Biotechnology: Pharmaceutical Aspects. Prodrugs: Challenges and Rewards. Part 1.* Springer AAPS Press, 2007.
169. Etmayer P, Amidon GL, Clement B, Testa B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J Med Chem* 2004; 47: 2393-2404.
170. Beaumont K, Webster R, Gardner I, Dack K. Design of ester prodrugs to enhance oral absorption of poorly permeable compounds: challenges to the discovery scientist. *Curr Drug Metab* 2003; 4: 461-485.
171. Pavan B, Dalpiaz A, Ciliberti N, Biondi C, Manfredini S, Vertuani S. Progress in drug delivery to the central nervous system by the prodrug approach. *Molecules* 2008; 13: 1035-65.
172. Fardis M, Oliyai R. in *Prodrugs: Challenges and Rewards. Part 2* (eds Stella, V. J. *et al.*) 647–657 (AAPS Press/Springer, New York, 2007).
173. Gallant JE, Deresinski S. Tenofovir disoproxil fumarate. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 944-950.
174. Chapman T, McGavin J, Noble S. Tenofovir disoproxil fumarate. *Drugs* 2003; 63: 1597-1608.

175. Dando T, Plosker G. Adefovir dipivoxil: a review of its use in chronic hepatitis B. *Drugs* 2003;63(20):2215-2234.
176. Frantz S. Pharma faces major challenges after a year of failures and heated battles. *Nature Rev Drug Discov* 2007; 6: 5-7.
177. Shi D, Yang J, Yang D, LeCluyse EL, Black C, You L, Akhlaghi F, Yan B. Anti-influenza prodrug oseltamivir is activated by carboxylesterase human carboxylesterase 1, and the activation is inhibited by antiplatelet agent clopidogrel. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319(3):1477-1484.
178. Eriksson UG *et al.* Absorption, distribution, metabolism, and excretion of ximelagatran, an oral direct thrombin inhibitor, in rats, dogs, and humans. *Drug Metab Dispos* 2003; 31: 294-305.
179. Clement B, Lopian K. Characterization of *in vitro* biotransformation of new, orally active, direct thrombin inhibitor ximelagatran, an amidoxime and ester prodrug. *Drug Metab Dispos* 2003; 31: 645-651.
180. Hilgendorf C, Ahlin G, Seithel A, Artursson P, Ungell A, Karlsson J. Expression of Thirty-six Drug Transporter Genes in Human Intestine, Liver, Kidney, and Organotypic Cell Lines. *Drug Metabolism and Disposition* 2007; 35(8): 1333-340.
181. Kim I, Chu XY, Kim S, Provoda CJ, Lee KD, Amidon GL. Identification of a human valacyclovirase: biphenyl hydrolase-like protein as valacyclovir hydrolase. *J Biol Chem* 2003; 278: 25348-25356.
182. Tsuda M, Terada T, Irie M, Katsura T, Niida A, Tomita K, Fujii N, Inui K. Transport characteristics of a novel peptide transporter 1 substrate, antihypertensive drug midodrine, and its amino acid derivatives. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318: 455-460.
183. Cundy KC, Branch R, Chernov-Rogan T, Dias T, Estrada T, Hold K, Koller K, Liu X, Mann A, Panuwat M, Raillard SP, Upadhyay S, Wu QQ, et al. XP13512 [(+/)- 1- ((α -isobutanoyloxyethoxy) carbonyl) aminomethyl]1- cyclohexane acetic acid], a novel gabapentin prodrug: I. Design, synthesis, enzymatic

- conversion to gabapentin, and transport by intestinal solute transporters. *J Pharmacol Exp Ther* 2004a; 311: 315-323.
184. Cundy KC *et al.* XP13512 [(+/-)-1-((α -isobutanoyloxyethoxy) carbonyl) aminomethyl)- 1- cyclohexane acetic acid], a novel gabapentin prodrug: II. Improved oral bioavailability, dose proportionality, and colonic absorption compared with gabapentin in rats and monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 2004b; 311: 324-333.
185. Cundy KC, Sastry S, Luo W, Zou J, Moors TL, Canafax DM. Clinical Pharmacokinetics of XP13512, a Novel Transported Prodrug of Gabapentin. *J Clin Pharmacol* 2008; 48(12): 1378-1388.
186. Howl J. Chimerism: a strategy to expand the utility and applications of peptides. *Methods Mol Biol* 2005;298:25-41.
187. Brasnjevic I, Steinbusch HWM, Schmitz C, Martinez-Martinez P. Delivery of peptide and protein drugs over the blood-brain barrier. *Progress in Neurobiology* 2009; 87: 212-251.
188. Gomes P, Vale N, Moreira R. Cyclization-activated Prodrugs. *Molecules* 2007; 12: 2484-2506.
189. Li F, Maag H, Alfredson T. Prodrugs of Nucleoside Analogues for Improved Oral Absorption and Tissue Targeting. *Journal Of Pharmaceutical Sciences* 2008; 97(3): 1109-1134.
190. Hsieh P, Hung C, Fang J. Current Prodrug Design for Drug Discovery. *Current Pharmaceutical Design* 2009; 15(19): 2236-2250.
191. Nofsinger R, Fuchs-Knotts T, Borchardt RT. Factors that restrict the cell permeation of cyclic prodrugs of an opioid peptide, part 3: Synthesis of analogs designed to have improved stability to oxidative metabolism. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012; 10(9): 3486-3499.
192. Samad A, Sultana Y, Aqil M. Liposomal drug delivery systems: an update review. *Curr Drug Deliv* 2007; 4(4): 297-305.
193. Shashi K, Satinder K, Bhara P. A Complete Review On Liposome. *IRJP* 2012; 3(7): 10-16.

194. Maherani B, Arab-Tehrany ER, Mozafari M, Gaiani C, Linder M. Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies. *Current Nanoscience* 2011; 7(3):436-452.
195. Prathyusha K, Muthukumaran M, Krishnamoorthy B. Liposomes as targetted drug delivery systems present and future prospectives: A Review. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*; 2013, 3(4), 195-201.
196. Ishida T, Harashima H, Kiwada H. Interactions of liposomes with cells in vitro and in vivo: opsonins and receptors. *Curr Drug Metab* 2001;2(4):397-409.
197. Immordino ML, Dosio F, Cattel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine*. 2006; 1(3): 297-315.
198. Mufamadi MS, Pillay V, Choonara YE, Du Toit LC, Modi G, Naidoo D, Ndesendo VMK. A Review on Composite Liposomal Technologies for Specialized Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery* 2011; Article ID 939851: 19 pages.
199. Veerareddy PR, Vobalaboina V. Lipid-based formulations of amphotericin B. *Lipid-based formulations of amphotericin B*.
200. Alberts DS, Muggia FM, Carmichael J, et al. 2004. Efficacy and safety of liposomal anthracyclines in phase I/II clinical trials. *Semin Oncol* 2004; 31(Suppl 13): 53-90.
201. Allen TM, Martin FJ. Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines. *Semin Oncol* 2004; 31(Suppl 13): 5-15.
202. Semple SC, Leone R, Wang J, Leng EC, Klimuk SK, Eisenhardt ML, Yuan ZN, Edwards K, Maurer N, Hope MJ, Cullis PR, Ahkong QF. Optimization and characterization of a sphingomyelin/cholesterol liposome formulation of vinorelbine with promising antitumor activity. *J Pharm Sci* 2005; 94(5): 1024-1038.
203. Tardi P, Choice E, Masin D, Redelmeier T, Bally M, Madden TD. Liposomal encapsulation of topotecan enhances anticancer efficacy in murine and human xenograft models. *Cancer Res* 2000; 60(13): 3389-3393.

204. Seiden MV, Muggia F, Astrow A, Matulonis U, Campos S, Roche M, Sivret J, Rusk J, Barrett E. A phase II study of liposomal lurtotecan (OSI-211) in patients with topotecan resistant ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2004; 93(1):229-232.
205. Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK, McDonald DM. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* 2000; 156: 1363-1380.
206. Tomaso E, Capen D, Haskell A, Hart J, Logie JJ, Jain RK, McDonald DM, Jones R, Munn LL. Mosaic tumor vessels: Cellular basis and ultrastructure of focal regions lacking endothelial cell markers. *Cancer Res* 2005; 65: 5740-5749.
207. Torchilin VP. Recent Advances With Liposomes As Pharmaceutical Carriers. *Nature Reviews Drug Discovery* 2005; 4: 145-160.
208. Lopes SCA, Novais MVM, Teixeira CS, Honorato-Sampaio K, Pereira MT, Ferreira LAM, Braga FC, Oliveira MC. Preparation, Physicochemical Characterization, and Cell Viability Evaluation of Long-Circulating and pH-Sensitive Liposomes Containing Ursolic Acid. *BioMed Research International* 2013; Article ID 467147: 7 pages
209. Oku N, Namba Y. Glucuronate-modified, long-circulating liposomes for the delivery of anticancer agents. *Methods Enzymol* 2005;391:145-62.
210. Taira MC, Chiamoni NS, Pecuch KM, Alonso-Romanowski S. Stability of liposomal formulations in physiological conditions for oral drug delivery. *Drug Deliv* 2004; 11(2): 123-128.
211. Moghimi SM, Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog Lipid Res* 2003; 42: 463-478.
212. Harrington KJ, Rowlinson-Busza G, Syrigos KN. Biodistribution and pharmacokinetics of ¹¹¹In-DTPA-labelled pegylated

- liposomes in a human tumour xenograft model: implications for novel targeting strategies. *Br J Cancer* 2000; 83:232-238.
213. Sawant RM. Polyethylene glycol (PEG) as a key component of long-circulating delivery systems for therapy and imaging. *Pharmaceutical Science Dissertations*. Northeastern University, Boston, Massachusetts, 2008.
214. Krown SE, Northfelt DW, Osoba D. Use of liposomal anthracyclines in Kaposi's sarcoma. *Semin Oncol* 2004; 31(Suppl 13): 36-52.
215. Rose PG. Pegylated liposomal doxorubicin: optimizing the dosing schedule in ovarian cancer. *Oncologist* 2005; 10: 205-214.
216. Hussein MA, Anderson KC. Role of liposomal anthracyclines in the treatment of multiple myeloma. *Semin Oncol* 2004; 31(Suppl 13): 147-160.
217. O'Brien ME, Wigler N, Inbar M, Rosso R, Grischke E, Santoro A, Catane R, Kieback DG, Tomczak P, Ackland SP, Orlandi F, Mellars L, Alland L, Tendler C. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2004;15(3):440-449.
218. Hau P, Fabel K, Baumgart U. Pegylated liposomal doxorubicin efficacy in patients with recurrent high-grade glioma. *Cancer* 2004; 100: 1199-1207.
219. Ewer MS, Martin FJ, Henderson C, Shapiro CL, Benjamin RS, Gabizon AA. Cardiac safety of liposomal anthracyclines. *Semin Oncol* 2004; 31: 161-181.
220. White SC, Lorigan P, Margison GP, Margison JM, Martin F, Thatcher N, Anderson H, Ranson M. Phase II study of SPI-77 (sterically stabilised liposomal cisplatin) in advanced non-small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer* 2006; 95: 822-828.

221. Zamboni WC, Gervais AC, Egorin MJ, Schellens JHM, Zuhowski EG, Pluim D, Joseph E, Hamburger DR, Working PK, Colbern G, Tonda ME, Potter DM, Eiseman JL. Systemic and tumor disposition of platinum after administration of cisplatin or STEALTH liposomal-cisplatin formulations (SPI-077 and SPI-077 B103) in a preclinical tumor model of melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 53: 329-336.
222. Zamboni WC, Friedland DM, Ramalingam S, et al. Final results of a phase I and pharmacokinetic study of STEALTH liposomal CKD-602 (S-CKD602) in patients with advanced solid tumors. *Proc ASCO* 2006; 24: 82s.
223. Zamboni WC, Strychor S, Joseph E, Walsh DR, Zamboni BA, Parise RA, Tonda ME, Yu NY, Engbers C, Eiseman JL. Plasma, Tumor, and Tissue Disposition of STEALTH Liposomal CKD-602 (S-CKD602) and Nonliposomal CKD-602 in Mice Bearing A375 Human Melanoma Xenografts. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 7217-72
224. Zamboni WC, Ramalingam S, Friedland DM, Edwards RP, Stoller RG, Strychor S, Maruca L, Zamboni BA, Belani CP, Ramanathan RK. Phase I and Pharmacokinetic Study of Pegylated Liposomal CKD-602 in Patients with Advanced Malignancies. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 1466-1472.
225. Abu Lila AS, Ishida T, Kiwada H. Targeting Anticancer Drugs to Tumor Vasculature Using Cationic Liposomes. *Pharm Res* 2010; 27: 1171-1183.
226. Abu Lila AS, Ishida T, Kiwada H. Recent advances in tumor vasculature targeting using liposomal drug delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv* 2009; 6: 1297-1309.
227. Campbell RB, Ying B, Kuesters GM, Hemphill R. Fighting cancer: from the bench to bedside using second generation cationic liposomal therapeutics. *J Pharm Sci* 2009;98(2):411-29.
228. Felgner P, Gadek T, Holm M, Roman R, Chan H, Wenz M, Northrop J, Ringold G, Danielsen M. Lipofection: A highly

- efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7413-7417.
229. Abu Lila AS, Kizuki S, Doi Y, Suzuki T, Ishida T, Kiwada H. Oxaliplatin encapsulated in PEG-coated cationic liposomes induces significant tumor growth suppression via a dual targeting approach in a murine solid tumor model. *J Control Release* 2009; 137: 8-14.
230. Kalra AV, Campbell RB. Development of 5-FU and doxorubicin-loaded cationic liposomes against human pancreatic cancer: Implications for tumor vascular targeting. *Pharm Res* 2006; 23: 2809-2817.
231. Jain N, Gupta BP, Thakur N, Jain R, Banweer J, Jain DK, Jain S. Phytosome: A Novel Drug Delivery System for Herbal Medicine. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* 2010; 2(4): 224-228.
232. Kareparamban JA, Nikam PH, Jadhav AP and Kadam VJ. Phytosomes: A Novel Revolution in Herbal Drugs. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry* 2012; 2(2): 299-310.
233. Tripathya S, Patela DK, Barob L, Naira SK. A review on phytosomes, their characterization, advancement & potential for transdermal application. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics* 2013; 3(3): 147-152.
234. Cuomo J, Appendio G, Dern SA. Comparative absorption of a standardized Curcuminoid mixture and its lecithin formulation. *Journal of Natural Products* 2011; 74: 664-669.
235. Kidd PM. Bioavailability and Activity of Phytosome Complexes from Botanical Polyphenols: The Silymarin, Curcumin, Green Tea, and Grape Seed Extracts. *Alternative Medicine Review* 2009; 14(3): 226-246.
236. Zaveri M, Gajjar H, Kanaki N, Patel S. Preparation and evaluation of drug phospholipid complex for increasing transdermal penetration of phytoconstituents. *International*

- Journal of Institutional Pharmacy and Life sciences 2011; 1(3): 80-93.
237. Shyam KR, Mruthunjaya K, Kumar GM. Preparation, Characterization and Antioxidant Activities of Gallic Acid-Phospholipids Complex. International Journal of Research in Pharmacy and Science (IJRPS) 2012; 2(1): 138-148.



Prof. Dr. Ernawati Sinaga, MS, Apt. lahir di Pematang Siantar, tanggal 31 Juli 1955. Beliau menyelesaikan studi doktoralnya di Universitas Indonesia dengan melakukan penelitian di Dept. Pharmaceutical Chemistry, University of Kansas Amerika Serikat, dengan mengambil topik Modulasi Junction Antar Sel untuk Meningkatkan Penghantaran Obat.

Minat dan semangatnya melakukan penelitian telah membuahkan banyak artikel ilmiah yang dipublikasi bersama-sama peneliti dalam dan luar negeri, baik di jurnal nasional maupun internasional, antara lain: Increasing Paracellular Porosity by E-Cadherin Peptides: Discovery of Bulge and Groove Regions in the EC1-Domain of E-Cadherin; Regulation of cadherin-cadherin interaction: Secondary structure of the HAV and ADT peptides derived from human E-cadherin sequence; Improvement of Paracellular Drug Delivery by Cadherin Peptides: Modulation of Intercellular Junction by Utilization of Cadherin Peptides; Roles of E-cadherin and β -catenin in cell adhesion, signaling and possible therapeutic applications; Modulasi Junction Antar Sel Menggunakan Peptida Kadherin: Metoda Baru Untuk Meningkatkan Penghantaran Obat; Effects of an E-cadherin-Derived Peptide on the Gene Expression of CACO-2 Cells; Enhancement of Drug Absorption through the Blood-Brain Barrier and Inhibition of Intercellular Tight Junction Resealing by E-Cadherin Peptides; dan lain-lain.

Di samping melakukan penelitian, saat ini beliau mengajar sebagai Guru Besar Biokimia dan Biologi Molekuler di Fakultas Biologi Universitas Nasional, Fakultas Farmasi Universitas Indonesia dan Fakultas Farmasi Universitas Pancasila.

ISBN 978-602-14335-5-3



9 786021 433553