

**VIRTUAL SCREENING STRUKTUR MODIFIKASI ISONIAZID
TERHADAP ENZIM KATALASE PEROXIDASE MENGGUNAKAN
METODE DOCKING**

RIDA RESTA DEWI^a ; HAFRIZAL RIZA^a; INARAH FAJRIATY^a

**Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura,
Pontianak, Indonesia.**

Email : restadewipa2@gmail.com

ABSTRAK

LATAR BELAKANG : Isoniazid merupakan obat antituberkulosis lini pertama yang masih digunakan. Penggunaan isoniazid berpotensi menimbulkan efek samping dan resistensi. **TUJUAN :** Tujuan dari penelitian ini ialah untuk mengetahui afinitas dari struktur hasil modifikasi isoniazid terhadap enzim katalase peroxidase dan mengetahui kemampuan permeabilitas senyawa hasil modifikasi berdasarkan hukum Lipinski. **METODE :** Penelitian dilakukan secara *in silico* menggunakan metode *docking*. Program yang digunakan yaitu *AutoDock Vina*, *ChemOffice* dan *Discovery Studio* serta menggunakan uji ANOVA untuk menganalisis data. **HASIL :** Hasil analisis menunjukkan nilai Log P tidak > 5, nilai BM tidak > 500 g/mol, jumlah H donor tidak > 5 dan jumlah H Aseptor tidak > 10. Nilai Log P, BM, H Donor dan Aseptor ketiga ligan dan kontrol positif secara berturut-turut ialah 2,35 ; 177,115 g/mol ; 1 ; 3 (Ligan 1), 1,60; 192,126 ; 0 ; 2 (Ligan 2), 1,92 ; 207,273 g/mol ; 1 ; 2 (Ligan 3), -0,64 ; 137,06 g/mol ; 2 ; 3 (Isoniazid). Nilai afinitas ketiga ligan terhadap enzim KatG berturut-turut ialah -7,1 ; -7,1 ; -7,3 kkal/mol. **KESIMPULAN :** Kesimpulan dari penelitian ini adalah Ligan 1,2 dan 3 memenuhi hukum Lipinski sehingga memiliki kemampuan permeabilitas yang baik dan Ligan 3 menunjukkan nilai afinitas yang berbeda signifikan terhadap isoniazid dan diprediksi memiliki efek antituberkulosis yang lebih baik.

Kata Kunci : Antituberkulosis, Isoniazid, Modifikasi Struktur.

- 1) Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura Pontianak, Kalimantan Barat.

VIRTUAL SCREENING MODIFICATION STRUCTURE OF ISONIAZID TO ENZYME CATALASE PEROXIDASE BY DOCKING METHOD

RIDA RESTA DEWI^a ; HAFRIZAL RIZA^a; INARAH FAJRIATY^a

Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, Tanjungpura University,
Pontianak, Indonesia.

Email: restadewipa2@gmail.com

ABSTRACT

BACKGROUND : Isoniazid is a first-line antituberculosis drug and still in use. The use of isoniazid is induce side effects and resistance. **AIMED** : This research aimed to modify and knew affinity of the modified structure of isoniazid against the catalase peroxidase enzyme and to determine the permeability ability of the modified composition based on Lipinski's law. **METHOD**: The research was conducted in silico using a docking method. The programs used are AutoDock Vina, ChemOffice and Discovery Studio and use the ANOVA test to analyze data. **RESULTS**: The results of the analysis showed that the Log P value was not > 5, the BM value was not > 500 g / mol, the number of H donors was not > 5 and the number of H receptors was not > 10. Log P, BM, H Donors and Receptor numbers of ligands and positive controls In full, it is 2.35; 177,115 g / mol; 1; 3 (Ligand 1), 1.60; 19,126; 0; 2 (Ligan 2), 1.92; 207,273 g / mol; 1; 2 (Ligands 3), -0.64; 137.06 g / mol; 2; 3 (Isoniazid). The affinity value of three ligands for the overall KatG enzyme is -7.1; -7,1; -7.3 kcal / mol. **CONCLUSION**: The conclusion of this research is 1,2 and 3 ligands fulfill Lipinski's law so they have good permeability and Ligand 3 shows significantly different affinity values for isoniazid and is predict to have a better antituberculosis effect.

Keywords: Antituberculosis, Isoniazid, Structure Modification.

- 1) Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura Pontianak, Kalimantan Barat.

PENDAHULUAN

Isoniazid (INH) merupakan salah satu komponen terpenting dalam pengobatan tuberkulosis (TB) didunia ⁽¹⁾. *Mycobacterium tuberculosis*, bakteri penyebab TB sangat peka terhadap INH ⁽²⁾. Disebutkan bahwa 0,2 - 2% pasien TB yang diberi terapi INH dengan dosis standar yaitu 3-5 mg/kg/hari mengalami efek samping berupa neuropati perifer atau *peripheral neuropathy* (PN). Jumlah ini semakin bertambah hingga 44% jika dosis yang diberikan ditingkatkan. Kejadian efek samping ini mulai terjadi dari minggu ke-16 pemakaian isoniazid dan akan lebih cepat (minggu ke 3-5) jika dosis yang digunakan ditingkatkan ^(3,4).

Mycobacterium tuberculosis sangat peka terhadap INH⁽⁵⁾. Isoniazid masuk kedalam sel *M. tuberculosis* sebagai prodrug dengan berdifusi secara pasif, INH kemudian diaktifkan oleh enzim katalase-peroksidase yang diekspresikan oleh gen KatG *M. tuberculosis* untuk menjadi bentuk aktifnya. INH aktif kemudian akan menghambat biosintesis asam mikolat (*long chain α -branched β -hydroxylated fatty acids*) dinding sel *M. tuberculosis* ⁽⁶⁾.

Pengembangan obat baru untuk mendapatkan obat antituberkulosis turunan isoniazid dapat dilakukan salah satunya dengan cara modifikasi struktur kimia obat, karena struktur kimia mempengaruhi ikatan kimia obat dan protein target. Salah satu metode yang dapat dipilih ialah menggunakan metode *docking* secara kimia komputasi. Selain itu, hasil modifikasi struktur kimia obat isoniazid juga dianalisa berdasarkan hukum Lipinski untuk mengetahui kemampuan penetrasinya⁽⁷⁾.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah laptop (Acer aspire 4750Z Intel Core B940 processor), Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>) untuk mengambil protein, Program *Discovery Studio 2016 Client (DS)* untuk melihat jenis ikatan dan sisi aktif dari reseptor, Program *Autodock Vina (Versi 4.2, updated for version 4.2.6)* untuk proses docking, Program *ChemOffice 2D (Versi 15.0)* untuk membuat dan memodifikasi struktur 2-Dimensi dan penentuan sifat

kimia-fisika ligan, Program *ChemOffice 3D* (Versi 15.0) untuk membuat struktur 3-Dimensi ligan.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah struktur isoniazid, struktur kimia senyawa-senyawa hasil modifikasi dari program *ChemOffice* (Versi 15.0) dalam format pdb, struktur tiga dimensi enzim KatG (PDB ID: 1S2J) yang diunduh dari Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>) dalam format pdb.

1. Analisis Senyawa Menggunakan ChemOffice

Struktur tiga dimensi target KatG (PDB ID: 1S2J) yang diperoleh dari RCSB data bank protein (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Senyawa hasil modifikasi isoniazid diperoleh dengan menggunakan program komputer *ChemOffice* 15.0 untuk mendapatkan struktur 2 dimensinya. Program ini juga dapat menentukan sifat fisika kimia dari isoniazid serta senyawa hasil modifikasi dari isoniazid, kaitannya dengan kemampuan menembus membran biologis tubuh dan permeabilitas yang baik sehingga dapat mencapai reseptor dengan baik. Parameter yang dilihat adalah nilai log koefisien partisi oktanol-air (LogP), berat molekul (BM), jumlah H akseptor dan H donor. Berikutnya dilakukan konversi menjadi struktur tiga dimensi dengan menggunakan *Chem3D* 15.0 agar dapat melihat bentuk stereokimia senyawa tiga dimensi.

2. Analisis *Docking* Menggunakan AutoDock Vina

Deteksi tempat/gugus aktif dari isoniazid, *docking* ligan-reseptor yang terikat dilakukan menggunakan program komputer *Autodock Vina* (Versi 4.2, updated for version 4.2.6). Nilai energi dan RMSD (*Root Mean Square Deviation*) kemudian dapat dilihat menggunakan *Command Prompt*.

3. Analisis Ikatan Senyawa dengan Reseptor

Protein/reseptor dan ligan berformat .pdbqt diinput ke program *Discovery Studio 2016 Client*. *Discovery Studio* akan memperlihatkan jenis ikatan antara reseptor dan ligan secara dua dimensi atau tiga dimensi. Dianalisa residu asam amino yang berperan serta jenis ikatan yang terbentuk antara ligan dan sisi aktif enzim KatG pada penelitian ini.

4. Modifikasi Struktur Isoniazid Menggunakan ChemOffice

Hasil *docking* antara isoniazid dengan enzim *pyridoxal phosphokinase* akan memperlihatkan gugus yang berikatan kuat atau lemah pada sisi enzim. Gugus yang berperan tersebut di modifikasi dengan mengganti atau melakukan penambahan gugus lain yang dapat mengurangi nilai afinitas.

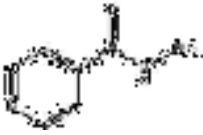
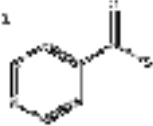
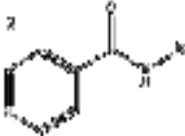
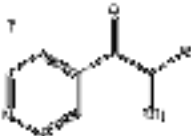
5. Analisis Data

Senyawa-senyawa hasil modifikasi struktur isoniazid kemudian dianalisis dengan hukum lima dari Lipinski, untuk memprediksi penetrasi senyawa. Kemudian dilihat asam amino apa saja yang terlibat, demikian pula dengan nilai *docking score*. Semakin rendah afinitas menunjukkan interaksi obat-reseptor semakin stabil dan diprediksi mempunyai aktivitas biologi semakin tinggi. Analisis secara statistik dilakukan menggunakan program SPSS versi.23.0 dengan uji ANOVA dengan taraf kepercayaan 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sifat Fisikokimia

Tabel 1. Struktur dan nama IUPAC ligan

Struktur	Nama IUPAC
Isoniazid 	Isonicotinohydrazine
Ligan 1 	1-(pyridin-4-yl)hexan-1-one
Ligan 2 	<i>N</i> -pentylisonicotinamide
Ligan 3 	2-hydroxy-1-(pyridin-4-yl)heptan-1-one

Berdasarkan hasil analisa Log P keempat senyawa memenuhi hukum Lipinski Log P tidak lebih dari 5 yaitu 2,35 (Ligan 1), 1,60 (Ligan 2) dan 1,92 (Ligan 3). Selain memperhatikan nilai Log P, syarat lain agar suatu senyawa memiliki permeabilitas yang baik ialah berat molekul senyawa tidak lebih dari 500 g/mol. Hal ini dikarenakan apabila suatu senyawa memiliki molekul yang besar, maka akan menyulitkan senyawa tersebut untuk menembus membrane tubuh. Inilah yang nantinya akan mengganggu proses penetrasi suatu obat. Berdasarkan hasil diketahui bahwa semua senyawa ligan telah memenuhi syarat (BM tidak lebih dari 500 g/mol) yaitu sebesar 177,115 g/mol (Ligan 1), 192,126 g/mol (Ligan 2) dan 207,273 g/mol (Ligan 3). Dua syarat terakhir yang dapat menentukan kemampuan permeabilitas senyawa ialah jumlah H donor tidak lebih dari 5 dan H aseptor tidak lebih dari 10. H donor dan H aseptor menjelaskan bahwa semakin tinggi kapasitas ikatan hidrogen, maka semakin tinggi energi yang dibutuhkan agar proses absorpsi dapat terjadi ⁽⁸⁾. Selain itu, ikatan hidrogen juga menunjukkan polaritas suatu senyawa dimana semakin banyak ikatan hidrogen maka senyawa akan semakin polar karena banyak berikatan dengan molekul oksigen dari air dalam cairan fisiologis.

Tabel 2. Hasil Sifat Fisika Kimia Senyawa Ligan

Nama Molekul	Rumus Molekul	Log P	Berat Molekul (g/mol)	Jumlah H	
				Donor	Aseptor
Isoniazid	C ₆ H ₇ N ₃ O	-0.64	137,06	2	3
Ligan 1	C ₂ H ₆ N ₂ O	2.35	177.115	1	3
Ligan 2	C ₁₂ H ₂₃ N ₃ O	1.60	192.126	0	2
Ligan 3	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₂	1.92	207.273	1	2

Berdasarkan hasil analisa sifat fisika kimia tersebut (**Tabel 2**), dapat disimpulkan bahwa jumlah H donor dan aseptor keempat ligan memenuhi syarat hukum Lipinski. Berikut adalah hasil analisis sifat fisika kimia ketiga ligan hasil modifikasi. Berdasarkan **Tabel 3**, setelah dilakukan minimalisasi energi menggunakan MM2 dari *Chem3d 17 free trial*, total energi sterik yang paling stabil diantara semua ligan adalah Ligan 2, hal tersebut dikarenakan nilai total

energi sterik yang didapat bernilai paling kecil, sehingga efek sterik yang menyebabkan tolakan antar atom sangat kecil, oleh karena itu molekul tersebut bersifat lebih stabil. Meminimalisasikan energy sterik bertujuan untuk memnetukan konfromasi yang paling stabil suatu ligan. Hal ini dilakukan agar saat berinteraksi dengan enzim atau protein target, ligan dapat berkonformasi lebih mudah dan stabil. Proses ini dapat mempengaruhi hasil nilai afinitas antara ligan dan enzim atau protein target saat dilakukan proses *docking*. Berikut adalah hasil energi sterik dari ketiga ligan dan kontrol positif dapat dilihat pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Hasil Preparasi Ligan Menggunakan Program ChemOffice 3D

Nama Molekul	Energi Sterik Sebelum MM2 (kkal/mol)	Total Energi (kkal/mol)
Isoniazid	712,783	4,088
Ligan 1	68.142	17.066
Ligan 2	58.456	7.714
Ligan 3	118.735	20.491

Docking

Proses *docking* dilakukan menggunakan aplikasi *AutodockTools* yang berbasis Vina. Parameter dari hasil *docking* yang dilihat adalah nilai energi bebas ikatan (ΔG) dan *Root Mean Square Deviation (RMSD)*. Nilai energi bebas Gibbs yang kecil menunjukkan bahwa konformasi yang terbentuk stabil, sedangkan nilai energi bebas Gibbs yang besar menunjukkan tidak stabilnya kompleks yang terbentuk^(9,10). Selanjutnya residu asam amino divisualisasikan menggunakan program *Discovery Studio*.

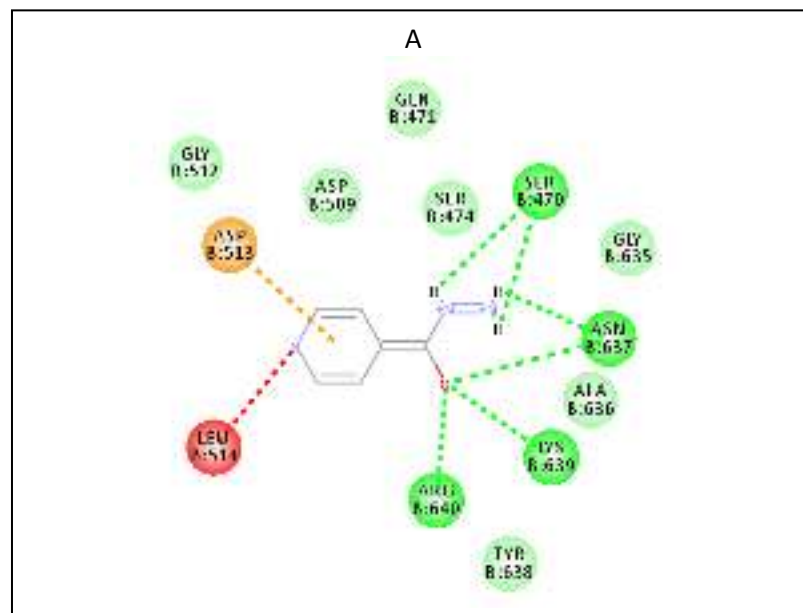
Ligan hasil modifikasi struktur isoniazid memiliki afinitas yang lebih rendah dibandingkan kontrol positif terhadap enzim KatG. Sehingga dapat diprediksi memiliki efek antituberkulosis yang lebih baik dibandingkan isoniazid sebelum dimodifikasi. Berikut adalah nilai afinitas hasil *docking* ketiga ligan terhadap enzim KatG.

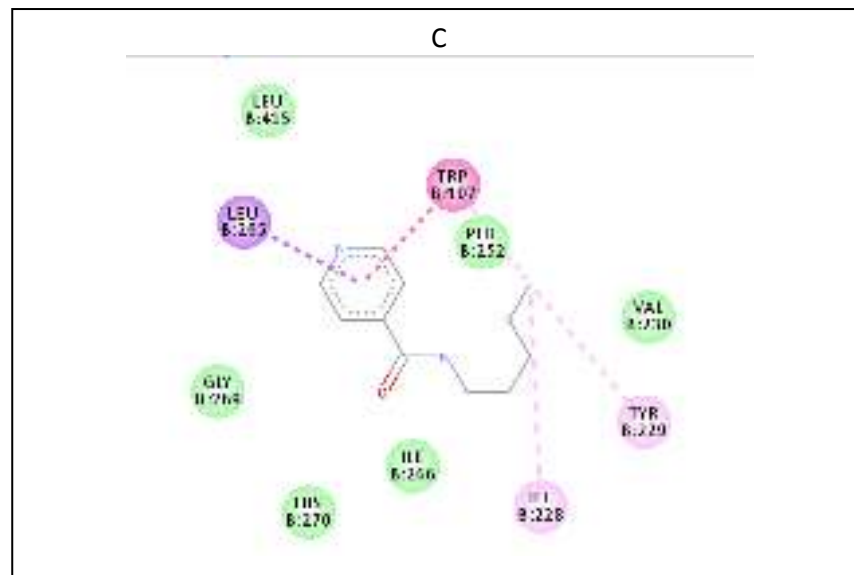
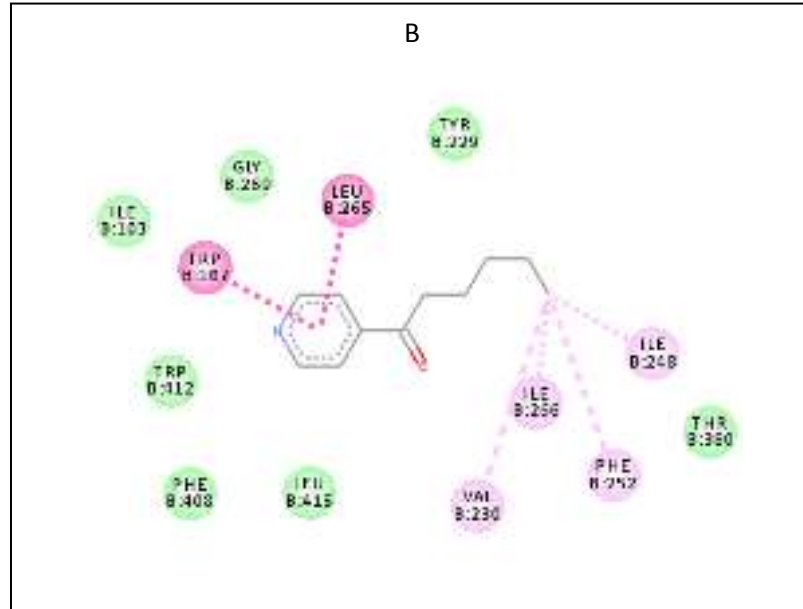
Tabel 4. Hasil *Docking* enzim Katg

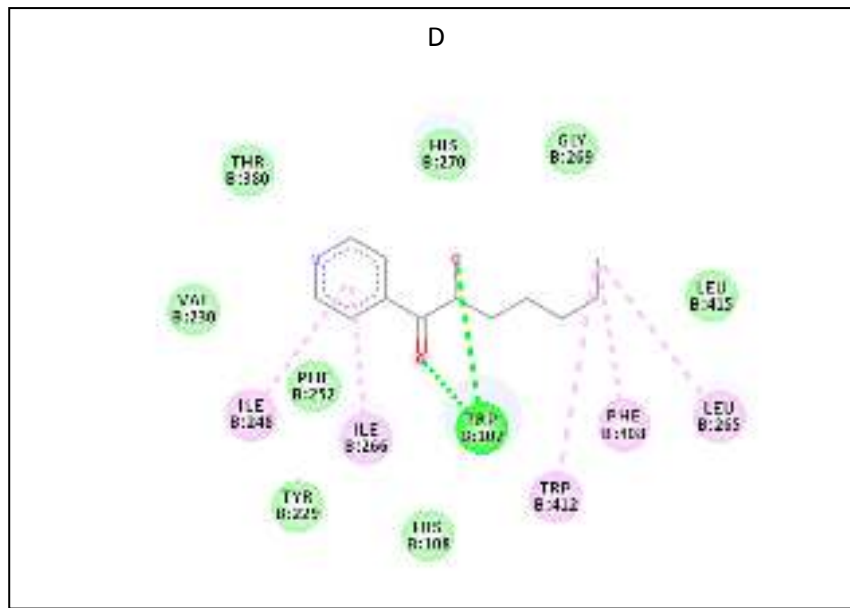
Nama Molekul	Afinitas (kkal/mol)	RMSD
Isoniazid	-6,3	0,000
Ligan 1	-7,1	0,000
Ligan 2	-7,1	0,000
Ligan 3	-7,3	0,000

Visualisasi Interaksi


Interaksi hasil *docking* ligan modifikasi terhadap enzim Katg dan PK dapat dilihat secara jelas dengan memvisualisasikannya menggunakan *discovery studio*. Dengan program ini, akan terlihat residu asam amino yang berinteraksi dengan struktur ligan secara dua dimensi (2D) atau tiga dimensi (3D). Terlihat pada **Gambar 1** hasil interaksi struktur isoniazid, ligan 1, ligan 2 dan ligan 3 terhadap enzim KatG.



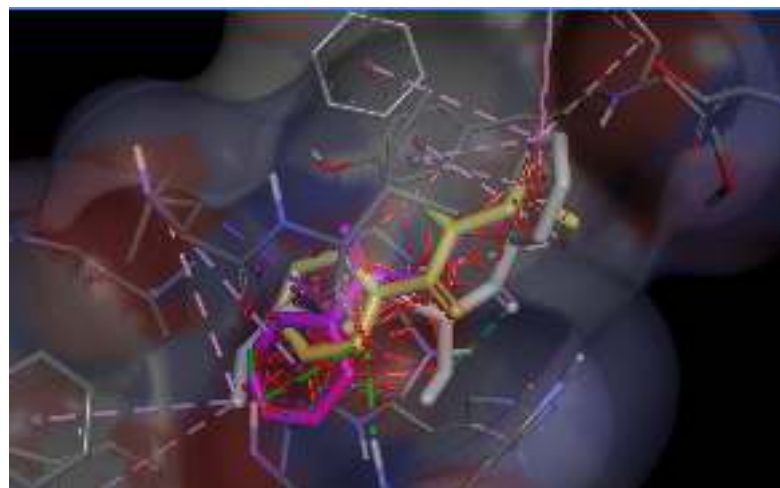







Interactions

- | | |
|--|---|
|  van der Waals |  Unfavorable Acceptor-Acceptor |
|  Conventional Hydrogen Bond |  Pi-Sigma |
|  Carbon Hydrogen Bond |  Alkyl |
|  Halogen (Fluorine) |  Pi-Alkyl |
|  Unfavorable Donor-Donor | |

Gambar 1. Visualisasi 2D Struktur Jenis Ikatan Isoniazid (A), Ligan 1 (B), Ligan 2 (C), Ligan 3 (D) terhadap enzim KatG



Keterangan:

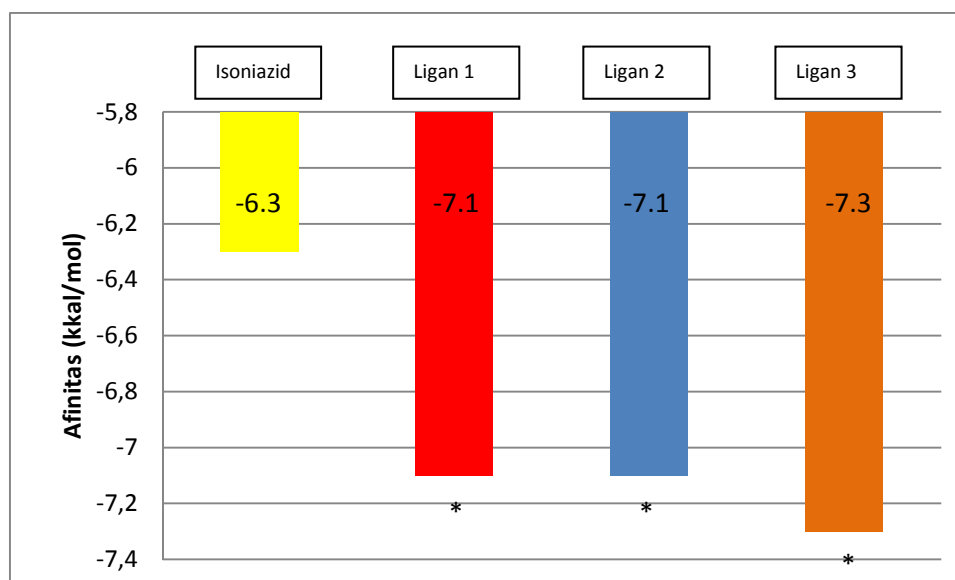
-  Ligan 1
-  Ligan 2
-  Ligan 3

Gambar 2. Hasil Visualisasi Senyawa Hasil Modifikasi pada Sisi Aktif KatG

Dapat dilihat pada **Gambar 2** bahwa ketiga ligan menempati sisi pada enzim KatG. Sehingga dapat dikatakan bahwa ketiga ligan dapat berinteraksi dengan enzim KatG dan memberikan efek antituberkulosis. Selanjutnya ligan akan diaktifkan oleh enzim KatG dan menghasilkan bentuk aktif yang nantinya akan berikatan dengan NADH dan menghambat sintesis asam mikolat pada bakteri. Namun, proses ini memerlukan penelitian lebih lanjut untuk memastikannya.

Analisis Statistik Menggunakan SPSS

Data yang dianalisis menggunakan SPSS yaitu afinitas dari 3 ligan dengan kontrol positif isoniazid. Total banyaknya data yang dianalisis yaitu 24 data. Hasil uji normalitas menunjukkan data terdistribusi normal yaitu nilai $P > 0.05$. Uji selanjutnya yaitu uji homogenitas untuk melihat kesamaan variasi (kehomogenan data) pada suatu populasi. Hasil uji homogenitas menunjukkan data ketiga ligan adalah homogen yaitu $p=0,675$ (nilai $P > 0,05$). Kemudian dilakukan uji perbandingan antara isoniazid terhadap ketiga ligan hasil modifikasi.



Ket:
*=Berbeda signifikan terhadap isoniazid

Gambar 3. Diagram Hasil Analisis Statistik Afinitas Ligan dengan Pembandingan Isoniazid terhadap Enzim KatG

Hasil menunjukkan bahwa antara Ligan 1, Ligan 2 dan Ligan 3 dengan kontrol isoniazid memiliki nilai Sig. (2.tailed) yang kurang dari 0.05 yaitu nilai P ketiga ligan ialah 0.000 (sig. < 0.05) yang artinya memiliki perbedaan yang bermakna terhadap kontrol positif. Sehingga berdasarkan hasil analisa tersebut dapat dikatakan bahwa nantinya ketiga ligan diprediksi akan menghasilkan efek yang lebih baik dibandingkan isoniazid karena memiliki nilai afinitas yang lebih rendah dibandingkan isoniazid (lebih mudah berinteraksi dengan enzim KatG).

KESIMPULAN

Ketiga ligan memenuhi hukum 5 Lipinski sehingga dapat diprediksi akan memiliki kemampuan penetrasi didalam tubuh yang baik. Ligan 3 memiliki hasil terbaik diantara ketiga ligan, karena afinitas ligan 3 terhadap enzim KatG lebih rendah dibandingkan kontrol positif terhadap enzim KatG secara signifikan.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization (WHO). Treatment Guidelines For Isoniazid-Resistant Tuberculosis. 2018.
2. Rattan, A., A. Kalia dan N. Ahmad. Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis: molecular perspectives. *Ind. J. Tub.* 1999; 46(51):51-68.
3. Watt, JJ. Et al. Polyneuropathy, anti-tuberculosis treatment and the role of pyridoxine in the HIV/AIDS era: a systematic review. *Int J Tuberc Lung Dis* ; 2011. doi:10.5588/ijtld.10.0284.
4. Fekih L, Boussoffarra L, Fenniche S, Abdelghaffar H, Megdiche ML. Neuropsychiatric side effects of anti-tuberculosis treatment. *Rev Med Liege.* 2011; 66: 82-85.

5. Rattan, A., A. Kalia dan N. Ahmad. 1999. Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis: molecular perspectives. *Ind. J. Tub.* 46(51):51-68.
6. Ramaswamy, S dan J. M. Musser. 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update. *Tubercle and Lung Disease.* 79(1):3-29.
7. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1997. 23, 3-25.
8. Funkhouser T. Lecture: Protein-Ligand Docking Methods. Princeton University; 2007.
9. Kitchen D, Decornez HFJ, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and application. *Nature Reviews.* 2004; 4: 935-949.
10. Wolf L. New Software and Websites for the Chemical Enterprise. *Chemical and Engineering News Archives.* 2009; 48.