

VIRTUAL SCREENING STRUKTUR SENYAWA MODIFIKASI ISONIAZID SEBAGAI UPAYA MENGURANGI EFEK HEPATOTOKSIK

NINDY ASTRI UTAMI^a ; HAFRIZAL RIZA^a ; INARAH FAJRIATY^a

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

email : nindyastritutami@gmail.com

ABSTRAK

Latar belakang : Penggunaan isoniazid sebagai anti tuberkulosis biasa dikaitkan dengan hepatotoksik. **Tujuan :** Penelitian ini bertujuan melihat kemampuan penetrasi berdasarkan hukum Lipinski serta afinitas terhadap enzim KatG dan NAT2 dari ligan hasil modifikasi isoniazid. **Metode :** Penelitian dilakukan dengan metode *docking* mengikuti tahapan modifikasi struktur menggunakan eugenol. Program yang digunakan yaitu *ChemOffice*, *AutoDock Vina* dan *Discovery Studio*. **Hasil :** Kedua ligan hasil modifikasi isoniazid memenuhi hukum Lipinski: ligan 1 (BM=285,11 g/mol; log P=1; H donor=2; H akseptor=6); ligan 2 (BM=212,12 g/mol; log P=0,74; H donor=1; H akseptor=5). Afinitas ligan 1 dan ligan 2 terhadap enzim KatG dan NAT2 berturut-turut yaitu -9,1 dan -9,0 kkal/mol; -7,0 dan -5,9 kkal/mol. **Kesimpulan :** Kesimpulan dari penelitian ini ialah kedua ligan hasil modifikasi isoniazid memiliki kemampuan penetrasi yang baik dan secara statistik ligan 2 memiliki afinitas terbaik terhadap enzim KatG maupun NAT2, dimana ligan 2 diduga dapat berkontribusi sebagai anti tuberkulosis dengan efek hepatotoksik yang minim.

Kata Kunci : *Docking*, Eugenol, Hepatotoksik, Isoniazid, Modifikasi Struktur.

ABSTRACT

Background : The use of isoniazid as anti tuberculosis is commonly associated with hepatotoxic. **Objective :** This study was aim to look at penetration ability based on Lipinski's law and affinity for KatG and NAT2 enzymes from isoniazid-modified ligands. **Method :** The study was conducted by docking method following structure modification stages used eugenol. The programs were used ChemOffice, AutoDock Vina and Discovery Studio. **Results :** Two isoniazid-modified ligands conform Lipinski's law: ligand 1 (BM = 285.11 g/mol; log P = 1; H donor = 2; H acceptor = 6); ligand 2 (BM = 212.12 g/mol; log P = 0.74; H donor = 1; H acceptor = 5). Affinity of ligand 1 and ligand 2 against KatG and NAT2 enzymes consecutively -9.1 and -9.0 kcal / mol, respectively; -7.0 and -5.9 kcal / mol. **Conclusion :** The conclusion of this study is two isoniazid-modified ligands have good penetration ability and statistically ligand 2 had the best affinity as isoniazid-modified result for both KatG and NAT2 enzymes, where ligand 2 was thought to contribute to anti-tuberculosis with minimal hepatotoxic effects.

Keywords : *Docking*, Eugenol, Hepatotoxic, Isoniazid, Structure Modification.

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) merupakan salah satu dari 10 penyebab kematian di dunia⁽¹⁾. Prevalensi TB masih cukup tinggi baik di dunia, di Indonesia maupun di Kalimantan Barat dengan angka kematian yang muncul pada tahun 2017 sekitar 1,3 juta pasien. Indonesia menjadi negara dengan jumlah kasus baru TB terbanyak kedua di dunia setelah India⁽²⁻⁵⁾. Isoniazid (INH) digunakan sebagai lini pertama pengobatan dan pencegahan TB, baik dalam bentuk terapi tunggal maupun kombinasi bersama Obat Anti Tuberkulosis (OAT) lainnya⁽⁶⁻⁸⁾.

N-acetyl transferase 2 (NAT2) adalah enzim yang memetabolisme INH melalui proses asetilasi pada gugus hidrazid. Kemudian dilanjutkan dengan proses metabolisme lain seperti asetilasi kembali, oksidasi maupun hidrolisis sehingga menghasilkan metabolit toksik seperti *hydrazine* yang menyebabkan terjadinya hepatotoksik⁽⁹⁾. Modifikasi berupa konjugasi pada bagian N-terminal INH dengan eugenol diharapkan dapat menghambat proses asetilasi, oksidasi metabolit hasil asetilasi (*acetyl hydrazine*) dan menghindari terbentuknya *hydrazine*⁽¹⁰⁾. Eugenol dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan, antiinflamasi, antikonvulsan, anestetik lokal, antistress, bakteriostatik dan bakterisida, antikandida dan anti jamur, antigenotoksik, serta antikarsinogenik⁽¹¹⁻¹²⁾. Efek hepatoprotektif eugenol juga telah dibuktikan terhadap obat-obatan yang dapat menginduksi kerusakan hati seperti *Thioacetamide* dan *Arsenic Trioxide*⁽¹³⁻¹⁴⁾.

Interaksi senyawa hasil modifikasi obat terhadap reseptor dapat diketahui melalui metode kimia komputasi yaitu *molecular docking*. Metode ini menganalisis berdasarkan jenis ikatan, jarak ikatan, energi sterik, interaksi atom-atom, karakter atom, serta faktor lainnya yang berhubungan dengan mekanika kuantum yang hasilnya konsisten terhadap nilai afinitas⁽¹⁵⁾. Analisis menggunakan hukum Lipinski juga bertujuan untuk mengetahui apakah senyawa hasil modifikasi obat mampu menembus membran biologis dengan baik⁽¹⁶⁾.

METODOLOGI

Alat dan Bahan

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah laptop (*Asus A43S Intel Pentium inside™ 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 tiga dimensi isoniazid (*pyridine-4-carbohydrazide*) dari program *ChemOffice* (Versi 15.0) dalam format pdb, struktur tiga dimensi enzim KatG (PDBID: 1SJ2) dan enzim NAT2 (PDBID: 2PFR) yang diunduh dari *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/>) dalam format pdb.

Tahapan Modifikasi Struktur

Memodifikasi suatu struktur obat memiliki metode yang bervariasi. Beberapa metode yang digunakan antara lain yaitu penyederhanaan molekul, penggabungan molekul, perubahan dimensi dan kelenturan molekul serta mengubah sifat kimia fisika molekul.

Preparasi Ligan dan Makromolekul

Struktur dua dimensi (2D) ligan hasil modifikasi dan isoniazid digambar menggunakan *ChemOffice* 2D (versi 15.0). Struktur tiga dimensi ligan dan isoniazid digambar menggunakan *ChemOffice* 3D (versi 15.0) dan dilakukan minimalisasi energi sterik ligan (MM2 Tools) untuk menemukan bentuk paling stabil dari ligan agar dapat berinteraksi dengan reseptor target. Struktur tiga dimensi reseptor target yaitu enzim KatG (PDBID: 1SJ2) dan enzim NAT2 (PDBID: 2PFR) diperoleh dari RCSB data bank protein (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Makromolekul yang telah di download, dipisahkan dengan ligan pembawa dengan *Discovery Studio* 2016. Hasil preparasi disimpan dalam format .pdb.

Analisis Senyawa Menggunakan ChemOffice

Parameter yang dilihat adalah nilai log koefisien partisi oktanol-air (LogP), berat molekul (BM), jumlah H akseptor dan H donor. Ligan dianalisis menggunakan program *ChemDraw* 2D (versi 15.0).

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*.

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.

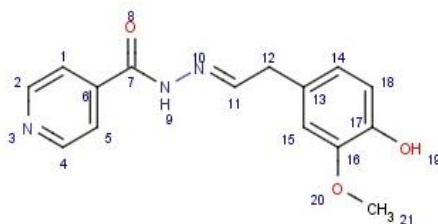
Analisis Data

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 *docking score*. Semakin rendah afinitas menunjukkan interaksi obat-reseptor semakin stabil dan diprediksi mempunyai aktivitas biologis semakin tinggi. Analisis secara statistik dilakukan menggunakan program SPSS versi.23.0 dengan uji ANOVA dengan taraf kepercayaan 95%.

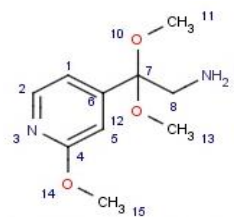
HASIL

Tahap Modifikasi

Tahap pertama yaitu pengurangan struktur yang bertujuan untuk mengetahui farmakofor ligan terhadap enzim KatG (indikasi) dan enzim NAT2 (efek toksik). Pada tahap pengurangan struktur dilakukan eliminasi perlahan dari setiap cabang dan gugus yang dimiliki isoniazid. Tahap kedua adalah modifikasi struktur isoniazid berdasarkan penambahan dan penggantian struktur isoniazid menggunakan struktur eugenol. Modifikasi dengan gugus lain juga dilakukan baik melalui tahap penggantian gugus, penambahan gugus maupun perubahan pada cabang atom pusat. Tujuan modifikasi dengan ketiga cara tersebut yaitu untuk mengganti interaksi yang terjadi antar ligan dan reseptor, mengubah konformasi serta membuat struktur menjadi lebih kaku atau menyulitkan ligan berinteraksi dengan reseptor. Diperoleh dua ligan terbaik sebagai kandidat modifikasi isoniazid seperti di bawah ini.



Ligan 1



Ligan 2

Analisis Sifat Fisika Kimia Ligan

Dua modifikasi ligan memenuhi hukum 5 Lipinski dilihat dari nilai Log P <5, BM <500, jumlah H donor <5 dan jumlah H akseptor <10. Hasil dapat dilihat pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Sifat Fisika Kimia Senyawa Ligan

Nama Molekul	Rumus Molekul	Log P	Berat Molekul (g/mol)	Jumlah H	
				Donor	Akseptor
Isoniazid	C ₆ H ₇ N ₃ O	-0,64	137,06	2	3
Ligan 1	C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O ₃	1	285,11	2	6
Ligan 2	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃	0,74	212,12	1	5

Docking

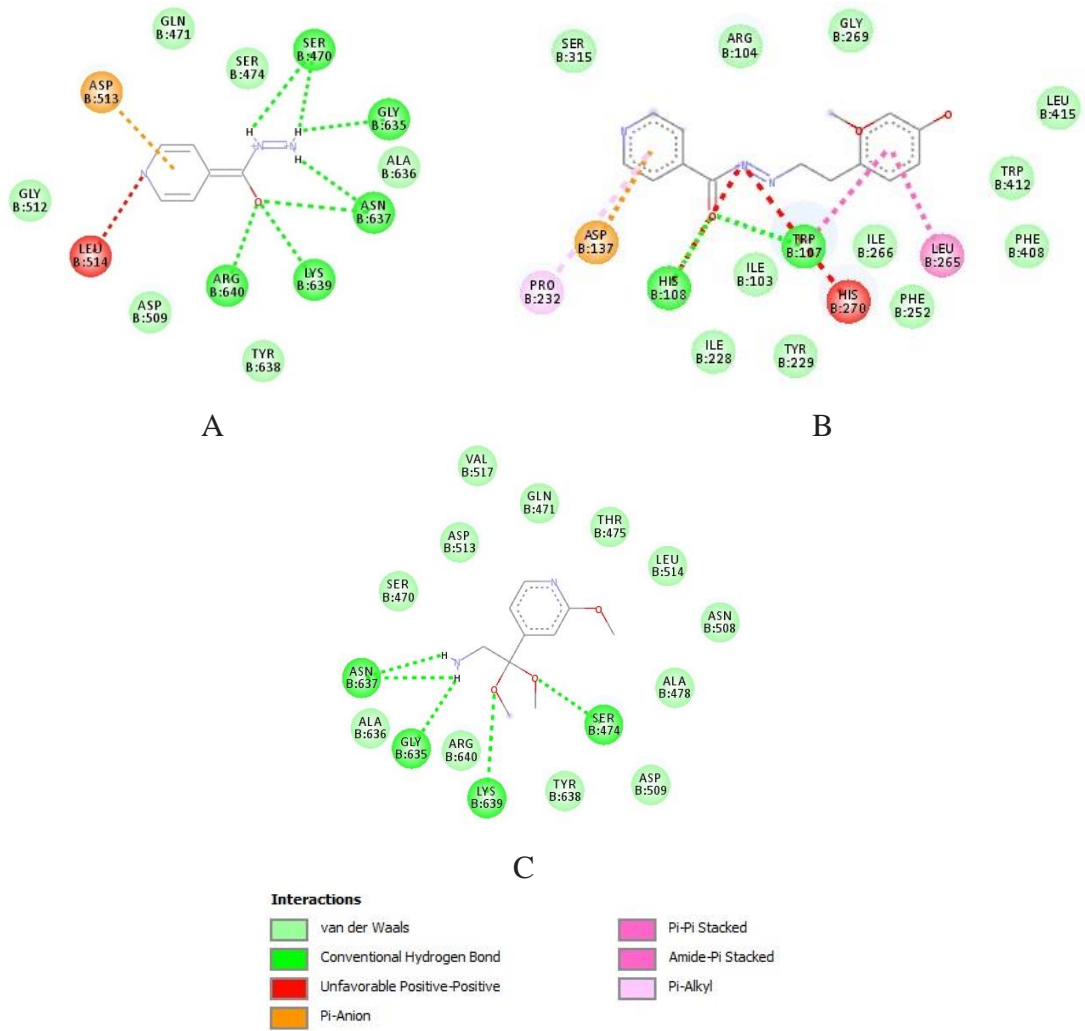
Proses *docking* menggunakan AutoDock Vina dilakukan pada 2 enzim yaitu enzim indikasi (KatG) dan enzim penyebab efek toksik (NAT2). Hasil dapat dilihat pada **Tabel 3** dengan RMSD = 0,000.

Tabel 3. Hasil *docking* terhadap enzim KatG dan NAT2

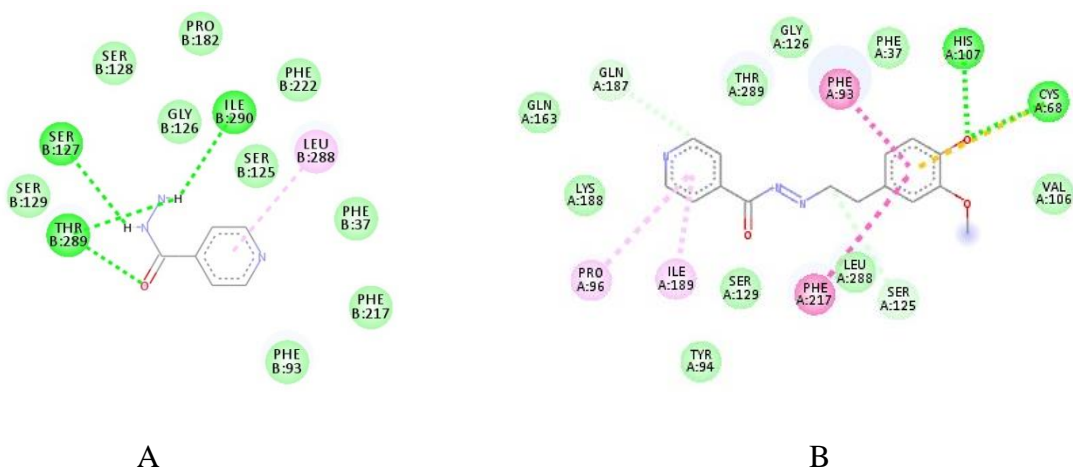
Nama Molekul	Afinitas (kkal/mol)		RMSD
	Indikasi (KatG)	Efek Toksik (NAT2)	
Isoniazid	-6,3	-6,1	0,000
Ligan 1	-9,1	-9,0	0,000
Ligan 2	-7,0	-5,9	0,000

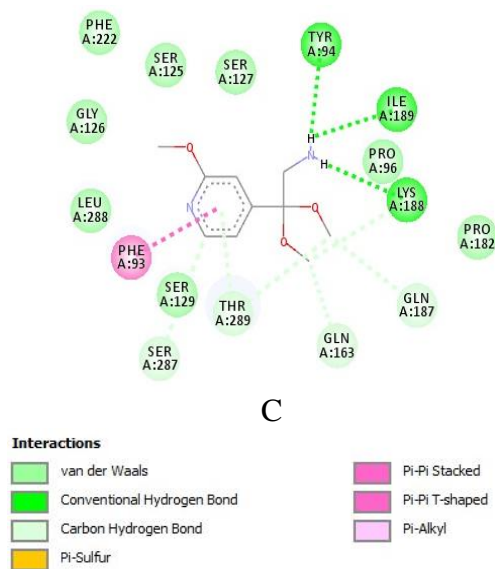
Visualisasi Interaksi

Jenis interaksi yang terjadi antara isoniazid, ligan 1 dan ligan 2 terhadap enzim indikasi (KatG) dapat dilihat pada **Gambar 1**, sedangkan interaksi antara isoniazid, ligan 1 dan ligan 2 terhadap enzim penyebab efek toksik (NAT2) dapat dilihat pada **Gambar 2**.



Gambar 1. Visualisasi Jenis Interaksi Isoniazid (A), Ligan 1 (B) dan Ligan 2 (C) terhadap Enzim KatG Secara 2D

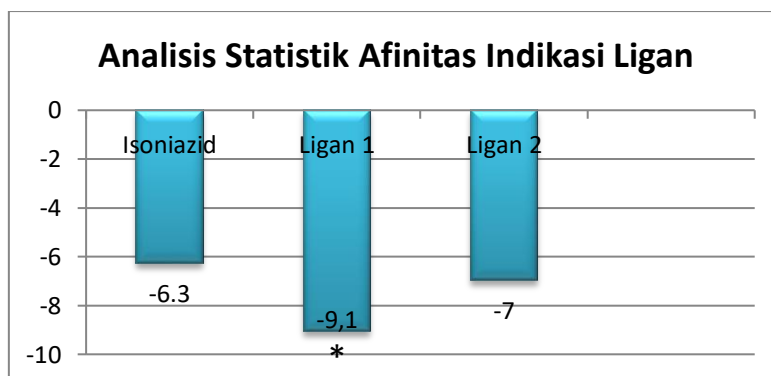




Gambar 2. Visualisasi Jenis Interaksi Isoniazid (A), Ligan 1 (B) dan Ligan 2 (C) terhadap Enzim NAT2 Secara 2D

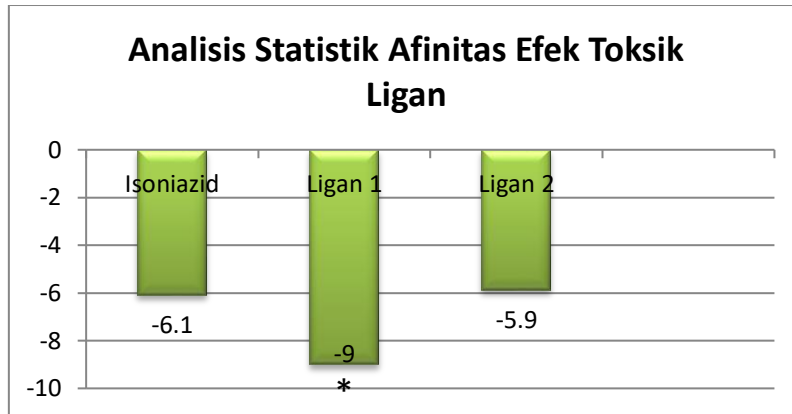
Analisis Menggunakan SPSS

Data yang dianalisis menggunakan SPSS yaitu afinitas dari kontrol positif isoniazid dan 2 ligan. Jumlah data yang dianalisis sebanyak 18 data. Hasil dari uji normalitas menunjukkan bahwa data terdistribusi normal (P value $> 0,05$), sedangkan uji homogenitas $P = 0,115$ (P value $> 0,05$) terhadap enzim KatG dan $P = 0,101$ ($P > 0,05$) terhadap enzim NAT2. Hasil analisis antara kontrol positif isoniazid, ligan 1 dan ligan 2 terhadap enzim KatG dan enzim NAT2 dapat dilihat pada **Gambar 3** dan **Gambar 4**.



Ket: * = Berbeda signifikan

Gambar 3. Hasil Analisis Statistik dari Afinitas Ligan dan Isoniazid terhadap Enzim KatG



Ket: * = Berbeda signifikan

Gambar 4. Hasil Analisis Statistik dari Afinitas Ligan dan Isoniazid terhadap Enzim NAT2

PEMBAHASAN

Senyawa yang memiliki permeabilitas baik dapat dianalisis menggunakan hukum 5 Lipinski. Hukum ini menyatakan bahwa suatu senyawa akan memiliki permeabilitas yang baik jika nilai Log P <5, BM <500, jumlah H donor <5 dan jumlah H akseptor <10. Hasil modifikasi struktur isoniazid menunjukkan bahwa 2 ligan hasil modifikasi memenuhi hukum Lipinski, berarti dapat diprediksi bahwa modifikasi struktur ini akan memiliki permeabilitas yang baik di dalam tubuh.

Mengacu pada sifat lipofilisitas ligan dari analisis Lipinski, kedua ligan berpotensi untuk dikembangkan dalam bentuk sediaan oral, salah satunya tablet. Berdasarkan nilai log P, kedua ligan diduga masuk dalam *Bioavailability Classification System* (BCS) kelas 1. Obat dengan BCS kelas 1 memiliki permeabilitas yang tinggi dan kelarutan yang tinggi, oleh karena itu obat dengan kelas ini dibuat dalam bentuk tablet dapat diabsorpsi dengan baik di dalam tubuh.

Berdasarkan hasil analisis statistik menggunakan uji ANOVA SPSS, ditemukan bahwa ligan 1 memiliki perbedaan signifikan dengan kontrol positif terhadap enzim indikasi (KatG), namun tidak pada sisi aktif enzim. Adapun ligan 2 menunjukkan interaksi pada sisi aktif enzim namun tidak berbeda signifikan dengan isoniazid, sehingga dapat dikatakan bahwa ligan 2 memiliki efek yang sama seperti isoniazid sebagai antituberkulosis. Ligan 1 juga berbeda signifikan dengan kontrol positif

terhadap enzim penyebab efek toksik (NAT2), tetapi baik ligan 1 maupun ligan 2 diduga memiliki potensi efek toksik yang minim dibanding isoniazid sebelum modifikasi karena keduanya tidak berikatan pada sisi aktif enzim NAT2.

KESIMPULAN

Berdasarkan hukum Lipinski, isoniazid, ligan 1 dan ligan 2 memiliki permeabilitas yang baik untuk menembus membran biologis tubuh. Ligan 2 menunjukkan hasil terbaik di antara seluruh hasil modifikasi dalam mengurangi potensi hepatotoksik dan memiliki indikasi yang baik sebagai antituberkulosis.

REFERENSI

1. World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017: 5.
2. World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018: 1-2.
3. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2017. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2018: 160.
4. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2016. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2017: 154.
5. Dinas Kesehatan Provinsi Kalimantan Barat. Profil Kesehatan Provinsi Kalimantan Barat Tahun 2017. Pontianak: Dinas Kesehatan Provinsi Kalimantan Barat; 2018: 35.
6. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Pedoman Nasional Pengendalian Tuberkulosis. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2014: 21.
7. Nurul D, Kaswandhani N. Laporan Kasus Berbasis Bukti Perbandingan Efektivitas Isoniazid pada Preparat Kombinasi Isoniazid dan Rifampisin pada Anak dengan Infeksi Laten Tuberkulosis. Sari Pediatri. 2016; 17(6): 486.
8. World Health Organization (WHO). Guidelines for Intensified Tuberculosis Case-Finding and Isoniazid Preventive Therapy for People Living with HIV in Resource Constrained Settings. Geneva: World Health Organization; 2011: 1.
9. Metushi IG, Cai P, Zhu X, Nakagawa T, Uetrecht JP. A fresh look at the mechanism of isoniazid-induced hepatotoxicity. Clin Pharmacol Ther 2011; 89: 911-914.

10. Bhilare NV, Dhaneshwar SS, Mahadik KR. Amelioration of Hepatotoxicity by Biocleavable Amino-thiol Chimeras of Isoniazid: Design, Synthesis, Kinetics and Pharmacological Evaluation. *World Journal of Hepatology*. 2018; 10(7): 497-498.
11. Gulcin I. Antioxidant Activity of Eugenol: A Structure-Activity Relationship Study. *J Med Food*. 2011; 14(9): 975-985.
12. Marchese A, Barbieri R, Coppo E, Orhan IE, Daglia M, Nabavi SF, et al. Antimicrobial Activity of Eugenol and Essential Oils Containing Eugenol: A Mechanistic Viewpoint. *Critical Reviews in Microbiology*. 2017; 1-22.
13. Prasad R, Ali S, Khan LA. Hepatoprotective Effect of *Syzygium aromaticum* Extract on Acute Liver Injury Induced by Thioacetamide. *IJPCR*. 2010; 2(2): 68-71.
14. Prakash B, Nellikunnath P, Surendran A, Radhakrishnan C, Vineetha, Harikumar N. Protective Effects of Eugenol Against Hepatotoxicity Induced by Arsenic Trioxide: An Antileukemic Drug. *IJMS*. 2018; 43(3): 305-310.
15. Jensen F. *Introduction of Computational Chemistry*, 2nd edition. Denmark: John Wiley and Sons, Ltd; 2007.
16. Lipinski, C.A. et al. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001.46 (1-3): 3-26.