

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit menular kronis yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Bakteri ini berbentuk basil dan tahan terhadap asam sehingga dikenal sebagai Basil Tahan Asam (BTA). Bakteri ini sering ditemukan menginfeksi parenkim paru dan menyebabkan TB paru. Meskipun demikian, bakteri ini juga dapat menginfeksi organ lainnya atau disebut dengan TB ekstra paru (Kemenkes, 2020). Tercatat 10 juta orang terkena TB dengan total kematian mencapai 1,5 juta dan menjadi penyebab kematian nomor 13 serta kedua setelah covid-19 dalam kategori kematian akibat infeksi. Indonesia berada pada urutan ketiga sebagai negara dengan kasus TB tertinggi di dunia (WHO, 2021).

Saat ini obat lini pertama untuk TB adalah isoniazid, rifampin, pirazinamid dan etambutol. Obat-obat ini memiliki target yang berbeda. Isoniazid bekerja menghambat biosintesis asam mikolat, yaitu komponen penting dinding sel mikobakterium (Beauduy and Winston, 2018), secara *in vitro* INH-NAD(H), yaitu bentuk aktif isoniazid menghambat *enoyl acyl carrier protein reductase* (*inhA*), enzim yang terlibat dalam proses perpanjangan asam lemak dan asam mikolat yang dibutuhkan untuk pembentukan dinding sel mikobakteri, hambatan enzim akan menyebabkan mikobakteri mengalami kematian (Nguyen, 2002; Hoagland *et al.*, 2016).

Rifampin, mengikat subunit β DNA-dependent RNA polymerase sehingga menghambat sintesis RNA (Beauduy and Winston, 2018). Pirazinamid diduga memiliki efek terhadap membran sel dengan mengganggu potensial membran pada pH asam (Iriani dkk, 2016). Etambutol menghambat *arabynosyl transferase* yang terlibat dalam polimerisasi arabinoglukan, yaitu komponen penting dinding sel (Beauduy and Winston, 2018)

Pengobatan TB dilakukan dengan kombinasi obat-obat tersebut untuk mencegah timbulnya resistensi. Kejadian resistensi mikobakterium, termasuk MTB, dapat disebabkan oleh laju pertumbuhan mikobakterium yang lebih lambat daripada bakteri lainnya dan dinding sel mikobakterium yang sukar dilalui oleh zat antibakteri (Beauduy and Winston, 2018). Resistensi juga dapat disebabkan oleh pengobatan yang tidak tepat dosis dan cara pemakaian serta kurangnya kepatuhan pasien (Gillespie, 2002). Resistensi terhadap obat

antituberkulosis dibagi menjadi lima, yaitu: resisten isoniazid, resisten rifampisin, multidrug resistant (MDR), (pre-extensively drug resistant (pre-XDR), dan extensively drug resistant (XDR) (WHO, 2021).

Pada penelitian yang dilakukan Cao *et al.* (2019) di rumah sakit Zunyi, Guizhou China diperoleh persentase resistensi dari 318 pasien terhadap rifampisin, isoniazid, dan etambutol berturut turut adalah 40,6%; 53,5%; dan 20,8%. Selain itu, juga dilaporkan oleh Pourakbari *et al.* (2016) isoniazid memiliki rata-rata prevalansi resistensi tertinggi di Teheran, Iran. Tingginya kejadian resistensi menjadi pertimbangan utama untuk mencari senyawa-senyawa yang memiliki potensi sebagai antituberkulosis (Boniface and Ferreira, 2020). Senyawa-senyawa ini dapat berasal dari tanaman, jamur, bakteri, marine, sintesis, dll (Katiyar *et al.*, 2012). Beberapa contoh tanaman yang terbukti memiliki aktivitas sebagai antituberkulosis antara lain *Syzygium aromaticum*, *Berchemia discolor*, *Warbugia salutaris*, *Terminalia sericea*, *Bridelia micrantha*, *Aspidosperma quebracho*, *Piper nigrum*, dan *Terminalia avicennoides*. Salah satu kandungan senyawa aktif pada tanaman-tanaman tersebut adalah flavonoid (Aprillia dan Tjitraresmi, 2018).

Flavonoid merupakan metabolit sekunder tanaman yang memiliki beberapa aktivitas antara lain antiinflamasi, antiviral, antimikroba, dan antimikobakterium (Jnawali *et al.*, 2016), yang potensial sebagai calon obat antituberkulosis. Dari 100 senyawa golongan flavonoid yang berasal dari tanaman telah diteliti sebagai antituberkulosis terhadap MTB dan didapatkan ada 16 senyawa dengan nilai KHM < 20 µg/ml yang efektif sebagai calon obat antituberkulosis (Boniface and Ferreira, 2020). Flavonoid bekerja sebagai antituberkulosis dengan menghambat *fatty acid synthase* (FAS) II yaitu proses perpanjangan asam lemak pembentuk asam mikolat (Brown, 2007; Gurvitz et al., 2008).

Flavonoid dibagi menjadi beberapa sub kelompok, yaitu: flavon, flavonon, flavonol, flavononol, flavanol/katekin, antosianin, dan khalkon (Panche, 2016). Salah satu flavonoid adalah apigenin, yang termasuk sub kelompok flavon. Aktivitas antituberkulosis terhadap MTB H37R_a (ATCC 25177) ekstrak metanol 98% tanaman *Thymbra spicata* var. *spicata* yang mengandung apigenin menunjukkan nilai konsentrasi hambatan minimal (KHM) sebesar 196 µg/ml (Askun *et al.*, 2009). Aktivitas antituberkulosis apigenin terhadap MTB H37R_v ditunjukkan dengan nilai KHM sebesar 70 µg/ml (Chen *et al.*, 2010), sedang terhadap *Mycobacterium Smegmatis* ATCC 14468 nilai IC₉₇ sebesar 250 µg/ml (Salih *et al.*, 2020).

Berdasarkan hal tersebut senyawa turunan apigenin dapat dikembangkan sebagai senyawa antituberkulosis. Pemilihan turunan apigenin dilakukan pada laman Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dan diperoleh sebelas turunan senyawa. Pemilihan berdasarkan perbedaan substitusi gugus metil pada gugus hidroksil apigenin diperoleh enam turunan senyawa, yaitu: apigenin 5-metil eter; apigenin 7-metil eter; apigenin 4'-metil eter; apigenin 4',7-dimetil eter; apigenin 5,7-dimetil eter; dan apigenin trimetil eter. Dan perbedaan substitusi glukosida diperoleh lima senyawa, yaitu: apigenin 6-C-glukosida; apigenin 8-C-glukosida; apigenin 5-O-glukosida; apigenin 7-O-glukosida; dan apigenin 4'-O-glukosida.

Dalam pengembangan obat baru, sebelum dilakukan sintesis perlu dilakukan pemodelan molekul (*molecular modeling*), yaitu salah satu cabang ilmu kimia untuk mengevaluasi sifat-sifat molekul dan struktur menggunakan kimia komputasi modern dengan teknik visualisasi tiga dimensi. Hal ini bertujuan memperkecil faktor coba-coba (*trial and error*) yang memerlukan biaya yang besar dan waktu yang lama. Pemodelan molekul secara *in silico* dapat digunakan untuk memprediksi nilai sifat kimia fisik, prediksi sifat farmakokinetika (absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi = ADME), prediksi toksisitas (LD50, hepatotoksitas, mutagenisitas, karsinogenisitas, dll), dan prediksi aktivitas senyawa (Siswandono, 2016; Wu *et al.*, 2020).

Docking merupakan prosedur komputasional yang menentukan pengikatan senyawa terhadap *active site* protein termasuk orientasi senyawa, konformasi senyawa dan *docking score* (nilai docking). Nilai docking dapat dinyatakan sebagai energi bebas, energi ikatan, maupun ukuran numerik kualitatif (Vu *et al.*, 2020). Nilai docking merupakan nilai kekuatan interaksi obat-reseptor yang dapat menginterpretasikan aktivitas biologis obat. Senyawa dengan nilai docking lebih rendah menunjukkan ikatan obat-reseptor lebih stabil (Siswandono, 2016).

Untuk menguji aktivitas apigenin dan turunannya secara *in silico* digunakan reseptor *enoyl acyl carrier protein reductase* (inhA) dari *Mycobacterium tuberculosis* (kode PDB: 2X23) yang mengandung ligan standar TCU [5-heksil-2-(2-metilfenoksi)fenol] (<https://www.rcsb.org>). Reseptor ini dipilih karena mengandung ligan standar yang mempunyai gugus farmakofor berupa cincin benzena dan gugus OH yang juga dimiliki turunan apigenin (Luckner *et al.*, 2010). Di antara turunan apigenin terdapat gugus donor ikatan hidrogen dan akseptor ikatan hidrogen yang akan mendukung interaksi senyawa dengan reseptor inhA. Sebagai pembanding digunakan INH obat antituberkulosis

yang sudah beredar dan memiliki mekanisme aksi menghambat inhA (Scior *et al.*, 2002; Marrakchi *et al.*, 2014). Prediksi nilai sifat farmakokinetik dan toksisitas ditentukan dengan menggunakan aplikasi pkCSM secara *on line* dan parameter LD₅₀ menggunakan ProTox-II *on line*. Prediksi aktivitas antituberkulosis dilakukan dengan doking molekul menggunakan program Autodock Vina. Hasil doking akan diperoleh nilai *energy of affinity* (Kkal/mol) yaitu kekuatan ikatan obat-reseptor yang dapat digunakan untuk memprediksi aktivitas biologis senyawa.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah senyawa apigenin dan sebelas turunannya mempunyai aktivitas antituberkulosis berdasarkan afinitasnya secara *in silico* terhadap *enoyl acyl carrier protein reductase* (inhA) dengan pembandingan ligan standar dan bentuk aktif isoniazid?
2. Apakah senyawa apigenin dan sebelas turunannya secara *in silico* mempunyai sifat farmakokinetik yang lebih baik dan toksisitas yang lebih rendah dibanding isoniazid?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Membuktikan bahwa senyawa apigenin dan sebelas turunannya mempunyai aktivitas antituberkulosis berdasarkan afinitasnya secara *in silico* terhadap *enoyl acyl carrier protein reductase* (inhA) dengan pembandingan ligan standar dan bentuk aktif isoniazid.
2. Membuktikan bahwa senyawa apigenin dan sebelas turunannya secara *in silico* mempunyai sifat farmakokinetik yang lebih baik dan toksisitas yang lebih rendah dibanding isoniazid.

1.4 Manfaat Penelitian

Memberikan informasi bahwa secara *in silico* apigenin dan sebelas senyawa turunannya diprediksi mempunyai efek antituberkulosis terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dengan cara menghambat reseptor *enoyl acyl carrier protein reductase* (inhA), sehingga dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai calon obat antituberkulosis setelah melalui uji-uji preklinik dan klinik.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang Tuberkulosis

Tuberkulosis (TB) disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Seseorang dengan infeksi TB dapat menularkan TB melalui udara dengan percik renek atau droplet nuclei, yaitu partikel berdiameter 1-5 μm yang dapat menampung 1-5 basilli, bersifat sangat infeksius, dan sapat bertahan di udara hingga 4 jam. Kecilnya ukuran percik renek menyebabkan kemudahan dalam mencapai alveolar paru-paru, tempat bakteri bereplikasi (Kemenkes, 2020). Tubuh akan merespon dengan mengeluarkan makrofag. Makrofag mengontrol MTB dengan cara membentuk lapisan pelindung. Saat makrofag mampu mengontrol MTB, maka terjadi TB Laten yaitu seseorang yang memiliki MTB dalam tubuhnya namun tidak mengalami gejala TB dan tidak berpotensi menularkan TB. Namun, jika makrofag tidak mampu mengontrol MTB, maka terjadi TB aktif. Sehingga, kondisi imun merupakan faktor utama terhadap perkembangan dari seseorang yang terinfeksi MTB menjadi penyakit TB aktif (CDC, 2021).

Pengobatan TB dilakukan melalui dua tahap, yaitu tahap intensif dan tahap lanjutan. Tahap intensif bertujuan untuk membunuh MTB aktif. Pada fase ini biasanya digunakan kombinasi dari Obat antituberkulosis (OAT) lini pertama yaitu isoniazid (INH), rifampin (RIF), etambutol (EMB), dan pirazinamid (PZA) selama 2 bulan (Kemenkes, 2020). Fase lanjutan bertujuan untuk membunuh MTB yang masih tersisa, fase ini dilakukan selama 4-7 bulan. Biasanya digunakan isoniazid (INH) dan rifampin (RIF) (CDC, 2021).

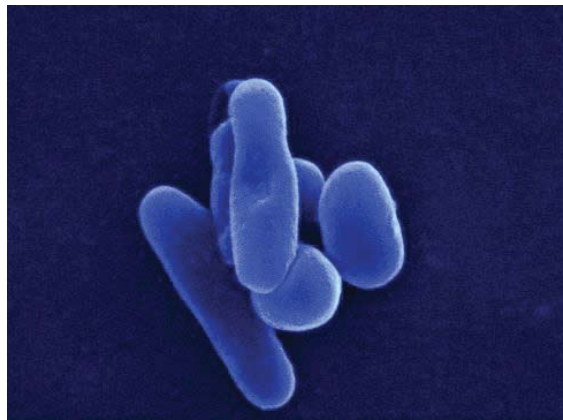
Jenis-jenis resistensi menurut WHO adalah resisten isoniazid, resisten rifampisin, MDR (*multidrug resistant*) yaitu resisten terhadap INH dan RIF dengan atau tanpa obat lini pertama lainnya, pre-XDR (*pre-extensively drug resistant*) yaitu TB MDR disertai dengan salah satu golongan florokuinolon atau salah satu OAT injeksi lini kedua, dan XDR (*extensively drug resistant*) yaitu TB MDR disertai dengan salah satu golongan florokuinolon dan salah satu OAT injeksi lini kedua (WHO, 2021).

2.2 Tinjauan tentang *Mycobacterium tuberculosis*

Mikobakteri pertama kali diisolasi oleh Hansen tahun 1874. Pada tahun 1882, Robert Koch mengembangkan MTB, kemudian dikonfirmasi lebih lanjut oleh Ziehl-Neelsen (1883) dan Ehrlich (1887). MTB memiliki bentuk basil dengan panjang 1-10 μm ,

biasanya 3-5 μm dan lebar 0,2-0,6 μm Ciri khas MTB adalah dinding sel yang kaya polisakarida dan lipid sehingga sukar untuk dilalui (*impermeable*) (Velayati and Farnia, 2012). Bakteri ini bersifat tahan asam sehingga sering dikenal dengan Basil Tahan Asam (BTA) (Kemenkes, 2020)

Dinding sel mikobakteri terdiri dari lapisan dalam dan lapisan luar. Lapisan luar terdiri dari protein dan lipid. Sedangkan lapisan dalam terdiri dari peptidoglikan (PG), arabinolaktan (AG), dan asam mikolat (MA) yang berikatan secara kovalen membentuk kompleks MA-AG-PG, dengan lapisan terluar adalah MA (Velayati and Farnia, 2012).



Gambar 2.1 Mycobacterium tuberculosis Pada Fase Eksponensial
(Velayati and Farnia, 2012)

2.2.1 Asam Mikolat

Asam mikolat adalah 2 alkil, 3 hidroksi rantai panjang asam lemak. Asam mikolat pada mikobakteri memiliki rantai karbon 60-90 yang diperoleh dari perpanjangan rantai asam lemak C22 -C24 dan pada spesies MTB, jumlah karbon asam lemak sebesar 26. Asam mikolat berperan penting dalam permeabilitas dinding sel. Dinding sel mikobakteri sangat sukar dilalui oleh molekul hidrofil termasuk antibiotika dan nutrien. Hal ini disebabkan oleh jumlah asam mikolat yang tinggi sehingga dinding bersifat sangat hidrofobik (Marrakchi *et al.*, 2014).

Proses pembentukan asam mikolat melibatkan asam lemak melalui dua proses sintesis (*fatty acid synthase* = FAS), yaitu FAS I dan FAS II dilanjutkan dengan proses kondensasi Claisen. Hasil dari FAS I adalah karboksiasil-CoA (rantai α) dan FAS II

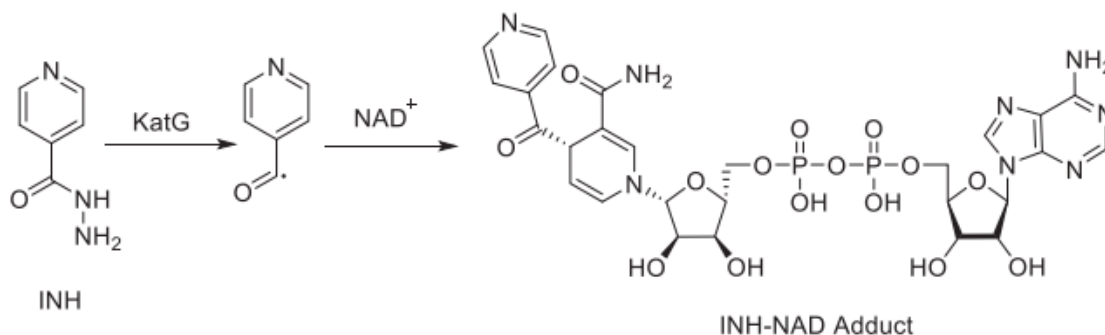
adalah rantai meromikolat. Hasil dari kedua proses ini akan mengalami kondensasi Claisen menjadi asam mikolat (Marrakchi *et al.*, 2014).

2.2.2 *Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (inhA)*

Enoyl acyl carrier protein reductase atau yang biasa dikenal dengan inhA termasuk golongan short-chain *dehydrogenases/reductases* (SDR), yang mereduksi ikatan rangkap *enoyl intermediate* pada *fatty acid synthase* (FAS) II. FAS II merupakan proses perpanjangan asam lemak dari FAS I pada pembentukan asam mikolat, komponen dinding sel MTB. InhA bekerja pada FAS II yang tidak dimiliki pada manusia, sehingga dapat menjadi target untuk pengobatan MTB (Zitko *et al.*, 2016; Rozman *et al.*, 2017). Hambatan pada inhA menyebabkan hambatan pada biosintesis asam mikolat dan akumulasi dari rantai panjang asam lemak. Sehingga konsistensi dinding sel terganggu dan menyebabkan kematian sel (Marrakchi *et al.*, 2014)

2.3 Tinjauan tentang Isoniazid

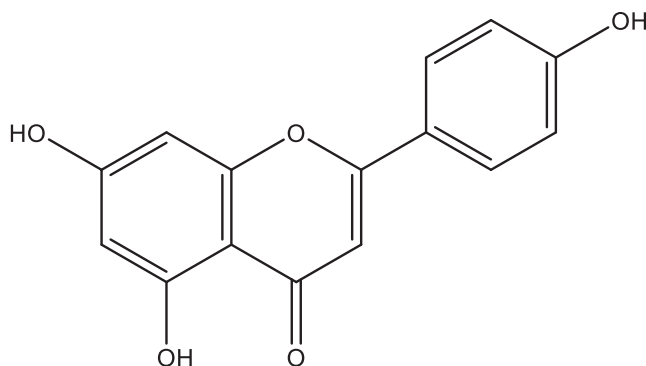
Isoniazid (INH) dikenal sebagai antituberkulosis sejak tahun 1952. Telah banyak dilakukan sintesis terhadap turunan isoniazid, namun tidak ada yang memiliki aktivitas lebih tinggi (Irianti dkk, 2016). Isoniazid adalah obat yang paling aktif untuk TB yang disebabkan oleh susceptible strain, dan kurang efektif untuk bakteri non-MTB. Secara *in vitro* terbukti menghambat sebagian besar MTB dengan konsentrasi < 0,2 µg/ml dan membunuh MTB aktif. Isoniazid bekerja dengan menghambat sintesis asam mikolat yang berperan pada proses pembentukan dinding sel mikobakterium (Beauduy and Winston, 2018). Isoniazid merupakan prodrug yang diaktifkan oleh *mycobacterial catalase-peroxidase* (KatG). Bentuk aktif isoniazid akan berinteraksi dengan *enoyl acyl carrier protein reductase* (inhA) (gambar 2.1) (Scior *et al.*, 2002; Hoagland *et al.*, 2016).



Gambar 2.2 Proses Pengaktifan Isoniazid

Mekanisme resistensi terhadap isoniazid dapat terjadi melalui beberapa gen, yaitu KatG, inhA, ahpC, kasA, dan ndh. Mutasi KatG dan inhA merupakan penyebab resistensi paling sering. Mutasi pada KatG menyebabkan penurunan aktivasi INH sehingga kadar INH aktif dalam tubuh rendah dan aktivitas sebagai antituberkulosis tidak tercapai. Mutasi pada inhA menyebabkan penghambatan biosintesis asam mikolat tidak terjadi (Iriani dkk, 2016).

2.4 Tinjauan tentang Apigenin



Gambar 2.3 Struktur Apigenin (4',5,7-Trihidroksi-Flavon)

Apigenin merupakan flavonoid subkelompok flavon dengan substitusi gugus hidroksi pada posisi 4', 5, dan 7. Apigenin banyak tersebar dalam berbagai tanaman, antara lain: jeruk, bawang putih, biji seledri, dan bayam. Banyak penelitian dilakukan terkait manfaatnya, antara lain: antitumor, hipotensi, hipoglikemi, anti inflamasi, dan antibakteri (Zhou *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2019). Aktivitas apigenin sebagai antibakteri telah banyak diteliti, antara lain: nilai KHM apigenin terhadap bakteri *Acinetobacter baumannii* RSKK 02026 sebesar 2 µg/ml, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 sebesar 8 µg/ml, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 sebesar 64 µg/ml, *Enterobacter cloacae* ATCC 10699 sebesar 64 µg/ml, dan *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 sebesar 8 µg/ml (Wang *et al.*, 2019). Selain itu, berdasarkan uji in vitro apigenin juga menunjukkan Aktivitas antituberkulosis terhadap MTB H37Rv ditunjukkan dengan nilai KHM sebesar 70 µg/ml (Chen *et al.*, 2010), sedang terhadap *M. Smegmatis* ATCC 14468 nilai IC₉₇ sebesar 250 µg/ml (Salih *et al.*, 2020).

2.5 Tinjauan tentang Sifat Kimia Fisik

Sifat kimia fisik mempengaruhi aktivitas biologis. Parameter kimia fisik dibagi menjadi tiga, yaitu: lipofilik, elektronik, dan sterik. Parameter elektronik dan sterik

merupakan parameter yang berkaitan dengan keserasian ikatan obat-reseptor. Sedangkan parameter lipofilik berkaitan dengan kemampuan penembusan membran (Siswandono, 2016)

Tinjauan terkait *drug-likeness properties* dilakukan oleh Lipinski *et al.* (1997) dengan menganalisis 2.245 obat dari data dasar world drug index dan menyimpulkan bahwa senyawa akan sulit diabsorpsi dan permeabilitasnya rendah apabila memiliki berat molekul lebih besar dari 500; nilai log koefisien partisi oktanol/air (logP) lebih besar +5; ikatan H donor, yang dinyatakan dengan jumlah gugus O-H dan N-H, lebih besar dari 5; dan ikatan H aseptor, yang dinyatakan dengan jumlah atom O dan N, lebih besar dari 10. Ghose *et al.* (1999) memodifikasi dan melengkapi analisis Lipinski *et al.* (1997) dengan memberikan rentang yang lebih baik. Rentang LogP adalah 1,3-4,1; rentang berat molekul adalah 230-390; rentang molar refractivity adalah 70-110; dan rentang jumlah atom adalah 30-55.

Oprea *et al.* (2001) melakukan analisis sifat kimia fisik dari data dasar obat dan menemukan bahwa 70 obat memiliki rentang jumlah ikatan H donor: 0-2; rentang jumlah ikatan H aseptor: 2-9; rentang jumlah ikatan yang dapat berputar (torsion): 2-8; dan rentang jumlah cincin: 1-4. Veber *et al.* (2002) menyatakan bahwa faktor lain yang mempengaruhi bioavailabilitas oral suatu senyawa adalah luas permukaan polar (polar surface area= PSA). Senyawa akan aktif pada pemberian secara oral apabila nilai $PSA < 140 \text{ \AA}$; total ikatan H-donor dan H aseptor < 12 ; dan ikatan yang berotasi bebas (torsion) < 10 .

2.6 Tinjauan tentang Studi *in silico*

Istilah *in silico* memiliki makna “bantuan komputer”. Istilah ini digunakan sebagai perumpamaan *in vivo* dan *in vitro*. Sehingga dapat diartikan sebagai percobaan menggunakan komputer yang berhubungan dengan *in vivo* dan *in vitro* (Ekins *et al.*, 2007; Vu *et al.*, 2015). Studi *in silico* didesain menyerupai kondisi aslinya tanpa menggunakan organisme coba dan dapat dikontrol secara mendetail. Studi ini dapat menjadi solusi untuk menjawab permasalahan yang sukar diatasi (Colquitt *et al.*, 2011). Informasi yang diperoleh dapat digunakan untuk membuat prediksi serta hipotesis yang berguna untuk penemuan dan kemajuan dalam bidang terapi dan pengobatan (Ekins *et al.*, 2007). Pengembangan obat secara *in silico* dapat menurunkan biaya hingga \$ 140 juta dan waktu hingga 0,9 tahun yang dibutuhkan untuk tiap obat (Seifert *et al.*, 2003). Berbagai metode *in silico* telah dikembangkan diantaranya adalah doking molekul dan prediksi ADMET (Ekins *et al.*, 2007)

2.6.1 Doking molekul

Doking molekul adalah metode yang mengharapkan orientasi ikatan ligan dengan reseptor (protein) yang paling disukai untuk membentuk ikatan yang stabil. Kekuatan ikatan dalam doking biasanya dinyatakan dalam nilai doking (*docking score*). Doking untuk kandidat obat dapat digunakan memprediksi kekuatan ikatan dan aktivitas obat (Chaudhary and Mishra, 2016). Langkah-langkah melakukan doking adalah melakukan sampling konformasi ligan pada sisi aktif protein dan melakukan ranking dari konformasi dengan scoring. Terdapat berbagai metode sampling diantaranya adalah metode Monte Carlo (MC), yaitu pose ligan dihasilkan melalui rotasi ikatan, translasi rigid-body atau rotasi, digunakan pada AutoDock versi lama; dan Genetic Algorithms (GA), yaitu pose ligan diwakili oleh derajat kebebasan ligan yang dikodekan sebagai string biner (*binary strings*), digunakan pada AutoDock. *Scoring* digunakan untuk menggambarkan pose yang benar dari pose yang salah maupun ikatan dari senyawa tidak aktif pada jangka waktu yang wajar. *Scoring function* dapat dibedakan menjadi scoring berbasis medan kekuatan (*force-field*), empiris (*empirical*), dan pengetahuan (*knowledge*). Scoring berbasis medan kekuatan klasik diperoleh dari interaksi energi non ikatan. Scoring berbasis empiris diperoleh dari perhitungan terhadap energi ikatan yang terdiri dari beberapa komponen, seperti: ikatan hidrogen, interaksi ionik, efek hidrofobik dan entropi. Dan scoring berbasis pengetahuan diperoleh dari analisis secara statistik frekuensi kontak interatom dan atau jarak antara ligan dan protein pada kompleks ligan-protein (Meng *et al.*, 2011).

2.6.2 Prediksi ADMET (absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, dan toksisitas)

Proses awal suatu xenobiotik (senyawa asing, termasuk obat) masuk ke tubuh organisme adalah absorpsi. Terdapat berbagai jalur absorpsi dalam tubuh, diantaranya adalah melalui saluran cerna, inhalasi, dan kulit. Setelah senyawa diabsorpsi dan masuk dalam sistem sirkulasi, senyawa akan disebarkan dalam seluruh tubuh, fase ini disebut dengan distribusi. Pada fase ini, obat akan diantarkan menuju sisi kerja (*site of action*). Selanjutnya senyawa akan mengalami metabolisme, yaitu proses konversi suatu xenobiotik menjadi kurang toksik dan lebih polar sehingga dapat diekskresikan. Meskipun demikian, pada beberapa kondisi, proses metabolisme dapat menyebabkan

suatu senyawa inaktif menjadi aktif (*prodrug*) atau menjadi lebih toksik. Kemudian senyawa akan dikeluarkan dari tubuh, fase ini disebut dengan ekskresi. Senyawa akan mengalami ekskresi melalui renal (sebagian besar), feses, keringat, dll (Madden, 2010).

Obat yang efektif dan aman didapatkan dari obat dengan sifat farmakodinamik dan farmakokinetik yang baik, termasuk potensi yang tinggi, afinitas dan selektivitas terhadap target molekul bersama dengan absorpsi, distribusi, metabolisme dan ekskresi yang memadai serta toksistas yang dapat ditoleransi (Ferreira and Andricopulo, 2019). Senyawa dengan sifat farmakokinetik yang tidak diharapkan menjadi salah satu penyebab lambatnya proses pengembangan obat sehingga perlu dilakukan prediksi ADMET (Chandrasekaran *et al.*, 2018)

Telah banyak prediksi sifat farmakokinetik dan toksisitas berdasarkan struktur kimia secara *in silico*. Salah satunya adalah aplikasi pkCSM secara on line. pkCSM merupakan prediksi farmakokinetik berbasis grafik dan mengadaptasi konsep cutoff scanning untuk mewakili struktur molekul kecil. dalam pkCSM terdapat total 30 prediktor dengan uraian sebagai berikut: 7 prediktor absorpsi, 4 prediktor distribusi, 7 prediktor metabolisme, 2 prediktor ekskresi dan 10 prediktor toksisitas (Pires *et al.*, 2015).

Salah satu aplikasi untuk memprediksi toksisitas berdasarkan struktur kimia adalah ProTox-II. Terdapat lima klasifikasi uji, yaitu toksisitas akut oral beserta tingkat toksisitasnya; toksisitas organ berupa hepatotoksitas; tokssikologi *endpoints*, meliputi: karsinogenisitas, mutagenisitas, sitotoksitas, dan imunotoksitas; target toksisitas dan jalur toksikologi (Benerjee *et al.*, 2018).

Parameter absorpsi pada aplikasi pkCSM meliputi permeabilitas caco-2, absorpsi usus (manusia), kelarutan dalam air, substrat dan penghambat p-glikoprotein, serta permeabilitas kulit. Permeabilitas caco-2: prediksi absorpsi pada mukosa intestinal dari obat rute oral. Prediksi dinyatakan dalam logaritma koefisien permeabilitas yang tampak ($\log p_{app}$; $\log \text{cm/s}$). Senyawa diprediksi memiliki permeabilitas caco-2 yang tinggi jika memiliki nilai $> 0,90$ ($p_{app} > 8 \times 10^{-6}$). Absorpsi usus (manusia): prediksi proporsi senyawa yang diabsorpsi melalui usus. Prediksi dinyatakan dalam persen, senyawa dengan absorpsi usus yang buruk berada pada nilai $< 30\%$ (Pires *et al.*, 2015).

Parameter distribusi pada aplikasi pkCSM meliputi VDss (manusia), permeabilitas BBB, fraksi tidak terikat (manusia), dan permeabilitas SSP. VDss: prediksi volume distribusi pada kondisi tunak, nilai VDss yang tinggi menunjukkan

senyawa banyak terdistribusi di jaringan. Prediksi dinyatakan dalam log VDss, senyawa dengan nilai log VDss < -0,15 (0,71 L/kg) menunjukkan senyawa memiliki VDss yang rendah dan senyawa dengan nilai log VDss > 0,45 (2,81 L/kg) menunjukkan senyawa memiliki VDss yang tinggi. Permeabilitas BBB (sawar darah otak): prediksi kemampuan senyawa untuk melewati BBB. Nilai permeabilitas BBB dinyatakan dalam logBB, senyawa dengan nilai logBB < -1 menunjukkan senyawa sukar terdistribusi ke otak dan senyawa dengan nilai logBB > 0,3 menunjukkan senyawa dapat terdistribusi ke otak (Pires et al., 2015).

Parameter metabolisme pada aplikasi pkCSM meliputi penghambat CYP450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4) dan substrat CYP2D6/CYP3A4. Penghambat CYP450: prediksi senyawa penghambat CYP450, yaitu enzim detoksifikasi dalam tubuh. Senyawa diprediksi sebagai penghambat CYP450 jika konsentrasi yang dibutuhkan untuk menimbulkan 50% hambatan adalah kurang dari 10 μ m. Substrat CYP2D6/CYP3A4: dua isoform utama CYP450 yang bertanggung jawab untuk metabolisme (Pires et al., 2015).

Parameter ekskresi pada aplikasi pkCSM meliputi substrat OCT2 ginjal dan kirens total. Substrat Organic Cation Transporter-2 (OCT2) ginjal: transporter pada ginjal yang berperan dalam disposisi dan klirens ginjal dari senyawa endogen dan obat. Klirens total: total klirens hati (metabolisme hati dan klirens biier) dan klirens ginjal (ekskresi ginjal), prediksi dinyatakan dalam log (ml/min/kg) (Pires et al., 2015).

Parameter toksisitas pada aplikasi pkCSM meliputi rat LD₅₀, toksisitas T. Pyriformis, toksisitas AMES, toksisitas minnow, dosis toleransi maksimum (manusia), penghambat hERG I dan II, hepatotoksitas, toksisitas oral kronis rat, dan sensitisasi kulit. Toksisitas AMES: uji untuk mengetahui potensi senyawa mutagenik menggunakan bakteri. Hasil positif menunjukkan senyawa mutagenik sehingga dapat bertindak sebagai karsinogen. Hepatotoksitas: senyawa yang dapat menyebabkan fungsi normal hati terganggu (Pires *et al.*, 2015). Toksisitas oral akut pada ProTox-II ditunjukkan dengan nilai LD₅₀ tikus yaitu jumlah senyawa yang menyebabkan 50% kematian kelompok hewan uji (tikus) dengan sekali paparan atau maksimal dalam 24 jam (Benerjee *et al.*, 2018).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konseptual

Kejadian resistensi telah terjadi hampir semua obat antituberkulosis (Boniface and Ferreira, 2020). Pada penelitian yang dilakukan Cao *et al.* (2019) di rumah sakit Zunyi, Guizhou China diperoleh persentase resistensi dari 318 pasien terhadap rifampisin, isoniazid, dan etambutol berturut turut adalah 40,6%; 53,5%; dan 20,8%. Selain itu, juga dilaporkan oleh Pourakbari *et al.* (2016) isoniazid memiliki rata-rata prevalansi resistensi tertinggi di Teheran, Iran. Dengan demikian perlu adanya senyawa baru yang berpotensi sebagai antituberkulosis.

Senyawa-senyawa baru dapat berasal dari tanaman, jamur, bakteri, marine, sintesis, dll (Katiyar *et al.*, 2012). Akhir-akhir ini, flavonoid yang merupakan metabolit sekunder, menjadi senyawa yang banyak diteliti sebagai antituberkulosis. Lebih dari 100 flavonoid telah dilakukan uji aktivitas antituberkulosis (Boniface and Ferreira, 2020). Salah satu senyawa flavonoid yang telah dilakukan uji daya hambatnya terhadap *Mycobacterium tuberculosis* adalah apigenin. Berdasarkan penelitian Chen *et al.* (2010), apigenin menunjukkan konsentrasi hambat minimum (KHM) sebesar 70 µg/ml terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

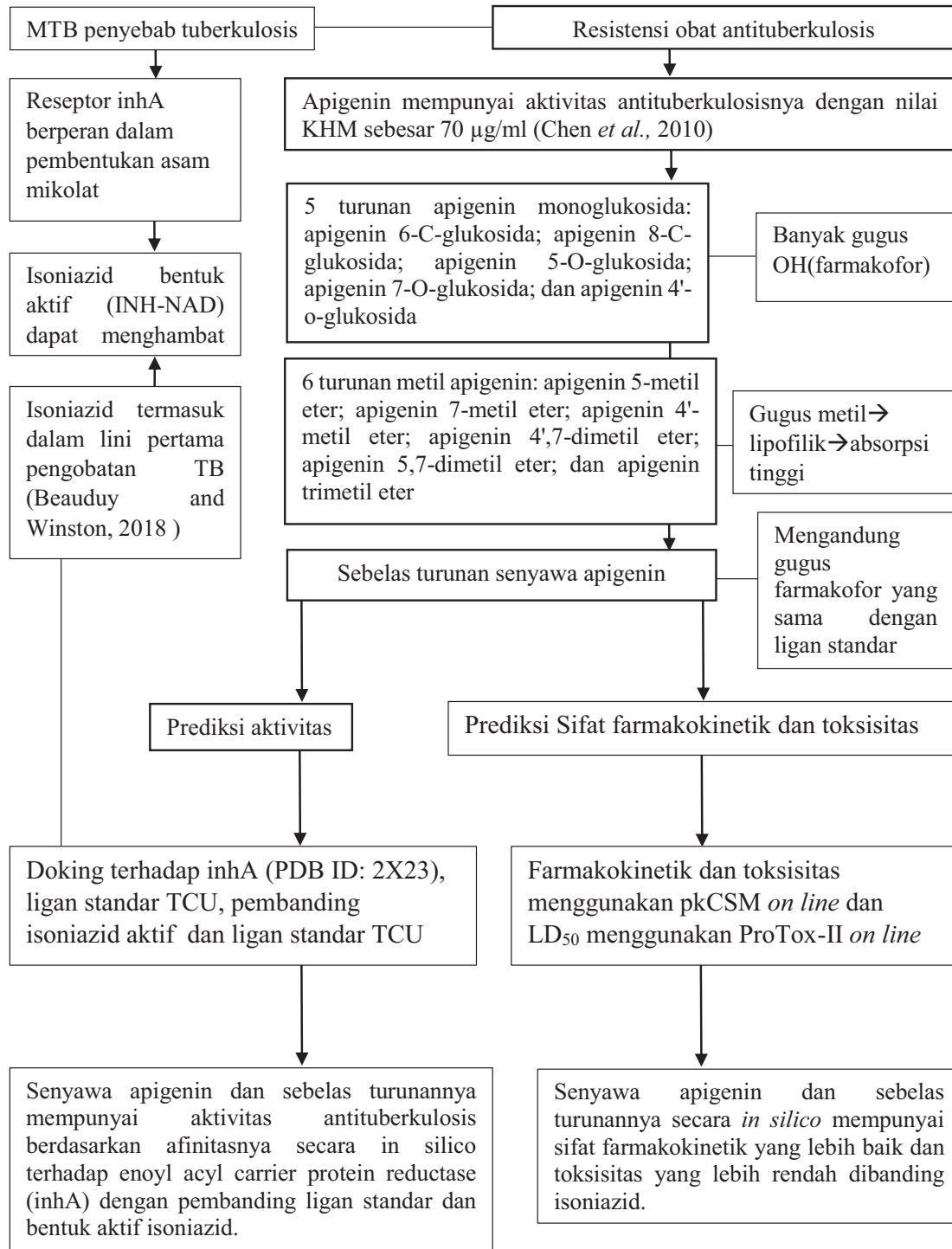
Isoniazid dan rifampisin merupakan obat antituberkulosis yang paling aktif. Isoniazid yang mempunyai mekanisme aksi melalui penghambatan sintesis asam mikolat yang berperan pada proses pembentukan dinding sel mikobakterium (Beauduy and Winston, 2018). Bentuk aktif isoniazid berikatan dengan dengan *enoyl acyl carrier protein reductase* (inhA), enzim yang terlibat dalam proses perpanjangan asam lemak dan asam mikolat yang dibutuhkan untuk pembentukan dinding sel mikobakteri, hambatan enzim akan menyebabkan mikobakteri mengalami kematian (Nguyen, 2002; Hoagland *et al.*, 2016).

Pada ligan standar terdapat cincin benzena dan OH (Luckner *et al.*, 2010). Apigenin dan turunannya juga memiliki gugus yang sama sehingga diduga dapat berinteraksi reseptor yang sama. Pemilihan turunan apigenin diperoleh melalui laman PubChem berdasarkan substitusi gugus metil pada gugus hidroksil apigenin diperoleh enam turunan senyawa, yaitu: apigenin 5-metil eter; apigenin 7-metil eter; apigenin 4'-metil eter; apigenin 4',7-dimetil eter; apigenin 5,7-dimetil eter; dan apigenin trimetil eter. Apigenin tersubstitusi

metil dipilih karena metil bersifat lipofilik sehingga diprediksi dapat terabsorpsi dengan mudah. Dan substitusi glukosida diperoleh lima senyawa, yaitu: apigenin 6-C-glukosida; apigenin 8-C-glukosida; apigenin 5-O-glukosida; apigenin 7-O-glukosida; dan apigenin 4'-O-glukosida. Apigenin glukosida dipilih karena banyak mengandung gugus OH, yaitu farmakofor senyawa penghambat inhA. Dari pemilihan tersebut diperoleh 11 senyawa turunan apigenin yang akan diteliti secara *in silico*.

Dilakukan studi *in silico* untuk memprediksi sifat kimia fisik untuk *drug likeness properties*, aktivitas, dan sifat farmakokinetik serta toksisitasnya. Prediksi sifat kimia fisik untuk *drug likeness properties* ditentukan menggunakan Chem Office. Prediksi sifat farmakokinetik dan toksisitas ditentukan dengan menggunakan aplikasi pkCSM secara *on line*. Prediksi parameter LD₅₀ ditentukan dengan menggunakan aplikasi ProTox-II secara *on line*. Prediksi aktivitas antituberkulosis dilakukan dengan doking molekul menggunakan program Autodock Vina. Dari hasil doking akan diperoleh nilai *energy of affinity* (kkal/mol) yaitu kekuatan ikatan obat-reseptor. Senyawa dengan nilai *energy of affinity* lebih rendah menunjukkan ikatan obat-reseptor lebih stabil dan hal ini dapat digunakan untuk memprediksi aktivitas biologis senyawa.

3.2 Skema Kerangka Konseptual



3.3 Hipotesis

1. Senyawa apigenin dan sebelas turunannya mempunyai aktivitas antituberkulosis berdasarkan afinitasnya secara *in silico* terhadap *enoyl acyl carrier protein reductase* (inhA) dengan pembanding ligan standar dan bentuk aktif isoniazid.
2. Senyawa apigenin dan sebelas turunannya secara *in silico* mempunyai sifat farmakokinetik yang lebih baik dan toksisitas yang lebih rendah dibanding isoniazid.