

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) merupakan satu dari 10 penyebab penyakit menular yang mematikan di dunia. Pada tahun 2019 tercatat hampir 1,4 juta kematian akibat tuberkulosis. Menurut data yang dilaporkan pada tahun 2015 – 2019 terjadi peningkatan hingga 1,1 juta orang dengan kasus tuberkulosis baru. Sebanyak 42 negara dilaporkan bahwa jumlah orang dengan kasus tuberkulosis meningkat hingga 10%. Negara dengan jumlah kasus kategori tinggi pada tahun 2020 yaitu India dan Indonesia, masing-masing sebesar 513.000 orang dan 120.000 orang (World Health Organization, 2020).

Tuberkulosis adalah penyakit yang disebabkan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Infeksi dari bakteri ini termasuk sulit disembuhkan karena dinding sel bakteri *M. tuberculosis* yang tidak mudah ditembus obat karena adanya dinding sel dengan kandungan asam mikolat yang rapat. Sel bakteri juga lambat dalam berkembang dan dapat menjadi *dormant*. Perkembangan sel-sel *M. tuberculosis* tergantung dari kecepatan membelah sel-selnya. Karakteristik ini menyebabkan bakteri ini sulit disembuhkan dan mudah menimbulkan resistensi terhadap obat (Katzung, 2017).

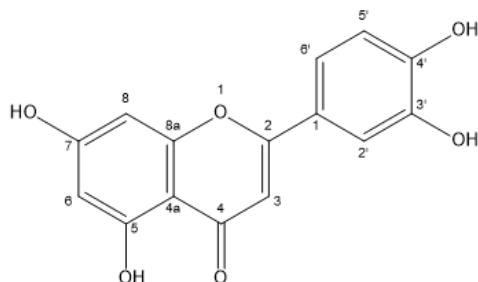
Sampai saat ini, penyakit TB diobati dengan antibiotik. Rifampisin (RIF), isoniazid (INH), etambutol (EMB), streptomisin, dan pirazinamid (PZA) telah digunakan selama bertahun-tahun sebagai obat antituberkulosis. Namun, banyak pasien telah mengalami resistensi terhadap obat lini pertama ini. Sejak tahun 1980, kasus TB di seluruh dunia meningkat akibat munculnya MDR-TB (*Multidrug-resistant TB*). Strain *Mycobacterium tuberculosis* adalah bakteri yang menyebabkan MDR-TB yang resisten terhadap obat anti-TB *first-line* seperti isoniazid dan rifampisin. (Shui Ngy, Z.K. ed., 2009).

Isoniazid merupakan prodrug dengan struktur sederhana terdiri dari cincin piridin dan group hidrazid yang merupakan komponen penting untuk melawan *Mycobacterium tuberculosis* (da Silva & Palomino, 2011). Isoniazid memiliki mekanisme kerja dengan target utama *NADH-dependent enoyl-acyl carrier protein reductase* (*inhA*). Protein ini merupakan enzim kunci dalam sintesis asam mikolat untuk integritas dinding sel mikobakteria. Kekurangan biosintesis asam mikolat akan menghilangkan integritas seluler sehingga bakteri akan mati (Barry *et al.*, 1998). Oleh karena itu, dipilih untuk menargetkan enzim, *InhA* yang terlibat dalam sintesis asam mikolat.

Isoniazid akan diaktivasi oleh enzim katalase peroksidase (KatG). Spesies aktif Isoniazid adalah radikal *isonicotinic acyl* yang selanjutnya membentuk senyawa konjugat dengan radikal NAD. Senyawa konjugat yang terbentuk adalah isonicotinic acyl NADH merupakan bentuk aktif isoniazid. Struktur kristal yang terbentuk dari InhA *Mycobacterium tuberculosis* dan senyawa konjugat *Isonicotinic acyl*-NADH (INA) mengindikasikan bahwa dapat bersaing secara kompetitif dengan NADH untuk berikatan pada InhA (Ma *et al.*, 2006). *Enoyl acyl carrier protein reductase* (inhA) berperan pada perpanjangan asam lemak pada *fatty acid synthase* (FAS) II. Hambatan perpanjangan rantai asam lemak diperlukan pada proses pembentukan asam mikolat (Marrakchi *et al.*, 2014). Aktivitas antituberkulosis isoniazid terhadap *M.tuberculosis* mempunyai konsentrasi penghambatan minimal (KHM) yaitu sebesar 0,2 µg/mL (Almeida *et al.*, 2007).

Untuk mengatasi resistensi obat antituberkulosis perlu dilakukan upaya mencari senyawa baru yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *M.tuberculosis*, antara lain dengan melakukan penapisan senyawa yang berasal dari alam. Flavonoid merupakan salah senyawa alami yang memiliki berbagai khasiat dalam pengobatan salah satunya sebagai antibakteri. Dalam beberapa tahun terakhir penggunaan senyawa alam banyak digunakan sebagai pengembangan obat baru. Flavonoid merupakan senyawa polifenol dimana sebagai antibakteri memiliki beberapa target seluler. Salah satu aktivitas molekulernya membentuk kompleks dengan protein melalui ikatan hidrogen dan efek hidrofobik, atau pembentukan ikatan kovalen (Kumar & Pandey, 2013). Flavonoid dapat bekerja dengan menghasilkan penghambat enzim fatty acid synthase II (FAS II) yang berguna dalam pembentukan asam mikolat (Bueno-Sánchez *et al.*, 2009). Beberapa tanaman telah diuji memiliki aktivitas sebagai anti-TB antara lain *Syzygium aromaticum*, *Berchemia discolor*, *Warbugia salutaris*, *Carica papaya*, *Origanum minutiflorum*, *Annona sylvatic* (Aprillia & Tjitraresmi, 2018).

Salah satu flavonoid yang memiliki aktivitas sebagai antituberkulosis dari tanaman *Annona sylvatica* adalah luteolin (Araujo *et al.*, 2014)



Gambar 1. 1 Struktur Luteolin

Penelitian (Araujo *et al.*, 2014), menyebutkan bahwa senyawa luteolin mempunyai aktivitas terhadap *M. tuberculosis* dengan KHM sebesar 236,8 $\mu\text{g/mL}$ dari tanaman *Annona sylvatic*. Pada penelitian yang lain diketahui bahwa penggunaan luteolin dosis 5 mg/kg BB pada mencit yang terinfeksi *M. tuberculosis* dapat menyebabkan pengurangan bakteri *M. tuberculosis* hingga nilai Log CFU 0,6-0,73, dapat menyebabkan peningkatan kecepatan penyembuhan dibandingkan dengan pengobatan isoniazid pada mencit (Singh *et al.*, 2021). Sampel dengan nilai MIC < 250 $\mu\text{g/mL}$ didefinisikan dapat aktif melawan *M. tuberculosis*, dan analisis lebih lanjut dapat diterapkan (Gu *et al.*, 2004).

Luteolin secara *in vitro* memiliki KHM yang cukup tinggi, oleh karena itu dengan modifikasi struktur terhadap luteolin diharapkan turunannya memiliki aktivitas yang lebih poten dibanding dengan obat pembanding. Sehingga diprediksi berpotensi memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *M. tuberculosis*. Dari mekanisme aksi obat isoniazid dengan target utama inhA, enzim NADH *dependent enoyl-acyl carrier protein* (ACP)-reductase yang terkait dengan sintesis asam lemak rantai panjang (asam mikolat) dan fase reduksi produksi asam lemak. Mutasi inhA memfasilitasi resistensi terhadap beberapa obat lini pertama seperti isoniazid, menjadikannya target yang tepat untuk penemuan obat. Luteolin yang mengandung gugus-gugus hidroksil dapat membentuk ikatan hidrogen dengan inhA, semakin banyak ikatan hidrogen yang terbentuk antara ligan-reseptor, maka semakin rendah nilai ikatan afinitasnya.

Oleh karena itu, perlu dibuktikan interaksi antara turunan luteolin dengan inhA secara *in silico* menggunakan docking molekul. Senyawa luteolin dan turunannya yang diteliti terbagi menjadi 3 kelompok yaitu: a. Senyawa yang terbukti memiliki aktivitas sebagai anti bakteri, luteolin, luteolin 8-C-glukosida, dan luteolin-6-C-glukosida (Karpinski *et al.*, 2020); b. Senyawa glukosida luteolin yaitu, luteolin-8-C- β -digitoxopiranosida, luteolin-8-C- β -boivinopiranosida, luteolin 8-C- β -digitoxopiranosil-

4'-O- β -D-glukopiranosida, luteolin-6-C-khinovosida, dan luteolin-6-C-fucosida; c. senyawa luteolin dengan substitusi gugus metil pada -OH luteolin yaitu luteolin 3'-metil eter, luteolin 4'-metil eter, luteolin 5'-metil eter, luteolin tetrametil eter, luteolin 3',4'-dimetil eter, dan luteolin 5,3'-dimetil eter (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Docking molekul dilakukan menggunakan program komputer AutoDockVina 1_1_2 terhadap *enoyl-acyl carrier protein reductase* (inhA) (PDB ID: 2X23) (<https://www.rcsb.org/search>). 2X23 merupakan kode *protein data bank* (PDB) untuk struktur kristal inhA mengandung *native ligand 5-Hexyl-2-(2-Metilphenoxy) Phenol* dengan kode PDB TCU. Reseptor ini dipilih karena mengandung *native ligand* yang mempunyai gugus farmakofor seperti yang ada pada turunan luteolin. Sebagai pembanding lainnya digunakan Isoniazid, yaitu obat antituberkulosis yang sudah beredar dan memiliki mekanisme aksi menghambat inhA.

Docking molekul adalah prosedur komputasional untuk mempelajari interaksi antara molekul obat sebagai ligan dengan reseptor dan memprediksi energi interaksinya. Kegunaan prosedur ini untuk memprediksi afinitas ikatan ligan-reseptor berdasarkan skor docking, yaitu nilai energi bebas interaksi ligan-reseptor. Semakin rendah nilai energi bebas, maka semakin stabil interaksi antara ligan dengan reseptor dan semakin besar aktivitas senyawa. Apabila dalam uji *in silico* senyawa terbukti dapat berinteraksi, maka dapat digunakan uji *in vitro* dan *in vivo*, sehingga dapat meminimalisir factor trial and error yang akan memakan waktu, energi, serta biaya yang dibutuhkan (Siswandono ed., 2016). Pada penelitian ini digunakan program AutoDockVina 1_1_2 yang dapat menghasilkan nilai energi afinitas ligan-reseptor (Kcal/mol). Semakin rendah nilai afinitas, maka interaksi antara ligan dengan reseptor semakin stabil dan diprediksi memiliki aktivitas biologis yang lebih besar.

Selain memiliki aktivitas tinggi terhadap reseptor, senyawa obat juga harus memiliki sifat farmakokinetika, dan toksisitas yang memenuhi syarat (Siswandono ed., 2016). Oleh karena itu, senyawa yang potensial berdasarkan interaksinya dengan inhA perlu diprediksi sifat farmakokinetika ADME (absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi), dan toksisitasnya memenuhi syarat. Untuk pertimbangan sifat farmakokinetik dan toksisitas (ADMET) dapat digunakan metode berbasis komputer seperti pkCSM *on line*. Persyaratan parameter pkCSM yang digunakan untuk memprediksi sifat absorpsi terdiri dari permeabilitas Caco2 ($P_{app} > 8 \times 10^{-6}$ cm/s ($>0,90$)) dan persentase (%) absorpsi intestinal manusia ($>30\%$ terabsorpsi). Distribusi terdiri dari volume distribusi (VDss) manusia ($\log VD_{ss} > 0,45$) dan permeabilitas *blood brain barrier* ($\log BB > 0,3$).

Metabolisme terdiri dari terjadi substrat dan inhibitor pada sitokrom CYP450. Ekskresi terdiri dari hasil dapat menghambat substrat OCT2 (ginjal) dan klirens total. Sifat toksisitas terdiri dari nilai rat LD50, AMES toksisitas dan hepatotoksik memprediksi bahwa senyawa tidak toksik. Senyawa turunan luteolin yang diduga dapat menghambat inhA juga harus memiliki sifat ADMET yang memenuhi syarat berdasarkan pkCSM *on line* agar dapat berpotensi sebagai antibakteri *M.tuberculosis* dalam tubuh.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah senyawa luteolin dan turunannya mempunyai aktivitas antituberkulosis berdasarkan afinitas hambatannya secara *in silico* terhadap inhA dengan pembanding *native ligand* dan isoniazid?
2. Apakah senyawa luteolin dan turunannya mempunyai profil ADMET sesuai persyaratan berdasarkan pkCSM *on line*?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Memprediksi aktivitas antituberkulosis senyawa luteolin dan turunannya mempunyai aktivitas antituberkulosis berdasarkan afinitas hambatannya secara *in silico* terhadap inhA dengan pembanding *native ligand* dan isoniazid.
2. Memprediksi profil ADMET senyawa luteolin dan turunannya berdasarkan pkCSM *on line*.

1.4 Manfaat Penelitian

Di bidang keilmuan kimia medisinal, hasil penelitian dapat menjadi dasar modifikasi struktur turunan luteolin untuk mendapatkan aktifitas yang lebih baik dengan profil farmakokinetik (absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi) dan toksisitas. Dari penelitian ini akan diperoleh informasi bahwa hambatan luteolin dan turunannya terhadap inhA, dapat digunakan sebagai dasar aktivitas antituberkulosis turunan luteolin