

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Melanin adalah pigmen yang hadir secara alami dan memberi warna pada kulit, rambut, dan pupil manusia. Melanin umumnya terdiri dari dua jenis polimer kuinon yaitu eumelanin dan feomelanin. Dalam keadaan normal melanin berfungsi untuk melindungi organisme dari radiasi sinar matahari dengan mengabsorpsi sinar ultraviolet dengan panjang gelombang 320 hingga 400 nm (Feng *et al.*, 2022; Zolghadri *et al.*, 2023). Namun paparan sinar matahari yang berkepanjangan dapat memicu produksi melanin yang berlebihan yang akhirnya akan menghasilkan pigmentasi abnormal pada kulit seperti melasma dan *freckles*. Pigmentasi ini umumnya terjadi akibat produksi berlebihan dari eumelanin, jenis melanin yang paling banyak terdapat pada manusia dan bertanggungjawab dalam menghasilkan pigmentasi coklat dan kehitaman (Feng *et al.*, 2022).

Sintesis melanin terjadi pada sel melanosit dan memerlukan tiga komponen yaitu tirosin, enzim tirosinase, dan oksigen. Reaksi biosintesis melanin dimulai dengan proses oksidasi senyawa tirosin menjadi dopakuinon dengan enzim tirosinase sebagai katalis. Kemudian dopakuinon teroksidasi secara alami menjadi senyawa 3,4-dihidroksifenilalanin (dopa) dan dopakrom. Dopa dapat kembali teroksidasi menjadi dopakuinon dengan bantuan enzim tirosinase. Dopakrom sebagian besar terkarboksilasi menjadi senyawa 5,6-dihydroxyindole (DHI) dengan katalis *tyrosinase-related protein-2* (TRP-2), dan sebagian kecil terhidroksilasi menjadi senyawa 5,6-dihydroxyindole carboxylic acid (DHICA). DHI membentuk polimer dengan DHICA dan menghasilkan senyawa eumelanin (Feng *et al.*, 2022). Melanin inilah kemudian menghasilkan bercak kecoklatan dan kehitaman pada kulit yang jika diproduksi berlebih akan menghasilkan kondisi yang disebut hiperpigmentasi.

Pencerah kulit adalah salah satu metode terapi yang digunakan untuk mengobati kondisi hiperpigmentasi (Saeedi, Eslamifar, and Khezri 2019). Beberapa senyawa kimia telah digunakan termasuk asam kojat dan hidrokuinon. Keduanya merupakan senyawa yang paling banyak digunakan dalam produk komersial karena dapat menghambat kerja dari enzim tirosinase yang menghambat produksi melanin. Meskipun senyawa-senyawa tersebut memiliki efek penghambatan yang baik, keduanya masih memiliki kekurangan dan efek samping yang jelas termasuk penetrasi yang rendah, potensi dermatitis, eritema, hingga kerusakan lipid akibat *reactive oxygen species* (ROS) yang dihasilkan (Deri *et al.* 2016). Oleh karena itu, telah dilakukan banyak usaha untuk meningkatkan potensi dan profil keamanan inhibitor tirosinase dengan memodifikasi struktur senyawa-senyawa tersebut (Ashooriha *et al.* 2020).

Sebagai salah satu senyawa utama dalam mengobati hiperpigmentasi, telah banyak dilakukan modifikasi struktur asam kojat dengan membuat konjugat dengan senyawa yang lain. Dalal *et al.*, (2021) telah melakukan derivatisasi asam kojat

dengan senyawa aldehida dan malononitril menggunakan enzim sebagai biokatalis dan menghasilkan sebelas derivat baru. Senyawa-senyawa tersebut berpotensi menjadi penghambat enzim tirosinase yang baru karena memiliki tambahan gugus amina yang mampu membentuk ikatan hidrogen dan gugus benzena yang mampu membentuk interaksi elektrostatik. Namun senyawa-senyawa tersebut belum melalui pengujian efektivitas penghambatan enzim tirosinase dan profil farmakokinetik serta profil keamanan. Salah satu metode yang dapat dilakukan yaitu melakukan penentuan interaksi senyawa dan protein target (enzim tirosinase) melalui metode *docking* molekuler serta penentuan profil farmakokinetik dan toksisitas secara *in silico*.

Docking Molekuler merupakan salah satu metode komputasi yang sangat berguna dalam penemuan obat baru karena mampu memprediksi konformasi senyawa ligan termasuk posisi dan orientasi dalam protein target serta menilai kualitas ikatan yang terbentuk (Stanzione *et al.*, 2021). Metode docking dapat digunakan untuk mengetahui interaksi antara senyawa-senyawa turunan asam kojat dan enzim tirosinase dengan melihat dari nilai energi bebas ikatan (kkal/mol) dan jenis ikatannya dengan residu asam amino enzim tirosinase. Nilai energi bebas ikatan sangat memengaruhi stabilitas kompleks yang terbentuk antara senyawa (lignan) dan enzim (protein target), dengan nilai negatif menandakan terbentuknya kompleks yang lebih stabil (Mahajan *et al.* 2019; Safithri *et al.* 2023). Senyawa-senyawa yang memiliki nilai energi bebas ikatan yang sama atau lebih negatif dibanding dengan asam kojat akan ditentukan profil farmakokinetik dan toksisitas secara *in silico*.

Prediksi profil farmakokinetik dan toksisitas secara *in silico* sering disebut sebagai prediksi ADMET (Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, Ekskresi, dan Toksisitas) dan penting dilakukan pada tahap awal penemuan dan pengembangan obat mengingat banyaknya jumlah kandidat obat yang gagal dalam uji klinis akibat profil ADMET yang buruk yang bahkan mencapai 40-50% (Clark 2005). Prediksi ADMET secara *in silico* dapat digunakan untuk menentukan *drug-likeness*, profil psikokimia, parameter absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi, serta menentukan toksisitas dari senyawa yang diuji (Ferreira *et al.*, 2019).

Docking dan prediksi admet merupakan langkah yang penting dan perlu dilakukan dalam penemuan senyawa-senyawa penghambat tirosinase khususnya pada tahap awal pengembangan obat karena mampu memprediksi interaksi senyawa-senyawa pilihan dengan protein target dan memprediksi profil fisikokimia, farmakokinetika, dan toksisitas obat.

I.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang yang telah dipaparkan, maka rumusan masalah dari penelitian ini yaitu:

1. Bagaimana interaksi dan nilai energi bebas ikatan penambatan senyawa-senyawa turunan asam kojat pada situs pengikatan enzim tirosinase (2Y9X) secara docking molekuler?
2. Bagaimana prediksi profil fisikokimia, *drug-likeness*, farmakokinetika, dan toksisitas senyawa-senyawa turunan asam kojat secara *in silico*?

I.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang ada, maka tujuan penelitian ini yaitu:

1. Untuk menentukan interaksi dan nilai energi bebas ikatan penambatan senyawa-senyawa turunan asam kojat pada situs pengikatan enzim tirosinase (2Y9X) secara docking molekuler.
2. Untuk memprediksi profil fisikokimia, *drug-likeness*, farmakokinetika, dan toksisitas senyawa-senyawa turunan asam kojat secara *in silico*.

BAB II

METODE PENELITIAN

II.1 Alat dan Bahan

Dalam penelitian ini alat dan bahan yang digunakan yaitu perangkat lunak BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2016, perangkat lunak ChemDraw Profesional 15.2, perangkat lunak PyMOL, perangkat lunak UCSF Chimera 1.17 terintegrasi dengan Autodock Vina, protein target yaitu enzim tirosinase (ID PDB: 2Y9X), senyawa-senyawa turunan asam kojat, situs web Admetlab 3.0, dan situs web SwissADME.

II.2 Metode Kerja

II.2.1 Penentuan Senyawa-senyawa Turunan Asam Kojat

Senyawa-senyawa turunan asam kojat diperoleh dengan melakukan studi literatur artikel ilmiah yang diperoleh dari situs web Elsevier (<https://www.elsevier.com/eng/eng>), situs web Google Scholar (<https://www.scholar.google.com/>), dan situs web PubMed (<https://www.pubmed.ncbi.nlm.gov/>) dan. Struktur senyawa-senyawa tersebut dikonversi menjadi *Canonical SMILES* menggunakan ChemDraw Profesional 15.2 lalu disalin dan disimpan. Struktur tiga dimensi senyawa-senyawa tersebut dibangun dan disimpan dengan format (.pdb).

II.2.2 Penentuan Protein Target

Protein target yang akan dianalisis yaitu enzim tirosinase (IDE PDB: 2Y9X) diperoleh dari situs web Research Collaboratory for Structural Bioinformatian (RSCB) Protein Data Bank (<https://www.pdb.org/>) dan disimpan dengan format (.pdb).

II.2.3 Molekuler Docking

II.2.3.1 Preparasi Ligan dan Protein Target

Struktur tiga dimensi enzim tirosinase yang telah diperoleh dari Protein Data Bank dipreparasi menggunakan perangkat lunak UCSF Chimera 1.17 terintegrasi dengan Autodock Vina. Pada proses preparasi, dilakukan pemisahan antara enzim dengan ligan alami dan menghilangkan komponen-komponen yang tidak diinginkan seperti molekul air. Kemudian dilakukan optimasi enzim, yaitu dengan menambahkan komponen seperti hidrogen dan muatan parsial. Hasil preparasi enzim disimpan dalam format (.pdb). Preparasi ligan dilakukan dengan menggunakan struktur tiga dimensi senyawa-senyawa turunan asam kojat yang sebelumnya telah disimpan dan preparasi dilakukan dengan metode yang sama dengan protein target (Jakimiuk *et al.* 2022; Kumari *et al.* 2023).

II.2.3.2 Validasi dan Simulasi Docking Molekuler

Sebelum proses molecular docking menggunakan senyawa-senyawa turunan asam kojat dilakukan, diperlukan proses validasi metode. Proses validasi metode dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak UCSF Chimera 1.17 antara ligan alami dan (tropolon) dan enzim tirosinase yang telah dipreparasi. *Grid point* yang digunakan dalam proses docking yaitu (x;y;z = 18,62; 20,75; 23,94) dengan *center point* (x;y;z = -9,48; -25,94; -43,71). Metode yang digunakan dinyatakan valid apabila nilai root mean square deviation (RMSD) sebesar $\leq 2\text{\AA}$. Hasil RMSD diperoleh dengan menggunakan perangkat lunak PyMOL. Jika metode yang digunakan dinyatakan valid maka selanjutnya dilakukan proses docking senyawa-senyawa turunan asam kojat dengan enzim tirosinase yang telah dipreparasi. Hasil molecular docking disimpan dalam format (.pdb) (Jakimiuk *et al.* 2022; Kumari *et al.* 2023).

II.2.3.3 Visualisasi Hasil Docking Molekuler

Hasil Molecular docking antara senyawa-senyawa turunan asam kojat dengan enzim tirosinase divisualisasikan menggunakan BIOVIA Discovery Studio Visualizer untuk mendapatkan hasil visualisasi dua dan tiga dimensi. Hasil visualisasi menampilkan jenis-jenis ikatan yang terbentuk antara senyawa-senyawa turunan asam kojat dan enzim tirosinase.

II.2.4 Prediksi ADMET

II.2.4.1 Prediksi ADMET dengan Situs Web SwissADME

Canonical SMILES dari senyawa-senyawa turunan asam kojat dimasukkan ke dalam kotak yang tersedia pada situs prediksi SwissADME (<https://www.swissadme.ch/index.php>) untuk mendapatkan hasil prediksi parameter Log Kp senyawa.

II.2.4.2 Prediksi ADMET dengan Situs Web ADMETlab 3.0

Canonical SMILES dari senyawa-senyawa turunan asam kojat dimasukkan ke dalam kotak yang tersedia pada situs prediksi ADMET (<https://admetmesh.scbdd.com/>) untuk mendapatkan hasil prediksi parameter fisikokimia berupa bobot molekul, jumlah hidrogen akseptor, jumlah hidrogen donor, TPSA (*Topological Polar Surface Area*), LogS, LogP, LogD7,4, dan pKA; parameter *drug-likeness* berupa aturan Lipinski, aturan Pfizer, aturan GSK (*GlaxoSmithKline*), dan Aturan Golden Triangle; parameter absorpsi meliputi permeabilitas Caco-2 (*The human colon adenocarcinoma cell lines*), Permeabilitas MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney Cells*), F20%, dan Log Kp; parameter distribusi meliputi PPB (*Plasma Protein Binding*), VDss (*The volume of distribution at steady state*), BBB (*Blood-Brain Barrier*), dan Fu (*The fraction unbound in the plasma*); parameter metabolisme meliputi prediksi inhibisi senyawa terhadap enzim CYP3A4, CYP2B6, CYP2C9, DAN CYP2C19; parameter ekskresi berupa klirens plasma dan waktu paruh; dan parameter toksisitas berupa DILI (Drug-Induced Liver Injury), Mutagenesis AMES, Karsinogenitas, dan sensitisasi kulit.