

Studi Interaksi Senyawa Kompleks Besi terhadap Reseptor Hasap pada *Pseudomonas aeruginosa* Secara In-Silico

Tanisa Maghfira Syarza, Anggi Arumsari, Taufik Muhammad Fakhri

Prodi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Bandung, Indonesia

Email : maghfiratanisa@gmail.com, anggiarumsari@yahoo.com, taufikmuhammadf@gmail.com

ABSTRACT: Antibiotic resistance from pathogens, affecting the human state index in unhealthy state. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the bacteria that has all known resistance mechanisms. One of the strategies that can improve antimicrobial treatment is photodynamics therapy. HasAp of *Pseudomonas aeruginosa* has been shown to be very important for the growth of this organism using hemoglobin (Hb) as a single iron source, thereby supporting its vital role in the acquisition of heme from hemoglobin (Hb). The study aims to compare Fe-Pc, Fe-Salophen and Fe-MPIX which are suitable as metal carriers for Photosensitizer against HasAP on *Pseudomonas aeruginosa* bacteria in-silico. Molecular docking simulations were performed using the MGLTools 1.5.6 software with the AutoDock 4.2 to compare the molecular interactions between Fe-Pc, Fe-Salophen and Fe-MPIX against Macromolecular HasAp. Based on molecular docking simulations it was found that the Fe-Pc compounds had good affinity with a free bond energy value of -11,62kcal/mol. The metallic differences in the molecular structure of phthalocyanine compounds have been shown to affect mechanisms of action against HasA proteins. Therefore, the results of this computational study can be a reference in designing the structure of a Fe-phthalocyanine compound as a photosensitizer candidate in photodynamic antimicrobial therapy.

Keywords: photosensitizer, Fe-Pc, Fe-Salophen and Fe-MPIX, *Pseudomonas aeruginosa*, computational studies.

ABSTARK: Resistensi antibiotik yang luas dari patogen, mempengaruhi indeks keadaan manusia dalam keadaan tidak sehat. *Pseudomonas aeruginosa* merupakan salah satu bakteri yang memiliki semua mekanisme resistensi yang diketahui. Salah satu strategi yang dapat meningkatkan pengobatan antimikroba adalah terapi fotodinamika. HasAp dari *Pseudomonas aeruginosa* telah terbukti sangat penting untuk pertumbuhan organisme ini menggunakan hemoglobin (Hb) sebagai sumber besi tunggal, sehingga mendukung peran vitalnya dalam perolehan heme dari hemoglobin (Hb). Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan Fe-Pc, Fe-Salophen dan Fe-MPIX yang cocok sebagai pembawa logam untuk fotosensitizer terhadap HasAP pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara in-silico. Simulasi docking molekul dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak MGLTools 1.5.6 dengan AutoDock 4.2 untuk membandingkan interaksi molekul antara Fe-Pc, Fe-Salophen dan Fe-MPIX terhadap makromolekul HasAp. Berdasarkan simulasi docking molekular ditemukan bahwa senyawa Fe-Pc memiliki afinitas yang baik dengan nilai energi ikatan bebas -11,62kcal/mol. Perbedaan logam dalam struktur molekul senyawa phthalocyanine telah terbukti dapat mempengaruhi mekanisme aksi terhadap protein HasA. Oleh karena itu, hasil dari studi komputasi ini dapat menjadi referensi dalam merancang struktur senyawa Fe-phthalocyanine sebagai kandidat fotosensitizer dalam terapi antimikroba fotodinamik.

Kata Kunci : Fotosensitizer, Fe-Pc, Fe-Salophen dan Fe-MPIX, *Pseudomonas aeruginosa*, Studi komputasi

1 PENDAHULUAN

Resistensi antibiotik yang luas dari patogen, mempengaruhi indeks keadaan manusia dalam keadaan tidak sehat (Geralde,2017). Maka dari itu penggunaan antibiotik secara rasional menjadi hal penting yang perlu diperhatikan. Seringkali

penggunaan antibiotik dapat menimbulkan masalah resistensi dan efek obat yang tidak dikehendaki, oleh karena itu penggunaan antibiotik harus mengikuti strategi peresepan antibiotik (Johns Hopkins Medicine dkk, 2016).

Pseudomonas aeruginosa merupakan salah satu bakteri yang memiliki semua mekanisme

resistensi yang diketahui (Nasrallah GK,2015). *Pseudomonas aeruginosa* diketahui memiliki resistensi terhadap beberapa jenis antibiotik, seperti imipenem (20.8%), sefalosporin seperti sefotaksim (90%) dan seftriakson (85%), aminoglikosida seperti tobramisin (70.07%) dan gentamisin (71.89%), fluorokuinolon seperti siprofloksasin (35%) dan levofloksasin (32%) (Raakhee T,2014) dan (Al-Ahmadey ZZ,2013).

Salah satu strategi yang dapat meningkatkan pengobatan antimikroba adalah terapi photodinamika (Nakonechny F,2010). Teknik photodinamika terapi (PDT) ini bersifat non-farmakologi, antimikroba dan berbasis cahaya yang dapat digunakan sebagai alternatif terhadap antibiotik tradisional.

Terdapat beberapa senyawa kompleks logam yang dapat digunakan sebagai fotosensitizer seperti Fe-Pc, Fe-Salophen, dan Fe-MPIX. Pada penelitian sebelumnya nilai konsentrasi hambat setengah-maksimal (IC_{50}) diperkirakan 24nm, sehingga menunjukkan bahwa HasAp yang terikat Fe-Pc secara efisien menghambat transportasi heme.

HasAp dari *Pseudomonas aeruginosa* telah terbukti sangat penting untuk pertumbuhan organisme ini menggunakan hemoglobin (Hb) sebagai sumber besi tunggal, sehingga mendukung peran vitalnya dalam perolehan heme dari hemoglobin (Hb). Namun, mekanisme di mana proses ini terjadi masih dalam perdebatan (Letoffe S, 1998).

Berdasarkan latar belakang masalah yang diuraikan diatas, maka rumusan masalah pada penelitian ini ialah apakah Fe-Pc, Fe-Salophen dan Fe-MPIX yang terikat dengan resptor HasAp pada *Pseudomonas aeruginosa* secara efisien dapat menghambat transportasi heme.

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan Fe-Pc, Fe-Salophen dan Fe-MPIX yang cocok sebagai pembawa logam untuk *fotosensitizer* terhadap HasAP pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara in-silico.

2 LANDASAN TEORI

In-silico adalah penggunaan ekspresi yang berarti dilakukan pada komputer atau melalui simulasi. In silico merupakan pendekatan relatif baru dalam penelitian, tapi mulai digunakan secara luas dalam studi untuk memprediksi bagaimana

obat berinteraksi dalam tubuh dan pathogen. Keunggulan dari in silico tersebut dikembangkan dalam berbagai bidang ilmu yang berkenaan dengan penggunaan senyawa kimia seperti ilmu pertanian hingga biomedik khususnya farmasi dalam upaya menemukan obat baru.

Docking adalah metode yang digunakan untuk memprediksikan orientasi antara satu molekul dengan molekul yang lainnya saat terjadi interaksi elektrostatik satu sama lain untuk membentuk ikatan yang stabil. Uji in silico menghasilkan nilai energi ikatan atau Rerank Score (RS). Energi ikatan menunjukkan jumlah energi yang dibutuhkan untuk membentuk ikatan antara ligan dengan reseptor. Semakin kecil energi ikatan berarti semakin stabil ikatan tersebut. Semakin stabil ikatan ligan dengan reseptor maka dapat diprediksikan bahwa aktivitasnya juga semakin besar (Hardjono, 2012).

Fungsi dari *docking* adalah mencakup pembuatan konformasi-konformasi ligan-protein yang disebut “posisi/pose” yang mungkin pada kantung ikatan protein (Okimoto,2009).

METODE PENELITIAN

Pada penelitian ini akan dilakukan studi in-silico antara HasAp dengan senyawa kompleks logam Fe-Pc, Fe-Salophen dan Fe-MPIX. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan Fe-Pc, Fe-Salophen dan Fe-MPIX yang cocok sebagai pembawa logam untuk fotosensitizer terhadap HasAp pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

Pertama, unduh struktur kristal 3D dari Fe-Pc, Fe-Salophen dan Fe-MPIX pada website www.rscb.org (*Protein Data Bank*) dengan kode PDB masing-masing yaitu 3W8O, 3W8M, dan 3WAH. Setelah struktur kristal diunduh, selanjutnya dilakukan preparasi struktur kristal HasAp dengan Fe-Pc, Fe-Salophen dan Fe-MPIX yaitu dengan menghilangkan molekul air yang dapat mengganggu proses *docking*. Pemisahan ini dilakukan bertujuan agar tidak mempengaruhi hasil pada proses *docking*. Pemisahan dilakukan dengan metode *Biovia Discovery Studio 2019*.

Kemudian preparasi HasAp dilakukan dengan penambahan atom hydrogen dan muatan parsial, sedangkan preparasi pada Fe-Pc, Fe-Salophen dan Fe-MPIX dilakukan dengan penambahan muatan parsial dengan menggunakan *software MGL*

Tools versi 1.5.6 yang dilengkapi dengan *Autodock Tools* versi 4.2.

Setelah itu dilakukan validasi metode *docking* dengan menggunakan *software MGL Tools* versi 1.5.6 yang dilengkapi dengan *Autodock Tools* versi 4.2. Validasi metode digunakan untuk memastikan kebenaran senyawa yang akan diuji, untuk mengetahui bahwa metode tersebut telah valid maka nilai RMSD yang diperoleh sesuai dengan ketentuan jika terjadi interaksi ligan dan protein target maka nilai RMSD tidak melebihi 2Å.

Kemudian dilakukan simulasi *docking* antara HasAp dengan Fe-Pc, Fe-Salophen dan Fe-MPIX dengan menggunakan metode *MGL Tools* versi 1.5.6 yang dilengkapi dengan *Autodock Tools* versi 4.2 hasil yang diperoleh dari *softwer* tersebut adalah energi ikatan (G) dan konstanta inhibisi (K_i). Serta interaksi residu asam amino yang dapat di amati dengan *software Biovia Discovery Studio 2019* sehingga diperoleh struktur acuan untuk antibakteri berbasis photodinamika terapi (PDT).

3 HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

a. Pencarian Data Aktivitas Biologis

Penelitian ini mengacu pada jurnal Inhibition of Heme Uptake in *Pseudomonas aeruginosa* by its Hemophore (HasAp) Bound to Synthetic Metal Complexes oleh Chikako Shirataki dkk, dimana pada penelitian ini telah dilakukan secara in vivo dengan penghambatan berpengaruh pada hasil heme oleh HasAp bantalan sintesis kompleks logam diperiksa dengan memantau pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*. HasAp terikat dengan besi-phthalocyanine menghambat penerimaan heme di hadapan HasAp yang terikat dengan heme sebagai sumber zat besi (Shirataki,2014). Penelitian yang dilakukan oleh Chikako Shirataki dkk menunjukkan bahwa HasAp dapat menangkap beberapa kompleks logam sintesis selain heme.

Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Chikako Shirataki dkk 2014, berdasarkan metode komputasi. Penelitian ini ingin membuktikan bahwa senyawa logam Fe-Pc, Fe-Salophen dan Fe-MPIX cocok sebagai pembawa logam untuk fotosensitizer terhadap HasAp pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

b. Lipofilisitas (ClogP)

Table 1. Hasil Nilai Lipofilisitas Senyawa Uji

Lipofilisitas	ClogP
Fe-Pc	5.651
Fe-Salophen	6.025
Fe-MPIX	5.826

Berdasarkan data Lipofilisitas yang didapat nilai ClogP yang dihasilkan dari ketiga senyawa tersebut tidak ada yang memenuhi aturan Lipinski karena nilai yang dihasilkan lebih dari 5, hal ini menunjukkan bahwa dari ketiga senyawa ini sulit untuk menembus membran biologis dan hal ini dapat menyebabkan proses distribusi senyawa uji yang digunakan untuk mencapai reseptor akan memerlukan waktu yang lebih lama. Dapat dilihat pada table hasil nilai lipofilisitas dari ketiga senyawa tersebut nilai terkecil yang diperoleh terdapat pada senyawa Fe-Pc karena nilai yang didapat dari senyawa Fe-Pc hanya 5,651, walaupun tidak memenuhi aturan Lipinski tapi senyawa Fe-Pc memiliki nilai lipofilisitas paling kecil dan mendekati aturan Lipinski dibandingkan kedua senyawa tersebut.

c. Reaktivitas Molar (CMR)

Table 2. Hasil CMR

Senyawa Uji	CMR
Fe-Pc	14.88
Fe-Salophen	97.674
Fe-MPIX	159.252

Berdasarkan hasil yang didapatkan dari ketiga senyawa tersebut tidak ada yang memenuhi atau pun mendekati nilai aturan Lipinski dapat dilihat dari table 2. Maka hal ini dapat berpengaruh pada mudah atau tidaknya struktur tersebut berpolatisi. Dan dilihat dari hasil yang didapat dapat disimpulkan pula bahwa ketiga senyawa ini akan sulit untuk berpolatisi.

d. Berat Molekul

Table 3. hasil berat molekul senyawa uji

Senyawa Uji	Bobot Molekul
Fe-Pc	568.38
Fe-Salophen	372.21
Fe-MPIX	620.53

Analisa drug scan berdasarkan parameter

Lipinski data pada table diatas menunjukkan dua senyawa tersebut tidak memasuki kriteria menurut Lipinski, hanya senyawa Fe-Salophen yang memasuki kriteria Lipinski karena bobot molekul yang didapat memiliki nilai yang kurang dari 500 Dalton yaitu 372,21 Dalton, dan hal ini menunjukkan bahwa senyawa Fe-Salophen akan mudah untk menembus membran biologis. Sedangkan untuk senyawa Fe-Pc yang memiliki berat molekul sebesar 568,38 Dalton dan senyawa Fe-MPIX yang memiliki berat molekul 620,53 Dalton ini tidak memenuhi aturan Lipinski karena lebih dari 500 Dalton dan akan sulit untuk menembus membran biologis.

e. Validasi Metode Docking

Sebelum dilakukan proses docking pada penelitian ini, maka terlebih dahulu dilakukan validasi dengan cara menambatkan ulang ligan asli pada reseptor asal dengan menggunakan *softwer Autodock 4.2*.

Semakin kecil nilai RMSD menunjukkan bahwa posisi ligan yang diperkirakan semakin baik karena semakin mendekati konfirmasi asal (Dany *et al.*, 2013). Hasil validasi dari senyawa Fe-Pc, Fe-Salophen dan Fe-MPIX didapatkan nilai RMSD sebesar 1.30Å, 0.71Å, 0.67Å. Hal ini secara teori, ligan dan protein yang divalidasi telah memenuhi syarat valid. Maka dapat disimpulkan bahwa nilai RMSD yang paling baik dari ketiga senyawa uji yaitu Fe-MPIX karena memiliki nilai RMSD paling kecil sehingga posisi ligan semakin baik dan mendekati konfirmasi awal.

f. Analisis Hasil Docking

Analisis berdasarkan hasil yang diperoleh dari *molecular docking* yaitu nilai energi ikatan (*Gbind*), konstanta inhibisi (KI), dan interaksi residu asam amino. Berikut penjelasannya:

Tabel 4. Analisis Hasil Docking

Ligan	Reseptor target	Binding energi	Inhibitor konstanta
Fe- Pc	Fe-Salophen	-0.00 kcal/mol	998.89 mM
Fe- MPIX	Fe-Salophen	+2.39kcal/mol	-
Fe-Salophen	Fe-Pc	-11.62kcal/mol	3.03 mM
Fe- MPIX	Fe-Pc	+2.35kcal/mol	-
Fe-Pc	Fe- MPIX	-0.00 kcal/mol	998.72 mM
Fe- Salophen	Fe- MPIX	-0.00 kcal/mol	995.21 mM

Nilai binding energi menunjukkan energi

terkecil yang digunakan oleh reseptor untuk berinteraksi dengan ligan. Semakin kecil nilai binding energi maka interaksi antara ligand dan reseptor semakin stabil (Berk *et al.*, 2000).

Parameter lainnya yang digunakan untuk melihat kekuatan interaksi antara ligan dengan reseptor adalah nilai konstanta inhibisi (KI). Semakin rendah nilai KI yang dihasilkan menunjukkan semakin besar kemampuan ligan untuk berinteraksi dengan reseptor.

g. Visualisasi dan Interaksi Penambatan Ligan dengan Reseptor

Visualisasi dilakukan untuk melihat hasil penambatan ligan uji dan ligan pembanding dengan reseptor yang digunakan. Hasil visualisasi berupa residu asam amino yang berperan membuat kontak antara ligan dengan reseptor. Residu asam amino merupakan komponen penting yang berperan dalam terjadinya ikatan hasil dari penambatan reseptor dengan suatu ligan.

Hasil penambatan Fe-Pc dengan Fe-Salophen menghasilkan 11 residu asam amino, residu asam amino tersebut adalah TYR75, TYR75, HIS32, HIS32, TYR75, MET141, TYR75, HIS83, TYR138, LEU85, VAL137.

4 KESIMPULAN

Senyawa dari golongan logam yang cocok sebagai pembawa logam untuk *fotosensitizer* terhadap HasAP pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara in-silico adalah reseptor Fe-Pc dengan Ligan Fe-Salophen berdasarkan hasil analisis *docking* yang didapat dengan nilai energi bebas Gibbs paling rendah yaitu -11.62 kcal/mol dan nilai Ki yang rendah pula yaitu 3.03 mM.

SARAN

Fe-Pc dapat dikembangkan sebagai kandidat obat antimikroba, dan untuk penelitian selanjutnya pada kedua senyawa logam kompleks lainnya dapat diuji kembali dengan menggunakan metode yang lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

Al-Ahmadey ZZ dan Mohamed SA. (2013). Antimicrobial Susceptibility Pattern of Bacterial Isolates in The Intensive Care Unit of Al-Ansar Hospital. European Journal of Advanced Research in Biological and Life Science.17-27. Saudi Arabia.

- Chikako Shirataki., et al. (2014) Inhibition of Heme Uptake in *Pseudomonas aeruginosa* by its Hemophore (HasAp) Bound to Synthetic Metal Complexes.
- Dany, et al., 2013. Stellar Superfluids, Inspire. INT-PUB-009
- El Zowalaty ME, Al Thani AA, Webster TJ, El Zowalaty AE, Schweizer HP, Nasrallah GK, dkk. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future Microbiol.* 10:1683–706.
- Geralde MC, Leite IS, Inada NM. et al. (2017). Pneumonia treatment by photodynamic therapy with extracorporeal illumination - an experimental model. *Physiol Rep.* 5.
- Hardjono, S. (2012). Modifikasi Struktur 1-(Benzoiloksi) urea dan Hubungan Kuantitatif Struktur-Aktivitas Sitotoksiknya. Universitas Airlangga, Disertasi, Surabaya.
- Letoffe S, Redeker V, Wandersman C. (1998). Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares function and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA haemophore. *Mol. Microbiol.* 28:1223–1234.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology* 4th Edition. New York: W.H Freeman Company.
- Medicine J.H. (2016). *Antibiotic Guidelines 2015-2016*, Johns Hopkins Medicine, USA.
- Nakonechny F, Firer MA, Nitzan Y, Nisnevitch M. (2010). Intracellular antimicrobial photodynamic therapy: a novel technique for efficient eradication of pathogenic bacteria. *Photochem Photobiol.* 86:1350–1355.
- Okimoto, N., Futasugi, N., Fuji, H., Suenaga, A., Morimoto, G., et.al. (2009). High Performance Drug Discovery: Computational Screening by Combining Docking and Molecular Dynamics Simulation, *PLoS Computational Biology*. Vol 10. 1-13.
- Raakhee T, Rao US. (2014). Prevalence and Resistance Pattern of *Pseudomonas* Strains Isolated from ICU Patients. *Int. J. Curr.*