

PENGARUH GUGUS FUNGSI CINCIN PIRIDIN, BENZEN, DAN ATOM NITROGEN PADA CINCIN PIRIDIN TERHADAP PENURUNAN KADAR PLASMA PIRIDOKSIN TIKUS WISTAR

Hafrizal Riza^{1*}, Jordi Buannata¹

¹Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura

*Email: hafrizal.riza@pharm.untan.ac.id

Artikel diterima: 22 Januari 2022; Disetujui: 1 Oktober 2022

DOI: <https://doi.org/10.36387/jiis.v7i2.873>

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peta gugus fungsi isoniazid yang memiliki afinitas terhadap enzim penyebab neuropati pada gugus fungsi cincin piridin. Melalui studi ini akan diketahui apakah ada pengaruh atom N pada cincin piridin, dan struktur cincin benzen dari isoniazid terhadap enzim piridoksal fosfokinase. Karena itu isoniazid diuji dalam bentuk struktur senyawa benzohidrazide, butyroidrazide dan formohidrazide, selain kontrol isoniazid. Uji dilakukan pada tikus coba untuk melihat efek pengaruh perubahan gugus fungsi terhadap penurunan afinitas pada reseptor enzim piridoksal fosfokinase yang dapat ditunjukkan dengan penurunan kadar piridoksin aktif dalam darah tikus. Ketiga struktur senyawa kemudian dilihat interaksinya terhadap enzim piridoksal fosfokinase melalui pengaruhnya terhadap peningkatan kadar piridoksal 5 fosfat yang merupakan bentuk aktif dari piridoksin, menggunakan metode Spektroskopi Ultraviolet-Visibel. Hasil uji spektroskopi ultra violet visible menunjukkan kadar piridoksin aktif tikus kelompok pemberian isoniazid, benzohidrazid (isoniazid tanpa atom N dalam gugus fungsi benzen) dan formohidrazid (isoniazid tanpa gugus fungsi benzen) dan kelompok kontrol negatif (tanpa pemberian obat) secara berturut - turut adalah 160.259, 120.548, 107.086 dan 104.490. Berdasarkan hasil disimpulkan atom N dalam gugus fungsi benzen dan gugus fungsi benzen merupakan gugus farmakofor isoniazid yang berkontribusi pada interaksi dengan enzim piridoksin fosfokinase.

Kata kunci: Piridoksin plasma, Isoniazid, Benzohidrazide, Formohidrazide

ABSTRACT

This study was purposed to determine the map of functional groups of isoniazid that have an affinity for neuropathy-causing enzymes in the pyridine ring functional group. Through this study, it will be known whether there is an effect of the N atom on the pyridine ring, and the structure of the benzene ring. Therefore, Isoniazid was tested in the three structures, namely benzohidrazide, butyroidrazide, formohidrazide, and also isoniazid control. These Three chemical structure were tested for their effect on the inhibition of the pyridoxal phosphokinase enzyme in experimental rats that showed the effect of changing functional groups on decreasing affinity for the pyridoxal phosphokinase enzyme

receptor which can be indicated by a decrease in active pyridoxine, levels in the blood mouse. The three compound structures were examined for their interactions with the pyridoxal phosphokinase enzyme through their effect on increasing levels of pyridoxal 5 phosphate which is the active form of pyridoxine, using the Ultraviolet-Visible Spectroscopy method. The results of the ultraviolet-visible spectroscopy test showed that the active pyridoxine levels of rats in the isoniazid, benzohydrazid, and formohydrazid groups and the negative control group were 160,259, 120,548, 107,086 and 104,490, respectively. Based on the results, it was concluded that benzohydrazide and formohydrazide did not have a pharmacophore group against the pyridoxine phosphokinase enzyme.

Keywords: *Plasma pyridoxine, Isoniazid, Benzohydrazide, Formohydrazide*

PENDAHULUAN

Obat isoniazid merupakan salah satu obat antibiotik yang menjadi pemilihan terapi TBC (Kautsar dan Intani, 2016). Di Indonesia, isoniazid masih menjadi standar terapi TBC (Kautsar dan Intani, 2016) (Suarayasa.,dkk, 2019). Obat ini digunakan secara kombinasi dengan obat golongan lainnya karena mengantisipasi potensi resistensi bakteri dan efektivitas terapi. Obat isoniazid merupakan prodrug yang memiliki mekanisme molekuler pada penghambatan dinding sel bakteri. Sebagai prodrug, isoniazid diaktivasi oleh enzim katalase- peroksidase bakteri, KatG, menjadi bentuk senyawa radikal asil nikotinat. Radikal ini akan berikatan dengan NADH membentuk senyawa NAD nikotinoil yang selanjutnya berlaku

sebagai analog substrat enzim pembangun dinding sel (Sing, et al., 2008).

Penggunaan berulang obat isoniazid menimbulkan efek samping neuropati, gangguan saraf. Penggunaan isoniazid membutuhkan pemberian piridoksin, vitamin C (Zaoui, et al., 2012). Penggunaan isoniazid 100 mg dibutuhkan 10 mg piridoksin (Mandel, 1957). Efek samping ini terjadi karena obat isoniazid memiliki afinitas terhadap enzim piridoksal fosfokinase selain afinitasnya terhadap enzim KatG pada penghambatan dinding sel bakteri. Dalam hal ini, obat isoniazid berlaku sebagai multisubstrat analog seperti yang terjadi pada obat PALA (N-phosphonoacetyl-L-aspartate) sebagai antitumor (Silverman, 2004).

Upaya yang dapat dilakukan

adalah memodifikasi gugus fungsi senyawa obat yang dapat menurunkan afinitas senyawa obat terhadap enzim target yang bertanggungjawab pada efek samping seperti modifikasi pada senyawa captopril pada gugus sulfhidril agar mengurangi interaksi gugus ini dengan ion Zn pada enzim (Silverman, 2004). Penelitian *in silico* yang dilakukan oleh Rida pada tahun 2019 menunjukkan adanya afinitas dengan energi gibbs yang mendukung dan interaksi antara residu asam amino enzim piridoksal fosfokinase. Penelitian ini mengidentifikasi gugus-gugus fungsi dari isoniazid yang memiliki afinitas terhadap reseptor enzim KatG dan reseptor enzim piridoksal fosfokinase. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pengurangan struktur cincin Piridin akan menurunkan afinitas terbanyak yang signifikan baik isoniazid terhadap enzim yang bertanggungjawab pada aktivitas TBC maupun pada enzim yang bertanggungjawab pada neuropati. Hal ini disebabkan interaksi yang terjadi didominasi interaksi van der Waals antara isoniazid dengan residu

asam amino kedua enzim. Beberapa gugus yang melekat kepada cincin Piridin seperti karboksil tidak memberikan kontribusi afinitas yang signifikan kepada aktivitas maupun efek samping yang menunjukkan adanya kontribusi ikatan hidrogen aseptor maupun donor.

Melalui studi ini diharapkan dengan perbedaan afinitas maka isoniazid lebih kuat kecenderungan berinteraksi dengan enzim KatG dibanding enzim piridoksal fosfokinase dan efek samping hanya dapat tercapai jika semua reseptor KatG sudah penuh ditempati oleh isoniazid (Silverman, 2004). Penelitian yang dilakukan oleh Hafrizal Riza pada tahun 2021 untuk memastikan secara *in vivo* pengaruh substituen piridin menunjukkan hasil bahwa struktur asam 4 piridin karboksilat, piridin aldehid dan metil piridin tidak memiliki afinitas sekuat isoniazid terhadap enzim piridoksin fosfokinase sebagai substrat analog. Gugus fungsi hidrazin dan karboksil memiliki peranan afinitas yang besar terhadap enzim yang menentukan efek neuropati perifer (Timmins.,dkk, 2004).

Saat ini penelitian modifikasi struktur kimia senyawa isoniazid bertujuan mengatasi resistensi isoniazid dalam terapi TBC. Penelitian mekanisme isoniazid dilakukan oleh Rozswarki untuk melihat mekanisme aksi pada reseptor *Mycobacterium tuberculosis* yang menunjukkan adanya ikatan kovalen dan cincin nikotinamid yang bertanggungjawab pada aksi obat (Rozwarski, et al., 1998). Penelitian yang dilakukan Dragostin mencari modifikasi isoniazid untuk mengatasi efek samping hepatotoksik isoniazid (Dragostin, et al., 2019). Namun, belum ada penelitian yang dilakukan untuk mengatasi efek samping neuropati yang juga dapat mempengaruhi kepatuhan pasien.

Pada penelitian ini, peneliti akan melakukan studi lanjut untuk mengetahui peta gugus fungsi yang memiliki afinitas terhadap enzim penyebab neuropati pada gugus fungsi cincin piridin setelah penelitian sebelumnya pada substituen cincin piridin. Melalui studi ini akan diketahui apakah ada pengaruh atom N pada cincin piridin, dan struktur cincin benzen. Karena

itu ketiga struktur berupa benzohydrazide, butyrohydrazide dan formohydrazide dan kontrol isoniazid akan diuji pengaruhnya pada penghambatan terhadap enzim piridoksal fosfokinase pada tikus coba untuk melihat efek pengaruh perubahan gugus fungsi terhadap penurunan afinitas pada reseptor enzim piridoksal fosfokinase yang dapat ditunjukkan dengan penurunan kadar piridoksin aktif dalam darah tikus (Pedersen and Myers, 2011).

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan *Pre and posttest only control group design* yaitu eksperimen perlakuan dengan membandingkan isoniazid sebelum dimodifikasi sebagai kontrol dibandingkan dengan isoniazid yang sudah dieliminasi beberapa gugus fungsi terhadap penurunan kadar piridoksin plasma sehingga diketahui pengaruh gugus fungsi yang menentukan penurunan kadar piridoksin plasma, serta melihat perbedaan pengaruh penurunan piridoksin dalam plasma darah sebelum senyawa isoniazid diberikan dan setelahnya sebagai kontrol

keberhasilan perlakuan dan sebelum dengan sesudah pemberian senyawa modifikasi untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh pemberian modifikasi senyawa.

Pengelompokan dan perlakuan hewan uji menggunakan Rancangan Acak Lengkap, tikus dibagi menjadi 4 kelompok dengan 5 ekor tiap kelompok uji. Hewan uji sebelum pengujian di aklimatisasi dengan ditempatkan dengan di ruang berventilasi cukup dengan suhu ruangan 25°C dalam kandang dan pakan dan minum yang memenuhi standar secara ad libitum selama 1 minggu (Sposito dan Santos, 2011). Besar sampel pada penelitian ini mengacu pada rumus Federer ($(t - 1)(r - 1) \geq 15$).

Pembagian kelompok perlakuan sebagai berikut: Kelompok 1 kontrol positif (Isoniazid 5,4 mg/200gBB); Kelompok 2 (asam 4 karboksil piridin 5,4 mg/200gBB); Kelompok 3 (piridin aldehid 5,4 mg/200gBB); Kelompok 4 (metil piridin 5,4mg/200gBB).

Teknik Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan dengan mengambil darah dan dibaca

pada spektroskopi *Ultra Violet* dan *Visible* (Edwards, et al., 1989; Soda, et al., 1969; Bartzatt, et al., 2011).

Darah tiap kelompok tikus diambil pada vena mata (sinus orbitalis) dan disentrifugasi (10,000 × g) selama 5 menit untuk mendapatkan eritrosit. 30µl eritrosit ditambahkan dengan 30µl larutan 0.85% (w/v) NaCl 1. 14 ml 0.025% (w/v) larutan saponin. Larutan diinkubasi pada 25°C selama 30 menit dan kemudian disentrifugasi (1000 × g) untuk memisahkan sel debris sehingga diperoleh supernatan. Supernatan disimpan dengan sealing tutup dan aluminium foil pada suhu -800C. (Bailey A, et al., 1999).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengujian pengaruh isoniazid, benzohydrazide dan formohydrazide pada penurunan kadar piridoksin dalam tikus yang dapat menyebabkan neuropati, dilakukan melalui uji spektroskopi Ultraviolet Visibel. Identifikasi dilakukan panjang gelombang maksimal yaitu 220 nm.

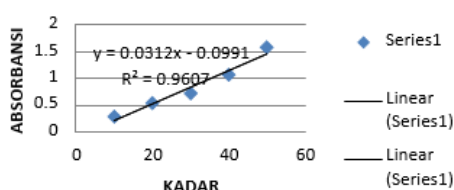
Untuk menghitung kadar piridoksin aktif dalam darah tikus

maka dilakukan pengukuran kurva baku pada larutan seri kadar. Melalui kurva baku diperoleh hubungan absorban seri baku dari seri kadar.

Tabel 1. Pengukuran Pembuatan Kurva Baku

No.	Kadar Baku (ppm)	Absorban	R	Persamaan kurva
1.	50	1,579	0,9607	$y = 0.0312x - 0.0991$
2.	40	1,069		
3.	30	0,718		
4.	20	0,534		
5.	10	0,286		

KURVA BAKU PIRIDOKSIN AKTIF



Gambar 1. Hubungan seri kadar pada absorban kurva baku Piridoksin Aktif

Tabel dan Gambar di atas menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang proporsional dari peningkatan kadar baku terhadap peningkatan nilai absorban. Seri kadar baku yang dibuat dengan rentang nilai yang sebanding antar kadar baku dapat menghasilkan rentang yang proporsional dari nilai absorban. Ini menunjukkan bahwa

metode pengukuran yang meliputi cara kerja, langkah pelaksanaan analisis dan kinerja alat sudah menunjukkan kondisi yang optimal dalam menghasilkan hasil pengukuran yang mendekati nilai sebenarnya. Hal ini dapat menunjukkan metode memiliki validitas yang baik sehingga dapat menghasilkan pengukuran kadar piridoksin aktif dalam darah tikus mendekati hasil sebenarnya.

Tabel 2. Hasil kadar piridoksin dalam darah

Sampel	Rerata Absorban	Kadar (ppm) piridoksin aktif
Isoniazid 2,7 ppm (kontrol positif)	0,581	21,538
Benzohidrazide 2,7 ppm,	0,372	14,840
Formohidrazide 2,7 ppm	0,346	14,006
Tanpa sampel (kontrol negatif)	0,875	30,962



Gambar 2. Hubungan modifikasi struktur senyawa Isoniazid terhadap piridoksin aktif

Tabel 2 menunjukkan bahwa kadar piridoksin aktif pada darah kelompok tikus yang mendapat

pemberian isoniazid ada pada level lebih rendah dari pada kelompok tikus kontrol negatif tanpa pemberian isoniazid. Sedangkan kadar piridoksin aktif pada darah tikus kelompok benzohidrazid terlihat lebih rendah dibanding kontrol negatif. Kadar piridoksin aktif pada kelompok tikus dengan pemberian formohidrazid ada pada kadar yang lebih rendah dari pada kelompok tikus kontrol negatif. Hal ini dapat disebabkan adanya mekanisme afinitas isoniazid terhadap aktivitas enzim dalam memproduksi piridoksin aktif sehingga kadar piridoksin aktif menurun. Hal yang sama berlaku pada benzohidrazid dan formohidrazid yang menunjukkan adanya afinitas keduanya terhadap enzim. Struktur isoniazid dan keduanya memiliki afinitas yang tinggi terhadap enzim sehingga dapat berikatan dengan enzim dalam memproduksi bentuk aktif piridoksin. Melalui gambar 2 terlihat kadar piridoksin aktif yang lebih rendah pada struktur senyawa formohidrazid dan benzohidrazid dari pada kontrol negatif yang menunjukkan kedua struktur memiliki afinitas terhadap

enzim. Hal ini berarti cincin piridin memiliki pengaruh pada afinitas isoniazid terhadap enzim. Cincin piridin memiliki gugus kromofor terhadap efek samping isoniazid.

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian studi *in silico* yang dilakukan oleh Rida Resta Dewi tahun 2019 bahwa tidak terdapat penurunan bermakna pada afinitas isoniazid terhadap enzim akibat dimodifikasi pada struktur cincin piridin (Rida, *et al.*, 2019).

Penelitian ini memiliki kurva baku dengan $r = 0,960$. Nilai ini mendekati angka 1 sehingga menunjukkan metode yang terdiri dari alat, penggunaan bahan dan kadarnya serta cara kerja peneliti memberikan prosedur yang sesuai. Hal ini ditunjukkan dengan proporsionalitas ukuran yang semakin meningkatnya kadar baku semakin tinggi absorbansinya. Hasil menunjukkan pengukuran yang benar karena tikus kelompok kontrol negatif yang tidak diberikan sampel memiliki kadar piridoksin yang tidak sama dengan kelompok kontrol positif yang diberikan isoniazid. Kontrol positif isoniazid dapat

meningkatkan kadar piridoksin tikus karena isoniazid terbukti memiliki afinitas yang kuat terhadap enzim.

KESIMPULAN

Struktur cincin piridin tidak memiliki afinitas sekuat isoniazid terhadap enzim piridoksin fosfokinase.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih ucapkan kepada Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura Pontianak atas dukungan dana yang diberikan untuk menuntaskan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Bailey A L, Wright A J A and Southon S, 1999, High performance liquid chromatography method for the determination of pyridoxal-5-phosphate in human plasma: How appropriate are cut-off values for vitamin B6 deficiency?, *European Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 53, p.448-455.
- Bartzatt R, Gajmer P, Nguyen M H C and Tran A M, 2016, Detection and Assay of Vitamin B6 (Pyridoxine Hydrochloride) Utilizing Isocratic High Performance Liquid Chromatography, *Journal of Scientific Research & Reports*, Vol. 12, No. 3, p. 1-12.
- Dragostin I 1, Dragostin O M, Samal S K, Dash S, Tatia R, Dragan M, Confederat L, et al., 2019, New isoniazid derivatives with improved pharmacotoxicological profile: Obtaining, characterization and biological evaluation, *Eur J Pharm Sci*, Vol. 137, p.104974.
- Edwards P, Liu P K S, Rose G A, 1989, Determination of plasma pyridoxal phosphate levels using a modified apotryptophanase assay, *Ann Clin Biochem*, Vol. 26, p. 158-163.
- Mandel W M D, 1959, Pyridoxine and the Isoniazid-Induced Neuropathy, *Chest Journal*, Vol. 36, Issue 3, p. 293–296.
- Pedersen F S and Myers M A, 2011, *Understanding the principle of organic chemistry, a laboratory course*, Balmont; Brooks Cole, engage learning.
- Rida R D, Hafrizal R, Inarah F, 2019, Virtual Screening Struktur Modifikasi Isoniazid terhadap Enzim Katalase Peroxidase menggunakan Metode Docking, *Jurnal Untan*.
- Rozwarski 1 D A, Grant G A, Barton D H, Jacobs W R, Sacchettini J C, 1998, Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from Mycobacterium tuberculosis, *Science* Vol. 279, No. 5347, p98-102.
- Silverman B R, 2004, *The organic chemistry of drug design and*

- drug action, second edition*, California; Elsevier, p.173-262.
- Soda K, Yorifuji T, Misono H and Moriguchi M, 1969, Spectrophotometric determination of pyridoxal and pyridoxal 5'-phosphate with 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazine hydrochloride, and their selective assay, *Biochem. J*, Vol. 114, p. 629-633.
- Sposito dan Santos, 2011, Histochemical Study of Early Embryo Implantation in Rats, *Int. J. Morphol*, Vol. 29, No.1, p. 187-192.
- Timmins G S, Master S, Rusnak F, Deretic V, 2004, Nitric oxide generated from isoniazid activation by KatG: source of nitric oxide and activity against *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob. Agents Chemother*, Vol. 48, p.3006-3009.
- Zaoui A A, Abdelghani, Salem B H, Ouane W, Hayouni A, Khachnaoui F., *et al*, 2012, Early-onset severe isoniazid-induced motordominant neuropathy: a case report, *Eastern Mediterranean Health Journal*, Vol.18, No.3, p.298-299.