

Analisis Polimorfisme Gen CYP pada Metabolisme Obat Melalui Pendekatan Bioinformatika

¹Windy Dwininda,

²Surya Dwira,

Rafika Indah Paramita

¹Mahasiswa Magister Biomedis

Kekhususan Bioinformatika,

²Staf Pengajar Departemen

Kimia Kedokteran

Fakultas Kedokteran,

Universitas Indonesia

Jakarta.

Penulis korespondensi:

Drs. Surya Dwira, M.Si.

Departemen Kimia Kedokteran,

Fakultas Kedokteran,

Universitas Indonesia

Jl. Salemba Raya No. 6,

Jakarta 10430, Indonesia.

E-mail: suryadwira@gmail.com

ABSTRAK

Xenobiotik merupakan suatu senyawa zat asing yang masuk ke dalam tubuh dalam bentuk obat-obatan, karsinogen, zat tambahan makanan atau bahan lainnya. Zat asing yang masuk akan dimetabolisme oleh enzim salah satunya enzim sitokrom P450 monooksigenase (CYPs) yang terlibat dalam metabolisme senyawa fisiologis penting bagi tubuh. Metabolisme xenobiotik oleh enzim dibagi menjadi dua fase yang bertujuan dalam membentuk xenobiotik yang lebih polar sehingga lebih mudah dieliminasi tubuh. Banyak penelitian mengakui bahwa adanya polimorfisme genetic dari enzim dan transporter yang memetabolisme obat dapat mempengaruhi secara signifikan variasi antar individu dalam merespon obat. Salah satunya adanya SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) merupakan jenis mutasi genetik paling umum yang mengubah pasangan basa tunggal antar atau intra individu. Semakin berkembang database mengenai SNP dikarenakan pengembangan menggunakan pendekatan bioinformatika sehingga identifikasi SNP melalui *in silico* terhadap genom manusia dapat dilakukan dalam skala lebih besar dan luas.

Kata kunci: xenobiotik, enzim sitokrom P450, SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), Bioinformatika.

PENDAHULUAN

Xenobiotik merupakan suatu senyawa zat asing yang masuk ke dalam tubuh. Contohnya adalah obat-obatan, zat karsinogen, zat tambahan makanan, dan bahan lainnya. Tanpa adanya metabolism, maka xenobiotik yang masuk ke dalam tubuh akan menimbulkan efek toksik. Ketika mencapai konsentrasi maksimumnya. Sebagian besar metabolisme memerlukan energi, kofaktor dan enzim.¹ Sitokrom P450 monooksigenase (CYPs) terlibat dalam metabolisme senyawa fisiologis penting pada banyak spesies mikroorganisme, tumbuhan, dan hewan. Pada mamalia, enzim ini berpartisipasi dalam detoksifikasi berbagai xenobiotik seperti lingkungan, racun dan obat-obatan.²

Metabolisme xenobiotic oleh enzim dibagi menjadi 2 fase yaitu fase I dan fase II. Enzim fase I, berfungsi untuk membuat xenobiotik lebih polar dan menyediakan tempat untuk reaksi konjugasi. Enzim fase II, merupakan enzim konjugasi dan dapat langsung berinteraksi dengan xenobiotik tetapi lebih sering berinteraksi dengan metabolit yang dihasilkan oleh enzim fase I. Melalui transpor pasif dan aktif, metabolit yang lebih polar ini dieliminasi. Kebanyakan xenobiotik dibersihkan melalui beberapa enzim dan jalur. Hubungan antara konsentrasi kimia, afinitas dan kuantitas enzim, dan ketersediaan kofaktor sering menentukan reaksi metabolic mana yang mendominasi pada individu tertentu.¹

Enzim sitokrom P450 (CYP) adalah enzim pemetabolisme fase I yang memetabolisme obat-obatan tertentu seperti lansoprazole, omeprazole, proguanil, cyclophosphamide dan karsinogen.³ Sitokrom P450 (CYP) adalah sumber utama variabilitas

dalam farmakokinetik dan respon obat. Dari 57 CYP manusia yang diduga fungsional hanya sekitar belasan enzim, yang termasuk dalam famili CYP1, 2, dan 3, bertanggung jawab atas biotransformasi sebagian besar zat asing termasuk 70-80% dari semua obat yang digunakan pada terapi klinis.⁴ Bentuk ekspresi tertinggi di hati adalah CYPs 3A4, 2C9, 2C8, 2E1, dan 1A2, sedangkan 2A6, 2D6, 2B6, 2C19 dan 3A5 kurang melimpah dan CYPs 2J2, 1A1, dan 1B1 terutama diekspresikan secara ekstrahepatik. Ekspresi masing-masing CYP dipengaruhi oleh kombinasi unik dari mekanisme dan faktor termasuk polimorfisme genetik, induksi oleh xenobiotik, regulasi oleh sitokin, hormon dan selama keadaan penyakit, serta jenis kelamin, usia dan lain-lain.

Semakin banyak bukti yang mengakui bahwa polimorfisme genetik dari enzim dan transporter yang memetabolisme obat dapat secara signifikan mempengaruhi variasi antar individu dalam reaksi dan disposisi obat.⁵

Single Nucleotide Polymorphism (SNP) adalah jenis mutasi genetik paling umum yang mengubah pasangan basa tunggal dalam alel, baik antar atau intra individu. Berkembang pesatnya database SNP karena pengembangan teknik baru untuk identifikasi skala besar SNP dalam genom manusia yaitu melalui analisis Bioinformatika secara *in silico*. Ada beberapa database yang tersedia mengenai SNP, seperti dbSNP, GWAS Central, dan SwissVar.

Oleh sebab itu, dengan studi makalah ini kita ingin melihat bagaimana analisis polimorfisme gen yang memetabolisme obat dengan menggunakan pendekatan Bioinformatika melalui analisis *in silico*.

Sitokrom P 450.

Definisi Sitokrom P 450.

Sitokrom P 450 merupakan superfamili dari isoenzim hemoprotein dengan berbagai klasifikasi. Enzim sitokrom P450 dominan terkandung pada organ hati, intestinal, dan ginjal dengan konsentrasi terbanyak pada organ hati. Sebanyak 57 isoenzim telah ditemukan dan terdapat 6 enzim yang berperan sekitar 90% dalam metabolisme obat yaitu CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYEP2E1, dan CYP3A4.⁶

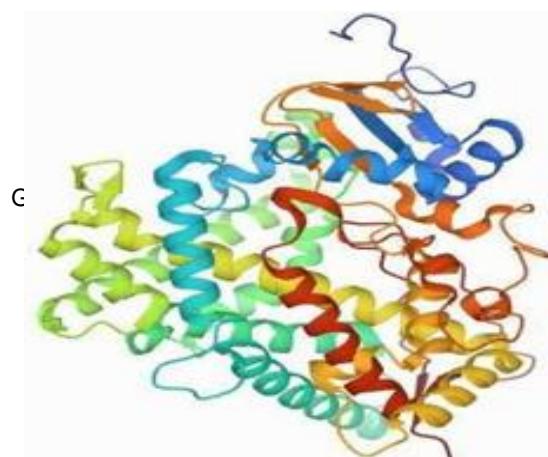
CYPs pada umumnya memiliki dua sisi aktif yaitu sisi aktif dan sisi alosterik, obat dapat memilih secara selektif sehingga berkerja sebagai inducer atau inhibitor. Induksi CYP adalah suatu proses yang terjadi antara

sitokrom p450 yang mencakup oksidasi senyawa xenobiotic. Molekul tersebut berperan dalam regulasi transkripsi. Sedangkan inhibisi CYPs lebih sering terjadi dibandingkan proses induksi CYPs. Pada prinsipnya, induksi CYPs adalah mekanisme metabolisme berdasarkan interaksi antar obat dan berkompetisi dengan molekul obat lain yang memiliki sisi aktif yang sama pada CYPs. Inhibisi CYPs dapat menyebabkan perubahan biotransformasi obat.⁷

Selain katabolisme obat, enzim CYP juga berperan penting dalam aktivasi prodrug, seperti antikanker dan antipsikosis. Prodrug adalah suatu senyawa inaktif yang memerlukan aktivasi untuk memberikan efek farmakologis. Aktivasi prodrug melalui perubahan metabolic dengan disesuaikan dengan karakteristik tempat dan waktu obat untuk bereaksi dengan target. Prodrug biasa digunakan untuk obat-obat anti kanker yang dapat bereaksi pada target reseptornya yang spesifik agar dapat mengurangi efek samping yang ditimbulkan. Prodrug dapat diaktifkan melalui iradiasi foto, perubahan pH dan enzimatik seperti halnya enzim CYPs. Polimorfisme pada CYPs dapat menimbulkan adanya perubahan atau penurunan efektivitas terhadap aktivasi prodrug. Empat jenis CYPs yang memiliki potensi paling tinggi membentuk polimorfisme (1A2, 2C9, 2C19, dan 2D6) yang akan mempengaruhi aktivitas kerja enzim yang ditunjukkan dalam gambar.⁸

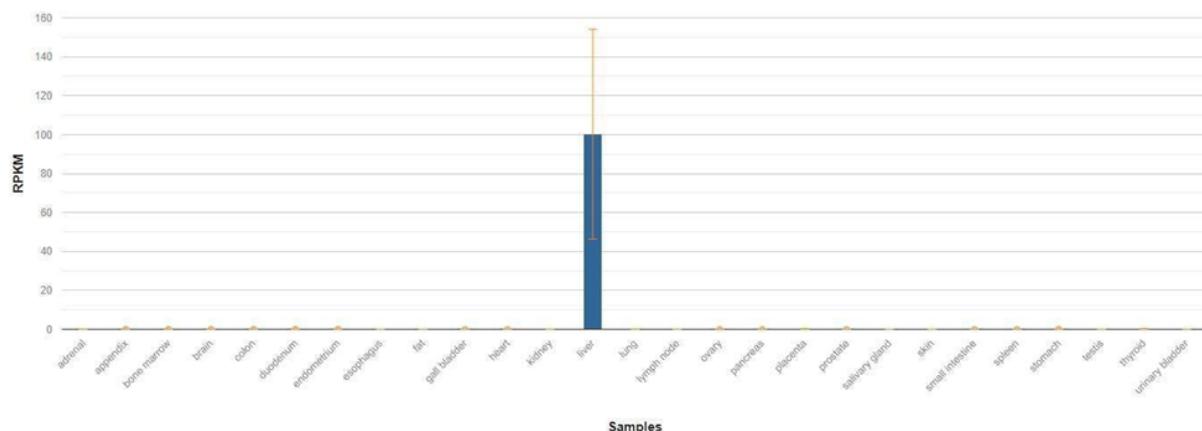
Enzim CYP1A2.

Enzim mikrosomal kelas 1 sitokrom P450 memainkan peran penting dalam detoksifikasi xenobiotik dan aktivasi prokarsinogen. Reaksi yang dikatalisis P450 melibatkan berbagai substrat, dan keserbagunaan ini tercermin dalam keragaman struktural terbukti di situs aktif dari struktur P450 yang tersedia. Struktur P450 1A2 pada manusia berikatan kompleks dengan inhibitor alpha-naphthoflavone ditentukan pada resolusi 1,95 Å. Alpha-Naphthoflavone terikat di situs aktif di atas permukaan distal dari kelompok prostetik heme. Strukturnya menunjukkan rongga situs aktif yang kompak dan tertutup yang sangat disesuaikan untuk pemasian dan oksidasi substrat planar yang relatif besar.⁹



Sumber: <https://www.rcsb.org/structure/2HI4>
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1544#section=Protein-3D-Structures>

Berdasarkan data dari NCBI bahwa ekspresi gen CYP1A2 terkespensi secara dominan dalam organ hati.

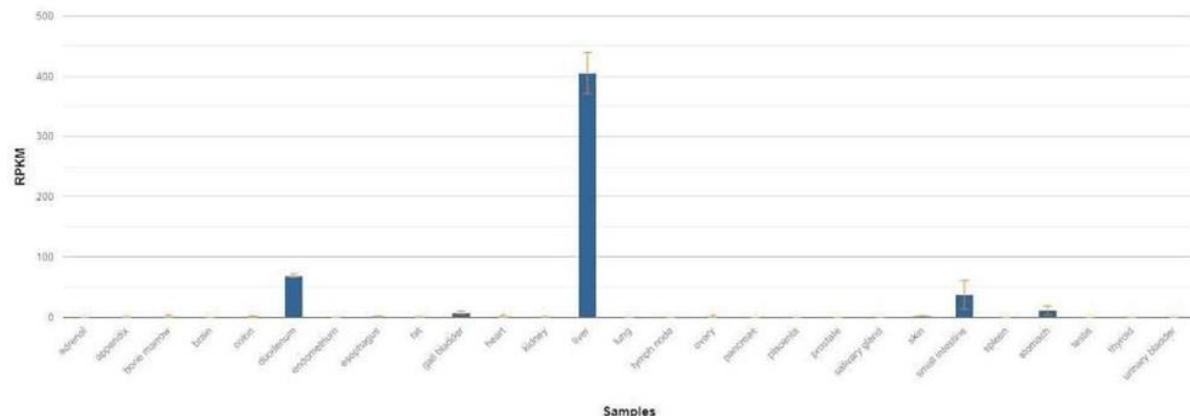


Gambar 2. Posisi ekspresi gen CYP1A2.

Enzim CYP2C9.

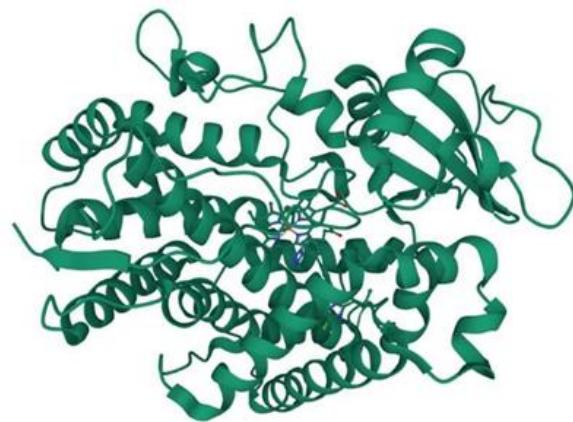
CYP2C9 merupakan enzim subfamili CYP2C paling banyak terkandung dalam hati manusia dan berperan penting dalam metabolisme obat (ann k daly). Adanya polimorfisme

pada CYP2C9 menunjukkan penurunan aktivitas enzim. Obat dengan efek terapi sempit menjadi salah satu poin perhatian dalam memantau keamanan dan efikasi obat.¹⁰



Gambar 3. Posisi ekspresi gen CYP2C9 dalam tubuh. Sumber: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1559>

CYP2C9 berkontribusi besar dalam memetabolisme obat dalam tubuh. Struktur CYP2CD tidak jauh berbeda dengan CYP2C9. Pada kedua enzim CYPs tersebut memiliki active site yang berbeda dan CYP2D6 merujuk pada molekul-molekul dasar sedangkan CYP2C9 cenderung memiliki komponen asam.¹¹



Gambar 4. Struktur 3D CYP2C9.

Sumber: <https://www.rcsb.org/3d-view/6VLT>

Enzim CYP2C19.

CYP2C19 merupakan polimorfik gen yang dapat mempengaruhi metabolisme obat. Gen ini berada pada posisi kromosom 10 yang memiliki 9 ekson dan 8 intron.³ Sebanyak 28 varian alel pada CYP2C19 telah ditemukan, polimorfisme pada CYP2C19 dapat menyebabkan adanya perubahan fenotipe secara farmakogenetik dan dikenal dengan poor metabolizer atau extensive metabolizer.

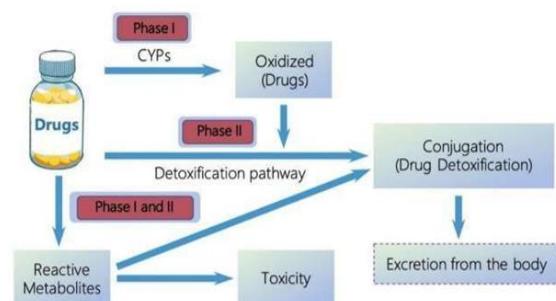
Perbedaan fenotip ini menunjukkan adanya perbedaan dalam proses farmakokinetik dan farmakodinamik serta efek samping yang muncul pada saat terapi.¹² Beberapa contoh obat yang banyak digunakan dan dimetabolisme oleh CYP2C19 sebagai berikut: obat antiplatelet (Clopidogrel), pompa proton inhibitor (omeprazole, lansoprazole), antikonvulsan (fenitoin, diazepam) antidrepresan trisiklik (amitriptylin). Studi menunjukkan bahwa polimorfisme CYP2C19 menyebabkan respon yang beragam terhadap clopidogrel. Resiko kejadian kardiovaskular meningkat pada pasien dengan poor metabolizer meskipun pasien mendapatkan dosis yang sesuai.¹³

CYP2D6.

Sitokrom P450 2D6 (CYP2D6) adalah sangat penting untuk farmakogenetik dan sekarang dianggap terlibat dalam metabolisme hingga 25% dari obat yang umum digunakan di klinik. Di antara CYP yang memetabolisme obat, CYP2D6 adalah satu-satunya enzim yang tidak dapat diinduksi, yang menghasilkan kontribusi besar variasi genetik terhadap variasi antar individu dalam aktivitas. CYP2D6 sangat polimorfik, dengan lebih dari 90 varian alelik yang diketahui. Polimorfisme CYP2D6 memiliki implikasi di banyak terapeutik yang berbeda, sebab beragam obat yang digunakan secara klinis dan dimetabolisme oleh CYP2D6.¹⁴

Mekanisme Metabolisme Obat.

Metabolisme obat merupakan suatu proses perubahan molekul secara kimia setelah masuk ke dalam tubuh. Pada umumnya, metabolisme obat mengakibatkan penurunan efek terapi. Sebagian besar obat bersifat lipofilik yang kemudian dikonversi menjadi hidrofilik selama proses biotransformasi sehingga meningkatkan kelarutan dalam air dan terleminiasi di urin atau hati. Biotransformasi merupakan proses yang penting dalam metabolisme obat karena sifat lipofilik dapat menyebabkan konsentrasi obat dalam tubuh bertahan lebih lama. Kondisi tersebut berpotensi menyebabkan efek toksik. Metabolisme obat terbagi dalam 2 fase yaitu fase 1 dan fase 2.⁷



Gambar 5. Mekanisme Metabolisme Obat.

Pada tahap 1 terjadi proses oksidasi, reduksi dan hidrolisis sehingga obat tidak dapat disekresikan dari tubuh. Obat yang dimodifikasi kemudian dikonjugasi menjadi senyawa polar dalam reaksi fase II, yang dikatalisis oleh berbagai transferase enzim, seperti uridine diphosphate (UDP)-glucuronosyltransferases, sulfotransferases, dan glutathione S-transferases.⁷

Single Nucleotide Polymorphism (SNP).

Polimorfisme muncul melalui mutasi. Mutasi yang terjadi dapat disebabkan salah satunya karena perubahan salah satu jenis basa nukleotida lain melalui penyisipan, penghapusan, atau penataan ulang nukleotida. Sebuah polimorfisme nukleotida tunggal muncul pada satu situs nukleotida tertentu. Molekul DNA pada suatu populasi sering ditemukan cukup berbeda di populasi misalnya, beberapa DNA molekul dalam populasi yang sama mungkin memiliki basa T-A berpasangan pada situs nukleotida tertentu,

sedangkan DNA lainnya molekul dalam populasi yang sama mungkin memiliki basa C-G berpasangan di situs yang sama. Perbedaan ini merupakan SNP. SNP mendefinisikan dua alel yang mungkin terdapat perbedaan genotipe di antara individu-individu dalam populasi.¹⁵

Pengaruh Polimorfisme terhadap Metabolism.

Perubahan fenotyp pada CYPs telah teridentifikasi sebanyak 3 jenis yaitu poor metabolizer (PM), intermediate metabolizer (IM), dan ultrarapid metabolizer (UM).¹⁸

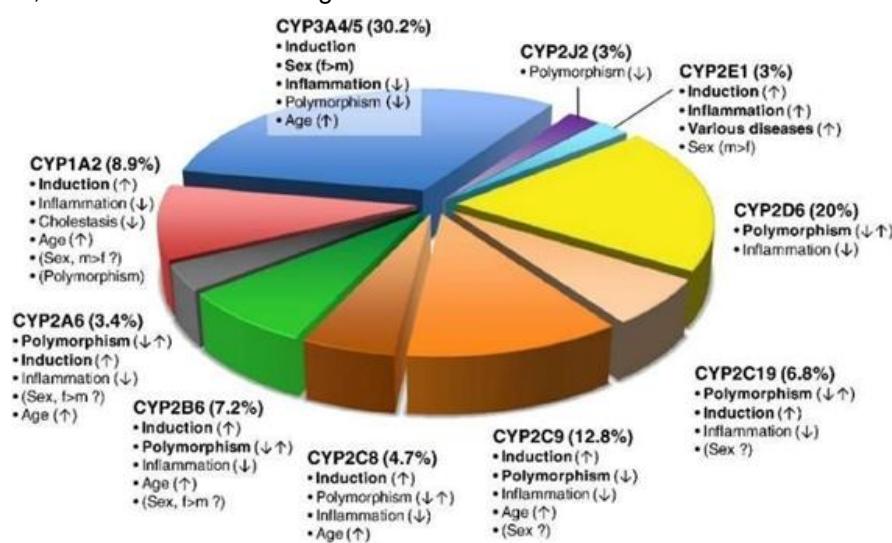
Drug type	Metabolizer phenotype	Effect on drug metabolism	Potential consequence
Prodrug, needs metabolism to work (e.g., codeine metabolized to morphine)	Poor to intermediate	Slow	Poor drug efficacy, patient at risk of therapeutic failure Accumulation of prodrug, patient at increased risk of drug-induced side effects
	Ultrarapid	Fast	Good drug efficacy, rapid effect
Active drug metabolized to inactive drug (e.g., omeprazole [Prilosec] metabolized to 5-hydroxyomeprazole)	Poor to intermediate	Slow	Good drug efficacy Accumulation of active drug, patient at increased risk of drug-induced side effects Patient requires lower dosage
	Ultrarapid	Fast	Poor drug efficacy, patient at risk of therapeutic failure Patient requires higher dosage

NOTE: Poor metabolizers have markedly reduced or absent enzyme activity; intermediate metabolizers have reduced enzyme activity; and ultrarapid metabolizers have high enzyme activity.

Gambar 6. Perubahan fenotyp pada polimorfisme.

Analisis mengenai profil aktivitas mekanisme obat, variabilitas antar individu, ekspresi regulasi, dan efek variasi genetik

terhadap dampak fungsi dan klinis yang dimetabolisme p450s.⁴



Gambar 7. Variasi genetik terhadap fungsi klinis.

Analisis Polimorfisme dengan Pendekatan Bioinformatika.

Bioinformatik menjadi salah satu peran penting dalam pengembangan, penemuan, dan penilaian obat. Identifikasi polimorfisme suatu obat melalui pendekatan bioinformatika *in silico* dapat memberikan informasi mengenai efek samping dan reaksi ditimbulkan dalam tubuh oleh obat yang sulit dianalisis sebab identifikasi tersebut harus dilakukan secara berulang menggunakan gen polimorfisme berbeda.¹² Pendekatan *in silico* telah dikembangkan terutama untuk skrining SNP dan mendeteksi efek nsSNP yang merusak protein kandidat. Banyak alat juga dapat memprediksi perubahan struktural 3D berdasarkan substitusi asam amino tunggal dalam protein.¹⁶

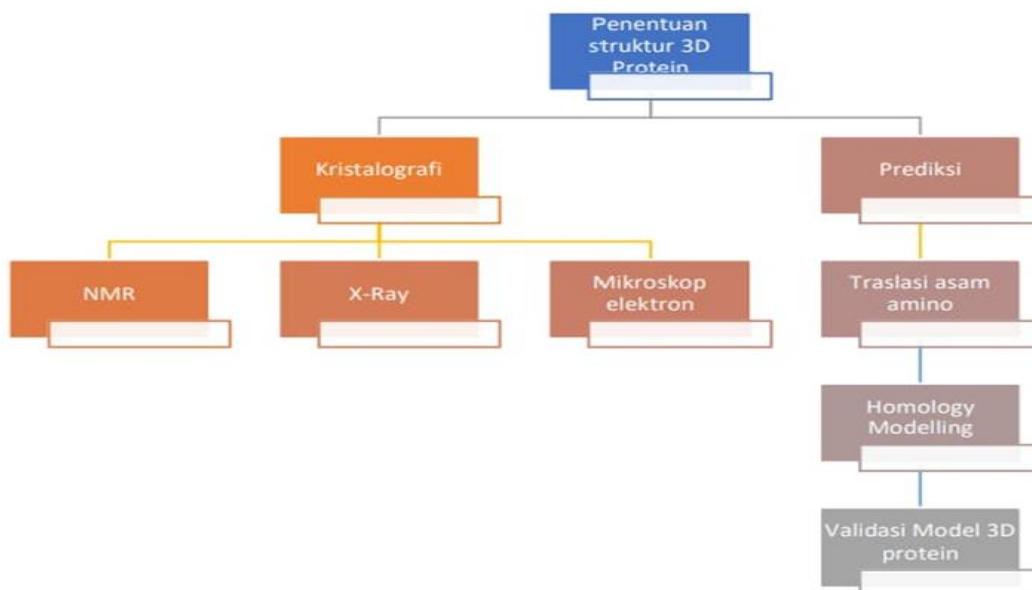
Dalam memprediksi efek misens, nonsense, delesi, insersi duplikasi atau mutase

frameshift membutuhkan analisis struktur 3D dari protein untuk memahami peran residu dalam stabilisasi stuktural dari salah satu domain, ikatan dengan substrat, kofaktor, obat atau interaksi dengan domain biomakromolekul lain.¹⁷

Semakin berkembang dan meningkatnya jumlah urutan genom yang teridentifikasi memberikan informasi baru terhadap variasi genetic pada manusia. Hal tersebut memicu untuk dilakukan identifikasi protein yang berubah dalam variasi tersebut, dan pendekatan analisis identifikasi yang dapat dilakukan adalah analisis struktur 3D.¹⁸

Penentuan Struktur 3D protein

Struktur 3D protein resolusi tinggi yang dihasilkan oleh metode prediksi *in silico* dapat secara signifikan mengurangi tenaga, waktu, dan biaya eksperimen di laboratorium.¹⁹



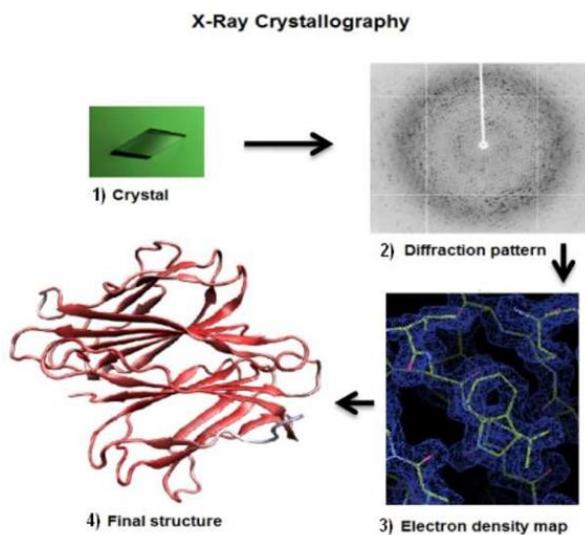
Kristalografi

Dalam mendapatkan suatu struktur protein 3D dapat dilakukan dengan kristalografi sinar-X atau dengan NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Melalui dua metode ini kita dapat menyaring dan memperbaiki kordinat atom yang menjadi kendala dalam penentuan struktur secara eksperimental. Kualitas struktur dari kristalografi sinar-X atau spektroskopi NMR ditentukan oleh data eksperimen, tetapi kualitas model yang disempurnakan didasarkan pada interpretasi model melalui pendapat analisis peneliti. Dalam kebanyakan kasus, kebebasan dalam interpretasi hasil model ini dapat menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi hasil yang

bias.²⁰ Terdapat 3 cara kristalografi yang dapat dilakukan dalam menentukan struktur 3D molekul, antara lain:

A. X-Ray.

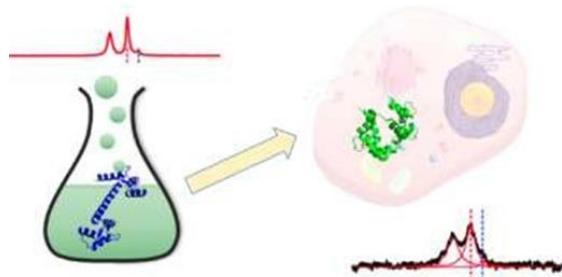
Struktur protein pertama yang ditentukan oleh kristalografi sinar-X diselesaikan pada akhir 1950-an. Sejak keberhasilan itu, lebih dari 60 ribu struktur kristal sinar-X dari protein, asam nukleat dan makromolekul biologis lainnya telah ditentukan. Kristalografi sinar-X digunakan menentukan susunan atom dalam kisi kristal. Prosedur struktur 3D memperoleh terdiri dari empat langkah utama.²⁰



Gambar 8. Prosedur struktur 3D dengan X-ray.

B. NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*).

Spektroskopi resonansi nuklir (NMR) adalah metode rutin untuk menentukan struktur protein dan kompleks protein pada resolusi atom dan dapat juga memberikan banyak informasi mengenai interaksi konformasi dan dinamika yang terjadi dalam skala waktu mulai dari picoseconds ke detik atau bahkan hari dan dalam berbagai sampel keadaan mulai dari larutan encer hingga sel hidup.²¹



Gambar 9. Nuclear Magnetic Resonance.

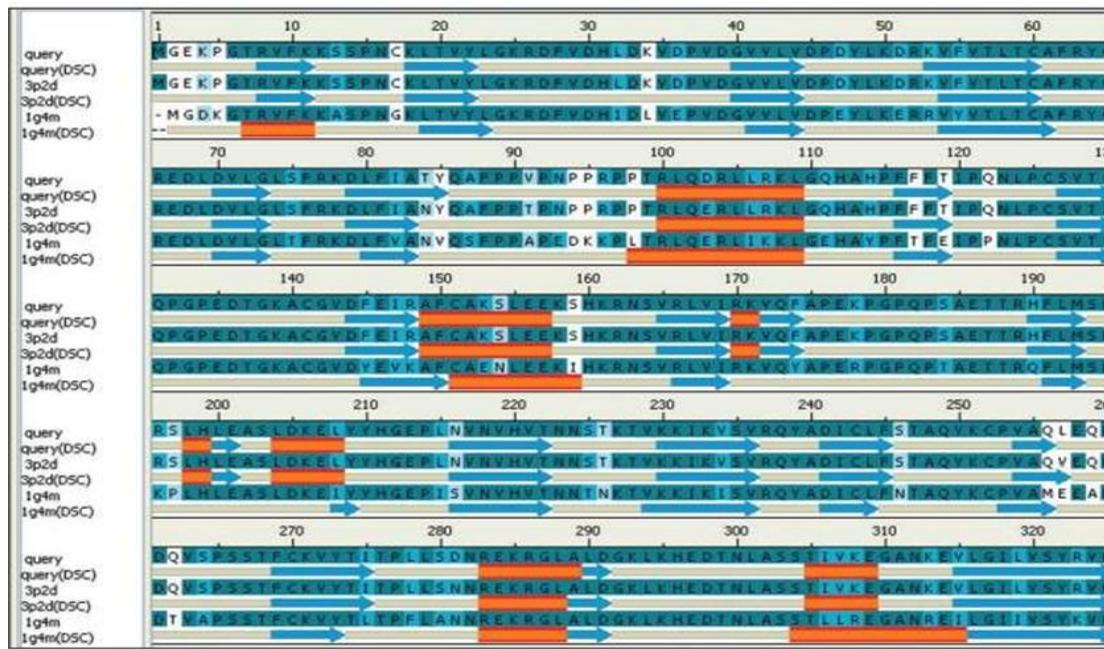
C. Mikroskop Cryo-Elektron.

Penentuan struktur protein dengan *cryo-electron microscopy* (EM) telah membuat kemajuan yang signifikan dalam beberapa dekade terakhir. Resolusi peta EM telah meningkat sebagaimana dibuktikan oleh struktur yang baru-baru ini dilaporkan yang diselesaikan pada resolusi tinggi mendekati 3. Metode komputasi memainkan peran kunci dalam menafsirkan data EM. Metode cryo-EM dapat digunakan untuk menentukan struktur tiga dimensi biomakromolekul dalam kondisi mendekati asli mendekati resolusi atom, dan memiliki potensi untuk mengungkapkan konformasi kompleks molekul dinamis.²²

Prediksi struktur 3D.

A. Translasi Asam Amino.

Ini adalah langkah awal dimana program/server bandingkan urutan struktur yang tidak diketahui dengan struktur yang diketahui yang terdapat dalam protein data bank (PDB). Sebserver yang paling banyak digunakan adalah BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). BLAST tidak dapat menemukan template saat urutannya identitas jauh di bawah 30%.¹⁹



Gambar 10. Sekuen Kueri pada BLAST.

B. Homology Modelling.

Pemodelan homologi adalah prediksi struktur protein berbasis pengetahuan. Dalam pemodelan homologi urutan protein dengan struktur yang tidak diketahui (target) disejajarkan dengan satu atau lebih urutan protein dengan struktur yang diketahui (templat). Metode pemodelan homologi didasarkan pada prinsip bahwa protein homolog memiliki struktur yang serupa.²³

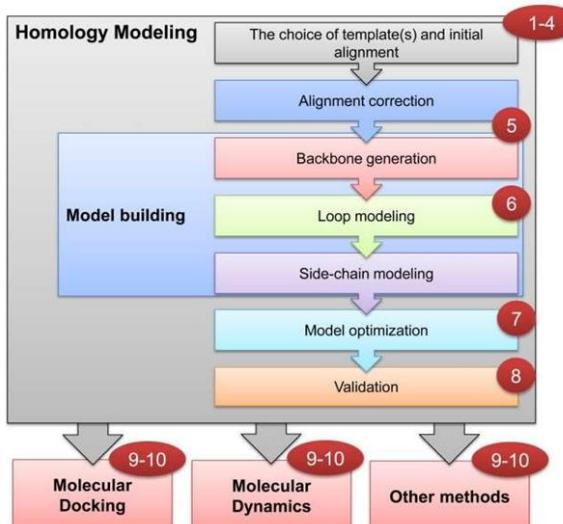
Homology modelling telah menjadi teknik yang cukup penting dalam analisis biologi struktural, yang secara signifikan mengurangi kesenjangan antara urutan protein yang diketahui dan struktur yang ditentukan secara eksperimental. Dengan adanya homology modelling, peneliti, dengan alur kerja yang lebih sederhana dapat melakukan analisis struktur 3D dengan lebih mudah tanpa ada keahlian khusus untuk mendapatkan struktur, visualisasi dan interpretasi.²⁴

Dalam pengembangannya, tahapan homology modeling terdiri dari beberapa langkah yang dapat diringkas sebagai berikut:²⁵

1. Identifikasi templat.
2. Sekuen alignment tunggal atau ganda.
3. Pembentukan model struktur target berdasar struktur 3D template.
4. Analisis model (analisis alignment, gap yang terinsersi atau teradisi).
5. Validasi model.

Pemilihan Template.

Prosesnya dimulai dengan memilih struktur 3D template terbaik, di mana: urutan target dapat berhasil di-thread. Penjajaran pertama untuk pencarian template biasanya dilakukan dengan menggunakan Matriks Substitusi BLOK (mis., BLOSUM62). Penyelarasan kedua (juga dikenal sebagai koreksi penyela-



Gambar 11. Alur kerja Homologi Modeling.²⁴

rasan) digunakan untuk membangun struktur 3D tulang punggung. Di Sini, urutan dan struktur atau beberapa penyelesaian menerapkan matriks penilaian posisi-spesifik. Template untuk pemodelan homolog dari database. Kristalografi sinar-X dan nuklir resonansi magnetik (NMR). Awalnya, pemodel melakukan Protein Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) pencarian (blast.ncbi.nlm.nih.gov) menggunakan urutan protein target sebagai kueri dan PDB sebagai database. Pencarian BLASTp (p singkatan dari protein) sudah cukup untuk mengetahui struktur 3D mana yang memiliki identitas dan cakupan kueri yang tinggi.²⁵

Pembentukan Model.

Setelah dilakukan pemilihan template, langkah selanjutnya dalam pemodelan homolog adalah pembentukan model. Cara yang digunakan dalam pembentukan model sangat bervariasi.²⁵

Model Validasi.

Setiap tahap pada homolog modelling bergantung pada proses-proses sebelumnya. Oleh karena itu, kesalahan mungkin terjadi dalam proses tersebut, sehingga model validasi dan analisis struktur protein sangat diperlukan. Model protein dapat dievaluasi secara keseluruhan maupun individu. Kesalahan dalam pembentukan model sangat umum dan diperlukan adanya validasi untuk penyempurnaan. Kesalahan dalam model dapat disebabkan oleh superposisi model dari struktur asli dan perhitungan nilai RMSD, ataupun nilai Z-score, dalam mengukur statistik signifikansi antara struktur yang cocok untuk homology modelling.²⁵

Berikut beberapa web server yang dapat digunakan dalam analisis homolog modeling:

Programs Name	WWW address	Availability
SWISS-MODEL*	http://swissmodel.expasy.org/	Academically free
MODELLER**	http://salilab.org/modeller/	Academically free
ExPASy *	http://www.expasy.ch/tools/	Academically free
BLAST*	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Academically free
SCHRODINGER**	http://www.schrodinger.com	Commercial
WHATIF*	http://swift.cmbi.kun.nl/whatif/	Academically free
SYBYL**	http://www.tripos.com	Commercial
SNPWEB*	http://modbase.compbio.ucsf.edu/LS-SNP/	Academically free
ICM	http://www.molsoft.com/homology.html	Academically free
SEA *	http://bioinformatics.burnham.org/sea/	Academically free
SCWRL*	http://www1.jcsg.org/prod/scripts/scwrl/serve.cgi	Academically free
EVA*	http://rostlab.org/cms/index.php?id=94	Academically free
VERIFY3D*	http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D/	Academically free
MOE**	http://www.chemcomp.com/software.htm	Commercial
GOLD**	http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/	Commercial
PROCHECK*	http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/	Academically free

Gambar 11. Contoh web server Homolog Modeling.

Analisis Validasi Struktur 3D Molekular Docking.

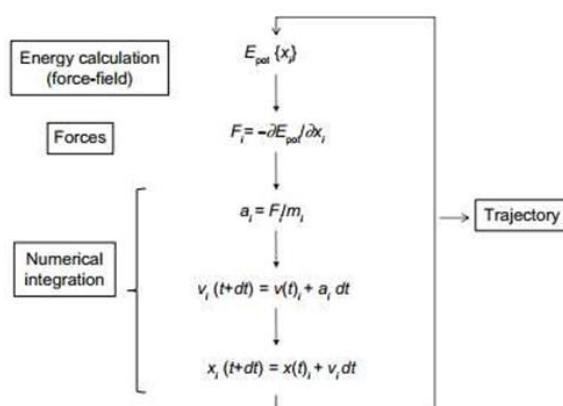
Molekuler docking adalah untuk memahami interaksi biomolekuler obat untuk desain dan penemuan obat yang rasional, seperti studi yang menganalisis penempatan molekul (ligan) ke dalam situs pengikatan yang berada pada daerah spesifik RNA/protein (reseptor) terutama secara ikatan non kovalen membentuk kompleks yang stabil. Teknik docking dapat digunakan dalam mendapat informasi berupa binding energy, energi bebas dan stabilitas kompleks suatu molekul senyawa. Saat ini, teknik docking adalah digunakan untuk memprediksi parameter pengikatan sementara ligan-reseptor kompleks sebelumnya.²⁶

Molekular Dinamik.

Simulasi molekuler dinamik adalah suatu proses yang dapat memprediksi bagaimana setiap atom dalam protein atau lainnya akan bergerak secara sistem molekul dari waktu ke waktu, berdasarkan model umum fisika yang mengatur interaksi antar atom. Simulasi ini dapat menangkap berbagai macam proses biomolekuler penting, termasuk perubahan konformasi, pengikatan ligan, dan pelipatan protein, sehingga dapat melihat posisi semua atom pada femtosecond dengan resolusi tertentu.

Pada simulasi ini juga dapat memprediksi bagaimana biomolekul akan merespon-pada tingkat atom-terhadap gangguan seperti mutasi, fosforilasi, protonasi, atau penambahan atau penghapusan ligan. Simulasi MD sering digunakan dalam kombinasi dengan berbagai teknik biologi struktural eksperimental, termasuk kristalografi xray, mikroskop cryo-electron (cryo-EM), reso-nansi magnetik nuklir (NMR), resonansi paramagnetik elektron (EPR), dan transfer energi resonansi Forster.²⁷

Semua trajektori dianalisis menggunakan modul analisis yang terdapat dalam paket simulasi server, contohnya GROMACS, trajektori dianalisis menggunakan konformasi parameter gmx, gmx rmsd, gmx rmsf, gmx gyrate, gmx sasa, gmx hbond, gmx covar, gmx anaeig, gmx energy, gmx do_dssp, dan GROMACS gmx sham untuk mengekstrak grafik Root Mean Square Deviation (RMSD), Root Mean Square Fluctuation (RMSF), radius girasi (Rg), luas permukaan yang dapat diakses pelarut (SASA), ikatan hidrogen, prinsipal komponen, struktur sekunder, dll. Semua grafik diplot menggunakan alat Qt Grace Visualization.²⁸



Gambar 12. Algoritma Dasar Molekular Dinamik.²⁷

Contoh Penelitian polimorfisme CYP dengan metode in silico.

Polimorfisme Gen CYP2C19*2 dan CYP2C9*3³

Peneliti Joshi K. et al., melakukan analisis polimorfisme CYP2C19 menggunakan sampel kontrol positif untuk subjek dengan polimorfisme gen dan kontrol negatif untuk subjek normal. Pemeriksaan tersebut dilakukan dengan tahap genotyping DNA dengan menggunakan PCR-RFLP sehingga didapatkan produk protein yang kemudian dilakukan pendekatan

analisis molecular dinamik. Dua jenis varian CYP2C19*2 dan CYP2C19*3 dibandingkan dengan wildtype/normal CYP2C19. Pada proses *genotyping* terlihat bahwa terdapat kemungkinan polipeptida tersier pada kedua varian tersebut tidak stabil dan menunjukkan adanya deformasi situs pengikatan protein. Selain itu, residu pada protein mutan terjadi perubahan sehingga menyebabkan penurunan fungsi protein.³

A. Preparasi dan Validasi Struktur.

Data mengenai struktur tersier dari CYP2C19 diambil dari website protein data bank (PDB) dengan ID: 4GQS dan untuk struktur tersier pada mutan dilakukan preparasi dengan menggunakan software PyMOL. Software PyMOL ini digunakan dalam mendesain struktur tersier dari CYP2C19*2 dan CYP2C19*3 menggunakan rantai A dari data PDB. Setelah itu dilakukan validasi pada struktur wildtype dan mutant menggunakan webserver seperti SAVES (Struktural analysis and verification server), ProSA (Protein Structure Analysis), dan QMEAN (Qualitative model energy analysis). Semua webserver tersebut dapat digunakan untuk melihat parameter stereokimia dan kualitas struktur protein.³

B. Simulasi Molecular Dynamics.

Tahapan simulasi dinamika molecular menggunakan GROMACS (GROningen Mechine for Chamical Simulation) 5.0. Pertama, dilakukan analisis topologi pada kedua gen (mutan dan wildtype) untuk dilakukan penurunan energi sehingga berada pada kondisi system yang sama (equal). Pada proses ini didapatkan nilai RMSD (Root mean square deviation), RMSF (root mean square fluctuation) dan Rg (Radius of gyration).³

C. Interaksi Struktur Residu.

Optimasi struktur hasil *molecular docking* digunakan dalam melihat hubungan interaksi antar residu melalui NAPS (Network Analysis Protein Structure). Webserver NAPS akan menghitung jarak antar residu. Semua struktur 3D protein yang didapat kemudian dibuat dalam software PyMOL.³

Hasil Analisis Penelitian CYP2C9-Warfarin.²⁹

Melalui analisis dinamika molekular Suguna, et al., dapat melihat bahwa adanya afinitas yang kuat antara residu warfarin dan residu CYP2C9. Afinitas energi interaksi warfarin dengan enzim CYP2C9 sebesar -10.2 (kcal/mol).

Residu yang berikatan kompleks dengan subtract yaitu Phe 100, Ala 103 serta jarak ikatan antara warfarin dengan residu adalah 3,0-3,6. Dari informasi tersebut dapat dilihat bahwa terjadi interaksi yang cukup kompleks baik antara obat-obat ataupun interaksi obat dengan protein. Adanya polimorfisme pada daerah coding region pada CYP2C9 menghasilkan varian residu asam amino 144 (Arg144Cys) dan 359 (Ile359Leu) pada protein CYP2C9. Indivi dengan homozygous dengan Leu359 menandakan terjadinya penurunan kapasitas metabolisme meskipun jumlah alel homozygote ini cenderung lebih sedikit ditemukan.²⁹

Analisis CYP2C9*30³⁰

Polimorfisme CYP2C9*30 ditemukan pada subjek Japanese yang dilakukan oleh Louiet *et al.*, dan didapat hasil bahwa terjadi penurunan respon efek obat antihypersensitif yaitu Losartan. Eksperimen secara *in vitro* menunjukkan bahwa interinsik klirens pada losartan, natrium diclofenac dan glimepiride terjadi penurunan disebabkan adanya polimorfisme enzim CYP2C9*30 (mutase A477T). Analisis secara struktur kristal antara wildtype dan mutan (CYP2C9*30) tidak terlihat adanya perubahan yang signifikan jika dinilai dari nilai RMSD yaitu 2.0 Å. Kemudian dilakukan analisis dengan simulasi molekular dinamik untuk menganalisis efek substitusi asam amino terhadap metabolisme obat atau selektifitas regio dari CYP. Dari hasil tersebut didapat bahwa perubahan molecular dinamik konformasi menyebabkan penurunan aktivitas katalis dan dinamika protein disebabkan mutase misens berperan penting dalam regulasi, pengenalan dan metabolisme substrat CYP2C9.³⁰

KESIMPULAN

Bioinformatik menjadi salah satu peran penting dalam pengembangan, penemuan, dan penilaian obat. Identifikasi polimorfisme suatu obat melalui pendekatan bioinformatika *in silico* dapat memberikan informasi mengenai efek samping dan reaksi ditimbulkan dalam tubuh oleh obat yang sulit dianalisis sebab identifikasi tersebut harus dilakukan secara berulang menggunakan gen polimorfisme berbeda.¹² Pendekatan *in silico* telah dikembangkan terutama untuk skrining SNP dan mendeteksi efek nsSNP yang merusak protein kandidat. Banyak alat juga dapat memprediksi perubahan struktural 3D berdasarkan substitusi asam amino tunggal dalam protein.¹⁶

Semakin berkembang dan meningkatnya jumlah urutan genom yang teridentifikasi memberikan informasi baru terhadap variasi genetic pada manusia. Hal tersebut memicu untuk dilakukan identifikasi protein yang berubah dalam variasi tersebut, dan pendekatan analisis identifikasi yang dapat dilakukan adalah analisis struktur 3D¹⁸ secara *in silico* melalui prediksi struktur 3D dengan homologi modelling yang memiliki kelebihan yang lebih efisien dan efektif dalam proses analisisnya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Croom E. General Metabolism of Xenobiotics with Examples from Chemicals in the Human Environment. 2012; Progress i.
2. Sanchez G. Las instituciones de ciencia y tecnología en los procesos de aprendizaje de la producción galoalimentaria en Argentina. El Sist argentino innovación Inst Empres y redes El desafío la creación y apropiación Conoc. 2013;155(October 2006):659-64.
3. Joshi K, Kaur S, Kumar R. Cytochrome P450 2C19 gene polymorphisms (CYP2C19*2 and CYP2C19*3) in chronic myeloid leukemia patients: *in vitro* and *in silico* studies. J Biomol Struct Dyn [Internet]. 2021;0(0):1-14. Available from: <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1929491>
4. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. Pharmacol Ther [Internet]. 2013;138(1):103-41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>
5. Liao D, Liu Z, Zhang Y, Liu N, Yao D, Cao L, *et al.* Polymorphisms of Drug-Metabolizing Enzymes and Transporters Contribute to the Individual Variations of Erlotinib Steady State Trough Concentration, Treatment Outcomes, and Adverse Reactions in Epidermal Growth Factor Receptor-Mutated Non-Small Cell Lung C. Front Pharmacol. 2020;11:1-11.
6. Gilani B. Biochemistry, Cytochrome P450 [Internet]. StatPearls Publishing; 2021. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557698/#_NBK557698_pubdet
7. Zhao M, Ma J, Li M, Zhang Y, Jiang B, Zhao X, *et al.* Cytochrome p450 enzymes and drug metabolism in humans. Int J Mol Sci. 2021;22(23):1-16.
8. Preissner SC, Hoffmann MF, Preissner R, Dunkel M, Gewiess A, Preissner S.

- Polymorphic cytochrome P450 enzymes (CYPs) and their role in personalized therapy. *PLoS One.* 2013;8(12):1-12.
- 9. Sansen S, Yano JK, Reynald RL, Schoch GA, Griffin KJ, Stout CD, Johnson EF. Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2. *J Biol Chem.* 2007;
 - 10. Daly AK, Rettie AE, Fowler DM, Miners JO. Pharmacogenomics of CYP2C9: Functional and clinical considerations. *J Pers Med.* 2018;8(1):1-31.
 - 11. Kato K, Nakayoshi T, Nokura R, Hosono H, Hiratsuka M, Ishikawa Y, et al. Deciphering structural alterations associated with activity reductions of genetic polymorphisms in cytochrome p450 2a6 using molecular dynamics simulations. *Int J Mol Sci.* 2021;22(18).
 - 12. Khalil SI, Awad TAA, Mohammed WSA, Elbager SJ, Elmoselhy AM, Alfaki MAI. In Silico Genetic Variation Analysis of Cytochrome P450 2C19 and Their Effect in Certain Drugs Metabolism. *Am J Bioinforma Res.* 2017;7(2):59-65.
 - 13. Saeed LH, Mayet AY. Genotype-phenotype analysis of CYP2C19 in healthy saudi individuals and its potential clinical implication in drug therapy. *Int J Med Sci.* 2013;10(11):1497-502.
 - 14. Pharmgkb. Very Important Pharmacogene: CYP2D6 [Internet]. 2021. Available from: <https://www.pharmgkb.org/vip/PA166170264/literature>
 - 15. Ismail S, Essawi M. Genetic polymorphism studies in humans. *Middle East J Med Genet.* 2012;1(2):57-63.
 - 16. Islam MJ, Khan AM, Parves MR, Hossain MN, Halim MA. Prediction of Deleterious Non-synonymous SNPs of Human STK11 Gene by Combining Algorithms, Molecular Docking, and Molecular Dynamics Simulation. *Sci Rep [Internet].* 2019;9(1):1-16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-52308-0>.
 - 17. Krebs FS, Zoete V, Trottet M, Pouchon T, Bovigny C, Michielin O. Swiss-PO: a new tool to analyze the impact of mutations on protein three-dimensional structures for precision oncology. *npj Precis Oncol [Internet].* 2021;5(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41698-021-00156-5>
 - 18. Hicks M, Bartha I, Di Iulio J, Craig Venter J, Telenti A. Functional characterization of 3D protein structures informed by human genetic diversity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019;116(18):8960-5.
 - 19. Tobias Schmidt, Andreas Bergner and TS. Modelling three-dimensional protein structures for applications in drug design. © 2013 Elsevier Ltd All rights Reserved. 2014;
 - 20. Kumar S, Demo G, Koca J, Wimmerova M. In Silico Engineering of Proteins That Recognize Small Molecules. *Protein Eng.* 2012;(May 2014).
 - 21. Hu Y, Cheng K, He L, Zhang X, Jiang B, Jiang L, et al. NMR-Based Methods for Protein Analysis. *Anal Chem.* 2021;93(4):1866-79.
 - 22. Morris et al. 2012. 基因的改变NIH Public Access. *Gerontology.* 2015;61(6):515-25.
 - 23. Wiltgen M, Tilz GP. Homology modelling: Eine übersicht über die methode am beispiel der strukturbestimmung vom diabetes antigen GAD 65. *Wiener Medizinische Wochenschrift.* 2009;159(5-6):112-25.
 - 24. Haddad Y, Adam V, Heger Z. Ten quick tips for homology modeling of high-resolution protein 3D structures. *PLoS Comput Biol [Internet].* 2020;16(4):1-19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007449>
 - 25. Vyas VK, Ukwala RD, Ghate M, Chintha C. Homology modeling a fast tool for drug discovery: Current perspectives. *Indian J Pharm Sci.* 2012;74(1):1-17.
 - 26. Dar AM, Mir S. Molecular Docking: Approaches, Types, Applications and Basic Challenges. *J Anal Bioanal Tech.* 2017;08(02):8-10.
 - 27. Hospital A, Goñi JR, Orozco M, Gelpí JL. Molecular dynamics simulations: Advances and applications. *Adv Appl Bioinforma Chem.* 2015;8(1):37-47.
 - 28. Scott A. Hollingsworth, Ron O. Dror. Molecular dynamics simulation for all. *Neuron.* 2018;99(6)(1):1129-43.
 - 29. Suguna S, Kunkulol R, Kumar V, Ambadasu B, Nandal DH. Affinity of warfarin with CYP2C9 by molecular docking study. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2014;6(5):181-2.
 - 30. Louet M, Labbé CM, Fagnen C, Aono CM, Homem-de-Mello P, Villoutreix BO, et al. Insights into molecular mechanisms of drug metabolism dysfunction of human CYP2C930. *PLoS One.* 2018;13(5):6-8.