

**PENAMBATAN MOLEKULER SITOKROM P450 ISOFORM 2C9 DENGAN
FENITOIN DAN SIMETIDIN**

WAHYU FITRIANA

0305050655



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN FARMASI
DEPOK
2009**

**PENAMBATAN MOLEKULER SITOKROM P450 ISOFORM 2C9
DENGAN FENITOIN DAN SIMETIDIN**

Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Farmasi

Oleh:

WAHYU FITRIANA

0305050655



DEPOK

2009

SKRIPSI : PENAMBATAN MOLEKULER SITOKROM P450 ISOFORM 2C9
DENGAN FENITOIDAN DAN SIMETIDIN

NAMA : WAHYU FITRIANA

NPM : 0305050655

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JULI 2009



Dr. Arry Yanuar, MSi., Apt.

Pembimbing I



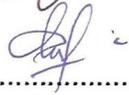
Dr. Herman Suryadi, MS., Apt

Pembimbing II

TANGGAL LULUS UJIAN SIDANG SARJANA : 10 - 7 - 2009

PENGUJI I : Dr. Harmita, Apt. 

PENGUJI II : Pharm. Dr. Joshita Djajadisastra, MS., PhD. 

PENGUJI III : Dr. Berna Elya, MS., 

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT. yang selalu melimpahkan rahmat, hikmah, dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini sebagai syarat untuk memperoleh gelar sarjana farmasi.

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Bapak Dr. Arry Yanuar, MS, Apt. sebagai pembimbing I dan Bapak Dr. Herman Suryadi, MS, Apt. sebagai pembimbing II yang telah memberikan bimbingan dan nasihat kepada penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS. selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI.
3. Ibu Dra. Juheini, M.Si sebagai pembimbing akademik yang telah memberikan bantuan dan nasihat kepada penulis selama menuntut ilmu di Departemen Farmasi FMIPA UI.
4. Seluruh dosen dan karyawan Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan ilmu yang berharga dan bantuan yang sangat berarti bagi penulis.

5. Kedua orang tua tercinta dan kakak serta adikku tersayang yang telah mencurahkan seluruh tenaga, perhatian, kasih sayang, dan doa kepada penulis sehingga penulis dapat mampu menyelesaikan skripsi ini.
6. Sahabat-sahabatku dan teman-teman farmasi 2005 serta rekan satu tim di laboratorium penelitian (Agus, Chatarina, Ventry) atas bantuan dan dukungan yang diberikan selama penelitian.
7. Semua pihak yang telah memberikan bantuan dan dukungan dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini yang tidak bisa disebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari sempurna dan masih banyak kekurangan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang dapat menambah pengetahuan dan informasi sehingga skripsi ini dapat lebih sempurna. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat kepada masyarakat dalam bidang ilmu pengetahuan.

Penulis

2009

ABSTRAK

Sitokrom P450 isoform 2C9 (CYP2C9) merupakan enzim utama pemetabolisme fenitoin. Inhibisi enzim ini dapat menyebabkan peningkatan kadar plasma fenitoin. Simetidin diketahui meningkatkan kadar plasma fenitoin dalam tubuh. Saat ini, interaksi antara fenitoin dan simetidin secara molekuler belumlah jelas. Suatu metodologi komputasional, penambatan molekuler, berorientasi pada afinitas ikatan struktur kompleks yang terbentuk antara ligan dengan makromolekul target secara tiga dimensi (3D). Berdasar alasan tersebut, peneliti dapat menggunakannya untuk menganalisis interaksi yang terdapat pada struktur kompleks yang terbentuk. Program penambatan molekuler yang paling banyak digunakan, AutoDock, memperlihatkan efisiensi kegunaan menilai ligan yang terikat pada situs aktifnya, sehingga dapat digunakan untuk memahami interaksi antara fenitoin dan simetidin pada CYP2C9.

Struktur 3D CYP2C9 yang digunakan adalah struktur kompleks dengan flurbiprofen (PDB ID 1R9O) yang memiliki konformasi terbuka dan struktur kompleks dengan S-warfarin (PDB ID 1OG5) yang memiliki konformasi tertutup. Hasil penambatan molekuler menggunakan struktur kristal 1R9O lebih efektif dibandingkan 1OG5. Substrat fenitoin distabilkan pengikatannya pada CYP2C9 dengan adanya ikatan hidrogen, interaksi dengan Arg108 sebagai residu kationik, interaksi hidrofobik khususnya dengan residu Phe114. Sedangkan inhibitor simetidin distabilkan

pengikatannya pada CYP2C9 dengan adanya ikatan hidrogen dengan beberapa residu asam amino termasuk Glu300 yang juga berperan sebagai residu anionik, serta adanya interaksi hidrofobik. Simetidin menjadi inhibitor kompetitif CYP2C9 pada situs pengenalan substrat fenitoin.

Kata kunci: fenitoin, interaksi, penambatan molekuler, simetidin

xv + 126 halaman, gambar, tabel, lampiran

Bibliografi: 59 (1981-2009)



ABSTRACT

Cytochrome P450 isoform 2C9 (CYP2C9) is a main enzyme which metabolize phenytoin. The inhibition of this enzyme can augment plasma level of phenytoin. Cimetidine is known as drug can make phenytoin to higher level in the body. Nowadays, the molecular basis of interaction between phenytoin and cimetidine toward CYP2C9 has not described well yet. A computational methodology, molecular docking, which oriented to the binding affinity of the complex structure that composed between ligand and macromolecule target three dimensionally. Based on that reason, the researchers can use this methodology to analyze interaction which exist between ligand and macromolecule. AutoDock is one of the most commonly used methodology, shows the efficiency of scoring function ligand that bound to its active site. So that, it can be used to understand about interaction between phenytoin and cimetidine in CYP2C9.

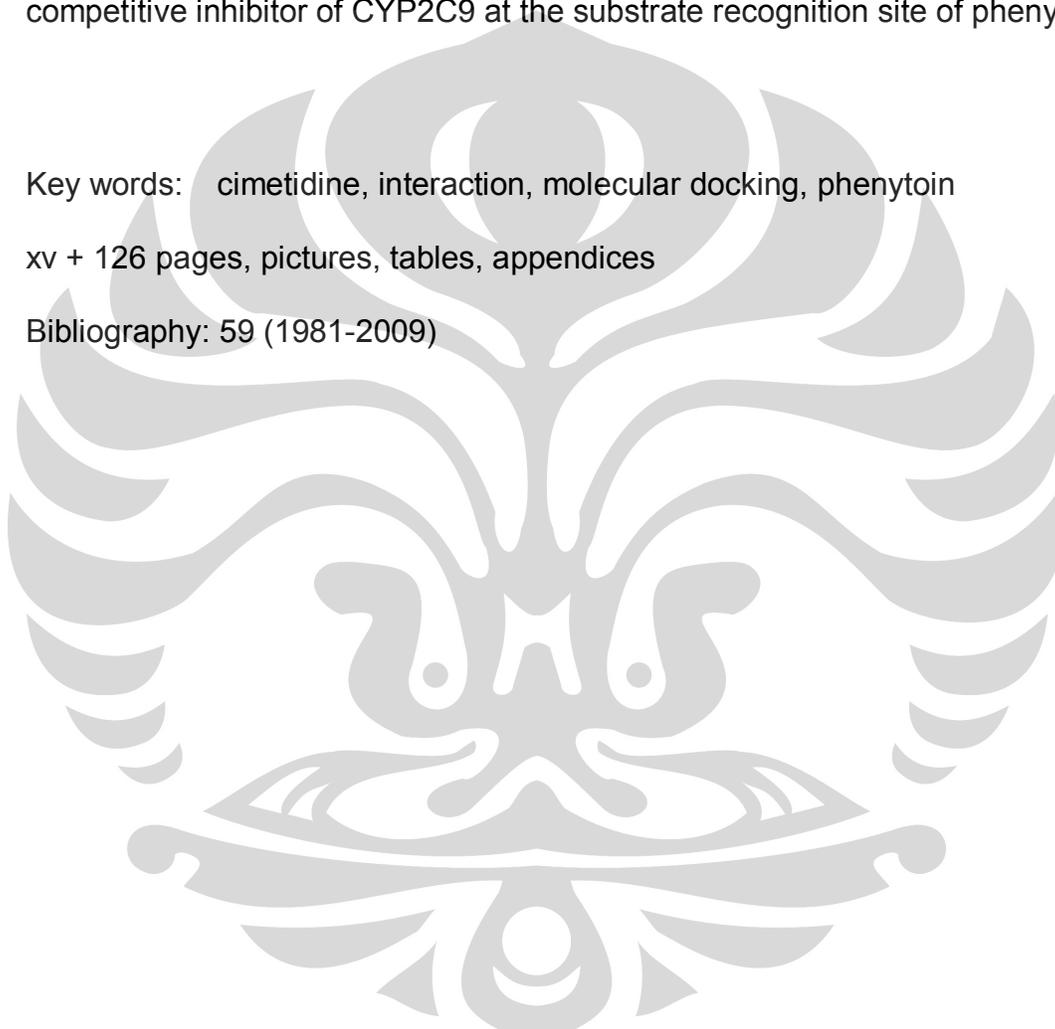
Crystal structure of CYP2C9 complexed with flurbiprofen (PDB ID: 1R9O) that has the closed conformational structure and complexed with S-warfarin (PDB ID: 1OG5) that has the open conformational structure were used in this experiment. In this, researcher has found that the use of structure 1R9O more effective than structure 1OG5. Binding of substrate phenytoin in CYP2C9 is stabilized by hydrogen bonds, interaction with cationic residue

Arg108, hydrophobic interaction particularly with Phe114. On the other side, binding of cimetidine inhibitor in CYP2C9 is stabilized by hydrogen bonds with some amino acid residues, including Glu300 which has role as anionic residue, also the exist of hydrophobic interaction. Cimetidine being competitive inhibitor of CYP2C9 at the substrate recognition site of phenytoin.

Key words: cimetidine, interaction, molecular docking, phenytoin

xv + 126 pages, pictures, tables, appendices

Bibliography: 59 (1981-2009)



DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
ABSTRAK	iii
ABSTRACT	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. LATAR BELAKANG	1
B. TUJUAN PENELITIAN	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
A. SITOKROM P450	5
B. SITOKROM P450 ISOFORM 2C9	7
C. SIKLUS KATALITIK SITOKROM P450.....	9
D. KARAKTERISTIK LIGAN	10
1. FENITOIN DAN SIMETIDIN	11
2. KONTROL POSITIF	13
E. DATABASE	13

1. PROTEIN DATA BANK	14
2. PUBCHEM	15
F. LIGPLOT	15
G. VEGAZZ	16
H. CCP4	17
I. PyMOL	18
J. CYGWIN	18
K. PENAMBATAN MOLEKULER (<i>MOLECULAR DOCKING</i>)..	19
L. AUTODOCK	21
BAB III. BAHAN DAN CARA KERJA	23
A. BAHAN	23
B. ALAT	24
C. CARA KERJA	25
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	31
A. HASIL	31
B. PEMBAHASAN	34
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	51
A. KESIMPULAN	51
B. SARAN	51

DAFTAR ACUAN	53
GAMBAR	59
TABEL	97
LAMPIRAN	111



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Gugus heme dari sitokrom P450	59
2. Pohon filogenetik anggota famili CYP2C manusia	59
3. Sekuens dari CYP 2C9 dengan struktur kristal 1OG5 dan 1R9O....	60
4. Siklus katalitik dari sitokrom P450.....	61
5. Struktur dua dimensi fenitoin dan simetidin.....	62
6. Hasil metabolit utama pada metabolisme fase I fenitoin.....	62
7. Struktur dua dimensi sulfafenazol dan S-warfarin.....	63
8. Aspek teoritis penambatan molekuler.....	63
9. <i>Rotatable bond</i> suatu molekul obat.....	64
10. <i>Software</i> penambatan molekuler.....	64
11. Kotak grid (<i>grid box</i>).....	65
12. Penyebaran data hasil penambatan molekuler.....	65
13. Struktur kompleks kristal 1R9O dengan flurbiprofen dan gliserol yang berorientasi terhadap heme.....	66
14. Struktur kompleks kristal 1OG5 dengan S-warfarin yang berorientasi terhadap heme.....	67
15. <i>Superpose</i> 1R9O dan 1OG5 dengan nilai RMSD 0,870 Å.....	68
16. Konformasi terbaik ligan dengan energi terendah.....	69
17. Hasil terbaik penambatan molekuler sulfafenazol yang dikelompokkan dalam bentuk <i>cluster</i>	70

18. Hasil terbaik penambatan molekuler S-warfarin yang dikelompokkan dalam bentuk <i>cluster</i>	70
19. Hasil terbaik penambatan molekuler fenitoin yang dikelompokkan dalam bentuk <i>cluster</i>	71
20. Hasil terbaik penambatan molekuler simetidin yang dikelompokkan dalam bentuk <i>cluster</i>	71
21. <i>Posing</i> sulfafenazol terhadap heme pada 1R9O dari hasil divergen menggunakan energi evaluasi 25 M.....	72
22. <i>Posing</i> sulfafenazol terhadap heme pada 1OG5 dari hasil divergen menggunakan energi evaluasi 25 M.....	73
23. <i>Posing</i> S-warfarin terhadap heme pada 1R9O dari hasil konvergen menggunakan energi evaluasi 2,5 M	74
24. <i>Posing</i> S-warfarin terhadap heme pada 1OG5 dari hasil konvergen menggunakan energi evaluasi 2,5 M	75
25. <i>Posing</i> simetidin terhadap heme pada 1R9O dari hasil konvergen menggunakan energi evaluasi 25 M.....	76
26. <i>Posing</i> simetidin terhadap heme pada 1OG5 dari hasil divergen menggunakan energi evaluasi 25 M	77
27. <i>Posing</i> fenitoin terhadap heme pada 1R9O dari hasil konvergen menggunakan energi evaluasi 2,5 M.....	78
28. <i>Posing</i> fenitoin terhadap heme pada 1OG5 dari hasil konvergen menggunakan energi evaluasi 2,5 M	79

29. Hasil Superpose Fenitoin dan Simetidin dalam situs aktif CYP2C9 1R9O.....	80
30. Hasil Superpose Fenitoin dan Simetidin dalam situs aktif CYP2C9 1OG5.....	81
31. Posisi Residu Arg105 dan Arg 108 serta Phe110 dan Phe476 pada CYP2C9 1OG5.....	82
32. Posisi Residu Arg105 dan Arg 108 serta Phe110 dan Phe476 pada CYP2C9 1R9O.....	82
33. Residu kationik Arg108 yang disabilkan ikatan hidrogen dengan Asp293 dan Asn289, dan mengarah pada situs aktif pada 1R9O.....	83
34. Residu kationik Arg108 yang disabilkan ikatan hidrogen dengan Asn289, dan mengarah pada permukaan enzim pada 1OG5	84
35. Ikatan hidrogen pada kompleks fenitoin dan CYP2C9 1R9O serta residu yang berinteraksi hidrofobik	85
36. Ikatan hidrogen pada kompleks fenitoin dan CYP2C9 1OG5 serta residu yang berinteraksi hidrofobik	86
37. Interaksi antara gugus fenil dari fenitoin dan gugus fenil dari Phe114 pada kompleks fenitoin dan 1R9O.....	87
38. Interaksi antara gugus fenil dari fenitoin dan gugus fenil dari Phe114 pada kompleks fenitoin dan 1OG5.....	88
39. Ikatan hidrogen yang menstabilkan heme pada 1R9O.....	89

40. Ikatan hidrogen yang menstabilkan heme pada 1OG5.....	90
41. Ikatan hidrogen pada kompleks simetidin - CYP2C9 1R9O serta residu yang berinteraksi hidrofobik.....	91
42. Ikatan hidrogen pada kompleks simetidin - CYP2C9 1OG5 serta residu yang berinteraksi hidrofobik.....	92
43. Interaksi hidrofobik antara fenitoin dan residu asam amino pada CYP2C9 1R9O	93
44. Interaksi hidrofobik antara fenitoin dan residu asam amino pada CYP2C9 1OG5	94
45. Interaksi hidrofobik antara simetidin dan residu asam amino pada CYP2C9 1R9O.....	95
46. Interaksi hidrofobik antara simetidin dan residu asam amino pada CYP2C9 1OG5.....	96

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Struktur kristal CYP2C9.....	97
2. Karakteristik simetidin dan fenitoin.....	98
3. Karakteristik sulfafenazol dan S-warfarin.....	99
4. Konsentrasi rata-rata serum fenitoin (\pm SD) sebelum, selama, dan setelah pemberian simetidin (C) sebanyak 1000 mg/hari.....	100
5. Kombinasi ligan-makromolekul yang dilakukan penambatan molekuler.....	101
6. Hasil Penambatan Molekuler Sulfafenazol dengan CYP2C9.....	102
7. Hasil Penambatan Molekuler S-Warfarin dengan CYP2C9.....	103
8. Hasil Penambatan Molekuler Simetidin dengan CYP2C9.....	104
9. Hasil Penambatan Molekuler Fenitoin dengan CYP2C9.....	105
10. Rangkuman Energi Bebas (Δ G) dan Konstanta Inhibisi (K_i) Hasil Penambatan Molekuler Terpilih.....	106
11. Jarak ikatan hidrogen dan jarak situs pengenalan fenitoin terhadap Fe.....	107
12. Jarak ikatan hidrogen dan jarak atom N imidazol simetidin terhadap Fe.....	108
13. Residu yang berinteraksi hidrofobik pada fenitoin dan simetidin pada struktur kristal CYP2C9 1R9O dan 1OG5.....	109

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Bagan alur kerja penelitian.....	111
2. Tampilan berkas .pdbqt ligan.....	112
3. Tampilan berkas .pdbqt makromolekul.....	113
4. Tampilan berkas .gpf.....	114
5. Tampilan berkas .dpf.....	115
6. Tampilan berkas .dlg.....	116
7. Perintah Cygwin	118
8. Tampilan Berkas <i>Protein Data Bank</i> CYP2C9 (1OG5).....	119
9. Tampilan program VegaZZ.....	120
10. Tampilan program AutoDock.....	121
11. Tampilan program PyMOL.....	122
12. Tampilan program Superpose dan Edit PDB File.....	123
13. Tampilan berkas program Cygwin.....	124
14. Tampilan berkas program Ligplot (pada Command Prompt).....	125
15. Residu Asam Amino.....	126

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Sitokrom P450 (CYP450) mikrosomal manusia merupakan katalis penting yang berperan pada metabolisme dan detoksifikasi berbagai macam xenobiotik, salah satunya adalah molekul obat (1, 2, 3). Saat ini terdapat 57 isoform CYP450 yang telah diketahui, diantaranya adalah CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, dan CYP3A4 (1, 3, 4). Sitokrom P450 2C9 (CYP450 2C9) merupakan isoform yang berperan penting sebagai enzim dalam metabolisme sekitar 20% obat yang digunakan dalam klinis (4). CYP2C9 berperan pada metabolisme fase I dan menunjukkan selektifitas untuk mengoksidasi molekul lipofil kecil yang bersifat asam (5). Selain itu, CYP2C9 juga menjadi pemicu interaksi obat dengan obat yang signifikan, serta membatasi bioavailabilitas obat-obat berindeks terapi sempit yang diberikan secara oral (4, 5).

Saat ini, terdapat tiga struktur kristal sitokrom P450 2C9 yang terdapat pada Protein Data Bank (PDB). Struktur kristal dari CYP2C9 telah ditentukan oleh William et al dan Wester et al, baik dalam bentuk apostruktur maupun struktur kompleks dengan S-warfarin dan flurbiprofen (6). Struktur-struktur tersebut memberikan dasar molekuler pengenalan obat oleh enzim. Situs aktif yang luas dari CYP2C9, sekitar 470 Å, ditafsirkan mampu

mengakomodasi secara simultan lebih dari satu ligan selama melakukan fungsi biologisnya. Hal tersebut memberikan dasar molekuler untuk memahami interaksi obat dengan obat yang kompleks (1).

Interaksi antara obat dengan obat yang menghasilkan efek yang tidak diinginkan ataupun efek toksik dapat terjadi pada proses metabolisme obat. Mekanisme terjadinya interaksi tersebut dalam kaitannya dengan enzim adalah dengan inhibisi ataupun induksi enzim pemetabolisme. Inhibisi dari enzim CYP2C9 dapat menyebabkan interaksi obat dengan obat yang berefek signifikan, dapat memicu toksisitas obat. Interaksi tersebut menjadi perhatian utama pada terapi obat yang memiliki profil farmakokinetik non-linear dengan indeks terapi sempit (5). Hal ini dikarenakan inhibisi enzim menyebabkan pengurangan aktivitas metabolik yang akan meningkatkan kadar obat dalam tubuh (7).

Salah satu obat yang memiliki profil seperti disebutkan diatas adalah fenitoin (8). Fenitoin merupakan antikonvulsan yang telah digunakan sejak akhir 1930an (9). Senyawa ini di metabolisme primer oleh CYP2C9 manusia menjadi senyawa inaktif utama yang bersifat lebih polar dibandingkan fenitoin, berupa S (-) 5-(4-Hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin (HPPH) (10, 11). Pemberian obat lain bersamaan dengan fenitoin dapat mempengaruhi kadar obat aktif dalam serum plasma, terutama senyawa yang menginhibisi aktivitas CYP2C9. Simetidin diketahui dapat menghambat metabolisme fenitoin (12). Simetidin dan fenitoin merupakan obat yang sering diresepkan (13). Pada laporan klinis, diketahui bahwa penggunaan simetidin dapat

meningkatkan kadar fenitoin dalam plasma, yang dapat menyebabkan toksisitas (nistagmus, ataksia, kebingungan, disritmia, dan *seizure*) (9).

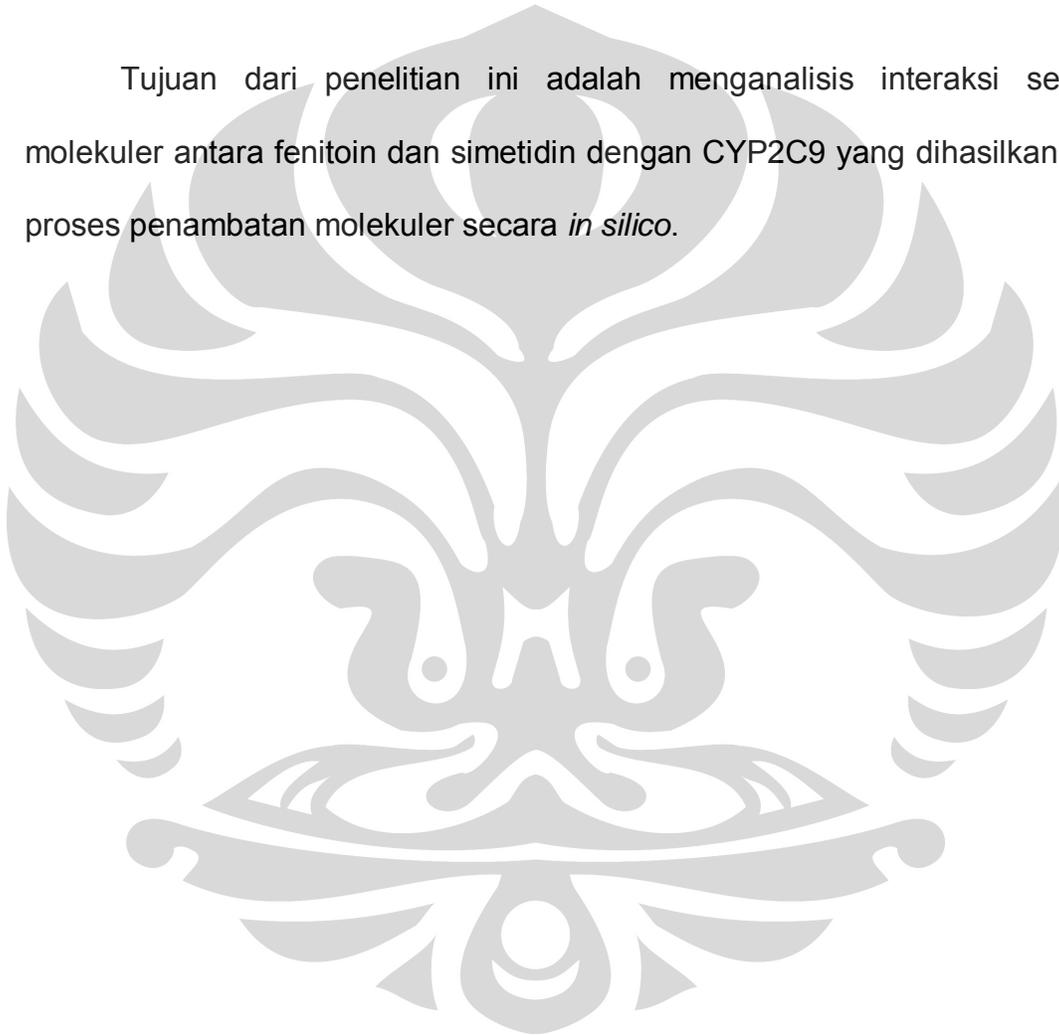
Metodologi komputasional telah menjadi komponen penting dari banyak program penemuan obat, dari identifikasi protein target hingga optimasi senyawa penuntun. Suatu kunci metodologi komputasional yaitu penambatan (*docking*) dari molekul kecil pada situs pengikatan protein telah berkembang sejak awal 1980 (14). Penambatan molekuler (*molecular docking*) berorientasi pada afinitas ikatan struktur kompleks yang terbentuk antara ligan dengan biomolekul. Metodologi ini dapat berkontribusi pada analisis metabolisme obat menggunakan struktur seperti isoform sitokrom P450 (15). Hal ini didukung dengan tersedianya *database* tiga dimensi (3D) dari struktur protein dan molekul ligan yang dapat diakses secara bebas.

Salah satu *software* penambatan molekuler yang paling banyak digunakan adalah AutoDock. Program AutoDock memperlihatkan efisiensi untuk diaplikasikan pada algoritma genetik dan kegunaan menilai (*scoring function*) ligan yang terikat pada situs aktifnya (16). Keuntungan yang didapatkan dari program AutoDock dapat diterapkan untuk menganalisis interaksi simetidin dan fenitoin pada sitokrom P450 2C9. Belum adanya struktur kristal kompleks CYP2C9 dengan fenitoin maupun dengan simetidin, menyebabkan dasar interaksi secara molekuler belumlah jelas. Maka, konfirmasi secara *in silico* menggunakan struktur 3D diperlukan untuk mendefinisikan residu asam amino yang berperan pada pengikatan substrat dan inhibitor, jenis ikatan yang terbentuk pada kompleks, nilai konstanta

inhibisi, serta besarnya energi yang digunakan untuk membentuk konformasi stabil pada situs aktif CYP2C9.

B. TUJUAN PENELITIAN

Tujuan dari penelitian ini adalah menganalisis interaksi secara molekuler antara fenitoin dan simetidin dengan CYP2C9 yang dihasilkan dari proses penambatan molekuler secara *in silico*.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. SITOKROM P450

Sitokrom P450 adalah superfamili dari haemoprotein yang berfungsi sebagai terminal oksidase dari sistem oksidase campuran, yang sangat penting pada metabolisme xenobiotik dan senyawa endogen. Selain itu, CYP450 merupakan famili dari protein yang mengandung heme dengan suatu protoporfirin besi yang terikat secara non kovalen pada apoprotein, yang disebut sebagai gugus prostetik. Kompleks tersebut disebut holoenzim. Bagian protein merupakan apoprotein dan bagian non-protein (heme yang reaktif) disebut sebagai gugus prostetik. CYP pada mamalia terikat pada membran yang terdapat pada retikulum endoplasma, sedangkan dalam mitokondria, inti, dan lisosom terdapat dalam jumlah kecil (17).

Sitokrom P450 memiliki karakteristik spektrum serapan Soret pada ~450 nm ketika CO terikat pada bentuk tereduksi (fero) dari protein yang menghasilkan kompleks $Fe^{II}-CO$. Protein heme lainnya menunjukkan spektrum pada ~420 nm dengan kondisi yang sama. Enzim CYP450, dinamakan demikian karena enzim tersebut terikat pada membran pada suatu sel (cyto) dan mengandung pigmen heme (chrome dan P) yang mengabsorpsi cahaya pada panjang gelombang pada 450 nm yang terjadi ketika karbon monoksida terikat pada heme yang tereduksi (17, 18).

Sumber utama enzim ini adalah hati, namun terdapat juga dalam seluruh sel mamalia, kecuali pada sel darah merah yang matang dan sel otot skelet. CYP pada bakteri tidak terikat pada membran dan ditemukan sebagai fraksi yang larut pada sitoplasma. Enzim-enzim tersebut memiliki domain protein yang *conserved*, domain α yang banyak mengandung struktur heliks dan domain β yang dibangun dengan struktur *-sheet* (17). Reaktivitas katalitik dari P450 tergantung pada gugus heme (Gambar 1). Gugus heme terdiri dari empat cincin pirol dengan koordinat pusatnya adalah besi. Dua dari cincin pirol memiliki rantai samping propionat yang dapat menstabilkan ikatan non kovalen pada gugus heme di apoprotein dengan ikatan hidrogen (pada CYP2C9 dengan dua ikatan hidrogen dari Arg 97) (17).

Sedikitnya terdapat 481 gen CYP dan 22 pseudogen yang diketahui pada seluruh spesies. Gen-gen CYP ini diklasifikasikan ke dalam beberapa famili (ditunjukkan dengan angka Arab) dan subfamili (ditunjukkan dengan huruf) berdasar pada asam amino yang mengkodekan protein. 35 gen CYP manusia yang diketahui diklasifikasikan dalam famili 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 17, 19, 21, 24, 27, dan 51. Hanya 18 bentuk dari famili 1, 2, dan 3 yang memperlihatkan secara substansial berkontribusi pada metabolisme obat dan xenobiotik bukan obat. Sisanya penting pada metabolisme dan/atau biosintesis senyawa endogen seperti asam empedu, *bioenic amines*, eicosanoids, asam lemak, phytoalexin, retinoid, kolesterol, prostasiklin, tromboxan A_2 , dan steroid (17, 18, 19).

B. SITOKROM P450 ISOFORM 2C9 (CYP2C9)

Subfamili CYP2C adalah subfamili terbanyak kedua dari enzim sitokrom P450 yang terdiri dari CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, dan CYP2C19 bertanggung jawab pada metabolisme sekitar 20% obat yang digunakan dalam klinik (Gambar 2). Seluruh enzim CYP2C bersifat polimorfik secara genetik dan membagi identitas sekuens asam amino secara signifikan (sekitar 70%), namun berbeda pada lokalisasi dan profil substratnya (6).

Profil spesifisitas substrat yang berbeda pada enzim-enzim yang memiliki residu yang tidak berbeda pada situs aktifnya memberi kesimpulan bahwa perubahan konformasi mendasari perbedaan selektivitas substrat, misal pada CYP2C9 dan CYP2C19. Isoform yang terbanyak dan menempati urutan teratas dari subfamili ini adalah 2C9. Berperan sebagai enzim pemetabolisme yang paling penting pada jalur utama metabolisme obat yang membatasi bioavailabilitas obat-obat yang diberikan secara oral, secara khusus pada jalur bersihan major untuk obat dengan indeks terapeutik yang rendah, yaitu warfarin dan fenitoin. Kapasitas metaboliknya akan menurun karena polimorfisme genetik atau interaksi obat-obat yang dapat menimbulkan toksisitas pada dosis terapi normal (1).

CYP 2 (famili) C (subfamili) 9 (gen/polipeptida) memperlihatkan selektivitas untuk oksidasi anion lipofilik yang relatif kecil seperti obat-obat yang mencakup terapi antidiabetik – glipizide, tolbutamide; antikonvulsan – phenytoin; angiotensin II receptor antagonist – losartan; HMG CoA

Reductase Inhibitor – fluvastatin; dan NSAID – ibuprofen, naproxen, piroksikam; senyawa antikoagulan oral – warfarin, dan progesteron (1, 20). CYP2C9 juga berperan penting pada interaksi obat dengan obat, ekstrapolasi in vitro-in vivo dari interaksi obat dengan obat dari CYP2C9 dapat diganggu dengan adanya variasi polimorfisme dan kemungkinan wilayah ikatan multiple dalam situs aktif CYP2C9 yang menuntun pada potensial inhibisi yang tergantung genotipe dan substrat (17).

Selain itu, CYP2C9 berpartisipasi pada metabolisme dan sintesis senyawa endogen seperti eicosanoid dan epoksida asam arakidonat dalam jaringan ekstrahepatik, dengan demikian mempengaruhi pengaturan homeostasis vaskuler, terutama mengatur tekanan darah (1, 5). Penyakit yang erat kaitannya dengan pengontrolan aktivitas CYP2C9 antara lain arthritis, gangguan pembekuan darah, diabetes mellitus, epilepsi, hipertensi, dan *thrombolytic disease* (21).

Struktur kristal dari CYP2C9 ditetapkan pada tingkat bebas ligan (apostruktur) (PDB ID: 1OG2) dan kompleks dengan dua substrat yang berbeda, S-warfarin (PDB ID: 1OG5) dan flurbiprofen (PDB ID: 1R9O), digunakan untuk *benchmark library* dari ligan yang diketahui (Tabel 1). CYP2C9 mengadopsi topologi umum untuk seluruh CYP, dimana daerah inti pengikatan yang melibatkan heme dibentuk dari heliks E, I, J, K, dan L, yang sifatnya *conserved*, sedangkan *distal haem pocket* dan bagian masuk ligan (*ligand entry*) merupakan subjek yang bervariasi. Situs aktif ditentukan sebagai seluruh residu yang masuk pada 6,5 Å dari tempat ikatan ligan.

Definisi situs aktif dari struktur bebas ligan berdasar pada pensejajaran dengan salah satu ligan yang terikat dan menyeleksi residu yang berhubungan. Heme selalu terlibat dalam situs aktif (6). Sekuens yang menyusun struktur enzim CYP2C9 ditunjukkan pada Gambar 3.

C. SIKLUS KATALITIK SITOKROM P450 (17)

Secara umum, siklus katalitik sitokrom P450 digambarkan pada Gambar 4. Pada siklus reaksi, sitokrom P450 memiliki tujuan utama yaitu, mengaktivasi oksigen (Langkah 1-6), kemudian untuk mengoksidasi substrat (Langkah 7 dan 8), dan akhirnya mengeluarkan produk (Langkah 9). Sifat oksidatif spesies yang terlibat pada reaksi dan tahapan yang dibatasi laju (*rate limiting step*) dapat berubah, tergantung pada jenis substrat dan jenis isoform. Pada langkah awal, substrat memasuki dan menggantikan air yang terikat pada heme. Pada keadaan ini, besi berada dalam tingkat oksidasi feri (Fe^{3+}) (Langkah 1). Satu elektron ditambahkan dari hasil oksidasi NADPH-CYP450 reduktase, yang akan mereduksi besi menjadi tingkat oksidasi fero (Fe^{2+}) (Langkah 2). Protein tambahan, gugus prostetik reduktase FMN-FAD, memfasilitasi transfer elektron dari NADPH. Bergantung pada jenis sitokromnya, langkah 1 dan 2 dapat terjadi pertama atau kedua, namun pada kedua langkah tersebut terdapat langkah dapat balik (*reversible*) dan langkah pertama selalu lebih cepat dibandingkan langkah yang kedua, tidak tergantung pada jenis substratnya.

Pada langkah selanjutnya, satu molekul oksigen harus menyebar dari permukaan protein yang kemudian membentuk koordinat dengan besi fero (Fe^{2+}). Kompleks yang terbentuk ini memiliki ketidakstabilan yang tinggi yang dapat membentuk besi feri (Fe^{3+}) dan anion superoksida O_2^- (Langkah 3). Elektron tambahan ditambahkan, baik melalui NADPH-sitokrom P450 reduktase atau sitokrom b_5 , yang tergantung pada sistem individu (Langkah 4). Suatu proton ditambahkan, baik secara langsung dari *conserved threonin* atau oleh suatu air yang terikat secara hidrogen pada threonin ini (Langkah 5). Langkah selanjutnya adalah ikatan dioksigen secara heterolitik terpecah dan melepaskan satu molekul air, menghasilkan suatu kompleks FeO^{3+} RH. Kompleks ini diperkirakan sebagai spesies reaktif utama dari siklus katalitik (Langkah 6). Selanjutnya, hidrogen inisial atau abstraksi elektron atau bentuk kompleks sigma mengambil alih (Langkah 7), yang diikuti dengan insersi oksigen untuk membangkitkan spesies terhidroksilasi oleh suatu mekanisme yang disebut mekanisme *rebound* oksigen (Langkah 8) dan terakhir substrat dilepaskan (Langkah 9).

D. KARAKTERISTIK LIGAN

Ligan yang digunakan pada penambatan molekuler memenuhi persyaratan *Lipinski's Rules* (Tabel 2 dan 3), yaitu memiliki karakteristik seperti:

1. berat molekul kurang dari 500 dalton,

2. nilai cLogP (koefisien partisi oktanol-air) antara -5 dan 5,
3. bilangan donor ikatan hidrogen kurang dari 5 (atom oksigen atau nitrogen dengan satu atau lebih atom hidrogen),
4. bilangan akseptor ikatan hidrogen kurang dari 10 (atom oksigen atau nitrogen),
5. bilangan *rotatable bond* kurang dari 10 (22).

1. FENITOIN DAN SIMETIDIN

Fenitoin (Gambar 5.a) merupakan antikonvulsan yang bekerja dengan membatasi kemampuan eksitasi neuronal, yaitu memperpanjang waktu *voltage-gated Na⁺-channels* yang terdapat pada keadaan inaktivasi (23). Senyawa ini bersifat asam lemah yang ditunjukkan dari nilai pKa 8,3 dan hidrofobik (24). Fenitoin mengalami metabolisme fase I dalam tubuh oleh enzim hepatic menjadi senyawa yang lebih polar. Hasil studi *in vitro* menunjukkan bahwa 4'-hidroksilasi yang menghasilkan total (R+S)-*p*-HPPH dikatalisis secara dominan oleh CYP2C9, sedangkan CYP2C19 mengambil peranan kecil dalam metabolisme fenitoin. Lebih spesifik, (S)-*p*-HPPH dikatalisis oleh CYP2C9 (Gambar 6), sedangkan pembentukan (R)-*p*-HPPH dimetabolisme oleh CYP2C19 (11). Metabolit 4-HPPH akan menjadi substrat untuk fase II uridine diphosphate-glucuronosyltransferase-ferase (UGT) yang menghasilkan 4-glucuronat yang larut dalam air, yang kemudian dieliminasi melalui urin (10).

Simetidin (Gambar 5.b) merupakan senyawa potensial yang menghambat reseptor histamine H₂ selektif, sehingga menghambat sekresi asam lambung yang di stimulus oleh histamine H₂, digunakan pada pengobatan *duodenal ulcer* dan *gastric ulcer*. Simetidin merupakan obat yang memiliki gugus imidazol yang dapat berikatan kuat dengan besi heme P450 dan secara efektif mereduksi metabolisme substrat yang diberikan secara bersamaan (25, 26). Metabolisme simetidin difasilitasi oleh enzim FMO₃, yang menghasilkan metabolit sulfoksida dan hidrosimetil, yang selanjutnya di buang melalui urin. Simetidin merupakan molekul hidrofilik yang memiliki koefisien partisi okanol air 2,5 (24).

Hetzel at al. menyebutkan bahwa pemberian simetidin dosis umum, 200 mg tiga kali sehari dan 400 mg sebelum tidur, meningkatkan kadar rata-rata plasma fenitoin sekitar 13-33% (Tabel 4) dengan menghambat metabolisme fase I fenitoin, yaitu hidrosilasi aromatis (13). Peningkatan kadar plasma ini dapat menyebabkan intoksikasi fenitoin. Secara umum, penurunan hidrosilasi fenitoin mencetuskan berkembangnya intoksikasi. Hal tersebut disebabkan karena simetidin menghambat enzim pemetabolisme fenitoin pada sistem mikrosomal hepatic. Intoksikasi fenitoin berawal dari peningkatan kadar fenitoin pada sistem saraf pusat, terutama serebelum dan *brainstem*. Kejadian yang sering dan pertama terjadi adalah nistagmus, yang berlanjut menjadi ataksia disertai mual dan muntah, yang dikenal sebagai toksisitas iatrogenik bila terjadi pada bayi yang baru lahir. Lebih lanjut lagi

dapat menyebabkan koma dan *seizure*. Toksisitas fenitoin bersifat reversible. Namun apabila terjadi atrofi serebelum, toksisitas menjadi irreversibel (9, 27).

2. KONTROL POSITIF

Sulfafenazol (Gambar 7.a) digunakan sebagai kontrol positif dari inhibitor, karena diketahui bahwa sulfafenazol merupakan inhibitor kompetitif dari CYP2C9 secara *in vitro* maupun *in vivo*, sehingga dijadikan *benchmark* inhibitor CYP2C9 (28). Selain itu, sulfafenazol diketahui sebagai inhibitor selektif CYP2C9 (29). Sedangkan S-warfarin (Gambar 7.b) merupakan substrat yang terbukti dimetabolisme oleh CYP2C9 dan memiliki profil farmakokinetik yang sama dengan fenitoin (20, 28). S-warfarin juga merupakan ligan yang terdapat dalam kristal 1OG5, salah satu kristal yang digunakan pada penambatan molekuler, sehingga S-warfarin digunakan sebagai kontrol positif substrat CYP2C9.

E. DATABASE (30, 31)

Database merupakan kumpulan data terkomputerisasi untuk mencari keterangan atau informasi. Penyimpanan catatan diatur dalam suatu kelompok data yang telah diketahui atributnya dengan program komputer, yang disebut sebagai *database management system*. Pada bioinformatik, *database* berperan penting untuk mengatur proyek berskala besar dan

kelompok penelitian yang heterogen. Data berasal dari kerja banyak orang yang memanfaatkan perkembangan teknologi secara terus menerus dalam penelitian kolaboratif. Beberapa jenis biodatabase primer adalah European Molecular Biology Laboratory DNA database (EMBL), GenBank, Bethesda and DNA Data Bank Jepang (DDBJ), database protein SWISS-Prot (database sekuens protein di Swiss Institute of Bioinformatics, Jenewa) dan PDB - database struktur 3D protein.

1. PROTEIN DATA BANK

Protein Data Bank (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb>) merupakan tempat penyimpanan tunggal mengenai data struktur makromolekuler dari seluruh dunia. PDB menyediakan struktur kristal protein, asam nukleat, kompleks protein dan kompleks asam nukleat, serta *database* khusus seperti *HIV Protease Structural Database*. Selain itu, PDB juga menyimpan struktur hasil metode non-kristalografi NMR (Nuclear Magnetic Resonance) dan *cryo-electron microscopy*. Struktur yang ada berasal dari penelitian perseorangan maupun organisasi *database* negara-negara di seluruh dunia (32). Saat ini PDB memiliki dua jenis berkas data yaitu berkas PDB yang berorientasi pada format mmCIF, serta berkas PDBML yang menggunakan format XML. Setiap struktur pada PDB memiliki nomer identitas yang terdiri dari empat karakter kombinasi huruf dan angka (32, 33). PDB didirikan oleh *Brookhaven*

International Laboratories pada tahun 1971. Pada 1998, PDB dikelola oleh Research Collaboratory for Structure Bioinformatics (RCSB) (34).

2. PUBCHEM (35)

PubChem merupakan database molekul kimia yang menyediakan informasi mengenai aktivitas biologis senyawa kecil. PubChem memiliki tiga jalur akses yang tergabung dalam Entrez NCBI (National Center for Biotechnology Information), yaitu PubChem Substance, PubChem Compound, dan PubChem Bioassay, yang menjelaskan mengenai karakteristik senyawa, sifat biologis, dan uji-uji biologis dari suatu senyawa. Selain itu PubChem juga menyediakan database struktur molekul, baik dalam bentuk dua dimensi (2D) ataupun tiga dimensi (3D) yang terdapat dalam format SMILES, InChi, berkas MOL, berkas SDF, XML, dan ASN dengan jalur akses *Structure Search*.

F. LIGPLOT (36, 37)

Program Ligplot secara otomatis menghasilkan diagram skematik dua dimensi yang menggambarkan interaksi kompleks ligan-protein dengan menggunakan *input* berkas .pdb. *Output* yang dihasilkan dalam berkas PostScript. Interaksi yang digambarkan adalah interaksi yang dimediasi oleh ikatan hidrogen dan kontak hidrofobik, serta kekuatannya. Ligplot dapat

dijalankan pada sistem Linux ataupun Windows. Pada penelitian ini digunakan Ligplot pada lingkungan Linux. Program ini dapat digunakan untuk berbagai macam jenis ligan. Selain itu, Ligplot juga dapat menunjukkan interaksi tipe lainnya dalam protein dan asam nukleat.

G. VEGAZZ (38)

VegaZZ merupakan perkembangan baru dari VegaZZ OpenGL. Program ini dapat digunakan untuk membuat molekul kecil, minimisasi energi (*single point, steepest descent, trust, conjugate gradients, quasi-Newton, truncated Newton, genetic algorithm, polytope simplex and rigid body*), dan mampu menemukan torsi yang fleksibel secara otomatis dari ligan maupun makromolekul. Sehingga dapat digunakan untuk mencari konformasi yang memiliki energi terendah. Selain itu, program ini menjembatani pengubahan berkas antar *software*. Aplikasi lain dari VegaZZ dapat juga digunakan untuk visualisasi molekuler dan penambatan molekuler.

Format dari berkas yang dapat menjadi *input* pada VegaZZ mencakup Fasta, Gromos/Gromacs *.gro* dan *.xtc*, IUCr Crystallographic Information Framework (CIF, mmCIF), UMSC CRT, QMC, MDL Molfile, Protein Data Bank (PDB), Data Bank with ATDL atom types (PDBA), dan Protein Data Bank Fat (PDBF). Selain itu dapat juga menerima *input trajectory* seperti AutoDock 4 DLG *output*. *Output* akan menghasilkan beberapa jenis format berkas seperti Protein Data Bank (PDB), Protein Data Bank with ATDL atom

types (PDBA), Protein Data Bank with atomic charges (PDBQ), Protein Data Bank Fat (PDBF), dan Protein Data Bank Large.

H. CCP4

CCP4 (*Collaborative Computational Project No. 4*) adalah *software* untuk makromolekul hasil kristalografi sinar X (39). CCP4 merupakan sekumpulan program dan data yang berkaitan, yang dapat digunakan untuk menentukan struktur makromolekul dan teknik biofisik lainnya. Program ini dirancang menjadi fleksibel, sehingga menyediakan sejumlah metode untuk mencapai tujuan pengguna. Untuk menjalankan tiap fungsi, dibutuhkan lebih dari satu program. Program ini dijalankan berdasar standar Fortran 77. Program – program di dalamnya di dapatkan dari berbagai sumber yang luas, namun dihubungkan dengan format berkas data standar (40). Program yang digunakan pada penelitian ini adalah Superpose dan Edit PDB File.

Superpose adalah program penyejajaran struktur sekunder. Program superpose mencocokkan struktur tiga dimensi dari protein. Sebagai *inputnya* membutuhkan dua berkas koordinat sebagai input, satu koordinat tetap menjadi *fit*“ dan koordinat lain yang bergerak mengikuti koordinat tetap disebut sebagai *moving*“. *Outputnya* adalah struktur protein *moving*“ yang menempati koordinat struktur *fit*“. Superpose dapat dijalankan melalui kumpulan program CCP4 dengan memilih *Superpose* pada *List Progame*. Edit PDB File merupakan program yang digunakan untuk memisahkan

subunit suatu makromolekul yang memiliki lebih dari satu subunit, yang dijalankan dengan memilih Edit PDB File pada *List Programme* (34).

I. PyMOL (41)

PyMOL adalah suatu *free and open source* program, yang digunakan sebagai visualisasi molekuler untuk struktur kimia 3D seperti struktur kristal hasil sinar X dari protein, asam nukleat (DNA, RNA, dan tRNA), karbohidrat, struktur senyawa kecil dari obat ataupun inhibitor, metabolit, dan nukleosida fosfat. PyMOL juga bermanfaat untuk penggambaran molekuler, seperti ikatan kimia, permukaan molekul, dan bentuk *cartoon ribbon* dari biomolekul. PyMOL dijalankan dengan menggunakan bahasa program Python. Berkas dengan format PDB (protein data bank), PQR, MOL, SDF, MOL2, XPLOR, CCP4, DSN6, DX, TRJ, DCD, XTC, dan GRID dapat dibaca oleh PyMOL. Selain itu, PyMOL juga dapat membaca berkas pemodelan molekuler yang dihasilkan dari MOE (Molecular Operating Environment).

J. CYGWIN (42)

Cygwin menggunakan sistem operasi mirip Linux yang dapat digunakan pada Windows, dikembangkan dengan sistem operasi GNU (GNU's NOT UNIX). Cygwin terdiri dari dua komponen yaitu sebuah DLL (Dynamic-link library) (cygwin.dll) yang berperan sebagai emulasi Linux API

dan berperan menyediakan fungsionalitas Linux API yang penting serta sebuah kumpulan *tool*, yang memberikan nuansa dan tampilan seperti Linux. Program ini mulai dikembangkan pada Desember 1998, dan pada penambatan molekuler berfungsi untuk memberikan perintah-perintah fungsional untuk menjalankan program AutoDock.

K. PENAMBATAN MOLEKULER (*MOLECULAR DOCKING*)

Pemikiran umum mengenai *docking* adalah memprediksikan posisi suatu ligan [I] pada suatu model pengikatan yang sesuai pada suatu situs aktif dari protein [E] di bawah kondisi ekuilibrium (Gambar 8) serta untuk mengkalkulasikan nilai suatu kompleks $[E+I] = [EI]$ protein-ligan (*scoring function*), yang dikenal sebagai energi bebas ikatan (*free energy of binding*) (14). Energi bebas ikatan (ΔG) berkaitan dengan afinitas ikatan. Ligan adalah suatu senyawa yang mampu terikat dan membentuk kompleks dengan molekul biologis dengan adanya gaya intermolekuler seperti ikatan ionik, ikatan hidrogen, dan gaya van der Waals untuk tujuan biologis. Penambatan secara umum ditemukan sebagai suatu proses multi langkah dimana tiap langkah memperkenalkan penambahan satu atau lebih derajat kompleksitas.

Secara umum, terdapat dua tujuan studi penambatan, yaitu pemodelan struktur yang akurat dan prediksi aktivitas yang tepat. Namun, identifikasi ciri molekuler yang bertanggungjawab untuk pengenalan biologis secara spesifik, atau prediksi dari modifikasi senyawa yang dapat

meningkatkan potensi, merupakan isu kompleks yang sering sulit untuk difahami dan juga sulit untuk simulasi pada komputer. Proses penambatan molekuler mencakup beberapa proses yaitu, prediksi konformasi dan orientasi ligan (*posing*) yang tepat dalam suatu situs pengikatan target, prediksi aktivitas biologis dari kompleks [E+I] (*ranking*), dan penilaian (*scoring*) (14).

Program penambatan menerapkan fungsi energi empiris untuk menentukan dan mengoptimisasi energi interaksi diantara kandidat obat dan situs aktifnya. Informasi yang digunakan untuk komputasi kinematik dan energi berkaitan dengan tiap atom dan ikatannya. Tiap atom memiliki informasi standar, seperti radius van der Waals dari atom tersebut. Sedangkan untuk ikatan, terdapat tiga informasi yang berkaitan, yaitu panjang ikatan (jarak antara pusat atom), sudut ikatan (sudut diantara ikatan yang berurutan), serta apakah ikatan tersebut dapat berotasi (*rotatable bond*) atau tidak (Gambar 9). Panjang dan sudut ikatan tidak memberikan efek signifikan terhadap bentuk dari molekul, sehingga dapat diasumsikan bahwa keduanya tidak berubah (*fix*). Derajat bebas dari molekul berasal dari ikatan yang dapat berotasi. Struktur 3D suatu molekul bila disebutkan dengan ikatan yang dapat berotasi melekat padanya disebut sebagai konformasi dari molekul tersebut. Konformasi ini mempengaruhi hasil dari *docking*. Secara tipikal, ligan memiliki 3-15 ikatan yang dapat berotasi, sedangkan makromolekul memiliki 1000-2000 *rotatable bond* (43).

L. AUTODOCK

Saat ini terdapat banyak pemrograman yang digunakan untuk penambatan molekuler (Gambar 10). *Software* yang banyak digunakan saat ini adalah Dock, FlexX, dan AutoDock (44). Diantara ketiga program tersebut, AutoDock adalah program yang terbanyak digunakan. AutoDock adalah *tool* untuk *docking* secara otomatis, yang dirancang untuk mengikatkan substrat pada reseptor yang diketahui struktur tiga dimensinya. Ligan akan mencari posisi yang cocok secara geometri dan energi pada situs aktif protein.

AutoDock Tools terdiri dari dua program utama, yaitu AutoDock yang memperlihatkan hasil *docking* dari ligan pada suatu kumpulan grid yang diasumsikan sebagai protein target dan AutoGrid sebagai pengkalkulasi dari grid tersebut (45). Pada model grid, molekul diposisikan dalam suatu kotak grid (Gambar 11). Energi interaksi yang terlacak dihitung pada seluruh titik potong kisi-kisi (point grid), melalui ruang XYZ, dimulai dari energi pertama E_{xyz} , yaitu pada poin pertama dari bidang XY pertama grid (17). Selain itu, AutoDock juga dapat memberikan visualisasi dari atom yang berafinitas dengan grid, yang dapat dijadikan pedoman merancang ikatan yang lebih baik dari senyawa organik sintetis. Aplikasi AutoDock mencakup perancangan obat yang berbasis struktur, optimasi senyawa penuntun, *virtual screening*, serta *docking* protein dengan protein (45).

AutoDock menggunakan model kinematik untuk ligan yang dapat berotasi. Ligan memulai proses pencarian secara acak diluar situs

pengikatan dan mengeksplor nilai dari translasi, rotasi, derajat kebebasan internal dari ligan, dan ligan akan secepatnya mencapai konformasi pengikatan. Baik buruknya suatu konformasi dihasilkan dari fungsi penilaian (*scoring function*), yang bergantung pada algoritma penambatan yang digunakan sebagai metode pencarian (*search methode*). Pada AutoDock terdapat beberapa algoritma penambatan, seperti SA (*original Monte Carlo simulated annealing*), GA (*traditional Darwinian genetic algorithm*), LS (*local search*), dan GALS (*hybrid genetic algorithm with local search*) atau yang biasa disebut LGA (*Lamarckian genetic algorithm*). Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) banyak diimplementasikan akhir-akhir ini, dimana metode ini merupakan kombinasi dari GA tradisional yang digunakan untuk pencarian global dengan prosedur pencarian lokal Solis-Wets. LGA mampu menangani ligan dengan derajat kebebasan yang lebih banyak dibandingkan SA dan GA (46).

BAB III

BAHAN, ALAT, DAN CARA KERJA

A. BAHAN

1. Struktur tiga dimensi CYP2C9 (makromolekul)

Struktur tiga dimensi CYP2C9 yang berikatan kompleks dengan flurbiprofen (PDB ID: 1R9O) dan S-warfarin (PDB ID: 1OG5) yang diperoleh dari *database Protein Data Bank* (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb>) (Gambar 13 dan Gambar 14).

2. Struktur tiga dimensi ligan

Struktur tiga dimensi ligan dalam berkas .sdf, yaitu fenitoin (CID: 1775), simetidin (CID: 2756), dan sulfafenazol (CID: 5335) yang diperoleh dari *database PubChem* (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), serta struktur tiga dimensi S-warfarin yang didapatkan dari struktur kristal PDB yang berikatan kompleks dengan CYP2C9 (PDB ID: 1OG5) dari *database PDB*.

A. ALAT

1. Perangkat keras (*hardware*)

Komputer dengan spesifikasi Microsoft Windows 2003/XP, Cygwin, 1 GB RAM, Intel Core 2 Quad 1.8 GHz 2 prosesor, dan koneksi internet.

2. Perangkat lunak (*software*)

- a. Program PyMOL (<http://www.pymol.org>)
- b. Program CCP4 (Superpose dan Edit PDB File)
(http://www.ccp4.ac.uk/ccp4i_main.php)
- c. Program AutoDock (<http://autodock.scripps.edu/>)
- d. Program VegaZZ (http://nova.coulombo58.unimi.it/cms/index.php?Software_projects:VEGAZZ)
- e. Program Ligplot menggunakan Command Prompt
(<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/ligplot>)
- f. Program Cygwin (Linux)

B. CARA KERJA

1. Pemisahan struktur kristal

Struktur kristal CYP2C9 dipisahkan dari molekul pelarut yang ikut dalam kristalisasi, ligan yang berikatan kompleks dengan enzim, serta air yang terdapat dalam kristal. Pemisahan dilakukan dengan memasukkan perintah **cat** dan **grep** pada program Cygwin (Lampiran 7). Struktur kristal 1OG5 memiliki dua subunit, sehingga perlu dilakukan pemisahan antara subunit A dan subunit B. Program yang digunakan adalah CCP4 dengan menggunakan Edit PDB File. Kedua proses pemisahan menggunakan struktur kristal dengan berkas .pdb yang di dapatkan dari *database* PDB sebagai *inputnya*. *Output* dari keduanya juga berupa berkas dengan ekstensi .pdb.

2. Superpose struktur kristal CYP2C9 1OG5 dan 1R90

Berdasar pada telaah *virtual screening*, struktur kristal yang digunakan dari 1OG5 adalah subunit A. Struktur 1OG5 subunit A yang diperoleh dari CCP4 dilakukan *superpose* dengan struktur kristal 1R90. *Superpose* dilakukan dengan menggunakan program *Superpose* pada CCP4 yang menghasilkan berkas dengan ekstensi *_lsq.pdb*.

3. Penyusutan energi (*energy minimization*) dan pencarian konformasi terbaik struktur ligan

Ligan-ligan (S-warfarin, fenitoin, sulfafenazol, dan simetidin) yang akan digunakan pada penambatan molekuler diminimisasi energinya dengan menggunakan program VegaZZ. Program ini menerima *input* berupa ligan dengan berkas *.sdf* (fenitoin, simetidin, dan sulfafenazol) dan *.pdb* (S-warfarin). Pada langkah ini, tiap struktur ligan ditambahkan atom hidrogen yang kemudian dihitung potensialnya menggunakan *force field* SP4, serta penghitungan muatan dengan *Gasteiger charge*. Penyusutan energi dilakukan dengan program *Minimization Step* menggunakan *Trust* 1000 dan *Toler* 0,01. Selanjutnya dilakukan pencarian konformasi terbaik menggunakan *Conformational Search*. Hasil akhir disimpan dalam berkas *.pdb*.

4. Pembuatan berkas ligan dan makromolekul

Konformasi terbaik ligan yang dihasilkan dari VegaZZ dalam berkas *.pdb* digunakan sebagai *input file* ligan pada AutoDock Tools. *Output* yang dihasilkan berupa berkas *.pdbqt*. *Input file* makromolekul adalah berkas *.pdb* hasil pemisahan struktur kompleks pada langkah 1. Selanjutnya, hidrogen polar ditambahkan pada makromolekul, dihitung muatannya dengan *compute Gasteiger charges*, dan dilanjutkan dengan penambahan hidrogen non polar.

Output yang dihasilkan berupa berkas .pdbqt. Selanjutnya, berkas .pdbqt dari makromolekul digunakan sebagai *input file* untuk mengubah muatan atom Fe menggunakan program vi dengan Cygwin (Lampiran 7). Atom Fe pada struktur kristal CYP2C9 dari PDB tidak memiliki muatan, sehingga untuk menyesuaikan muatan Fe yang berperan pada proses oksidasi substrat pada awal reaksi maka muatan Fe diubah menjadi tingkat oksidasinya (+3).

5. Pembuatan berkas parameter grid

Berkas parameter grid menjelaskan kepada modul **Autogrid4** mengenai daerah reseptor dan jenis *map* dari ligan yang akan dihitung potensialnya. Jenis *map* bergantung pada jenis atom, sehingga untuk memilih jenis *map* adalah dengan memilih jenis ligan. Antara satu ligan dengan ligan yang lain memiliki jenis *map* yang berbeda, bergantung pada macam atom pada ligan tersebut. Suatu ligan memiliki satu *map* elektrostatik, satu *map* desolvasi, dan beberapa *map* atom spesifik yang terdapat secara terpisah. Setelah memilih jenis ligan, dilakukan penentuan ukuran kotak grid (*grid box*). Kotak grid ini mendefinisikan besarnya area penambatan molekuler. Penentuan besarnya kotak grid berdasar pada ligan dan situs aktif dari CYP2C9. Kotak grid harus mampu menampung molekul ketika berotasi bebas, umumnya dua kali jarak atom terjauh ligan dan dapat mencakup area situs pengikatan dari makromolekul.

Berdasar pada ukuran *grid box* yang digunakan pada penambatan molekuler CYP2C9 dengan diklofenak, maka digunakan ukuran kotak grid 50 x 54 x 60 poin, satu poin berukuran 0,375 Å (5). Pembuatan parameter grid dilakukan menggunakan program **Grid** pada AutoDock Tools yang membutuhkan *input* ligan dan makromolekul dengan berkas *.pdbqt* yang akan menghasilkan berkas *output* berupa *.gpf* (*grid parameter file*), berkas *.gpf* ini selanjutnya digunakan sebagai *input file* untuk mendapatkan *grid map* dengan perintah **Autogrid4** pada Cygwin (Lampiran 7).

6. Pembuatan berkas parameter penambatan (*docking*)

Berkas parameter penambatan menjelaskan kepada modul **Autodock4** mengenai berkas *map* ligan yang akan digunakan, molekul yang akan bergerak, bagian yang menjadi pusat dari ligan, jumlah torsi dari ligan tersebut, posisi awal ligan untuk memulai pergerakan, residu fleksibel yang harus bergerak jika rantai samping residu di modelkan untuk bergerak, algoritma penambatan manakah yang akan digunakan sebagai metode pencarian (*searching methode*), dan banyak hasil penambatan (*run*) yang diinginkan. Pembuatan parameter *docking* dilakukan dengan menggunakan program **Docking** pada AutoDock Tools, membutuhkan *input* ligan dan makromolekul dengan berkas *.pdbqt* yang akan menghasilkan berkas *output* berupa *.dpf* (*docking parameter file*).

Parameter yang digunakan untuk membuat parameter *docking* adalah parameter *default* yang terdapat pada program **Docking**. Algoritma yang digunakan adalah LGA dengan nilai *Number of GA Runs* 100 dan *Maximum Number of Energy Evaluation* 2,5 M (2 500 000) dan 25 M (25 000 000). Selanjutnya, berkas .dpf ini digunakan sebagai *input* untuk mendapatkan hasil penambatan, yang dijalankan dengan perintah Autodock4 pada Cygwin (Lampiran 7). Setiap kombinasi ligan-makromolekul masing-masing dilakukan sebanyak tiga kali percobaan (Tabel 5).

7. Analisis hasil penambatan

Hasil penambatan berupa berkas dengan ekstensi .dlg (Lampiran 6) mencatat rincian mengenai apa yang menjadi *input file*, banyaknya *run* dalam penambatan tersebut, struktur penambatan yang ditemukan di akhir tiap *run*, energi bebas (ΔG) dari tiap konformasi penambatan, dan nilai konstanta inhibisi. Pada akhir dari berkas .dlg terdapat rangkuman hasil *docking*. Hasil *docking* disusun dalam bentuk kelompok yang disebut *cluster*. Tiap *run* yang memiliki kemiripan dalam hal nilai energi bebas dan konformasi terhadap situs aktif, terdapat dalam satu *cluster*. *Cluster-cluster* tersebut menunjukkan penyebaran data dari seratus konformasi hasil *docking*. Maka dikenal adanya *cluster best dock* dan *cluster best cluster* (Gambar 12). Hasil konvergen dihasilkan bila hanya terdapat *cluster best dock*. Sedangkan hasil divergen

dihasilkan bila *best dock* dan *best cluster* terdapat dalam *cluster* yang terpisah.

Apabila dari ketiga percobaan semuanya memberikan hasil konvergen, maka diambil *run* yang memiliki energi bebas terkecil dari tiap percobaan. Apabila penyebaran data divergen, diambil *run* yang memiliki energi bebas terkecil dari *cluster best dock* dan *cluster best cluster*. Selanjutnya dipilih *run* yang memiliki *posing* (konformasi), *scoring* (nilai energi bebas), dan persentase terbaik untuk dianalisis lebih lanjut. *Run* yang terpilih dianalisis secara visual pada situs aktifnya menggunakan program visualisasi molekuler PyMOL. Residu yang berikatan secara hidrofobik dengan ligan dianalisis menggunakan program Ligplot, sedangkan ikatan hidrogen yang terjadi antara ligan dan makromolekul dianalisis secara manual dengan PyMOL.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Pemisahan struktur kristal

Struktur kristal 1OG5 memiliki dua subunit, A dan B, sedangkan struktur kristal 1R9O hanya memiliki satu subunit. Program Edit PDB File dalam kumpulan program CCP4 memisahkan subunit A dengan subunit B pada struktur kristal 1OG5. Perintah **cat** dan **grep** pada program Cygwin memisahkan ligan S-warfarin dari struktur kompleks 1OG5, flurbiprofen dan gliserol dari struktur kompleks 1R9O, serta molekul air. Hasilnya adalah struktur kristal enzim CYP2C9 bebas ligan yang dapat digunakan sebagai makromolekul pada penambatan molekuler.

2. *Superpose* struktur kristal CYP2C9 1OG5 dan 1R9O

Hasil *Superpose* dengan program Superpose pada kumpulan program CCP4 dari 1R9O dan 1OG5 memiliki nilai RMSD sebesar 0,870 Å (Gambar 15).

3. Penyusutan energi (*energy minimization*) dan pencarian konformasi terbaik struktur ligan

Program Vega ZZ menghasilkan konformasi terbaik dari S-warfarin, sulfafenazol, fenitoin, dan simetidin dengan energi terendah (Gambar 16).

4. Pembuatan berkas ligan dan makromolekul

AutoDock Tools menghasilkan ligan dan makromolekul dengan berkas .pdbqt. Atom Fe dari makromolekul memiliki muatan +3. Ligan dan makromolekul yang dihasilkan ini siap digunakan sebagai *input* proses *docking*.

5. Pembuatan berkas parameter grid

Ukuran kotak grid 50 x 54 x 60 menghasilkan pusat dari kotak grid (*center grid box*) pada 1R9O adalah [2.966, 25.812, -0.206] dan pada 1OG5 adalah [-21.105, 78.284, 30.093]. Fenitoin memiliki jenis *map* untuk atom A, N, OA, dan HD. Simetidin memiliki jenis *map* untuk atom A, C, HD, N, NA, dan SA. S-warfarin memiliki jenis *map* untuk atom A, C, HD, dan OA. Sulfafenazol memiliki jenis *map* untuk atom A, HD, N, NA, OA, dan S. Tiap ligan juga memiliki masing-masing *map* e (elektrostatik) dan *map* d (desolvasi). Seluruh berkas *map* memiliki ekstensi .map (Lampiran 4). Selain

itu, Autogrid4 juga menghasilkan berkas dengan ekstensi .glg, .maps.fld, dan .maps.xyz. Hasilnya adalah grid *map* dari atom-atom spesifik pada ligan yang jenisnya dan banyaknya bergantung pada jenis atom yang terdapat pada ligan tersebut, serta *map* elektrostatik dan *map* desolvasi.

6. Pembuatan berkas parameter penambatan (*docking*)

Berkas parameter penambatan (*docking*) yang dihasilkan oleh Autodock Tools memiliki ekstensi *file* .dpf (Lampiran 5). Berkas ini berisi parameter-parameter yang digunakan pada *docking*.

7. Analisis hasil penambatan

Hasil penambatan molekuler terdapat dalam berkas .dlg. Penambatan sulfafenazol pada 1OG5 dan 1R9O memberikan hasil divergen, kecuali percobaan pertama. *Posing* dari sulfafenazol yang memiliki nilai energi bebas terkecil dari *cluster best dock* dan *cluster best cluster* diberikan pada gambar 21 dan Gambar 22, sedangkan *scoring* sulfafenazol terdapat pada Tabel 6. Simetidin memiliki hasil konvergen pada 1R9O, sedangkan pada 1OG5 memberikan hasil divergen (Gambar 25 dan Gambar 26) dengan *scoring* diberikan pada Tabel 8. S-warfarin dan fenitoin memiliki hasil konvergen. Konformasi dan nilai energi bebas dari S-warfarin diberikan pada Gambar 23, Gambar 24, dan Tabel 7. Konformasi fenitoin diberikan pada Gambar 27 dan

Gambar 28, sedangkan nilai energi bebas diberikan pada Tabel 9. Analisis hasil penambatan molekuler dari tiap ligan yang memberikan nilai energi pengikatan (ΔG) dan konstanta inhibisi (K_i) yang terbaik dirangkum pada Tabel 10.

B. PEMBAHASAN

Sitokrom P450 isoform 2C9 telah diketahui sebagai enzim pemetabolisme utama obat dan menjadi fokus pada telaah metabolisme dan interaksi obat dengan obat. Salah satu interaksi obat yang diperkirakan dimediasi oleh CYP2C9 adalah intoksikasi fenitoin karena pemberian bersamaan dengan simetidin yang menyebabkan peningkatan kadar plasma fenitoin dalam tubuh. Suatu metode *in silico*, penambatan molekuler, digunakan untuk menganalisis interaksi kedua obat pada CYP2C9 secara molekuler dan mengkonfirmasi interaksi obat yang terjadi antara kedua obat.

Pada penambatan molekuler ini, menggunakan semua parameter *default* pada AutoDock Tools, kecuali banyaknya konformasi yang ingin dihasilkan dari sekali proses penambatan molekuler dijalankan, yaitu 100, dan besarnya energi evaluasi yang digunakan untuk menjalankan proses *docking* dengan menggunakan algoritma *docking* GALS (Lampiran 5). Tiap konformasi yang dihasilkan dikelompokkan ke dalam *cluster-cluster* berdasar nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD), dengan nilai toleransi maksimum RMSD tiap anggota dalam *cluster* adalah 2 Å. Hasil dari penambatan

kemudian dipilih berdasar kriteria energi interaksi dan kualitas kecocokan geometri. Struktur ligan yang digunakan untuk telaah penambatan dioptimasi menggunakan *force field* SP4 pada *software* VegaZZ.

Struktur 3D dari CYP2C9 yang digunakan pada studi ini adalah struktur kristal CYP2C9 yang berikatan kompleks dengan flurbiprofen (PDB ID: 1R9O) dan S-warfarin (PDB ID: 1OG5), sedangkan apostruktur (PDB ID: 1OG2) tidak digunakan. Apostruktur tidak digunakan pada penambatan karena berdasar studi *mapping solvent* yang dilakukan Clodfeter et al. menunjukkan bahwa saluran pengikatan yang besar menyebabkan kemampuan yang rendah untuk mengikat molekul kecil, yang menyebabkan perhitungan penambatan menjadi tidak efektif (6). Dengan demikian, kristal 1OG2 tidak dapat digunakan sebagai makromolekul target pada penambatan molekuler. Selain itu, 1OG2 memiliki nilai resolusi kristalisasi sinar X terbesar (2,60 Å) dibandingkan dua struktur kristal lainnya. Kristal 1R9O memiliki resolusi terbaik dari ketiga struktur kristal CYP2C9 dengan nilai R sebesar 2,00 Å, sedangkan 1OG5 memiliki nilai R sebesar 2,55 Å. Makromolekul target mempengaruhi kualitas *posing* dan *scoring* dari hasil penambatan molekuler, sehingga pemilihan dan persiapan model struktur dari makromolekul target merupakan variabel yang penting (14).

Hasil dari *superpose* 1R9O dan 1OG5 memberikan kesamaan struktur tiga dimensi dengan nilai RMSD 0,870 Å (nilai RMSD kurang dari 2 Å) (48). Struktur kristal 1OG5 dan 1R9O memiliki perbedaan pada beberapa residu asam amino. Residu yang berbeda tersebut terletak pada residu 38 sampai

42 yang membentuk *loop* heliks A' dan residu 213 hingga 223 yang membentuk *loop* heliks F' - G' (Gambar 15). Pada struktur 1R9O, *loop* heliks A', F' dan G' merupakan daerah *disordered*, tidak terdapat pada struktur kristal. Sedangkan pada struktur kristal 1OG5, heliks F' - G' dibentuk dari tujuh residu asam amino tersubstitusi. Substitusi residu asam amino diperoleh dari proses mutasi yang bertujuan untuk meningkatkan karakteristik struktur pada proses kristalisasi. Substitusi asam amino tersebut adalah Lys206Glu, Ile215Val, Cys216Tyr, Ser220Pro, Pro221Ala, Ile222Leu, dan Ile223Leu (Gambar 3) (1). Struktur kristal 1R9O disebut juga sebagai *wild-type* CYP2C9, karena sekuens yang digunakan untuk membuat struktur 1R9O mengikuti sekuens asli (*native*). Meskipun sekuens dari dua struktur P450 2C9 yang digunakan untuk kristalisasi berbeda, perbedaan yang jelas diantara 1R9O dan 1OG5 adalah untuk menunjukkan fleksibilitas konformasional dari protein (5).

Simetidin merupakan senyawa yang memiliki 8 ikatan yang dapat berotasi, 6 diantaranya merupakan torsi aktif yang terdeteksi oleh AutoDock Tools, sedangkan fenitoin hanya memiliki 2 torsi aktif. Senyawa kontrol positif, keduanya masing-masing memiliki 5 torsi aktif. Banyaknya ikatan yang dapat berotasi pada suatu ligan menentukan fleksibilitas ligan. Fleksibilitas ligan berpengaruh besar terhadap prediksi konformasi yang tepat dibandingkan polaritas dan ukuran ligan, dimana fleksibilitas ligan berkaitan dengan *posing* hasil *docking* (14). Faktor tersebut menyebabkan adanya kesulitan untuk membedakan hasil pencarian konformasi, yaitu antara *posing*

yang kurang baik namun memiliki nilai energi bebas (ΔG) yang kecil dengan hasil konformasi yang baik namun memiliki nilai energi bebas yang besar pada hasil penambatan yang divergen (Gambar 20.b).

Hasil konformasi terbaik dari sulfafenazol (kontrol positif inhibitor) memiliki nilai ΔG dan konstanta inhibisi (K_i) pada struktur 1R9O dan struktur 1OG5 berturut-turut adalah -7,25 kkal/mol dan 4,85 μM serta -6,74 kkal/mol dan 11,52 μM (Table 10). Sedangkan hasil konformasi terbaik dari S-warfarin (kontrol positif substrat) memiliki nilai ΔG dan K_i sebesar -8,70 kkal/mol dan 0,042 μM pada 1R9O, serta -7,94 kkal/mol dan 1,51 μM pada 1OG5 (Tabel 10). Nilai ΔG dan K_i dari S-warfarin lebih kecil dibandingkan dengan sulfafenazol. S-warfarin digunakan sebagai *benchmark* substrat (20). Meskipun demikian, dari hasil diatas menunjukkan bahwa S-warfarin dapat berperan sebagai substrat dan inhibitor. Peran S-warfarin sebagai inhibitor pada CYP2C9 akan terlihat bila S-warfarin diberikan bersamaan dengan substrat CYP2C9 lainnya yang memiliki afinitas lebih rendah terhadap CYP2C9, seperti fenitoin (17). Sedangkan sulfafenazol sebagai inhibitor kompetitif, membutuhkan konsentrasi yang tinggi agar dapat menggeser substrat yang telah berikatan dengan CYP2C9, yang ditunjukkan dari nilai ΔG dan K_i yang lebih besar dibandingkan dengan kontrol positif substrat.

Pada penambatan molekuler fenitoin dengan makromolekul target 1R9O, afinitas terhadap enzim CYP2C9 lebih lemah dibandingkan dengan afinitas S-warfarin, yang dibuktikan dari nilai energi pengikatan fenitoin lebih besar (-6,88 kkal/mol) dibandingkan dengan energi pengikatan S-warfarin (-

8,70 kkal/mol). Nilai konstanta inhibisi fenitoin terhadap CYP2C9 (9,06 μM) juga lebih besar daripada S-warfarin (0,042 μM). Hasil yang sama juga di dapatkan pada penambatan molekuler dengan makromolekul target 1OG5. S-warfarin memiliki afinitas yang lebih besar ketika membentuk kompleks S-warfarin-CYP2C9 dibandingkan dengan fenitoin, dimana S-warfarin memiliki ΔG -7,94 kkal/mol dengan K_i 1,51 μM sedangkan ΔG dan K_i dari fenitoin berturut-turut adalah -5,97 kkal/mol dan 41,90 μM (Tabel 10).

Ligan simetidin menunjukkan afinitas yang lebih lemah dibandingkan afinitas kontrol positif inhibitor, sulfafenazol, pada CYP2C9. Nilai energi pengikatan dari simetidin (-4,39 kkal/mol) yang lebih besar dibandingkan energi pengikatan sulfafenazol (-7,25 kkal/mol), dan nilai konstanta inhibisi simetidin (602,80 μM) yang juga lebih besar dibandingkan sulfafenazol (4,85 μM) pada 1R9O, menunjukkan bahwa simetidin merupakan inhibitor lemah pada CYP2C9 dibandingkan dengan sulfafenazol. Penambatan molekuler pada makromolekul target 1OG5 juga menunjukkan hasil yang sama, perbandingan nilai energi pengikatan dan konstanta inhibisi menunjukkan bahwa nilai ΔG dan K_i simetidin (-4,15 kkal/mol dan 915,28 μM) lebih besar daripada sulfafenazol (-6,74 kkal/mol dan 11,52 μM) (Tabel 10).

Penambatan molekuler pada makromolekul target 1R9O secara umum memperlihatkan hasil yang lebih baik dibandingkan pada makromolekul target 1OG5. Selain karena hasil ΔG dan K_i pada penambatan molekuler menggunakan 1R9O lebih kecil dibandingkan dengan 1OG5, kedekatan hasil K_i senyawa kontrol positif pada percobaan ini dengan K_i senyawa kontrol

positif yang dihasilkan dengan metode in-vitro juga memberikan kesimpulan bahwa makromolekul target 1R9O lebih efektif digunakan untuk penambatan molekuler. Nilai K_i dari percobaan untuk S-warfarin dan sulfafenazol pada 1R9O berturut-turut adalah 0,042 μM dan 4,85 μM , sedangkan nilai K_i untuk S-warfarin dan sulfafenazol secara in vitro secara berturut-turut adalah 0,17 μM dan 0,4 μM (49, 50).

Berdasar pada hasil penambatan molekuler, simetidin memiliki afinitas yang lebih lemah dengan CYP2C9 dibandingkan dengan kompleks fenitoin-CYP2C9 (Tabel 10). Selain itu, nilai K_i fenitoin lebih kecil dibandingkan nilai K_i dari simetidin. Kedua parameter tersebut menunjukkan bahwa simetidin merupakan inhibitor lemah untuk fenitoin, sehingga untuk dapat menggeser fenitoin dari tempat pengikatan CYP2C9 dibutuhkan konsentrasi yang tinggi. Hal ini berkaitan dengan dosis simetidin yang digunakan pada uji interaksi simetidin dengan fenitoin, yaitu 1000 mg sehari (Tabel 4), lebih besar dibandingkan dosis fenitoin. Dengan demikian, peningkatan kadar plasma fenitoin yang disebabkan karena pemberian bersamaan dengan simetidin diperkirakan melalui inhibisi enzim pemetabolisme fenitoin CYP2C9.

Superposisi konformasi pengikatan 3D (Gambar 29 dan Gambar 30) antara simetidin dan fenitoin pada CYP2C9 menunjukkan bahwa tempat interaksi fenitoin dan simetidin terhadap situs aktif adalah sama. Simetidin dan fenitoin terdapat dalam posisi yang sama, yaitu dekat dengan heme. Inhibisi kompetitif terjadi pada situs pengikatan substrat atau yang disebut sebagai situs pengikatan katalitik (4). Hasil ini memprediksikan bahwa

interaksi fenitoin dengan simetidin melalui mekanisme inhibisi kompetitif pada CYP2C9, yaitu simetidin terdapat dalam situs pengikatan yang sama dengan substrat fenitoin.

Selain itu, simetidin dan fenitoin keduanya memiliki gugus heteroaromatik yang mengandung nitrogen, berupa inti imidazol (Gambar 16). Ada bagian dari struktur inhibitor yang menyerupai struktur substrat merupakan ciri lain dari inhibitor kompetitif, atau yang sering disebut sebagai inhibitor analog substrat (4). Oleh karena itu, inhibitor tersebut dapat berikatan secara reversibel dengan enzim sehingga yang seharusnya membentuk kompleks enzim substrat [EnzS] dalam hal ini CYP2C9Fenitoin justru membentuk kompleks enzim inhibitor [EnzI] CYP2C9Simetidin. Bila substrat sekaligus inhibitor ini terdapat bersamaan, maka keduanya akan bersaing memperebutkan situs pengikatan yang sama pada enzim (4). Seluruh hasil di atas membuktikan bahwa penambatan molekuler atau secara umum disebut sebagai metode *in silico* dapat digunakan untuk mengkonfirmasi interaksi antara fenitoin dan simetidin yang terjadi pada proses metabolisme fenitoin.

Hasil analisis manual residu asam amino yang membentuk situs aktif menggunakan program visualisasi molekuler, PyMOL, menunjukkan bahwa situs aktif dari CYP2C9 merupakan situs aktif yang besar, baik pada 1R9O maupun 1OG5 (Gambar 29 dan Gambar 30). Besarnya situs aktif ini memungkinkan terjadinya interaksi antara satu obat dengan obat lain yang terjadi pada proses metabolisme substrat karena inhibisi enzim, seperti

terjadinya interaksi antara fenitoin dan simetidin. Hal ini dikarenakan CYP2C9 dapat mengikat lebih dari satu ligan pada situs aktifnya yang besar (3).

Situs aktif dari CYP2C9 didominasi residu hidrofobik, seperti Ile99, Phe100, Phe110, Leu102, Ala103, Val113, Phe114, Leu201, Ile205, Leu208, Val237, Met240, Val292, Ala297, Leu366, Pro367, Phe476, dan Ala477. Residu Phe69, Phe100, Leu102, Leu208, Leu362, Leu366, dan Phe476 membentuk jalan hidrofobik ke dalam situs aktif. Residu hidrofobik/aromatik yang penting pada pintu masuk ligan ke situs aktif CYP2C9 adalah Phe100 dan Phe476, yang berperan sebagai *gate keeper* (6). Pada 1OG5, jarak Phe476 dan Phe100 lebih besar (5,51 Å) (Gambar 31) dibandingkan jarak kedua residu pada 1R9O (3,31 Å) (Gambar 32). Perbandingan jarak tersebut memperlihatkan bahwa kompleks S-warfarin (1OG5) merupakan struktur terbuka, sedangkan kompleks flurbiprofen (1R9O) memiliki konformasi tertutup. Konformasi terbuka dan tertutup mempengaruhi keberhasilan suatu ligan untuk dapat membentuk kompleks dengan makromolekul target.

Program AutoDock tidak memperhitungkan fleksibilitas makromolekul target, target dianggap sebagai senyawa kaku (*rigid*). Dengan demikian, konformasi terbuka memiliki situs aktif yang lebih besar dibandingkan dengan situs aktif pada konformasi yang tertutup. Konformasi terbuka menyebabkan residu asam amino terdapat dalam jarak yang lebih jauh dengan ligan, sedangkan jarak residu asam amino pada konformasi tertutup lebih dekat dengan ligan. Sehingga, pada struktur target dengan konformasi tertutup

(1R9O) memberikan nilai energi bebas pengikatan yang lebih kecil dibandingkan pada struktur dengan konformasi terbuka (1OG5).

Arg105 dan Arg108 merupakan residu hidrofil. Pada 1OG5, kedua residu hidrofil ini terdapat pada posisi yang mengarah pada permukaan enzim (Gambar 31), menyebabkan hidrofobitas permukaan enzim yang dekat dengan pintu masuk ligan lebih lemah dibandingkan pada struktur kristal 1R9O (Gambar 32). Hasil ini memprediksikan bahwa substrat hidrofobik seperti fenitoin tidak dapat lebih dekat dengan tempat masuknya substrat, sehingga sulit untuk masuk ke dalam situs aktif enzim. Kesulitan ini memungkinkan menjadi salah satu penyebab nilai energi bebas pengikatan kompleks fenitoin-1R9O lebih kecil dibandingkan dengan fenitoin-1OG5. Sehingga afinitas pada 1R9O lebih besar dibandingkan dengan 1OG5.

Residu basa pada situs aktif berperan penting pada pengikatan substrat. CYP2C9 memiliki selektivitas terhadap substrat lipofil yang bersifat asam, dengan demikian diperlukan adanya residu basa atau kationik pada situs aktifnya untuk menstabilkan ikatan substrat anion pada CYP2C9. Secara khusus, Lys72, Arg97, Arg105, Lys200, Arg108, dan Lys241 merupakan residu kationik pada situs aktif yang berperan pada pengikatan substrat anion (Gambar 29 dan Gambar 30). Berdasar pada eksperimen mutagenesis, substitusi Lys72 dan Arg105 hanya berefek kecil atau tidak berefek pada interaksi substrat. Residu Arg108, anggota dari loop B-C, berhubungan langsung dengan situs aktif, yang menunjukkan tidak hanya penting pada aktivitas enzim, namun berpartisipasi pada pengikatan selektif

dari substrat asam (6). Berdasar Ridderstrom et al., mutasi Arg108 dengan asam amino lain menyebabkan enzim menjadi inaktif untuk dapat mengeliminasi substrat asam (51). Selain itu, Arg108 memainkan peran penting pada pemosisian ligan sehingga molekul dapat ditempatkan pada orientasi yang benar (5).

Pada 1R9O, posisi Arg108 mengarah pada situs aktif enzim, sedangkan pada 1OG5, asam amino kationik ini terdapat dalam posisi yang mengarah pada permukaan enzim. Hal ini diprediksikan memberikan pengaruh pada hasil afinitas substrat fenitoin yang lebih besar pada 1R9O dibandingkan dengan 1OG5. Meskipun interaksi antara Arg108 dengan substrat fenitoin tidak membentuk ikatan hidrogen, namun posisi Arg108 yang mengarah ke situs aktif pada 1R9O memungkinkan memberi kontribusi yang lebih besar dibandingkan Arg108 pada 1OG5 untuk mengikat substrat fenitoin. Hal ini disebabkan Arg108 merupakan residu asam amino yang bersifat basa dan fenitoin merupakan substrat yang bersifat asam.

Selain itu, pada 1R9O, Arg108 distabilkan konformasinya pada situs aktif dengan adanya ikatan hidrogen yang terbentuk dengan residu disekitarnya, dengan jumlah ikatan yang lebih banyak dibandingkan dengan jumlah ikatan hidrogen antara Arg108 dengan residu disekelilingnya. Arg108 distabilkan dengan ikatan hidrogen yang terjadi dengan dua residu pada heliks I Asp293 dan Asn 289 (Gambar 33), sedangkan pada 1OG5, Arg108 hanya distabilkan dengan adanya ikatan hidrogen dengan Asn289 (Gambar 34). Hal ini karena Arg108 pada 1OG5 mengarah ke permukaan enzim.

Mutagenesis Asp293 menyebabkan perubahan pada oksidasi diklofenak, substrat lain dari 2C9, yang juga mempengaruhi stabilitas enzim. Asp293 juga menunjukkan penstabil struktur pada belokan yang dibentuk dari tulang punggung residu 111-114 (5).

Pada kompleks fenitoin-1R9O, hanya terbentuk satu ikatan hidrogen, yaitu atom nitrogen dari NH (amin) pertama gugus hidantoin pada fenitoin berikatan dengan Ala297 (Gambar 35). Sedangkan pada kompleks fenitoin-1OG5 distabilkan dengan empat ikatan hidrogen. Atom O pada OH residu Thr301 membentuk tiga ikatan hidrogen, satu dengan atom N pada NH posisi ketiga, dua yang lainnya dengan atom O keton posisi 2 dan 4 pada fenitoin, serta Ala297 dengan atom N pada NH ketiga gugus hidantoin (Gambar 36). Ikatan hidrogen yang terbentuk antara fenitoin dan residu asam amino pada situs aktif CYP2C9 menstabilkan kompleks yang terbentuk, sehingga banyaknya ikatan hidrogen yang terbentuk menunjukkan stabilitas ligan pada situs aktif. Hasil ini menunjukkan bahwa afinitas fenitoin pada 1OG5 lebih kuat dibandingkan pada 1R9O. Namun, kesimpulan tersebut tidak terbukti pada hasil penambatan molekuler, dimana afinitas fenitoin pada 1R9O lebih besar dibandingkan pada 1OG5. Hal ini dapat dijelaskan bahwa pada penambatan molekuler ini juga terdapat ikatan kimia lainnya yang tidak dapat dianalisis secara visual, seperti ikatan van der Waals, yang berkontribusi pada afinitas ligan terhadap makromolekul. Ikatan hidrogen merupakan ikatan lemah jika terdapat secara individual, namun bila terdapat secara bersamaan dalam intermolekul maupun intramolekul, dapat menjadi ikatan yang kuat dan

menstabilkan struktur, baik pada struktur enzim, maupun struktur kompleks ligan-enzim. Pada analisis ikatan hidrogen yang digunakan adalah ikatan hidrogen yang memiliki jarak kurang dari 4 Å (51). Analisis ikatan hidrogen dilakukan dengan menggunakan program PyMOL. Jarak ikatan hidrogen diukur dari satu atom elektronegatif ke atom elektronegatif lainnya yang memiliki hidrogen. PyMOL tidak dapat mengukur jarak antara atom hidrogen dengan atom elektronegatif yang membentuk ikatan hidrogen dengannya.

Selain distabilkan dengan ikatan hidrogen, kompleks fenitoin-CYP2C9 juga distabilkan dengan interaksi hidrofobik pada pusat situs aktif (dekat dengan heme). Phe114 merupakan residu hidrofobik dari CYP2C9 yang berperan membentuk π - π *stacking interaction* dengan residu aromatis dari substrat. Berdasar studi mutagenesis, Phe114 juga berperan sebagai residu selektif substrat untuk membentuk interaksi dengan substrat (1). Jarak gugus fenil fenitoin dengan gugus fenil dari Phe114 pada 1R9O lebih dekat (3,73 Å) (Gambar 37) dibandingkan pada 1OG5 (4,58 Å) (Gambar 38). Namun, kedua gugus tersebut tidak terdapat dalam posisi yang bertumpuk, sehingga tidak terbentuk π - π *stacking interaction*, hanya interaksi hidrofobik. Berdasar pada hasil Ligplot, Phe114 pada kompleks fenitoin-1R9O berinteraksi secara hidrofobik, sedangkan pada kompleks fenitoin-1OG5, Phe114 tidak membentuk interaksi hidrofobik dengan fenitoin. Hal ini diprediksikan sebagai faktor yang menyebabkan nilai energi bebas interaksi pada kompleks fenitoin-1R9O lebih kecil daripada kompleks fenitoin-1OG5.

Hasil metabolit fenitoin pada manusia adalah S (-) 5-(4-Hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin, yang merupakan hasil hidroksilasi gugus aromatis dari fenitoin. Fenitoin merupakan senyawa yang memiliki struktur simetris, sehingga untuk menentukan gugus fenil manakah yang di hidroksilasi pada fenitoin tidak dapat ditentukan. Oleh karena itu, jarak tempat hidroksilasi diukur dari posisi *para* kedua gugus fenil yang terdapat pada fenitoin. Jarak terjadinya 5 (4-hydroxyphenyl) pada fenitoin terhadap heme pada 1OG5 (8,50 Å & 9,20 Å) sedikit lebih jauh dibandingkan dengan 1R9O (8,61 Å & 8,22 Å) (Tabel 11).

Jarak keduanya diperkirakan sebagai jarak pengenalan substrat oleh CYP2C9, bukan jarak yang tepat untuk membentuk produk hidroksilasi, karena pada umumnya jarak hidroksilasi untuk serangan oksidatif enzim adalah kurang dari 5 Å (1). Jarak demikian (sekitar 10 Å) merupakan posisi yang tidak produktif sebagai posisi hidroksilasi dari situs pengikatan CYP2C9, diprediksikan sebagai posisi pemberhentian sementara substrat untuk mengalami perubahan konformasional yang memfasilitasi terjadinya katalisis, yang disebut sebagai situs pengenalan substrat. Spekulasi langkah yang memfasilitasi katalisis tersebut antara lain perubahan konformasional yang disebabkan transfer elektron atau reduksi besi heme melalui interaksi dengan *electron-transfer partner*, sitokrom P450 reduktase (1).

Heme merupakan gugus prostetik yang menentukan aktivitas katalitik dari enzim CYP, termasuk CYP2C9. Residu Arg97 menstabilkan heme pada 1R9O dan 1OG5 dengan membentuk ikatan hidrogen dengan propionat

heme serta dengan atom oksigen karbonil dari Pro367 dan residu Val113 (Gambar 39 dan Gambar 40). Hal tersebut menunjukkan, meskipun letak Arg97 dekat dengan ligan yang terikat, namun, Arg97 lebih menunjukkan sebagai penstabil heme dibandingkan perannya dalam menstabilkan interaksi dengan substrat. Mutasi dari Arg97 secara drastis mengubah efisiensi katalitik, sehingga menunjukkan peran penting dari Arg97 pada penstabil struktur, bukan pada interaksi selektif dengan substrat (1).

Pemilihan konformasi simetidin juga mempertimbangkan posisi gugus imidazol, terutama jarak atom nitrogen dari heme, selain melihat nilai energi interaksi dan konstanta inhibisi yang relatif kecil. Hal ini dikarenakan atom nitrogen gugus imidazol dari simetidin diketahui dapat berikatan kuat dengan heme dan mengurangi aktivitas katalitik dari CYP 450. Jarak atom N pada gugus imidazol simetidin terhadap heme pada 1R9O dan 1OG5 berturut-turut adalah 6,90 Å dan 8,00 Å serta 2,79 Å dan 3,82 Å (Tabel 12).

Posing simetidin terhadap 1OG5 lebih baik dibandingkan dengan 1R9O dengan jarak atom N gugus imidazol yang lebih dekat. Dengan demikian afinitas simetidin pada 1OG5 lebih besar dibandingkan pada 1R9O. Namun kesimpulan tersebut tidak terbukti pada energi bebas pengikatan, dimana energi bebas pengikatan pada 1R9O lebih kecil (-4,39 kkal/mol) dibandingkan dengan nilai energi bebas pengikatan pada 1OG5 (-4,15 kkal/mol). Bila melihat kepada perannya sebagai inhibitor kompetitif bagi fenitoin pada CYP2C9, letak gugus imidazol pada 1R9O tepat berada pada gugus fenil dari fenitoin, tempat diprediksikan sebagai situs pengenalan

substrat fenitoin (Gambar 29). Sehingga jarak atom N pada gugus imidazol simetidin 6,90 Å dan 8,00 Å adalah jarak simetidin dari heme untuk menghambat CYP2C9 yang menyebabkan aktivitas CYP2C9 menurun untuk menghidroksilasi fenitoin. Maka, hasil *posing* dengan makromolekul 1R9O memberikan visualisasi dan energi bebas terbaik untuk memahami interaksi fenitoin dengan simetidin.

Simetidin merupakan senyawa polar dengan nilai clogP 0,4 (24). Pada penambatan molekuler simetidin pada 1OG5, penyebaran *clustemya* divergen (Gambar 20.b), sehingga apabila melihat pada energi pengikatan terkecil yang dihasilkan simetidin, yaitu hingga -4,64 kcal/mol (Tabel 4) dapat diperkirakan bahwa tingkat hidrofobisitas dari enzim mempengaruhi energi bebas interaksi. Hal ini disebabkan hidrofobisitas dari 1OG5 lebih kecil dibandingkan dengan 1R9O, dimana terdapat residu Arg105 dan Arg108 yang posisinya mengarah pada permukaan enzim dekat pintu masuk ligan, yang menyebabkan lebih polar. Polaritas enzim CYP2C9 struktur 1OG5 menyebabkan simetidin lebih mudah masuk ke dalam situs aktif untuk menghambat enzim, yang menyebabkan energi bebas yang dihasilkan lebih kecil dibandingkan pada 1R9O. Namun, keterulangan konformasi yang memiliki energi terkecil ini kurang dari 10%, maka tidak digunakan sebagai hasil penambatan terbaik (Tabel 8).

Pada situs aktif CYP2C9, terdapat residu asam amino yang bersifat asam, seperti Glu300 dan Asp293. Dilihat dari struktur molekulnya, simetidin merupakan senyawa yang bersifat basa lemah dan bersifat polar. Adanya

residu asam membuktikan bahwa simetidin dapat terikat dalam situs aktif CYP2C9, ditambah dengan adanya residu polar seperti Thr301. Simetidin distabilkan dengan adanya ikatan hidrogen. Empat ikatan hidrogen yang terdapat pada kompleks simetidin-1R9O menstabilkan ikatan simetidin pada situs aktif 1R9O, yang terbentuk dengan residu Glu300, Thr304, dan Gly296 (Gambar 41 dan Tabel 12), sedangkan kompleks simetidin-1OG5 distabilkan dengan terbentuknya enam ikatan hidrogen dengan residu Ala297, Thr299, Leu201, Glu300, dan Gly296 (Gambar 42 dan Tabel 12). Selain itu, kompleks simetidin CYP2C9 juga distabilkan dengan adanya interaksi hidrofobik pada situs aktif CYP2C9 yang ditunjukkan dari hasil analisis Ligplot pada Gambar 45 dan Gambar 46. Hasil analisis residu yang berinteraksi hidrofobik dari Ligplot menunjukkan bahwa residu Leu362, Ile205, Glu300, dan Thr301 berinteraksi hidrofobik dengan fenitoin dan simetidin, pada 1R9O (Tabel 13). Sedangkan pada 1OG5, residu yang berinteraksi hidrofobik dengan fenitoin dan simetidin adalah Leu362, Ala297, Gly296, dan Leu366 (Tabel 13).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Penambatan molekuler menggunakan struktur kristal 1R9O lebih efektif dibandingkan menggunakan struktur 1OG5. Substrat fenitoin distabilkan pengikatannya pada CYP2C9 dengan adanya ikatan hidrogen, interaksi dengan Arg108 sebagai residu kationik, interaksi hidrofobik khususnya dengan residu Phe114. Sedangkan inhibitor simetidin distabilkan pengikatannya pada CYP2C9 dengan adanya ikatan hidrogen dengan beberapa residu asam amino termasuk Glu300 yang juga berperan sebagai residu anionik, serta adanya interaksi hidrofobik. Simetidin menjadi inhibitor kompetitif CYP2C9 pada situs pengenalan substrat fenitoin.

B. SARAN

1. Perlu dilanjutkan kembali dengan mengorientasikan residu Phe114, Arg108, Phe100, Glu300, dan Phe476 sebagai residu fleksibel.
2. Waktu proses penambatan molekuler sebaiknya ditambah, mengingat beberapa hasil dari penambatan molekuler terdapat dalam penyebaran yang divergen.

DAFTAR ACUAN

1. Williams PA, Cosme J, Ward A, Angove HC, Matak VD & Jhoti H. Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature*. 2003. **424**: 464–468.
2. Tanaka T, Okuda T & Yamamoto Y. Characterization of the CYP3A4 active site by homology modeling. *Chem. Pharm. Bull.* 2004. **52**(7): 830-835.
3. Murray KR, Graner DK, Mayer PA & Rodwell VW. Biokimia Harper Ed 24. Terj. dari Harper Biochemistry 25thEd, oleh Andry H. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. 2003: 746.
4. Ahlstrom MM, Ridderstrom M & Zamora I. CYP2C9 structure – metabolisme relationship: Substrates, inhibitors, and metabolites. *J. Med. Chem.* 2007. **50**: 5382-5391.
5. Wester MR, Yano JK, Schoch GA, Yang C, Griffin KJ, Stout CD & Johnson EF. The structure of human cytochrome P450 2C9 complexed with flurbiprofen at 2.0-Å resolution. *J. Biol. Chem.* 2004. **259**(34): 35630-35637.
6. Polgar T, Menyhard DK & Keseru GM. Effective virtual screening protocol for CYP2C9 ligands using a screening site constructed from flurbiprofen and S-warfarin pockets. *J Comput Aided Mol Des.* 2007. **21**: 539-648
7. Baxter K, Davis M & Driver S. Stockley's Drug Interaction 8th Ed. London Chicago: Pharmaceutical Press. 2008: 4
8. Neuvonen PJ, Tokola RA & Kaste M. Cimetidine-phenytoin concentration and antipyrine test. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1981. **21**: 215-220
9. Craig S. Phenytoin poisoning. *Neurocritical Care.* 2005. **3**: 161-170
10. Brunton L, Parker K, Blumenthal D, & Buxton I. Goodman & Gilman's. Manual of pharmacology and therapeutics. 11th Ed. USA: McGraw-Hill Companies, Inc. 2008: 330.
11. Ieiri K, Mamiya K, Urae A, Wada Y, Kimura M, Irie S, Amamoto T, Kubota T, Yoshioka S, Nakamura K, Nakano S, Tashiro N & Higuchi S. Stereoselective 4'-hydroxylation of phenytoin relationship to (S)-

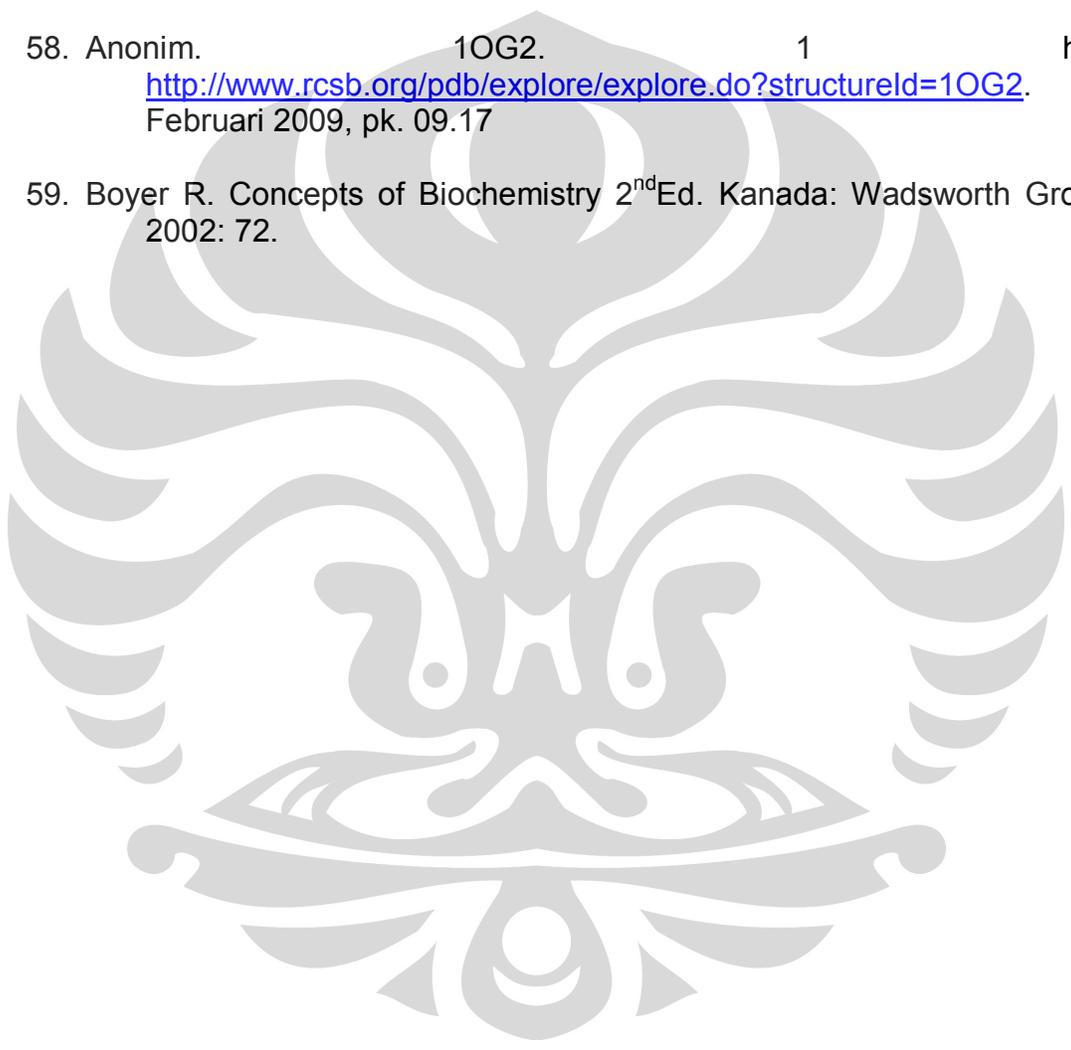
- mephenytoin polymorphism in Japanese *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1997. **43**: 441-445
12. DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG & Posey LM. Pharmacotherapy. A pathophysiologic approach 6th Ed. USA: McGraw-Hill Companies, Inc. 2005: 1078
 13. Hetzel DJ, Bochner F, Hllpike JF, Shearman DJC & Hann CS. Cimetidine interaction with phenytoin. *Short Review: British Medical Journal.* 1981. **282**:1512
 14. Kitchen DB, Decornez H, Furr JR & Bojorath J. Docking and scoring virtual screening for drug discovery: Methods and applications. *Nature Reviews: Drug Discovery.* 2004. **3**: 935-949
 15. Pospisil P & Folkers G. Making the best account of molecular docking in drug design. *FABAD J. Pharm. Sci.* 2004. **29**:81-92
 - 16 Iorga B, Herlem D, Barre E & Guillon C. Acetylcholine nicotinic receptors: Finding the putative binding site of allosteric modulators using the "Blind Docking" approach. *J Mol Model.* 2006. **12**: 366-372
 17. Afzelius L. Computational Modeling of Structures and Ligands of CYP2C9. Acta Universitatis Upsaliensis. *Comprehensive Summeries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy.* 2004.
 18. Lynch T & Price A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *American Family Physician.* 2007. **76**: 391-396.
 19. de Groot MJ. Designing better drugs: Predicting cytochrome P450 metabolism. *Review: Drug Discovery Today.* 2006. **11**: 601-606
 20. Walker JM & Yan Q. Methods in molecular biology. Pharmacogenomics in drug discovery and development. USA: Humana Press. 2008: 159, 224.
 21. Kumar V, Wahlstrom JL, Rock DA, Warren CJ, Gorman LA & Tracy TS. CYP2C9 inhibition: Impact of probe selection and pharmacogenetics on in vitro inhibition profiles. *Drug Metabolism and Disposition.* 2006. **34**: 1966-1975

22. Park H & Jeon YH. Toward the virtual screening of Cdc25A phosphatase inhibitors with the homology modeled protein structure. *J. Mol. Mode.* 2008. **14**: 833-841
23. Lenkowski PW. A pharmacophore derived phenytoin analogue with increased affinity for slow inactivated sodium channels exhibits a desired anticonvulsant profile. 2007. *Neuropharmacology*. **52**(3): 1044-1054
24. Block JH & Beale JM. Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. Hal 27-70. 11th Ed. 2004: 146, 639-640, 720-721.
25. Katzung BG. Basic and Clinical Pharmacology 9th Ed. Appleton & Lange, Prentice Hall. 2006: 68
26. Frigo GM, Lecchini S, Caravaggi M, Gatti G, Tonini M, D'Angelo L, Perucca E & Crema A. Reduction in phenytoin clearance caused by cimetidine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1983. **25**: 135-137
27. Lowry JA, Vandover JC, DeGreeff J & Scalzo AJ. Unusual presentation of iatrogenic phenytoin toxicity in a newborn. *Int J Med Toxicol.* 2001. **4**(1):26-29
28. Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, Honkakoski P, Hukkanen J & Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: Current status. *Review Article.* 2001. **20**: 332-338.
29. Afzelius L, Zamora I, Ridderstrom M, Andersson TB, Karlen A & Masimirembwa CM. Competitive CYP2C9 inhibitors enzyme inhibition studies, protein homology modeling, and three-dimensional quantitative structure-analysis relationship analysis. 2001. *Mol. Pharmacol.* **59**: 909-919.
30. Altman RB. Editorial: Building successful biological databases. *Briefing in Bioinformatics.* 2004. **5**(1): 4-5.
31. Bourne P. Will a biological database be different from a biological journal. *PLoS Comput Biol.* 2005. **1**(3): 34.
32. Westbrook J, Ito N, Nakamura H, Henrick K & Berman HM. PDML: The representation of archival macromolecular structure data in XML. *Bioinformatics.* 2005. **21**(7): 988-992.

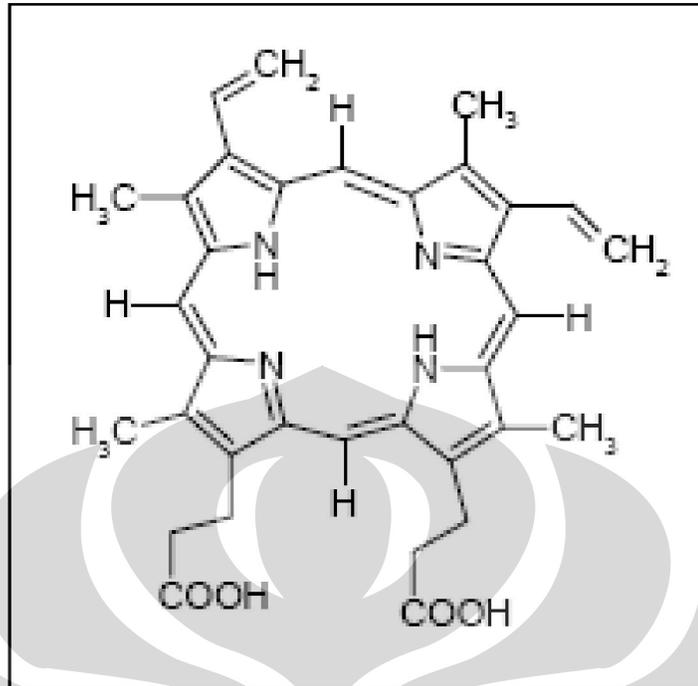
33. Berman MH. The protein data bank: A historical perspective. *Acta Crystallographica*. 2008. **A64**: 88-95.
34. Tantrilestari, AS. Simulasi dinamika molekuler Switch I dan Switch II RAD GTPase yang diperoleh dari *Homology Modelling*. 2008. Universitas Indonesia. Depok.
35. Anonim. PUBCHEM. 1 hlm. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. 28 Mei 2009, pk. 17.05.
36. Wallace AC, Laskowski RA & Thornton JM. LIGPLOT: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Prot. Eng.* 1995. **8**: 127-134.
37. Anonim. *LIGPLOT*. 1 hlm. <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/ligplot/ligplot.html>. 15 Juni 2008, pk. 15.23
38. Anonim. VEGAZZ. 3 hlm. <http://www.ddl.unimi.it/vega/history.htm>. 6 Juni 2009, pk.23.04
39. Anonim. CCP4 Software for Macromolecular Crystallography. 1 hlm. <http://www.ccp4.ac.uk/html>. 3 Mei 2009, pk. 12.56
40. Anonim. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 1994. **50**(Pt 5): 760-763.
41. Anonim. PyMOL. 1 hlm. <http://pymol.sourceforge.net/html>. 6 April 2009, pk. 09.06
42. Anonim. CYGWIN. 1 hlm. <http://www.cygwin.com/html>. 17 April 2009, pk. 16.57
43. Teodoro ML, Philips GN & Kavraki LE. Molecular Docking: A problem with thousands of degrees of freedom. *Rice University*. 2005.
44. Sousa SF, Fernandes PA & Ramos MJ. Protein ligand docking: Current status and future challenges. *Protein Structures, Functions, and Bioinformatics*. 2006. **65**(1): 15-26
45. Morris GM, Goodsell DS, Huey R, Lindstrom W, Hart WE, Kurowski S, Halliday S, Belew R & Olson AJ. AUTODOCK. 3 hlm. <http://autodock.scripps.edu/html>. 26 Maret 2009, pk 14.28

46. Ragni R, Tramontano A, Martinelli A & Tuccinardi T. Molecular docking tutorial. VI European Workshop in Drug Design. Siena, Italia. 2007.
47. Yamazaki H, Komatsu T, Takemoto K, Saeki M, Minami Y, Kawaguchi Y, Shimada N, Nakajima M & Yokoi T. Decreases in phenytoin hydroxylation activities catalyzed by liver microsomal cytochrome P450 enzymes in phenytoin-treated rats. 2001. *Drug Metabolism and Disposition*. **29**: 427-434.
48. Rajakrishnan V, Manoj VR, Rao GS. Computer-aided, rational design of a potent and selective small peptide inhibitor of cyclooxygenase 2 (COX2). *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. 2008. **25**(5): 535-542.
49. Doecke CJ, Veronese ME, Pond SM, Miners JO, Birkett DJ, Sansom LN & McManus ME. Relationship between phenytoin and tolbutamide hydroxylations in human liver microsomes. 1991. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **31**(2): 125-130
50. Lasseur R, Grandemange A, Longin-Sauvageon C, Berny P & Benoit E. Heterogeneity of the coumarin anticoagulant targeted vitamin K epoxide reduction system. Study of kinetic parameters in susceptible and resistant mice (*Mus musculus domesticus*). 2006. *J Biochem Mol Toxicol.* **20**(5):221-9.
51. Yao Y, Han W, Zhou Y, Li Z, Li Q, Chen X & Zhong D. The Metabolism of CYP2C9 and CYP2C19 for glicazide by homology modeling and docking study. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2008. **10**: 1-8.
52. Anonim. PHENYTOIN. 1 hlm. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=1775&loc=ec_rcs. 3 Mei 2009, pk. 23.14
53. Anonim. CIMETIDINE. 1 hlm. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=2756&loc=ec_rcs. 3 Mei 2009, pk. 23.16
54. Anonim. SULPHAFENAZOLE. 1 hlm. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5335&loc=ec_rcs. 3 Mei 2009, pk. 23. 19
55. Anonim. WARFARIN. 1 hlm. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=6691&loc=ec_rcs. 3 Mei 2009, pk. 23.24

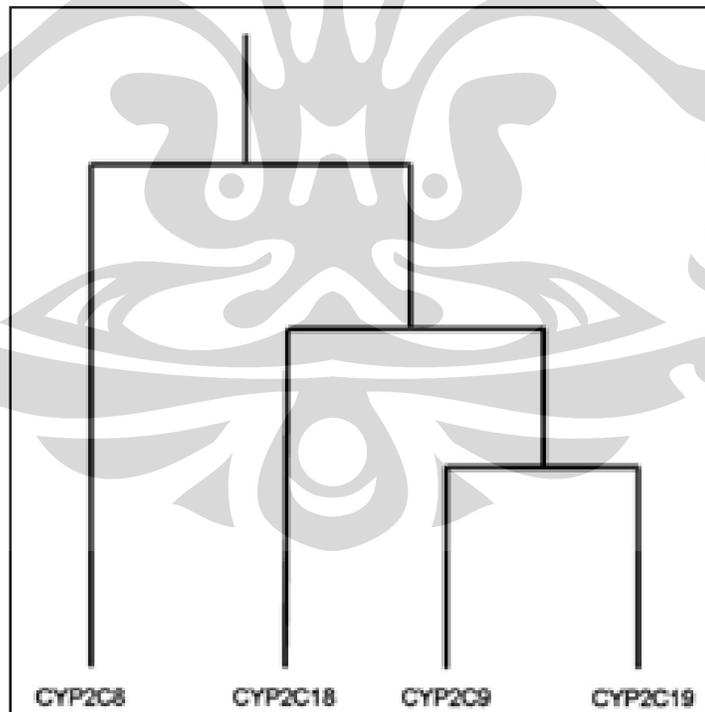
56. Anonim. 1OG5. 1 hlm.
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1OG5>. 26
Februari 2009, pk. 08.46
57. Anonim. 1R9O. 1 hlm.
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1R9O>. 26
Februari 2009, pk. 09.00
58. Anonim. 1OG2. 1 hlm.
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1OG2>. 26
Februari 2009, pk. 09.17
59. Boyer R. Concepts of Biochemistry 2ndEd. Kanada: Wadsworth Group.
2002: 72.







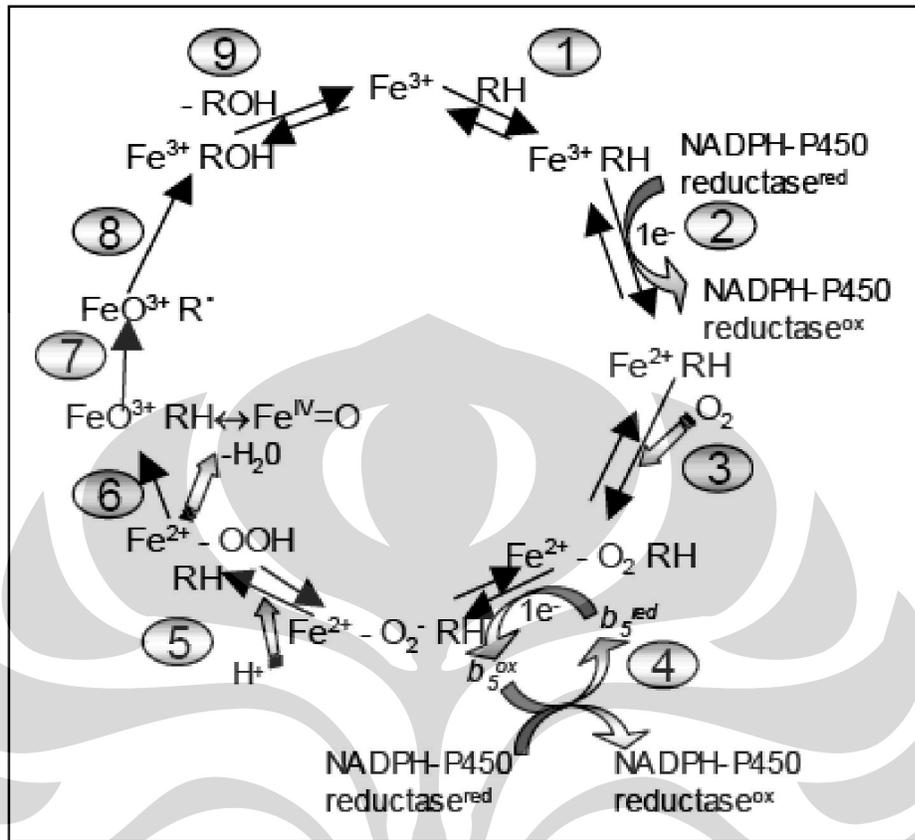
Gambar 1. Gugus heme dari sitokrom P450 (17).



Gambar 2. Pohon filogenetik anggota famili CYP2C manusia (6).

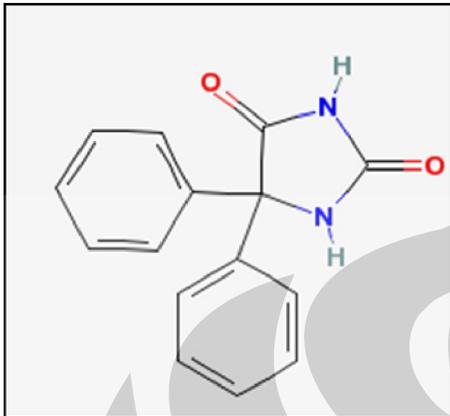
NATIVE	MDSLVLVVLVCLSCILLLSLWRQS									
1R90		MAKKT	SGRGKLP	PGPTPLPV	IGNILQI	GIKDISKSLTNLSKV				60
1OG5		MAKKTSSKCR	PPGPTPLPV	IGNILQI	GIKDISKSLTNLSKV					60
					A'	A				
1R90	YGPVFTLYFGLKPIVVLH	GYEAVKEALI	DLGEEFSGRGI	FPLAERANR	GFIVFS	NGKKW				120
1OG5	YGPVFTLYFGLKPIVVLH	GYEAVKEALI	DLGEEFSGRGI	FPLAERAN	RGFIVFS	NGKKW				120
	β 1-1	β 1-2	B	β 1-5	B'					
1R90	KEIRRFSLMTL	RNFGMGKRS	SIEDRVQEEARCLVEELRKT	KASPCD	PTFILGCAPCNVICS					180
1OG5	KEIRRFSLMTL	RNFGMGKRS	SIEDRVQEEARCLVEELRKT	KASPCD	PTFILGCAPCNVICS					180
	C		D		E					
1R90	IIFH	KRFDYK	DOOFLNMEKLNENIKILS	SPWIG	IGNNESPIIDYFPG	TENKLLKNVAFM				240
1OG5	IIFH	KRFDYK	DOOFLNMEKLNENIEILS	SPWIOVY	NNEPALLDYFPG	TENKLLKNVAFM				240
			F	F'	G'	G				
1R90	KSYILEKVKEHQES	MDMNNPQ	DFIDCFLMKMEKEK	HNQPS	EFTIESLENTAVDLFGAGTE					300
1OG5	KSYILEKVKEHQES	MDMNNPQ	DFIDCFLMKMEKEK	HNQPS	EFTIESLENTAVDLFGAGTE					300
			H		I					
1R90	TTSTTLRYALLLLK	HPEVTAKVQEEI	ERVI	GRNRSE	CMQDRS	HMPYTD	DAVVHEVQRYID			360
1OG5	TTSTTLRYALLLLK	HPEVTAKVQEEI	ERVI	GRNRSE	CMQDRS	HMPYTD	DAVVHEVQRYID			360
			J	J'		K				
1R90	LLPTSLPHAVTCDIKERNYLIPKGT	TILIS	LTSVLH	DNKEFPNPEMF	DPHHFL	DEGGNFK				420
1OG5	LLPTSLPHAVTCDIKERNYLIPKGT	TILIS	LTSVLH	DNKEFPNPEMF	DRHHE	LDEGGNFK				420
	β 1-4	β 2-1	β 2-2	β 1-3	K'	K''				
1R90	KSKYFMPFSAGKRICV	GEALAGMELFLFLTSILQ	NENLKS	LVDPKNLD	TPVVNGFASVP					480
1OG5	KSKYFMPFSAGKRICV	GEALAGMELFLFLTSILQ	NENLKS	LVDPKNLD	TPVVNGFASVP					480
			L	β 3-3	β 4-1	β 4-2				
1R90	PFYQLCFIPI	HHHHH								494
1OG5	PFYQLCFIPV	HHHHH								494

Gambar 3. Sekuens dari CYP 2C9 dengan struktur kristal 1OG5 dan 1R90. Huruf tebal menunjukkan perbedaan jenis residu yang terdapat pada 1OG5 dan 1R90. Residu dalam tanda kotak membentuk struktur heliks, sedangkan residu yang digaris bawah membentuk struktur *strand* (helaian). Residu yang tidak terdapat dalam struktur ditandai dengan garis coret (5).

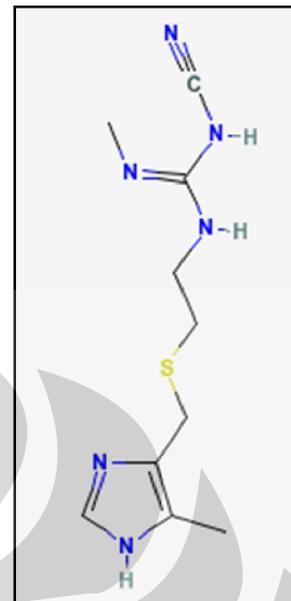


Gambar 4. Siklus katalitik dari sitokrom P450 (17)

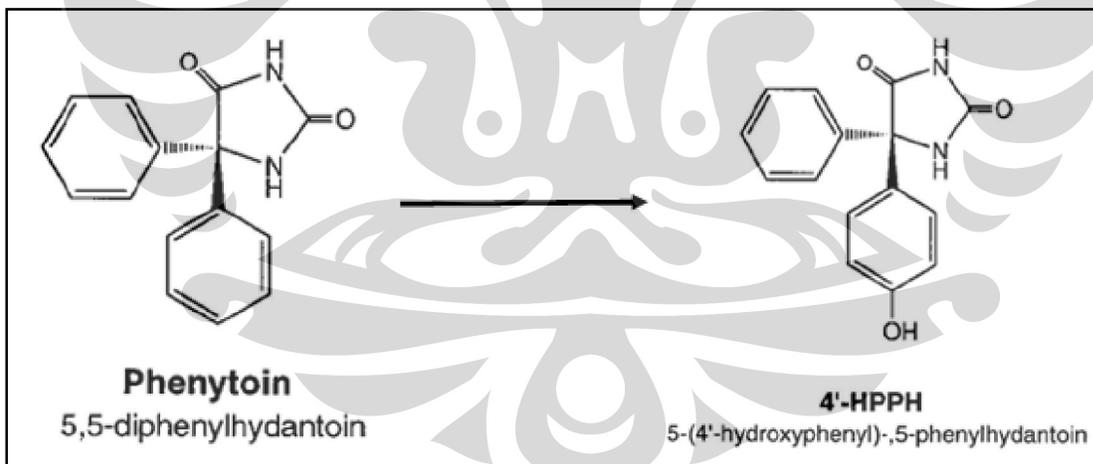
a)



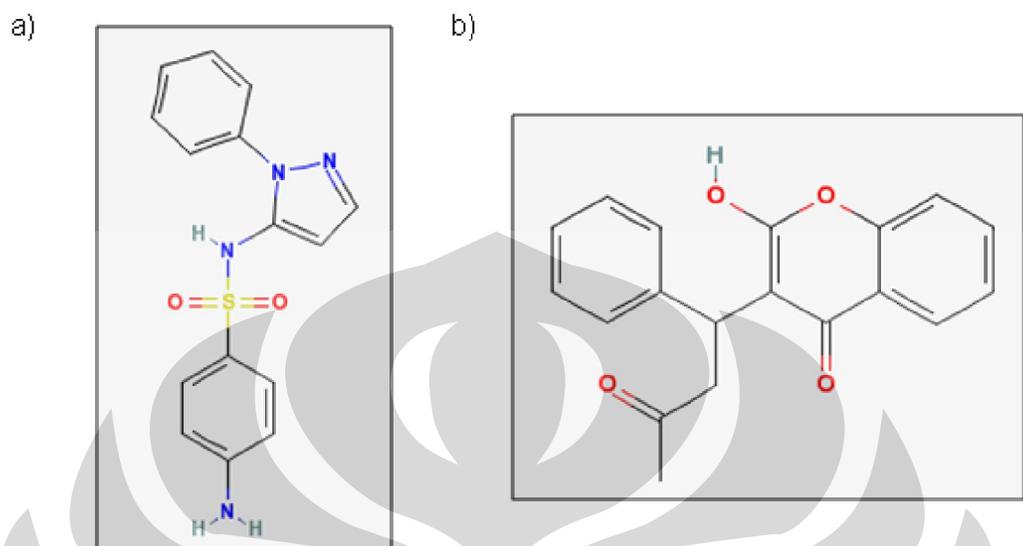
b)



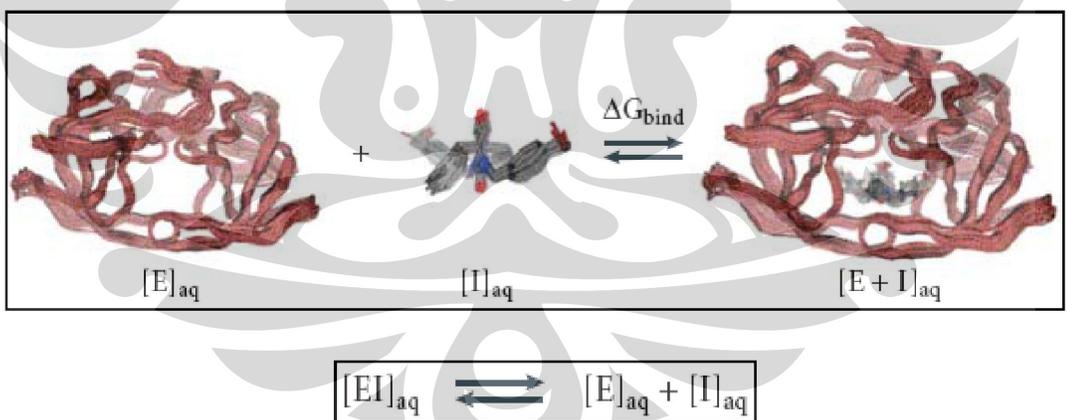
Gambar 5. a) Struktur dua dimensi fenitoin, b) Struktur dua dimensi simetidin (52, 53)



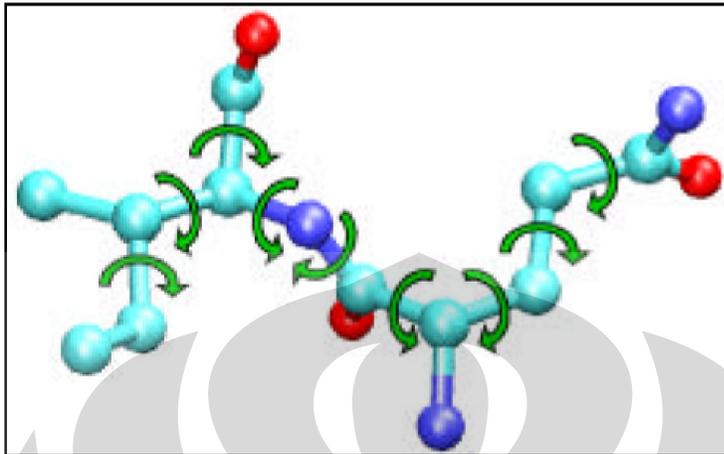
Gambar 6. Hasil metabolit utama pada metabolisme fase I fenitoin (47)



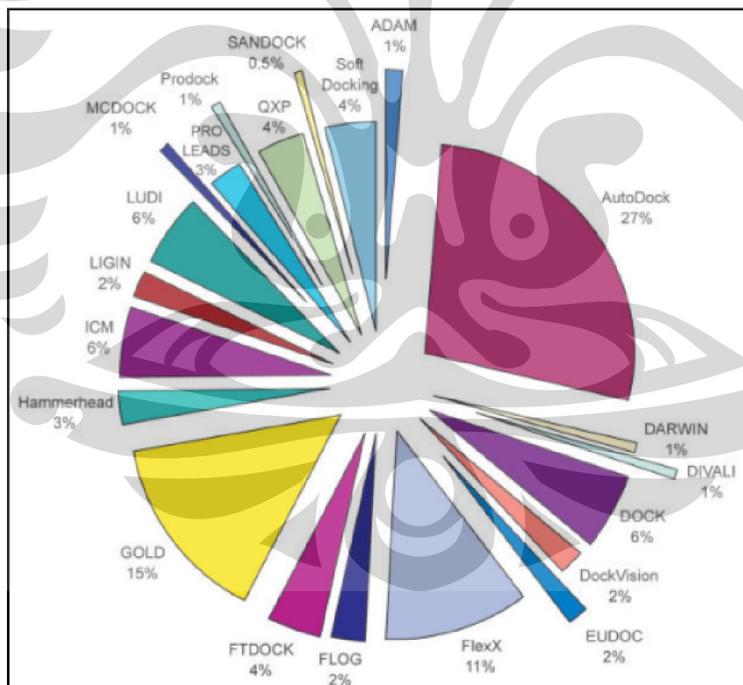
Gambar 7. a) Struktur dua dimensi sulfafenazol b) Struktur dua dimensi S-warfarin (54, 55)



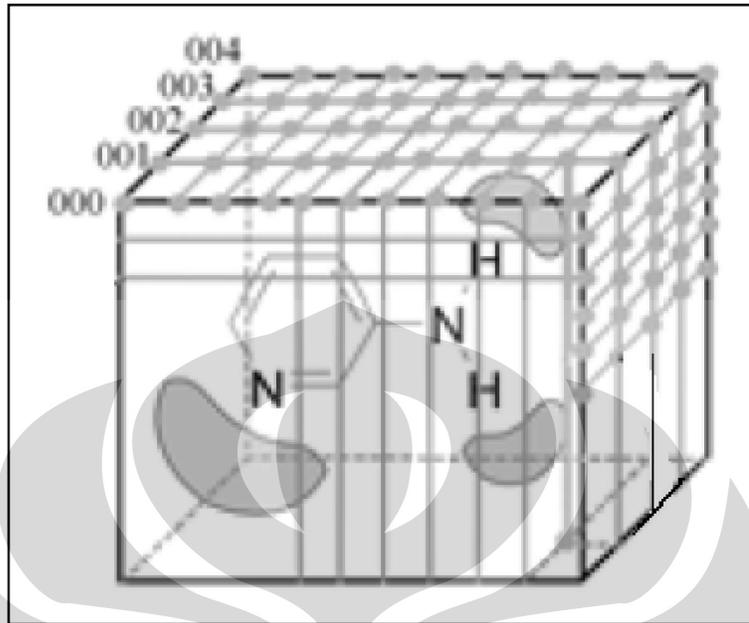
Gambar 8. Aspek teoritis penambatan molekuler (14).



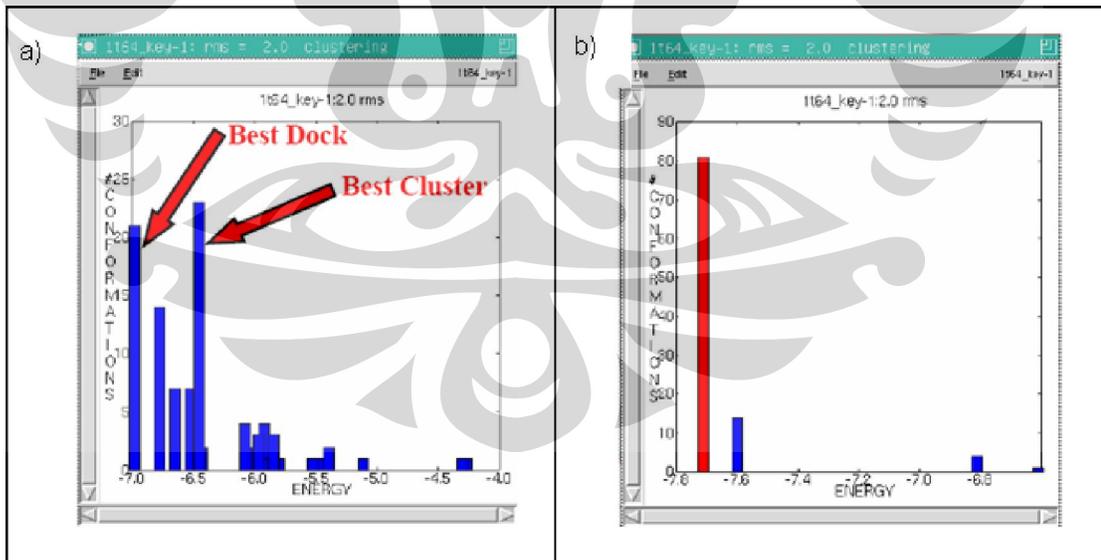
Gambar 9. *Rotatable bond* suatu molekul obat (43).



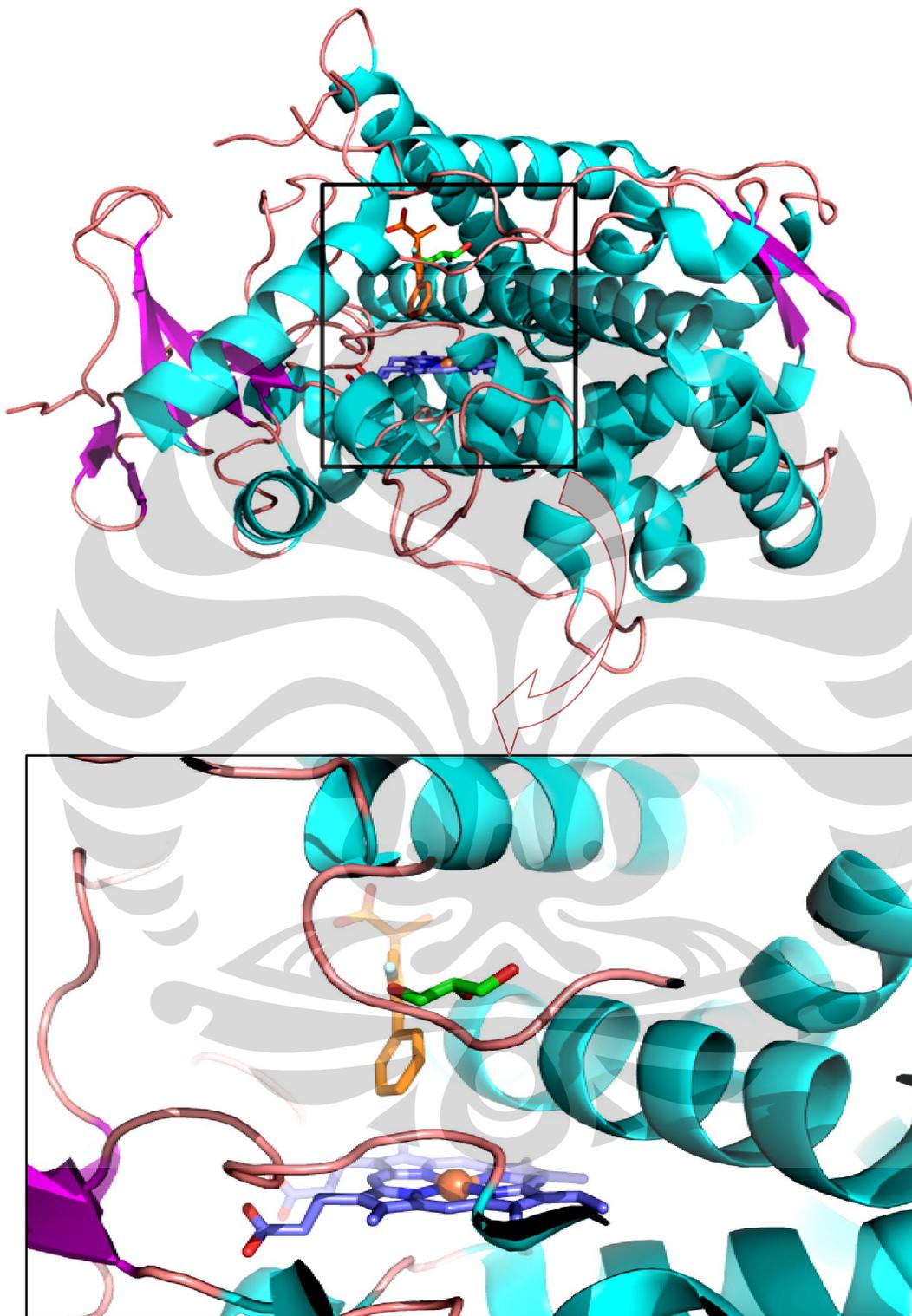
Gambar 10. *Software* penambatan molekuler (44).



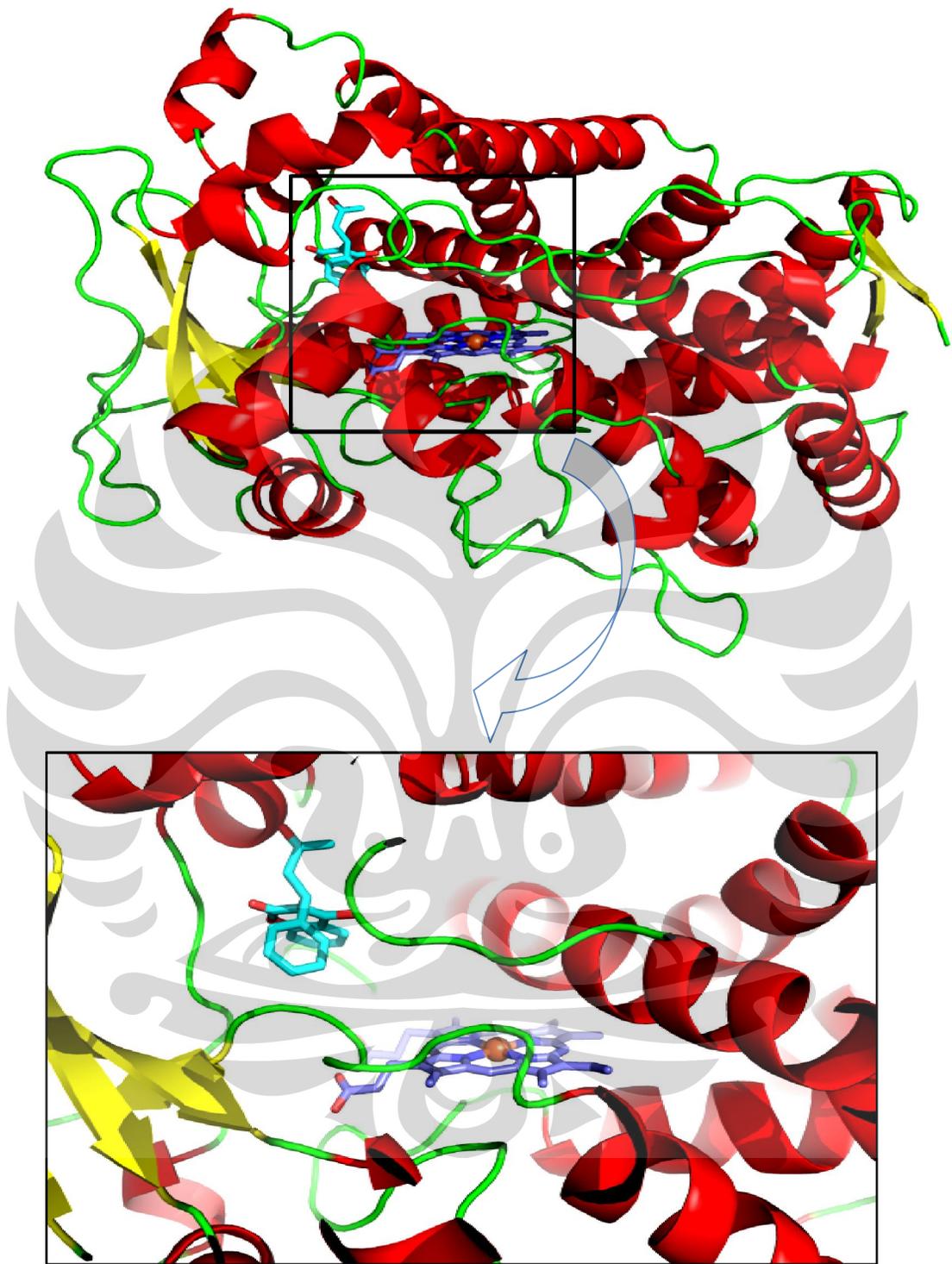
Gambar 11. Kotak grid (*grid box*) (17)



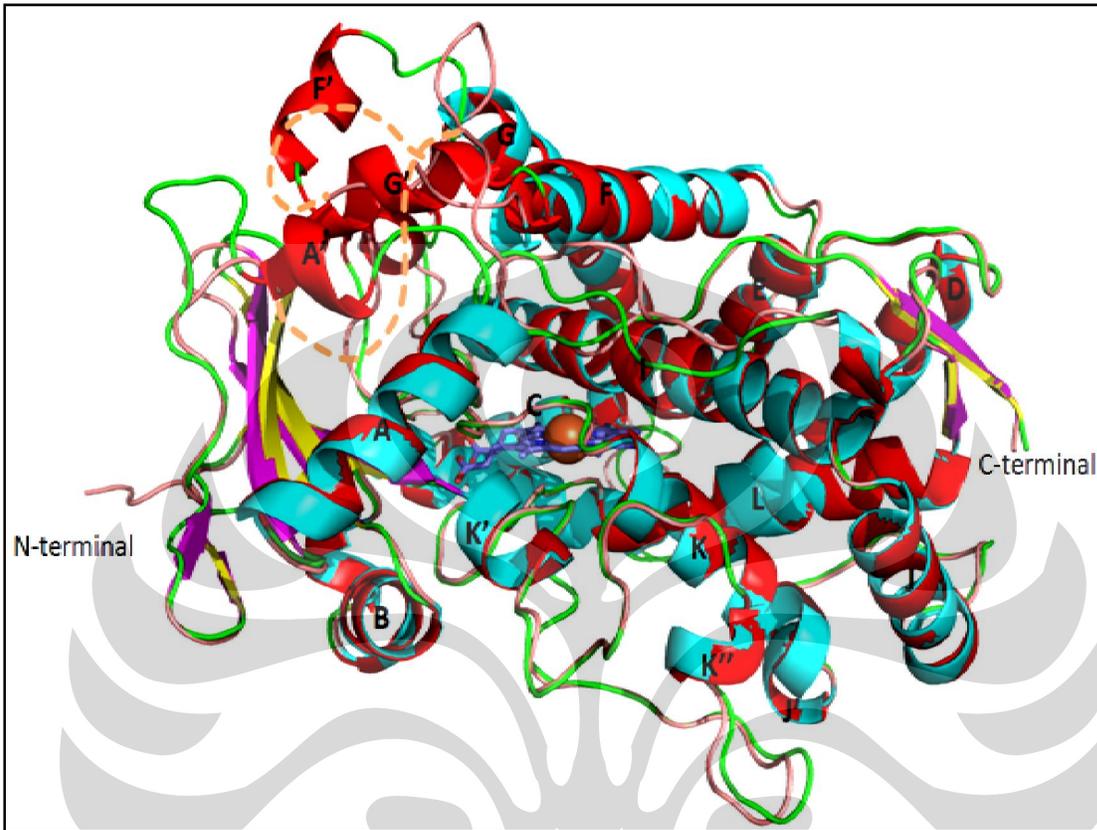
Gambar 12. Penyebaran data hasil penambatan molekuler (46)
a) data divergen; b) data konvergen



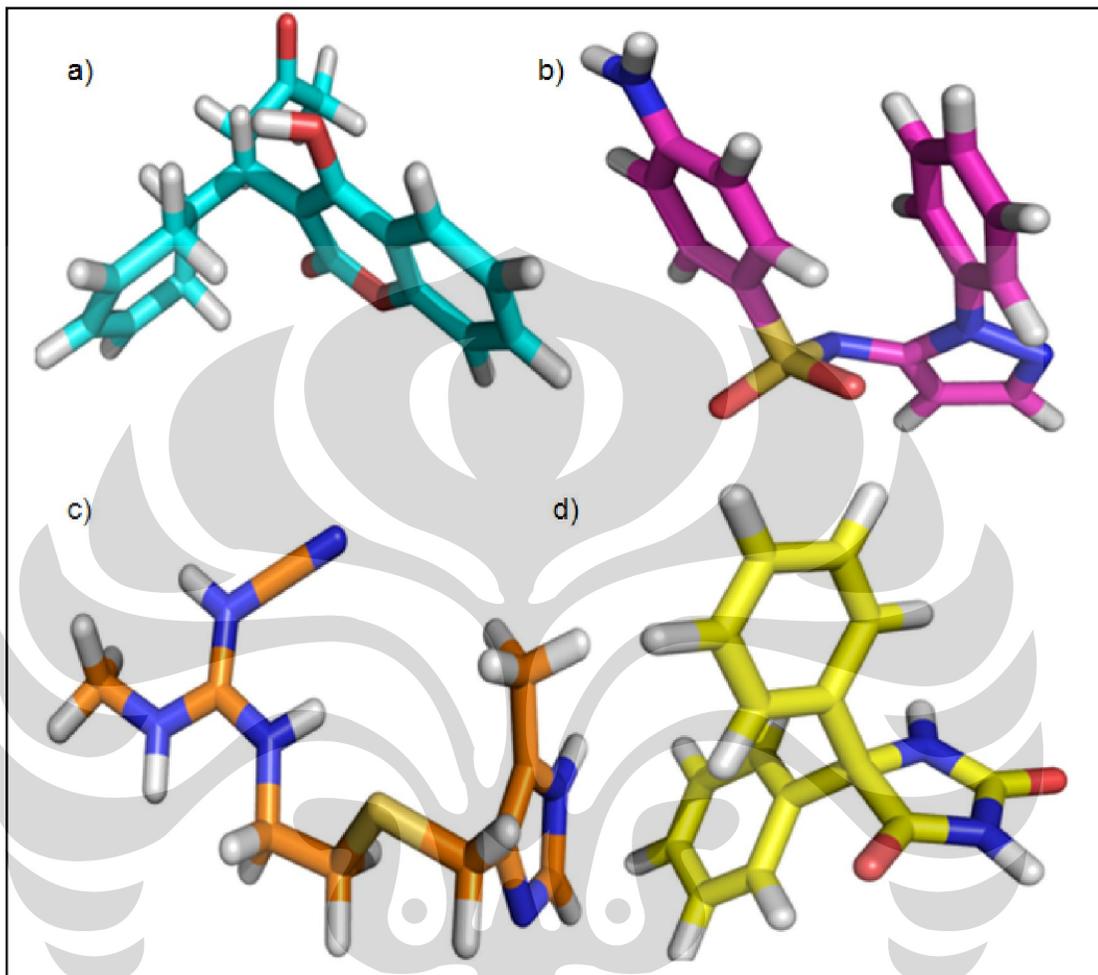
Gambar 13. Struktur kompleks kristal 1R9O dengan flurbiprofen (jingga) dan gliserol (hijau) yang berorientasi terhadap heme (biru)



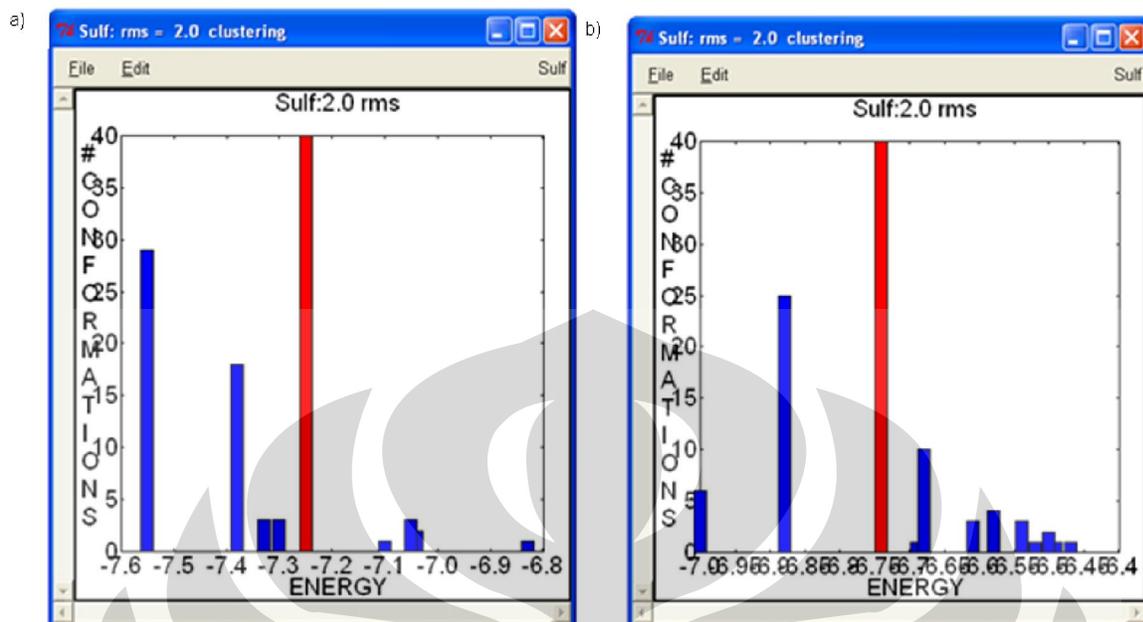
Gambar 14. Struktur kompleks kristal 1OG5 dengan S-warfarin (sian) yang berorientasi terhadap heme (biru)



Gambar 15. Superpose 1R90 (Helix Sheet Loop) dan 1OG5 (Helix Sheet Loop) dengan nilai RMSD 0,870 Å

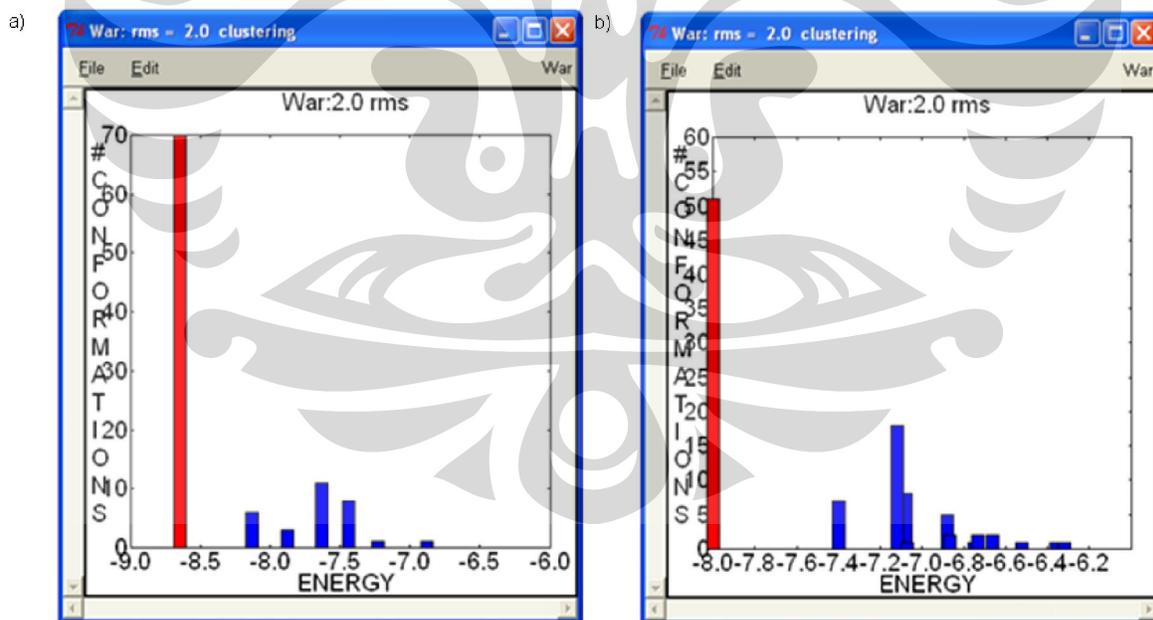


Gambar 16. Konformasi terbaik ligan dengan energi terendah
a) S-warfarin, b) sulfafenazol, c) simetidin, d) fenitoin



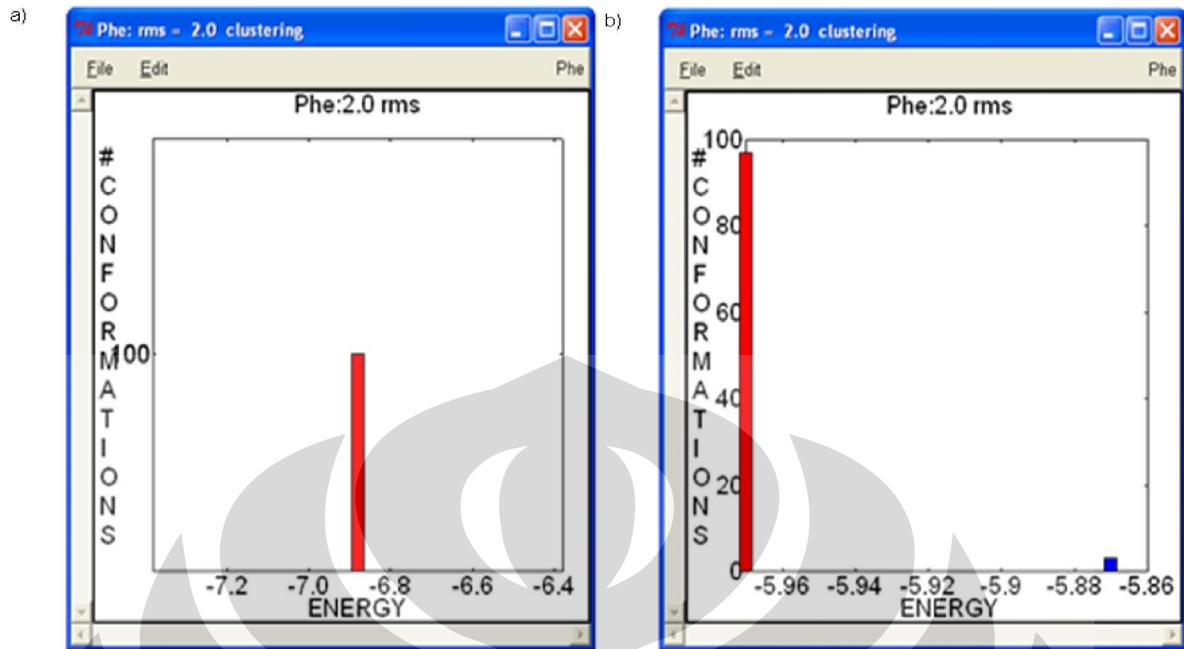
Gambar 17. Hasil terbaik penambatan molekuler sulfafenazol yang dikelompokkan dalam bentuk *cluster*.

a) dengan struktur 1R9O b) dengan struktur 1OG5

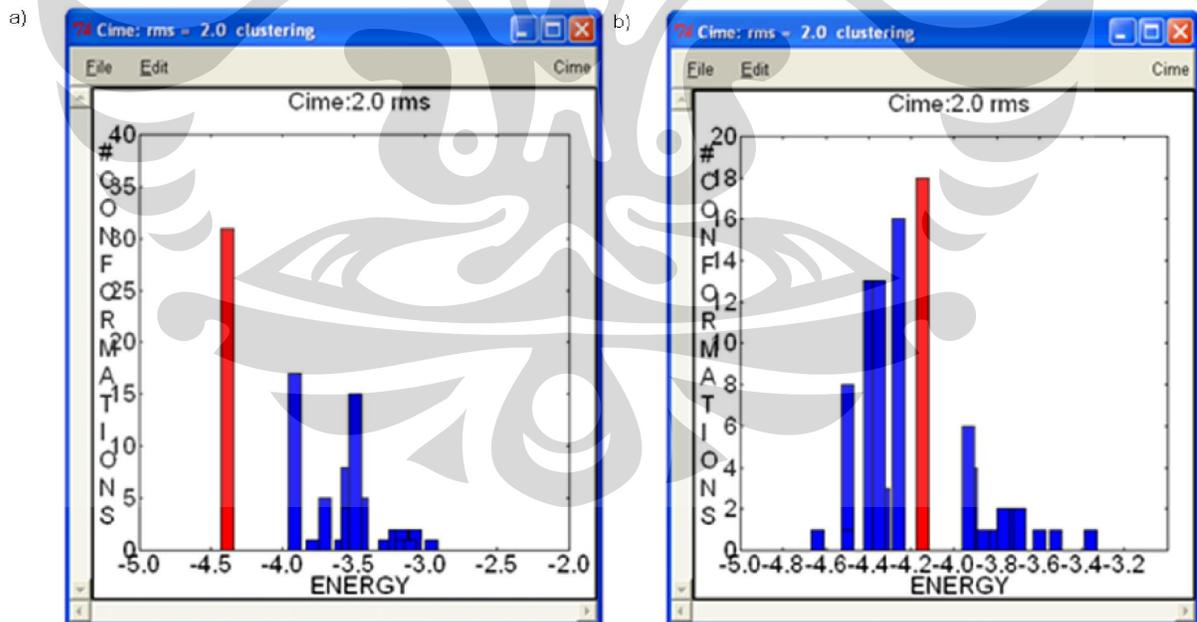


Gambar 18. Hasil terbaik penambatan molekuler S-warfarin yang dikelompokkan dalam bentuk *cluster*.

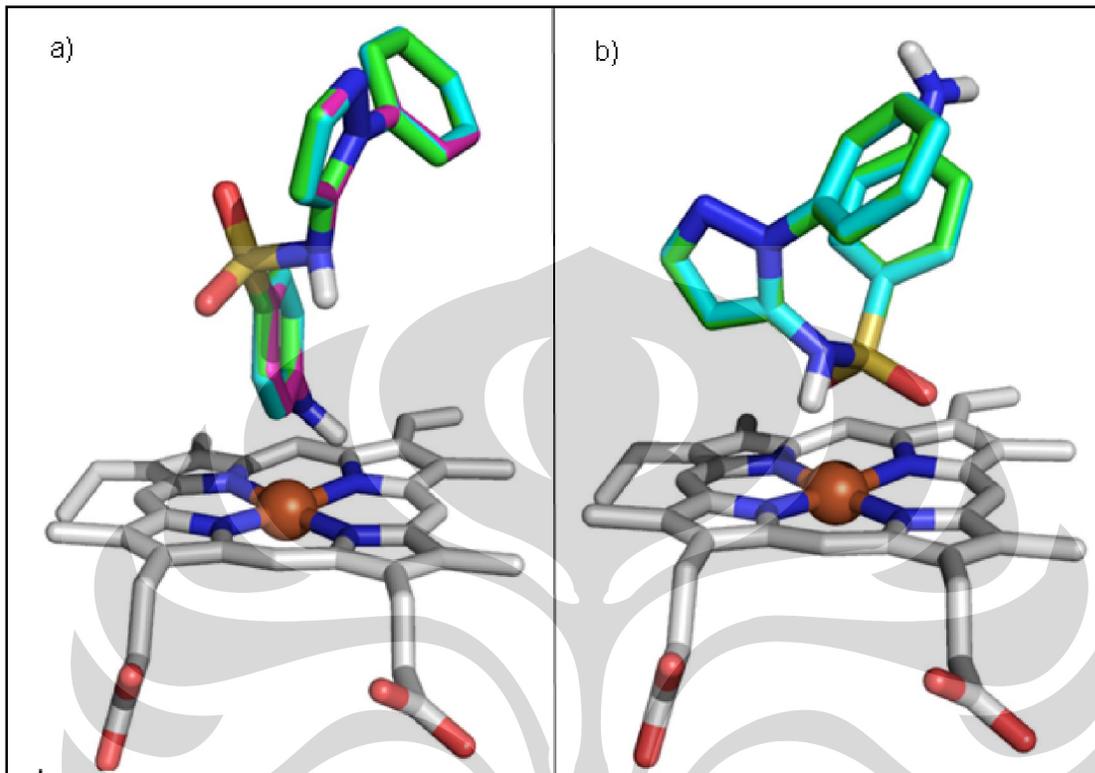
a) dengan struktur 1R9O b) dengan struktur 1OG5



Gambar 19. Hasil terbaik penambatan molekuler fenitoin yang dikelompokkan dalam bentuk *cluster*.
 a) dengan struktur 1R9O b) dengan struktur 1OG5

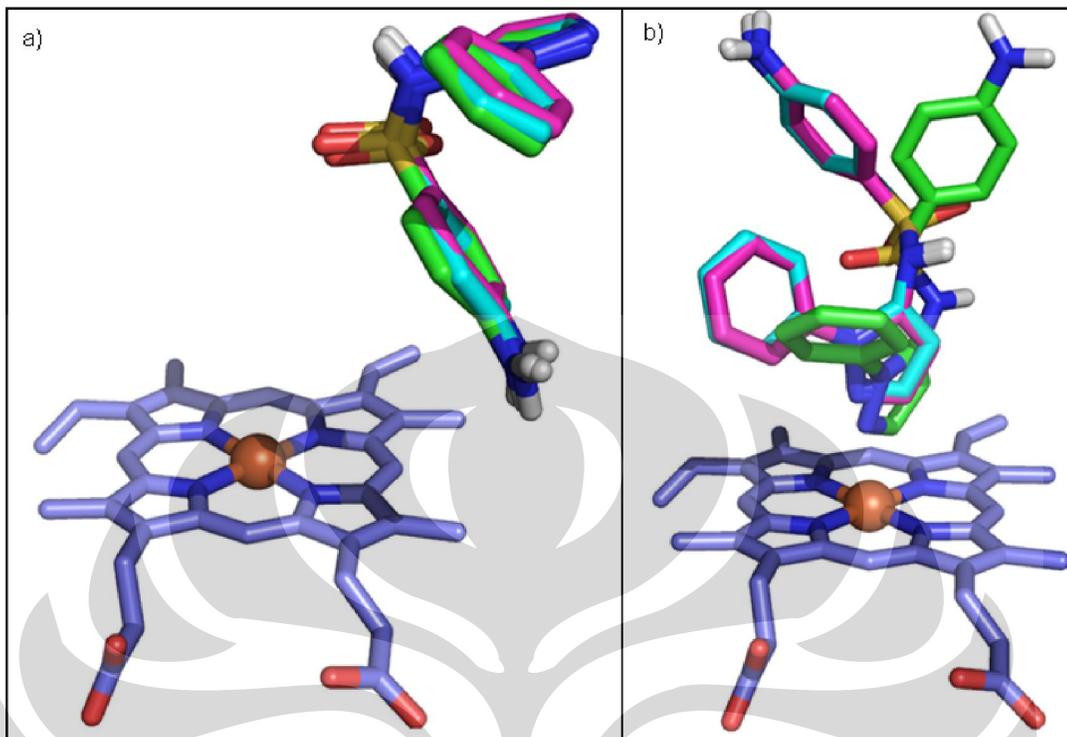


Gambar 20. Hasil terbaik penambatan molekuler simetidin yang dikelompokkan dalam bentuk *cluster*.
 a) dengan struktur 1R9O b) dengan struktur 1OG5



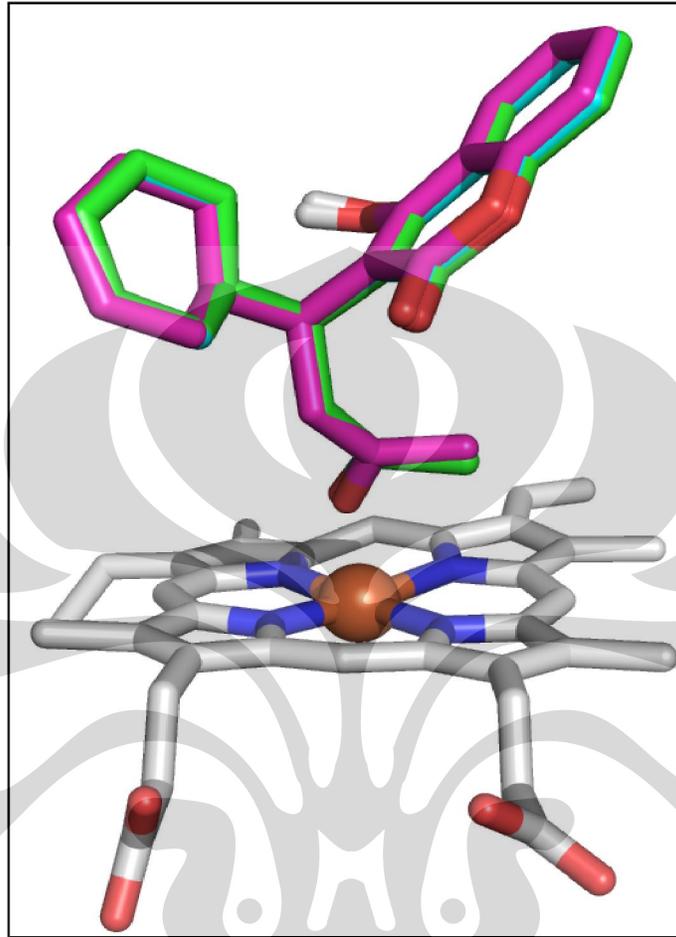
Gambar 21. *Posing* sulfafenazol terhadap heme pada 1R9O dari hasil divergen menggunakan energi evaluasi 25 M. a) *Cluster Best Dock*, b) *Cluster Best Cluster*

Magenta : Percobaan I (penyebaran data konvergen)
 Hijau : Percobaan II
 Sian : Percobaan III
 Abu-abu : Heme



Gambar 22. *Posing* sulfafenazol terhadap heme pada 1OG5 dari hasil divergen menggunakan energi evaluasi 25 M. a) *Cluster Best Dock*, b) *Cluster Best Cluster*

Magenta : Percobaan I
 Hijau : Percobaan II
 Sian : Percobaan III
 Biru : Heme



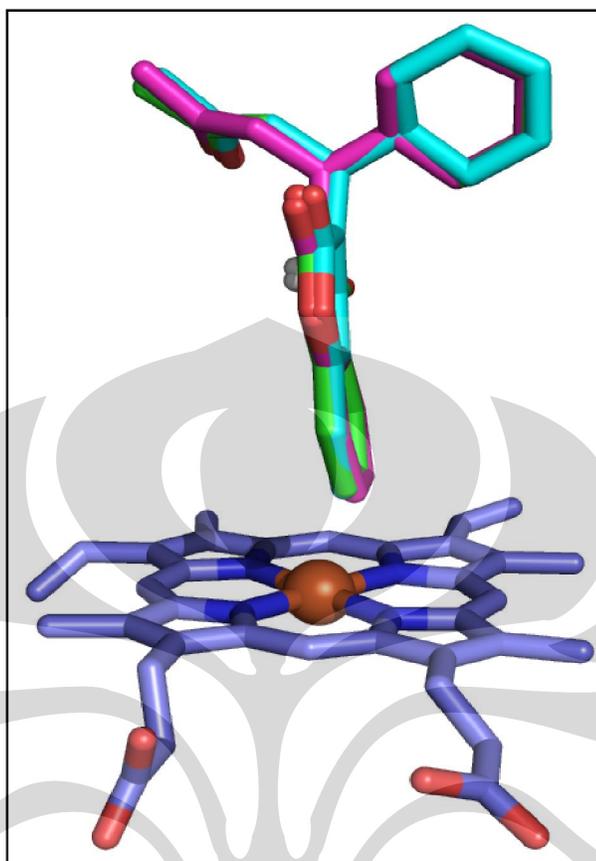
Gambar 23. *Posing* S-warfarin terhadap heme pada 1R9O dari hasil konvergen menggunakan energi evaluasi 2,5 M.

Magenta : Percobaan I

Hijau : Percobaan II

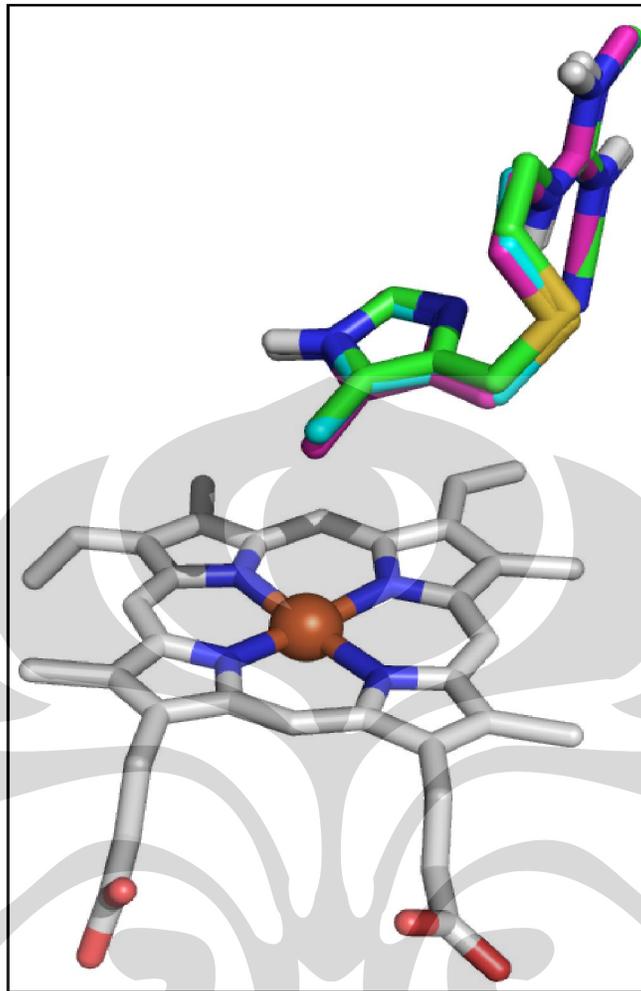
Sian : Percobaan III

Abu-abu : Heme



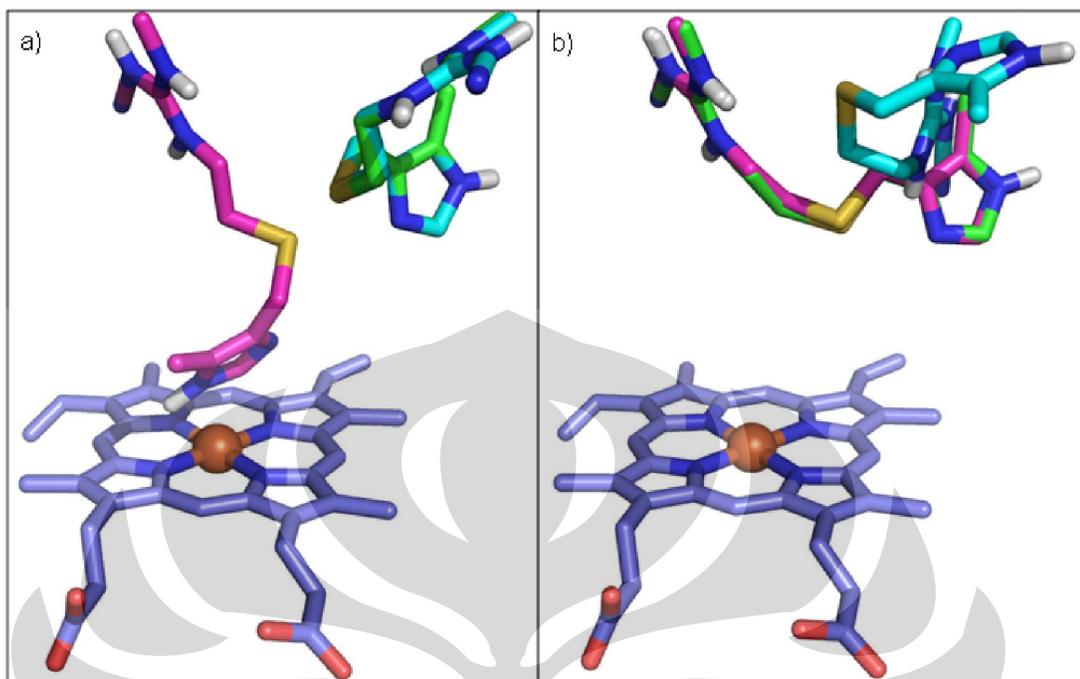
Gambar 24. *Posing* S-warfarin terhadap heme pada 1OG5 dari hasil konvergen menggunakan energi evaluasi 2,5 M.

Magenta : Percobaan I
Hijau : Percobaan II
Sian : Percobaan III
Biru : Heme

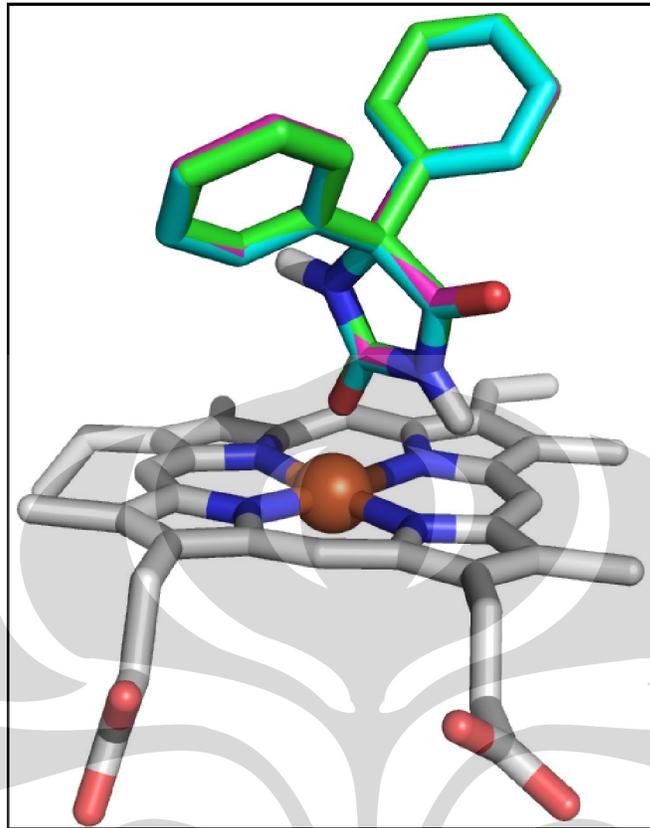


Gambar 25. *Posing* simetidin terhadap heme pada 1R9O dari hasil konvergen menggunakan energi evaluasi 25 M.

Magenta : Percobaan I
Hijau : Percobaan II
Sian : Percobaan III
Abu-abu : Heme

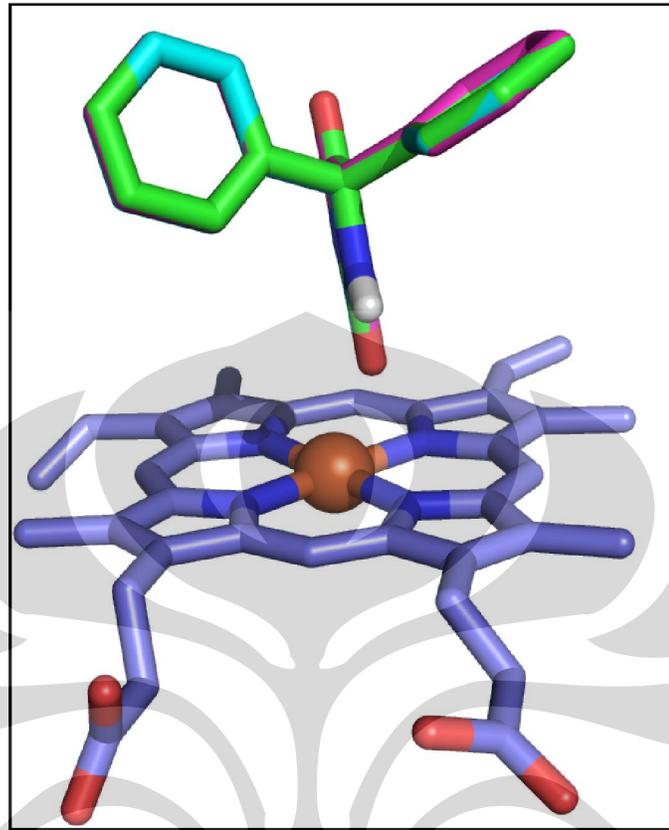


Gambar 26. *Posing* simetidin terhadap heme pada 1OG5 dari hasil divergen menggunakan energi evaluasi 25 M. a) *Cluster Best Dock*, b) *Cluster Best Cluster*
 Magenta : Percobaan I
 Hijau : Percobaan II
 Sian : Percobaan III
 Biru : Heme



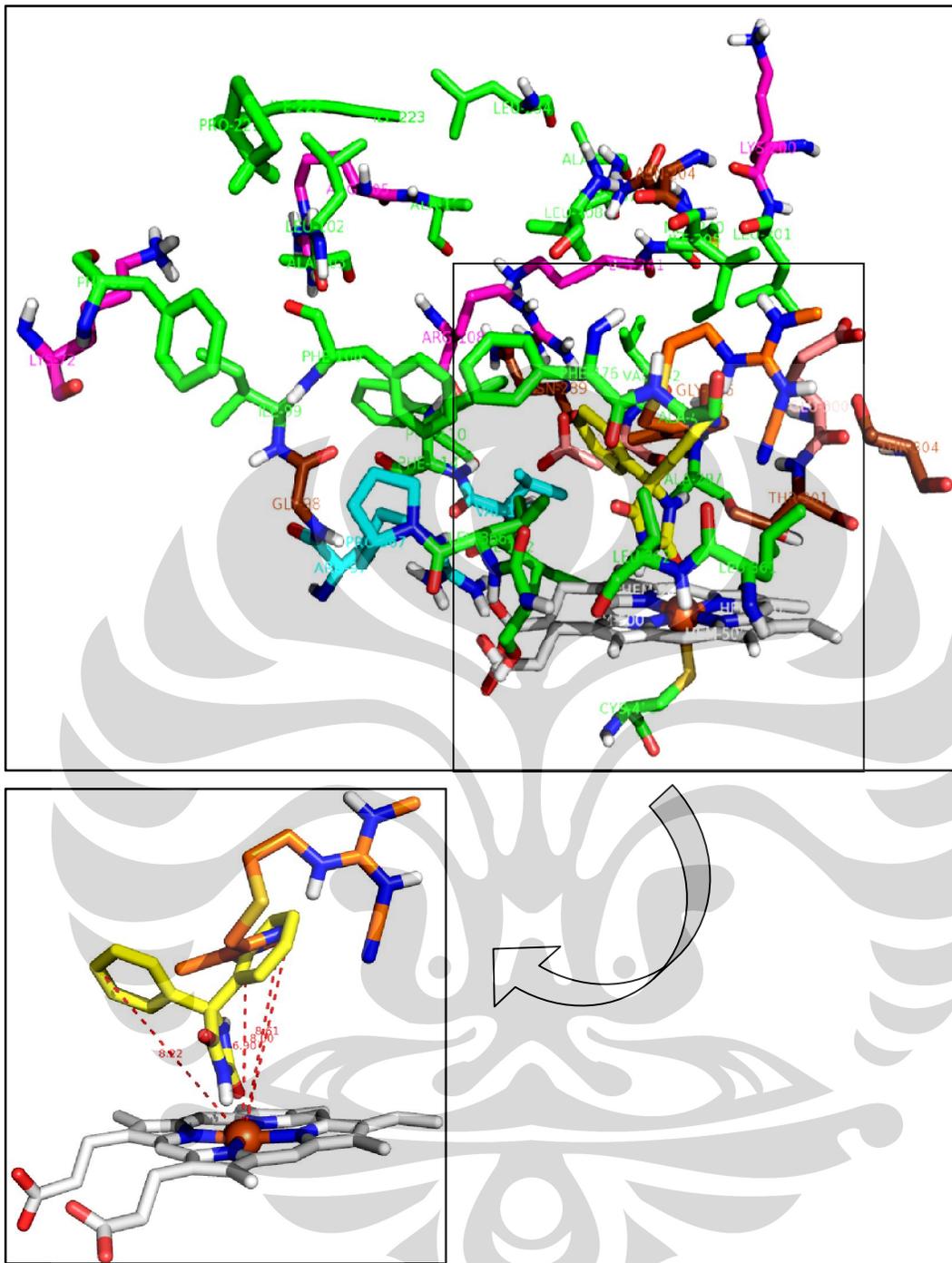
Gambar 27. *Posing* fenitoin terhadap heme pada 1R9O dari hasil konvergen menggunakan energi evaluasi 2,5 M.

Magenta : Percobaan I
Hijau : Percobaan II
Sian : Percobaan III
Abu-abu : Heme

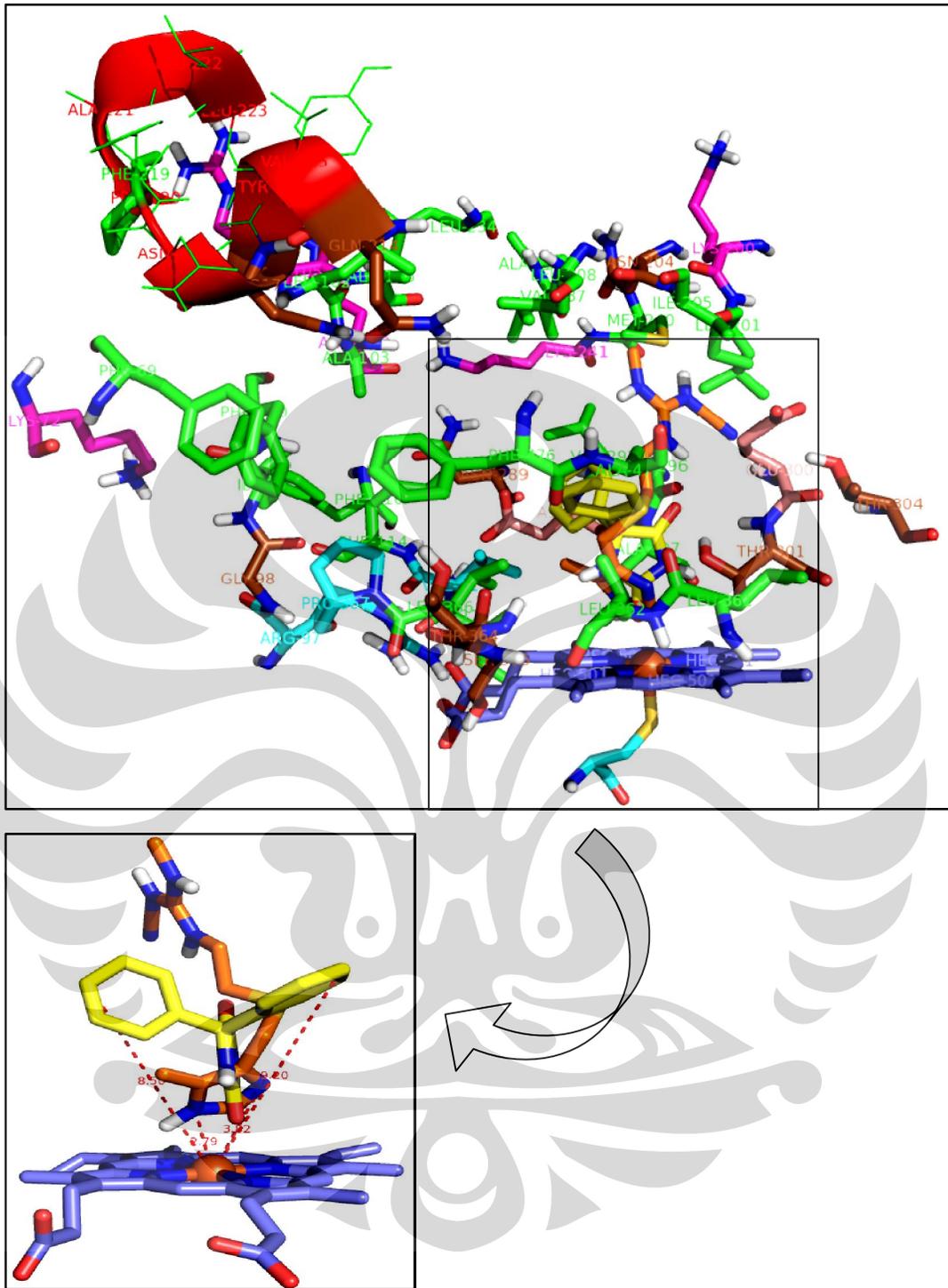


Gambar 28. *Posing* fenitoin terhadap heme pada 1OG5 dari hasil konvergen menggunakan energi evaluasi 2,5 M.

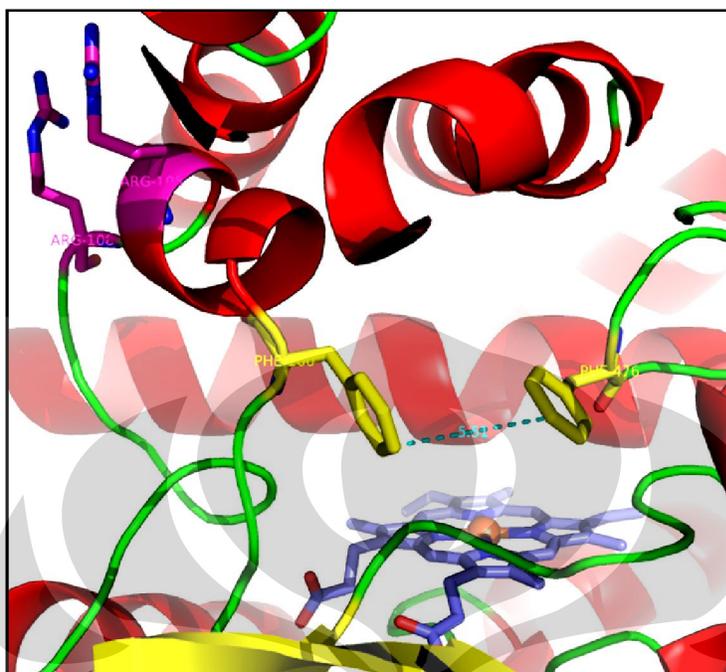
Magenta : Percobaan I
Hijau : Percobaan II
Sian : Percobaan III
Biru : Heme



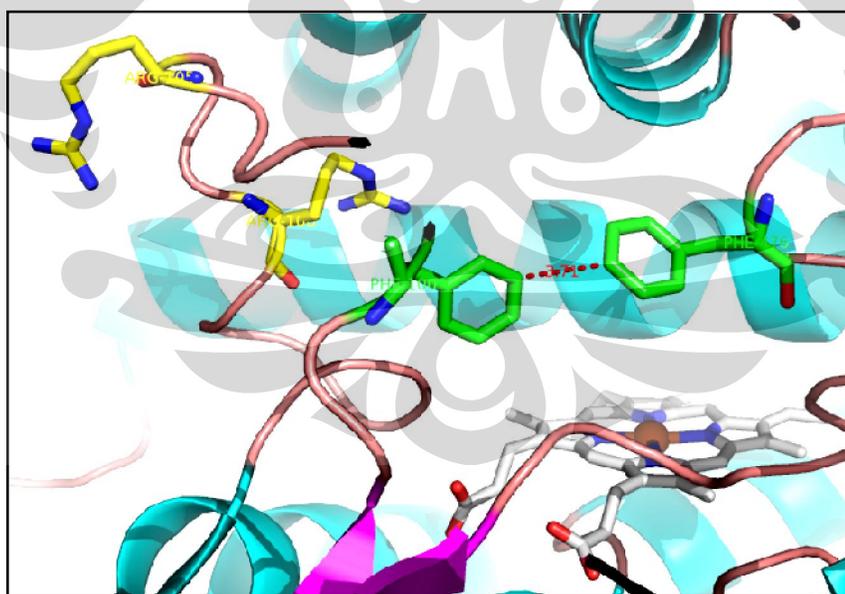
Gambar 29. Hasil superpose fenitoin (kuning) dan simetidin (jingga) dalam situs aktif CYP2C9 1R9O. Situs aktif yang besar didominasi residu hidrofobik (hijau). Residu kationik (magenta)



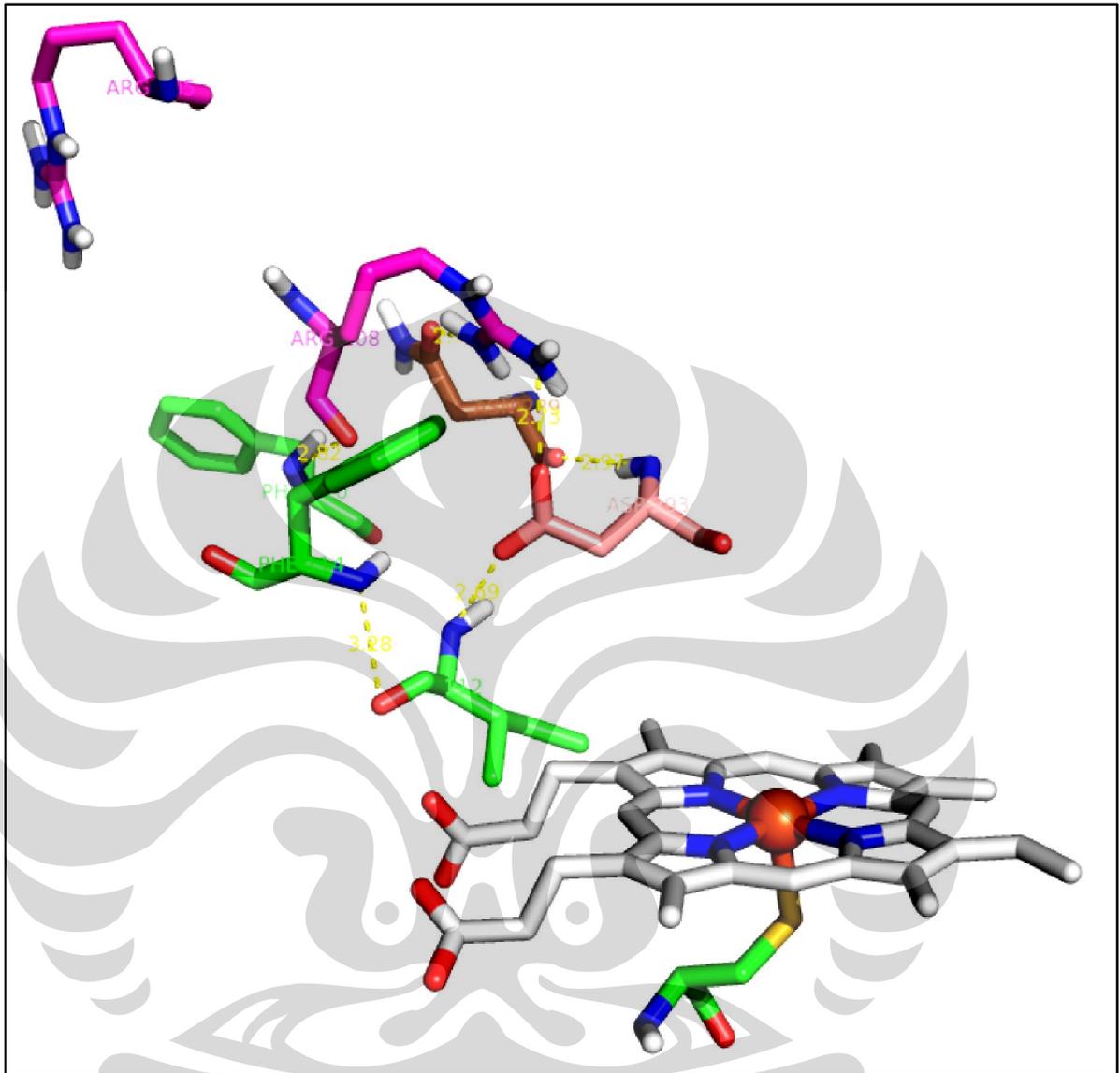
Gambar 30. Hasil superpose fenitoin (kuning) dan simetidin (jingga) dalam situs aktif CYP2C9 1OG5. Situs aktif yang besar didominasi residu hidrofobik (hijau). Residu kationik (magenta)



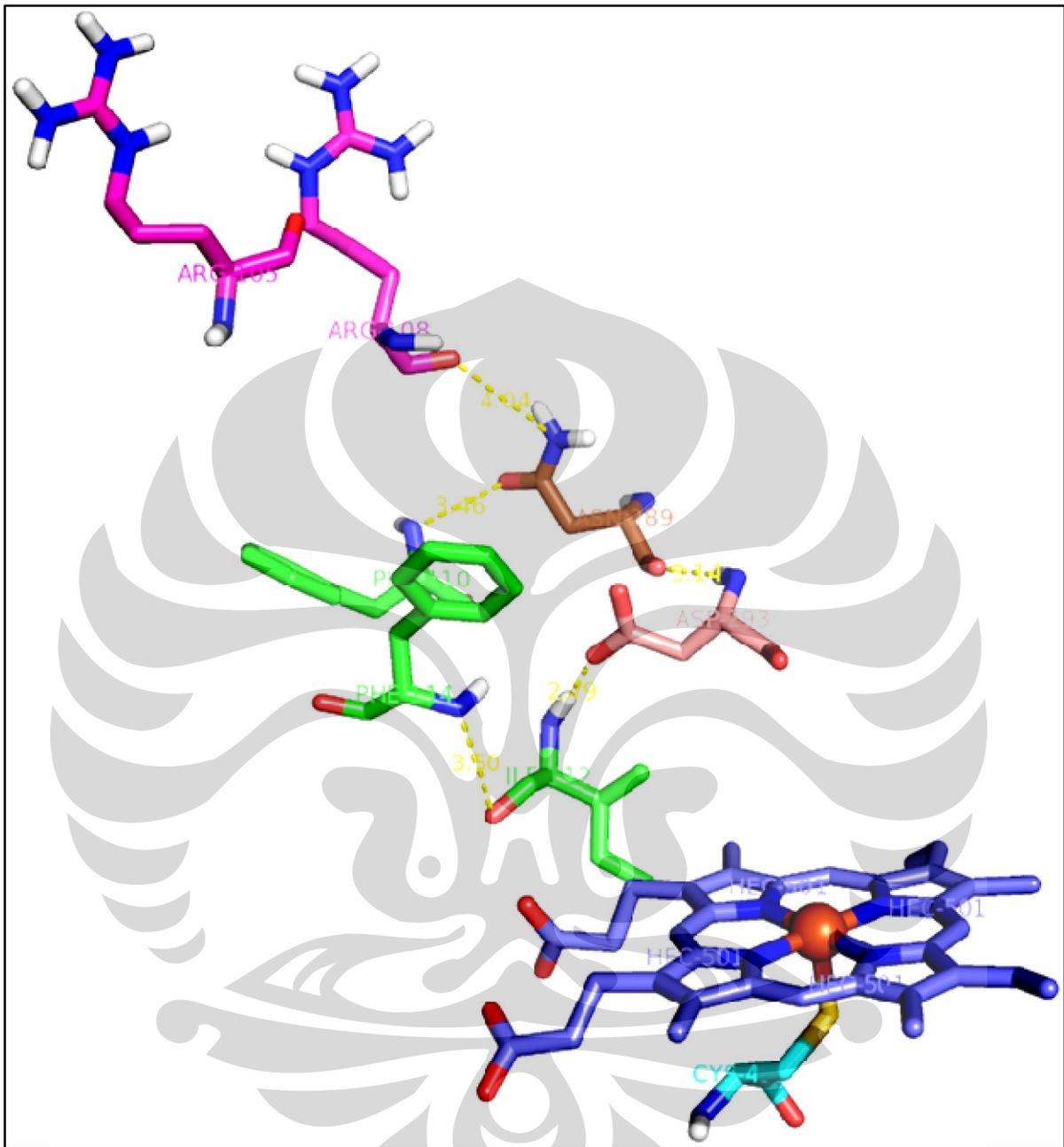
Gambar 31. Posisi residu Arg105 dan Arg108 (magenta) serta Phe110 dan Phe476 (kuning) pada CYP2C9 1OG5



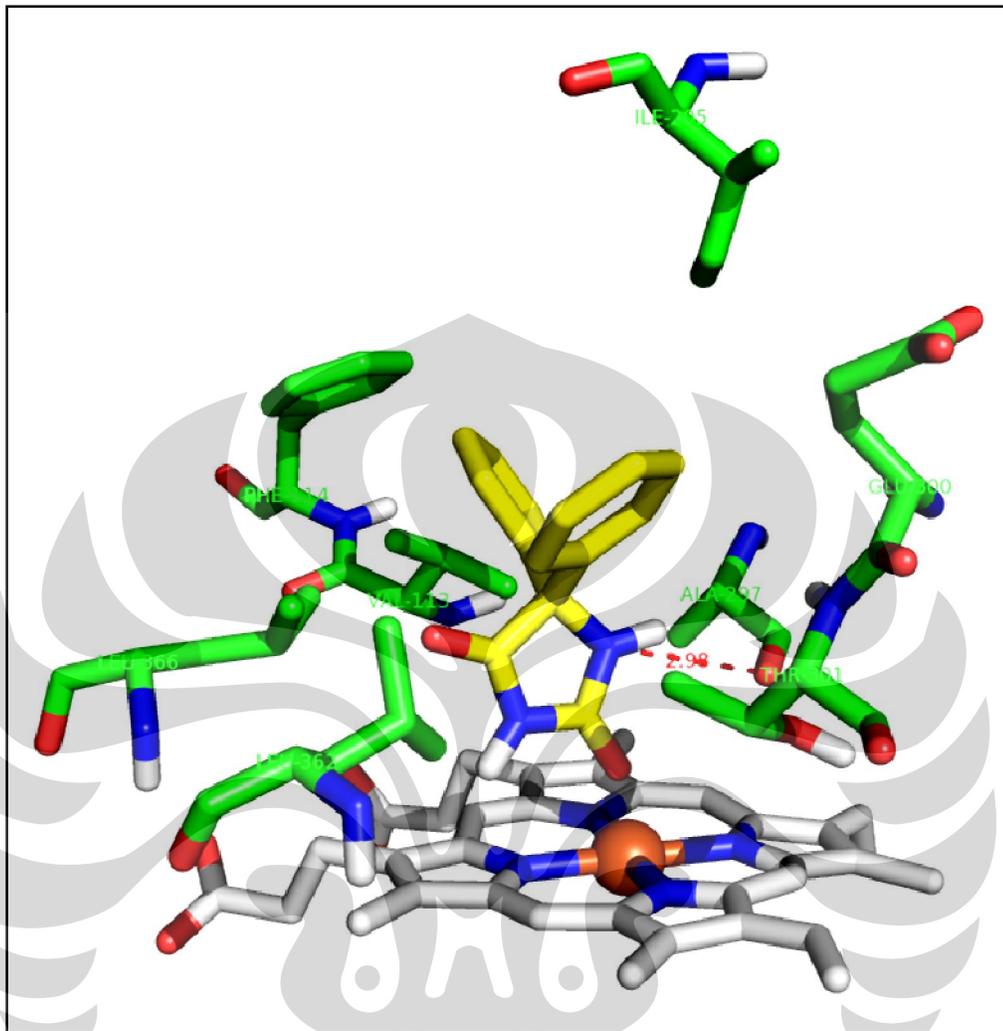
Gambar 32. Posisi residu Arg105 dan Arg108 (kuning) serta Phe110 dan Phe476 (hijau) pada CYP2C9 1R9O



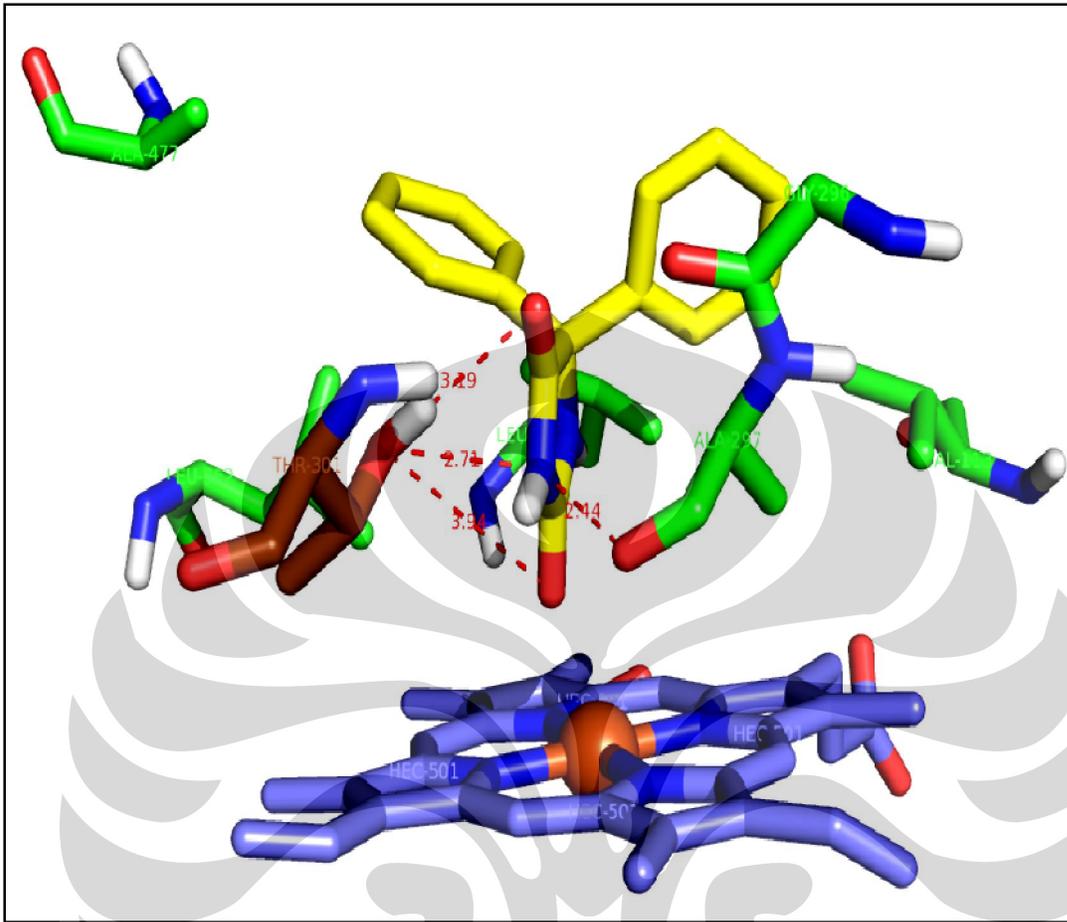
Gambar 33. Residu kationik Arg108 yang disabilkan ikatan hidrogen (garis kuning) dengan Asp293 dan Asn289 dan mengarah pada situs aktif pada 1R9O



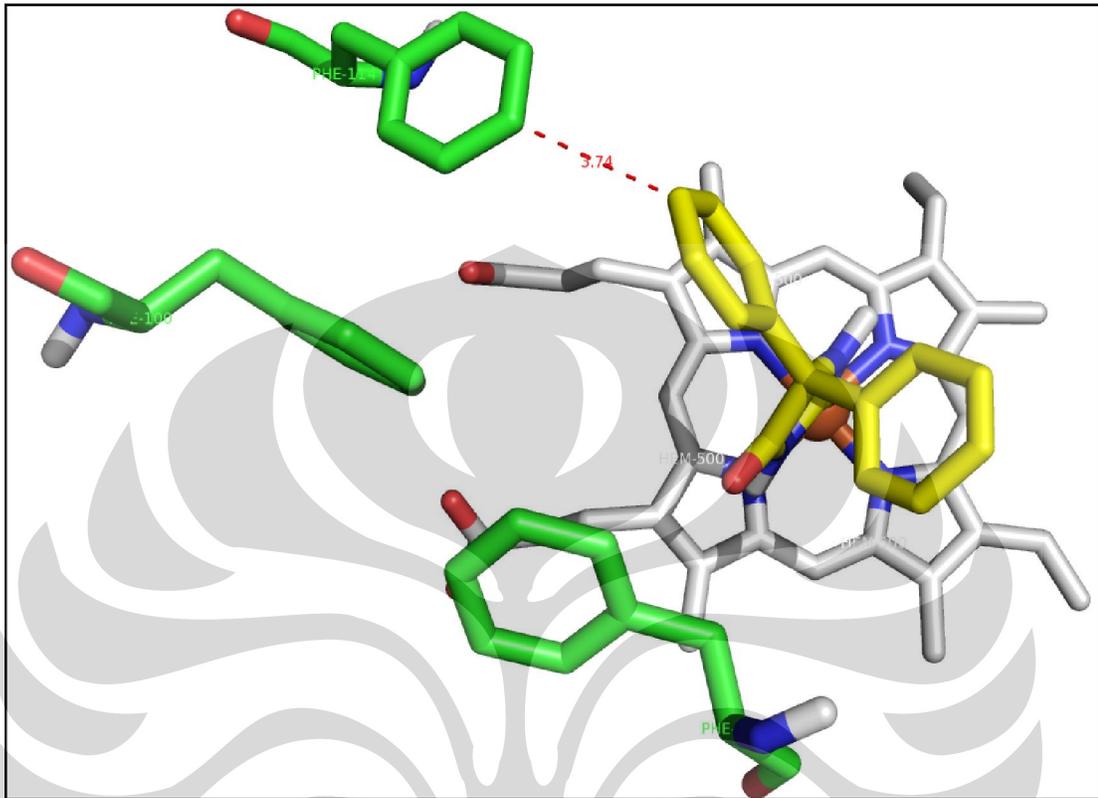
Gambar 34. Residu kationik Arg108 yang disabilkan ikatan hidrogen (garis kuning) dengan Asn289 dan mengarah pada permukaan enzim pada 1OG5



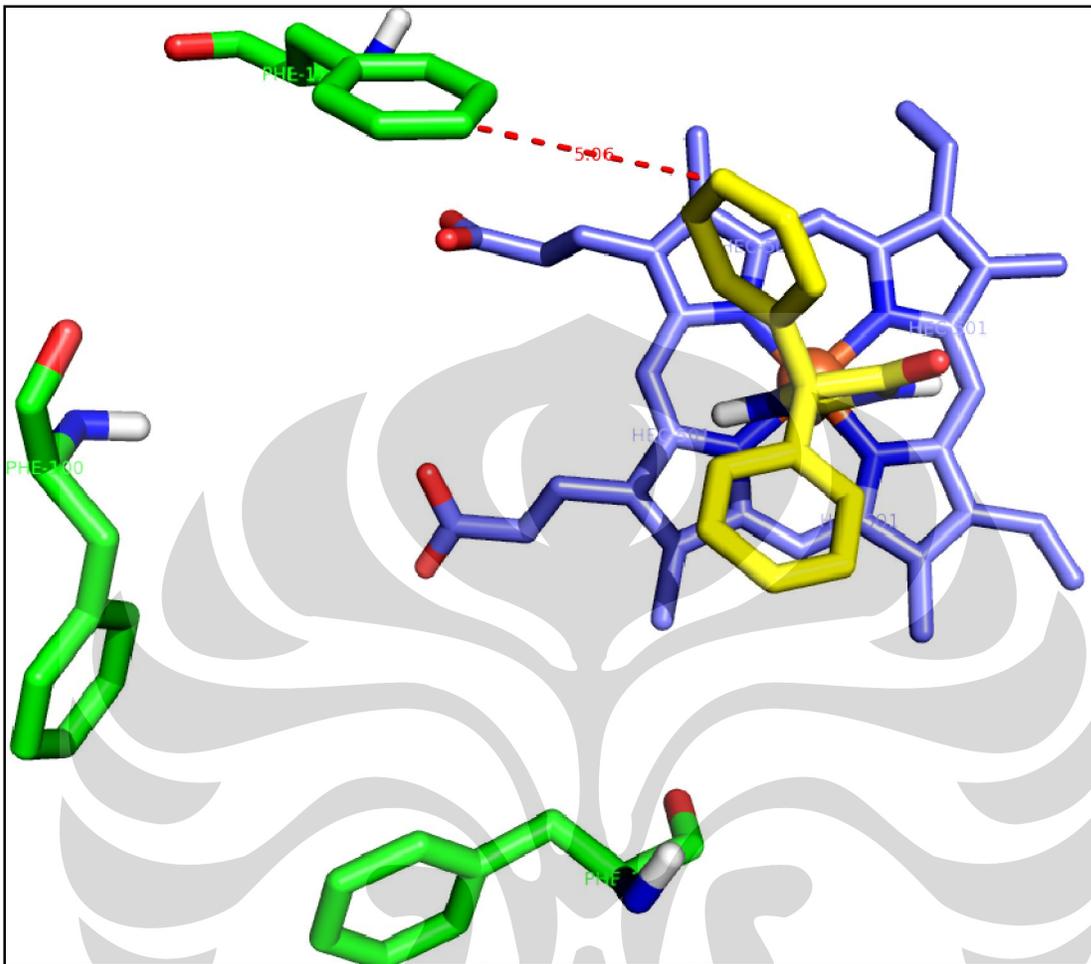
Gambar 35. Ikatan hidrogen (garis merah) pada kompleks fenitoin (kuning) dan CYP2C9 1R9O serta residu yang berinteraksi hidrofobik (hijau).



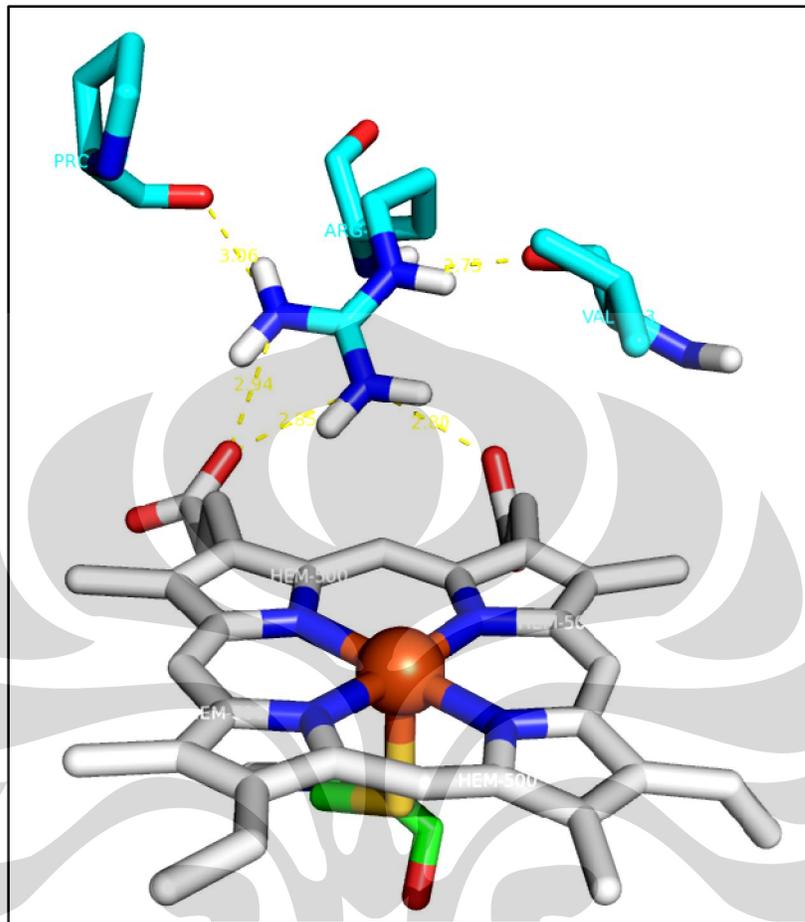
Gambar 36. Ikatan hidrogen pada kompleks fenitoin (kuning) dan CYP2C9 1OG5 (garis merah) serta residu yang berinteraksi hidrofobik (hijau).



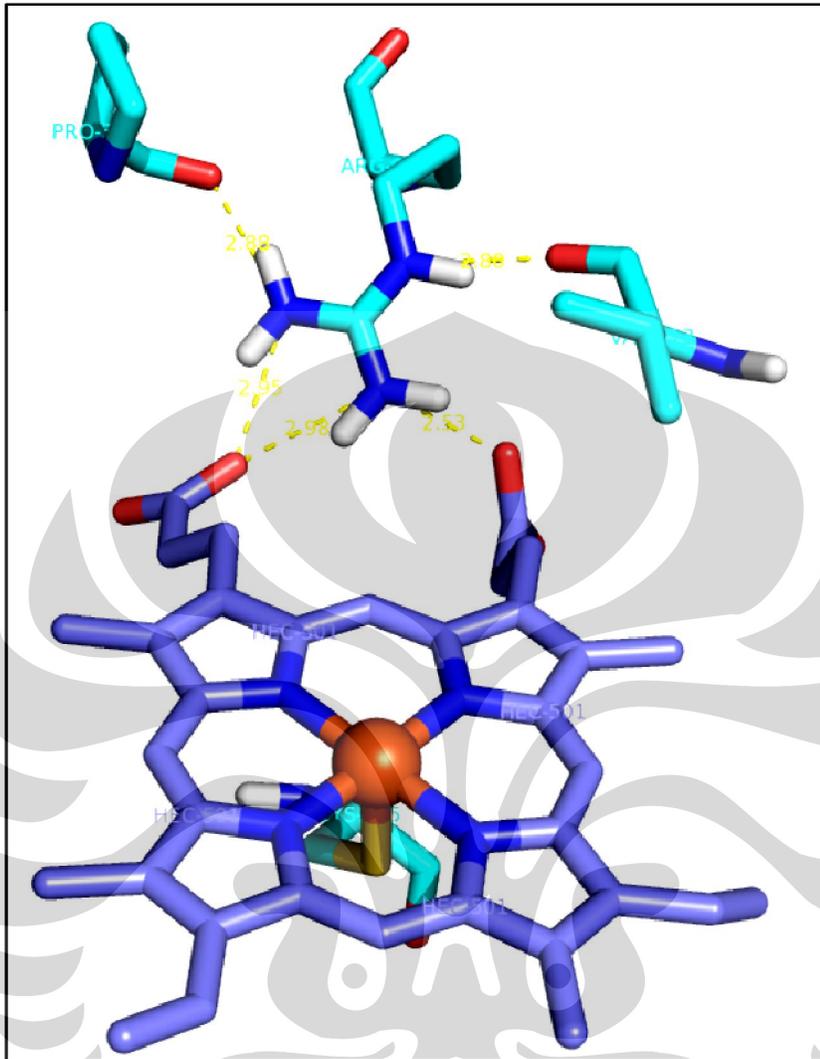
Gambar 37. Interaksi antara gugus fenil dari fenitoin dan gugus fenil dari Phe114 yang berjarak 3,74 Å pada kompleks fenitoin dan 1R9O.



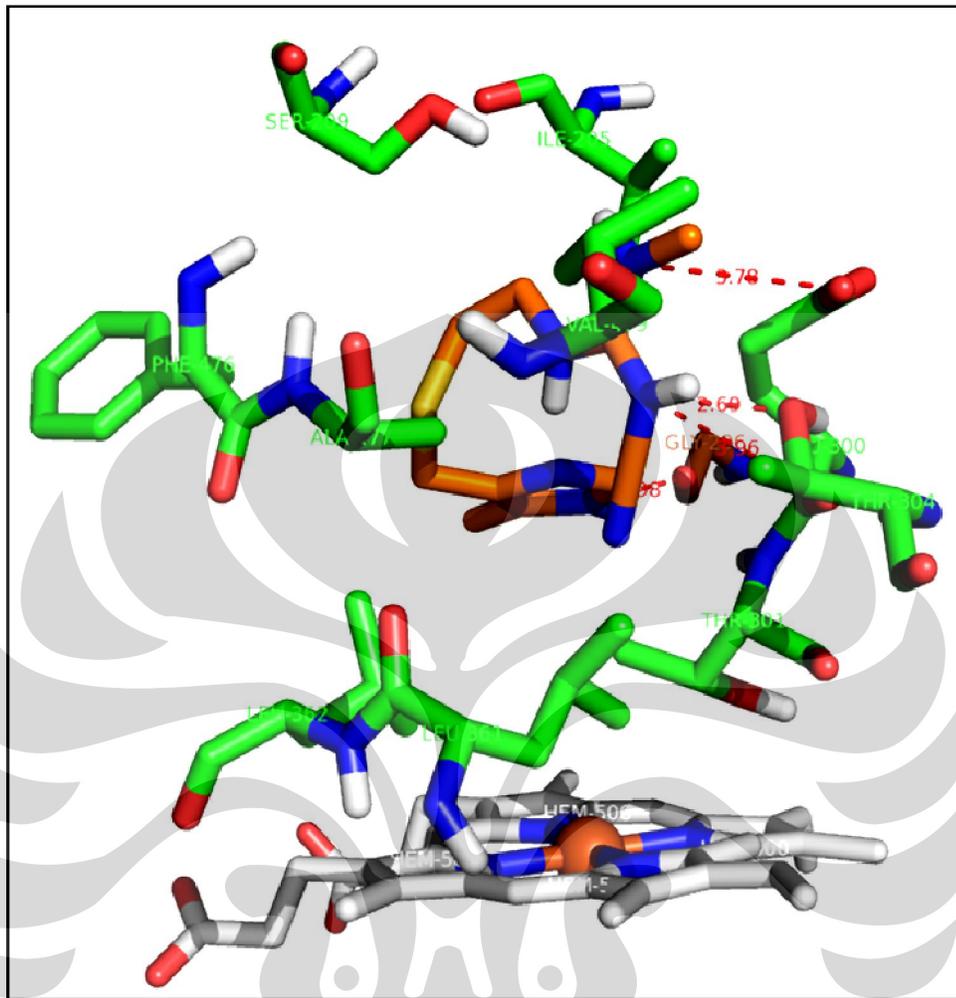
Gambar 38. Interaksi antara gugus fenil dari fenitoin dan gugus fenil dari Phe114 yang berjarak 5,06 Å pada kompleks fenitoin dan 1OG5.



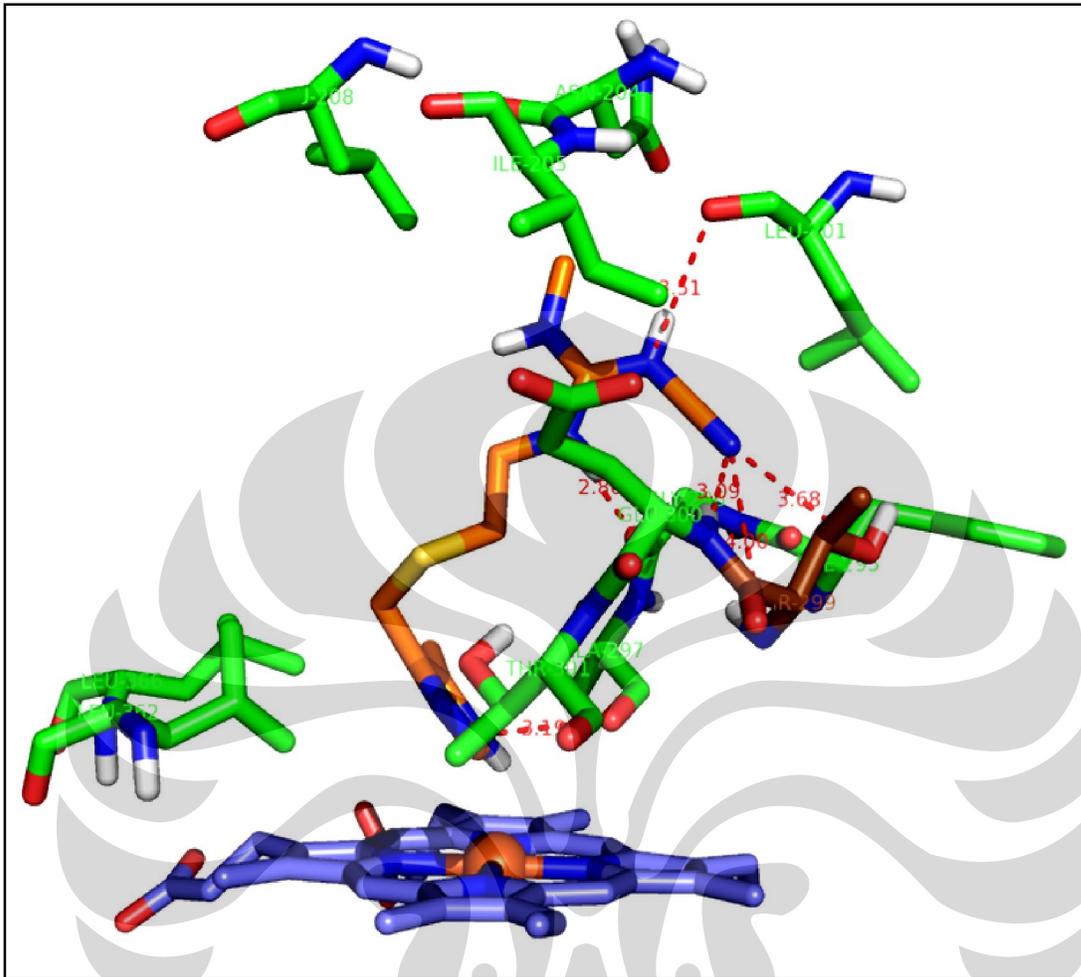
Gambar 39. Ikatan hidrogen (garis kuning) yang menstabilkan heme (abu-abu) pada 1R9O



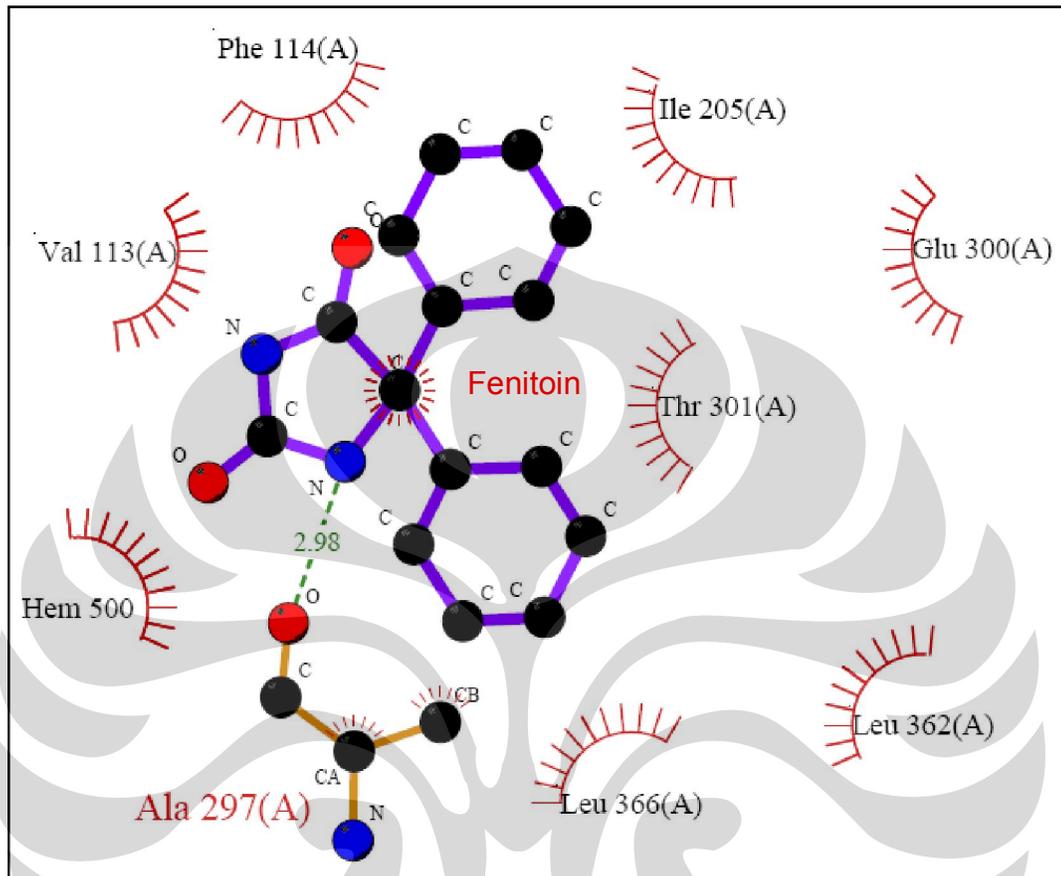
Gambar 40. Ikatan hidrogen (garis kuning) yang menstabilkan heme (biru) pada 1OG5



Gambar 41. Ikatan hidrogen (garis merah) pada kompleks simetidin (jingga) dan CYP2C9 1R9O serta residu yang berinteraksi hidrofobik (hijau).

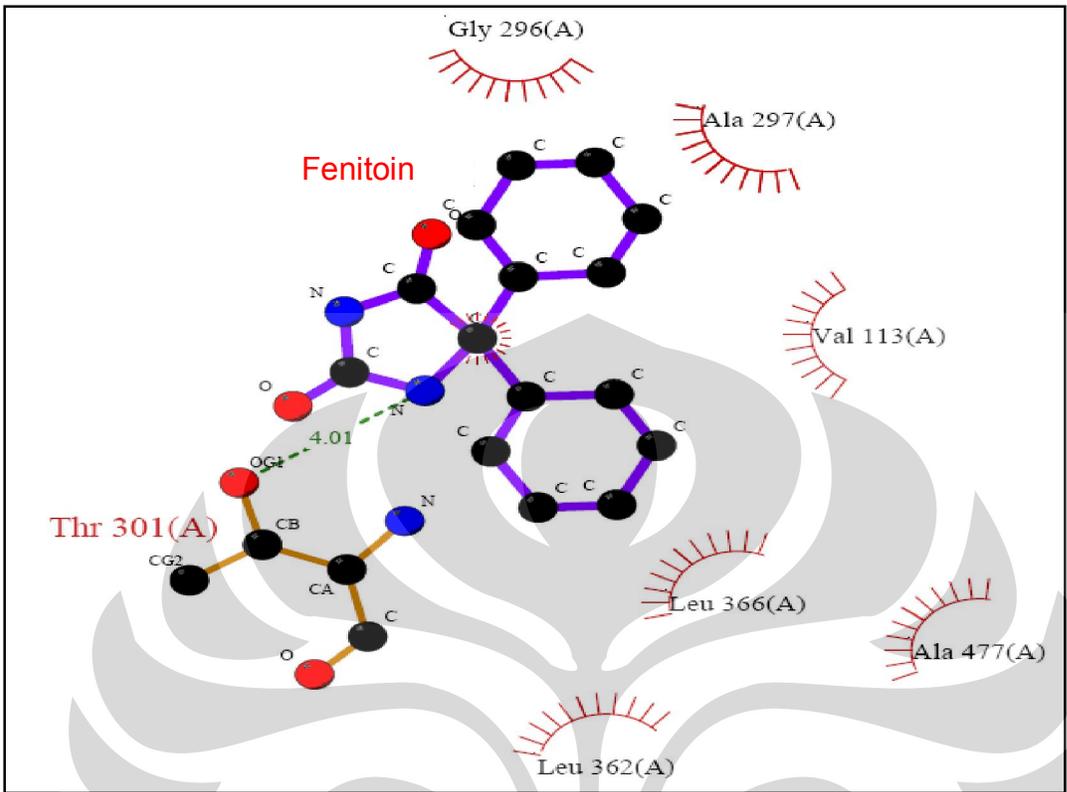


Gambar 42. Ikatan hidrogen (garis merah) pada kompleks simetidin (jingga) dan CYP2C9 1OG5 serta residu yang berinteraksi hidrofobik (hijau).



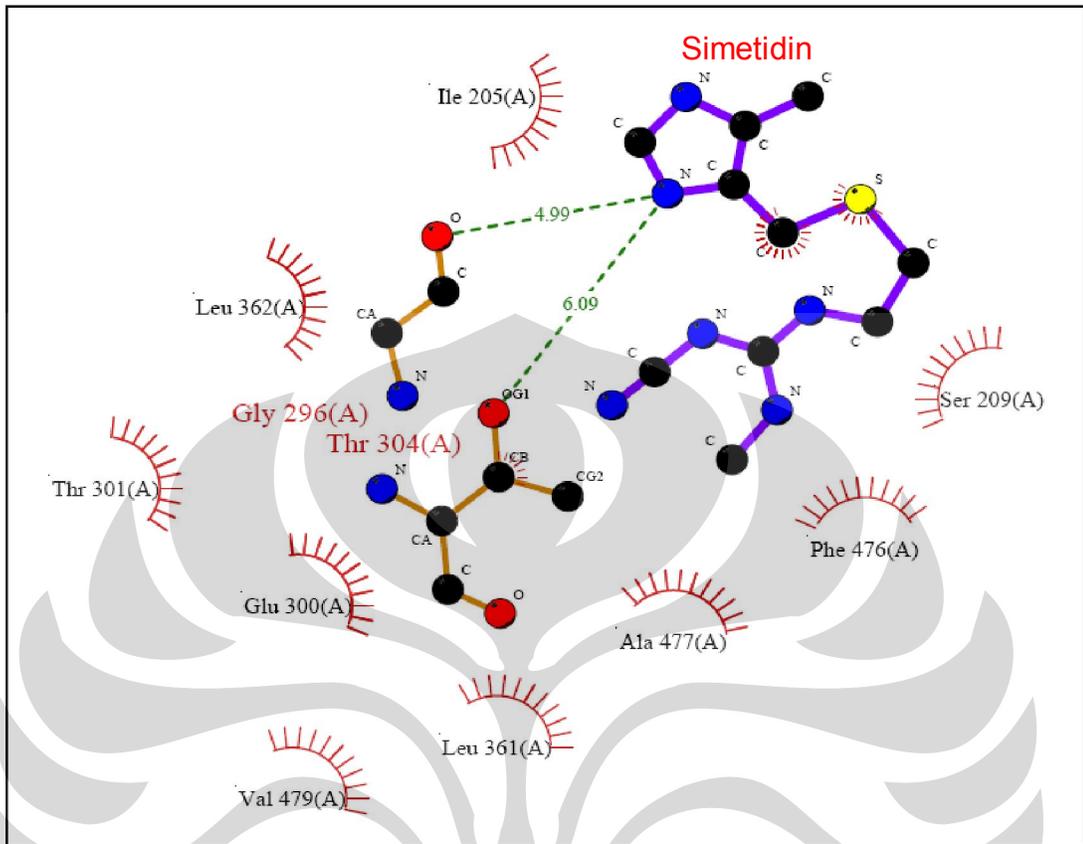
Gambar 43. Interaksi hidrofobik antara fenitoin dan residu asam amino pada CYP2C9 1R9O (dari Ligplot)

- Ligand bond
- Non-ligand bond
- Hydrogen bond and its length
- His 53 Non-ligand residues involved in hydrophobic contact(s)
- Corresponding atoms involved in hydrophobic contact(s)



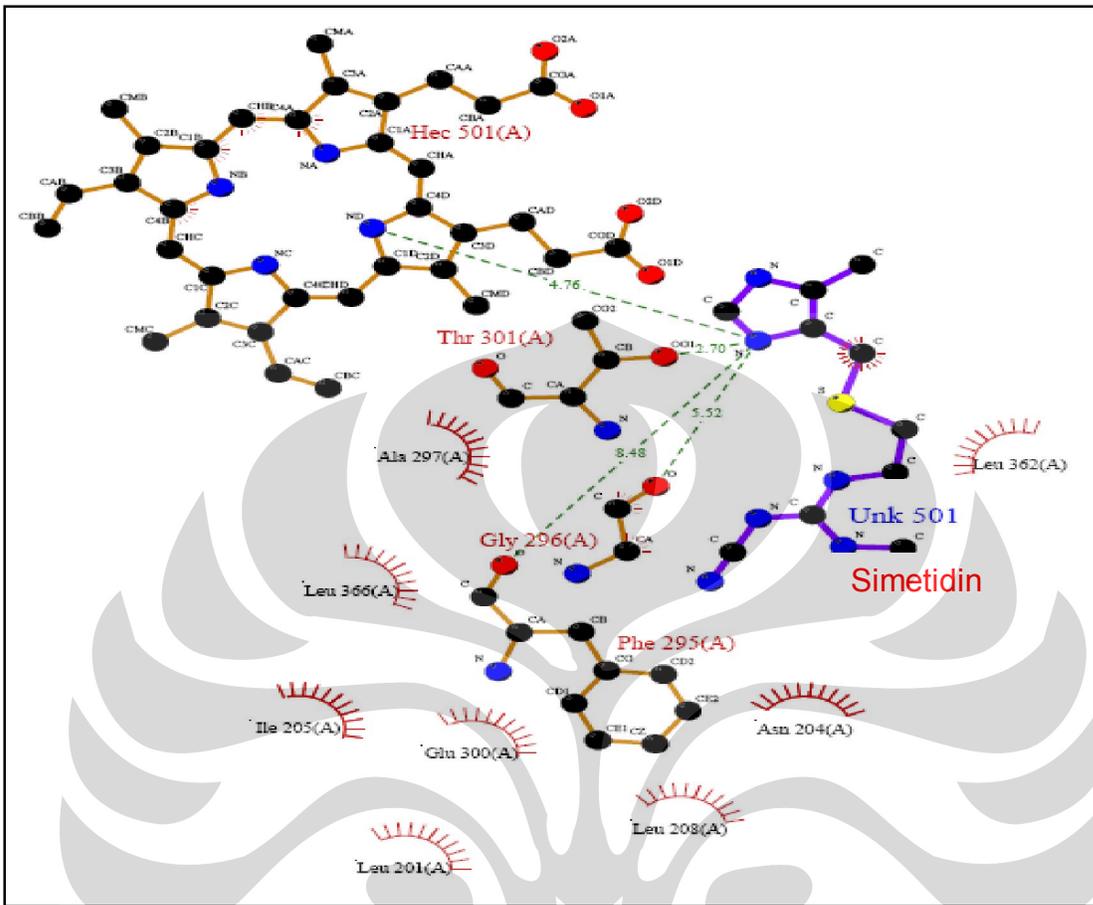
Gambar 44. Interaksi hidrofobik antara fenitoin dan residu asam amino pada CYP2C9 1OG5 (dari Ligplot)

- Ligand bond
- Non-ligand bond
- Hydrogen bond and its length
- Non-ligand residues involved in hydrophobic contact(s)
- Corresponding atoms involved in hydrophobic contact(s)



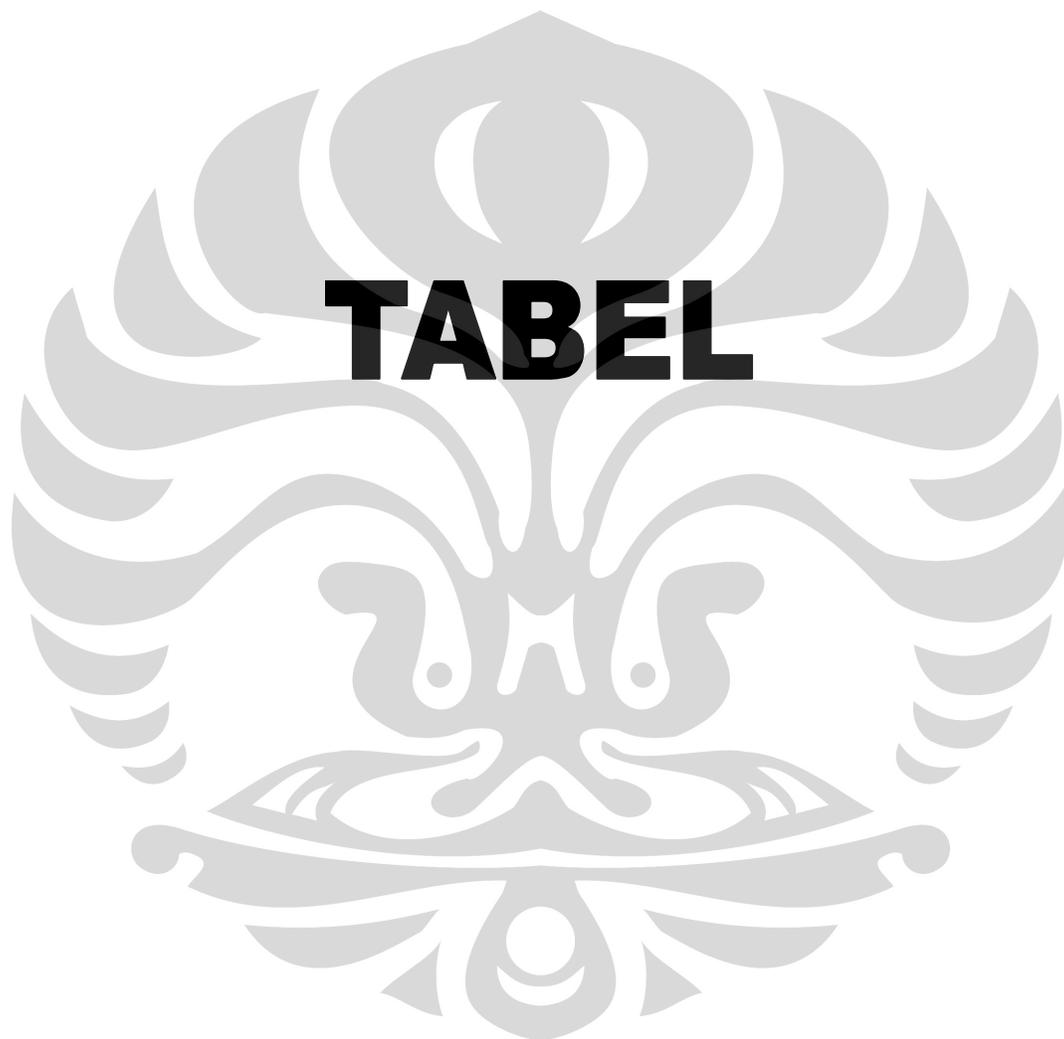
Gambar 45. Interaksi hidrofobik antara simetidin dan residu asam amino pada CYP2C9 1R9O (dari Ligplot)

- Ligand bond
- Non-ligand bond
- Hydrogen bond and its length
- Non-ligand residues involved in hydrophobic contact(s)
- Corresponding atoms involved in hydrophobic contact(s)



Gambar 46. Interaksi hidrofobik antara simetidin dan residu asam amino pada CYP2C9 1OG5 (dari Ligplot)

-  Ligand bond
-  Non-ligand bond
-  Hydrogen bond and its length
-  His 53 Non-ligand residues involved in hydrophobic contact(s)
-  Corresponding atoms involved in hydrophobic contact(s)



Tabel 1
Struktur kristal CYP2C9 (56, 57, 58)

PDB ID	R (Å)	SUBUNIT	LIGAN
1OG2	2.60	A, B	HEME
1OG5	2.55	A, B	S-WARFARIN HEME FLURBIPROFEN
1R90	2.00	A	GLISEROL HEME

Tabel 2

Karakteristik simetidin dan fenitoin (52, 53)

Karakteristik	Simetidin	Fenitoin
	1-cyano-2-methyl-3-[2-[(5-	5,5-
Nama IUPAC	methyl-1H-imidazol-4-yl)methylsulfanyl]ethyl]guanidine	di(phenyl)imidazolidine-2,4-dione
Berat Molekul	252.33924 [g/mol]	252.26798 [g/mol]
Rumus Molekul	C ₁₀ H ₁₆ N ₆ S	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂
XLogP3	0.4	2.5
<i>H-Bond Donor</i>	3	2
<i>H-Bond Acceptor</i>	6	2
<i>Rotatable Bond</i>	7	2

Tabel 3

Karakteristik sulfafenazol dan S-warfarin (54, 55)

Karakteristik	Sulfafenazol	S-warfarin
Nama IUPAC	4-amino-N-(2-phenylpyrazol-3-yl)benzenesulfonamide	2-hydroxy-3-(3-oxo-1-phenylbutyl)chromen-4-one
Berat Molekul	314.36226 [g/mol]	308.32794 [g/mol]
Rumus Molekul	C ₁₅ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	C ₁₉ H ₁₆ O ₄
XLogP3	1.5	2.7
<i>H-Bond Donor</i>	2	1
<i>H-Bond Acceptor</i>	6	4
<i>Rotatable Bond</i>	4	4

Tabel 4

Konsentrasi rata-rata serum fenitoin (\pm SD) sebelum, selama, dan setelah pemberian simetidin (C) sebanyak 1000 mg/hari (13).

No	Umur (tahun)	Dosis Fenitoin (mg/hari)	Kadar Rata-Rata Plasma Fenitoin (μ mol/L)*		
			Sebelum C	Selama C	Setelah C
1	27	400	74,7 \pm 5,8	99,2 \pm 6,3	89,4 \pm 11,0
2	20	260	63,8 \pm 3,1	82,6 \pm 6,7	74,5 \pm 2,1
3	33	300	45,4 \pm 3,9	52,7 \pm 4,5	48,0 \pm 0,7
4	63	300	33,8 \pm 3,8	40,3 \pm 3,5	36,0 \pm 0,0

*Indeks terapi normal 40-80 μ mol/L (10-20 μ g/L)

Konversi: SI ke unit tradisional – Fenitoin: 1 μ mol/L 0,25 μ g/L

Tabel 5

Kombinasi ligan-makromolekul untuk penambatan molekuler beserta energi evaluasi yang digunakan.

Masing –masing kombinasi dilakukan tiga kali proses penambatan molekuler.

No	Ligan	Struktur Kristal CYP2C9	Energi Evaluasi
1	Sulfafenazol	1R90	25 M
		1OG5	25 M
2	S-Warfarin	1R90	2,5 M
		1OG5	2,5 M
3	Simetidin	1R90	25 M
		1OG5	25 M
4	Fenitoin	1R90	2,5 M
		1OG5	2,5 M

Tabel 6

Hasil Penambatan Molekuler Sulfafenazol dengan CYP2C9

PDB ID	Percobaan	Kategori <i>Posing</i>	ΔG (kkal/mol)	%	Ki (μM)	Warna
1R9O	Perc I	Best Dock	-7,53	36	3,00	magenta
		Best Cluster	-	-	-	
	Perc II	Best Dock	-7,55	29	2,94	hijau
		Best Cluster	-7,25	40	4,85	
	Perc III	Best Dock	-7,53	34	3,01	sian
		Best Cluster	-7,25	40	4,85	
1OG5	Perc I	Best Dock	-6,96	2	7,95	magenta
		Best Cluster	-6,76	38	11,17	
	Perc II	Best Dock	-7,00	6	7,39	hijau
		Best Cluster	-6,74	40	11,52	
	Perc III	Best Dock	-7,04	8	6,92	sian
		Best Cluster	-6,78	25	10,79	

Tabel 7

Hasil Penambatan Molekuler S-Warfarin dengan CYP2C9

PDB ID	Percobaan	Kategori <i>Posing</i>	ΔG (kcal/mol)	%	Ki (μM)	Warna
1R90	Perc I	Best Dock	-8,65	70	458,23	magenta
		Best Cluster	-	-	-	
	Perc II	Best Dock	-8,69	74	428,39	hijau
		Best Cluster	-	-	-	
	Perc III	Best Dock	-8,70	76	419,99	sian
		Best Cluster	-	-	-	
1OG5	Perc I	Best Dock	-7,94	62	1,51	magenta
		Best Cluster	-	-	-	
	Perc II	Best Dock	-8,02	53	1,32	hijau
		Best Cluster	-	-	-	
	Perc III	Best Dock	-8,00	51	1,36	sian
		Best Cluster	-	-	-	

Tabel 8

Hasil Penambatan Molekuler Simetidin dengan CYP2C9

PDB ID	Percobaan	Kategori Posing	ΔG (kkal/mol)	%	Ki (μM)	Warna
1R90	Perc I	Best Dock	-4,40	29	594,15	Magenta
		Best Cluster	-	-	-	
	Perc II	Best Dock	-4,39	31	602,80	Hijau
		Best Cluster	-	-	-	
	Perc III	Best Dock	-4,38	21	619,44	Sian
		Best Cluster	-	-	-	
1OG5	Perc I	Best Dock	-4,64	1	396,26	Magenta
		Best Cluster	-4,15	18	915,28	
	Perc II	Best Dock	-4,64	9	396,52	Hijau
		Best Cluster	-4,40	22	591,46	
	Perc III	Best Dock	-4,49	8	513,53	Sian
		Best Cluster	-4,42	23	574,75	

Tabel 9

Hasil Penambatan Molekuler Fenitoin dengan CYP2C9

PDB ID	Percobaan	Kategori Posing	ΔG (kkal/mol)	%	Ki (μM)	Warna
1R9O	Perc I	Best Dock	-6,87	100	9,18	magenta
		Best Cluster	-	-	-	
	Perc II	Best Dock	-6,87	100	9,16	hijau
		Best Cluster	-	-	-	
	Perc III	Best Dock	-6,88	100	9,06	sian
		Best Cluster	-	-	-	
1OG5	Perc I	Best Dock	-6,00	96	39,93	magenta
		Best Cluster	-	-	-	
	Perc II	Best Dock	-5,97	97	41,90	hijau
		Best Cluster	-	-	-	
	Perc III	Best Dock	-5,97	94	42,12	sian
		Best Cluster	-	-	-	

Tabel 10

Rangkuman Energi Bebas (ΔG) dan Konstanta Inhibisi (K_i) Hasil
Penambatan Molekuler Terpilih

Ligan	ΔG (kkal/mol)		K_i (μM)		Ki literatur
	1R90	1OG5	1R90	1OG5	
S-warfarin	-8,70	-7,94	0,042	1,51	0,17 μM (in vitro) (49)
Fenitoin	-6,88	-5,97	9,06	41,90	
Sulfafenazol	-7,25	-6,74	4,85	11,52	0,4 μM (in vitro) (50)
Simetidin	-4,39	-4,15	602,80	915,28	

Tabel 11

Jarak ikatan hidrogen dan jarak situs pengenalan substrat fenitoin
terhadap Fe

PDB ID	Donor	Akseptor	Jarak Ik. Hidrogen (Å)	Jarak Fe-C posisi <i>para</i> gugus fenil (Å)
1R9O	N ₁ -H _(hidantoin)	Ala297 (O)	2,98	8,61 & 8,22
1OG5	N ₃ -H _(hidantoin)	Thr301 (O-H)	2,71	8,50 & 9,20
	Thr301 (OH)	O ₄ (hidantoin)	3,19	
	Thr301 (O-H)	O ₄ (hidantoin)	3,94	
	Ala297 (N-H)	N ₃ -H _(hidantoin)	2,44	

Tabel 12

Jarak ikatan hidrogen dan jarak atom N imidazol simetidin terhadap Fe

PDB ID	Donor	Akseptor	Jarak Ik. Hidrogen(Å)	Jarak Fe-N _(imidazol) (Å)
1R9O	Thr304 (O-H)	N ₁ -H _(guanidin)	2,69	NH: 6,90
	N ₂ -H _(guanidin)	Glu300 (O)	3,78	N: 8,00
	N ₁ -H _(guanidin)	Glu300 (O)	3,96	
	N-H _(imidazol)	Gly296 (O)	2,98	
1OG5	N-H _(imidazol)	Ala297 (O)	3,19	NH: 2,79
	Thr299 (O-H)	N ₌ _(cyano)	3,68	N: 3,82
	Thr299 (N-H)	N ₌ _(cyano)	4,00	
	N ₁ -H _(guanidin)	Leu201 (O)	3,51	
	Glu300 (N-H)	N ₌ _(cyano)	3,09	
	N ₃ -H _(guanidin)	Gly296 (O)	2,80	

Tabel 13

Residu yang berinteraksi hidrofobik pada fenitoin dan simetidin pada struktur kristal CYP2C9 1R9O dan 1OG5

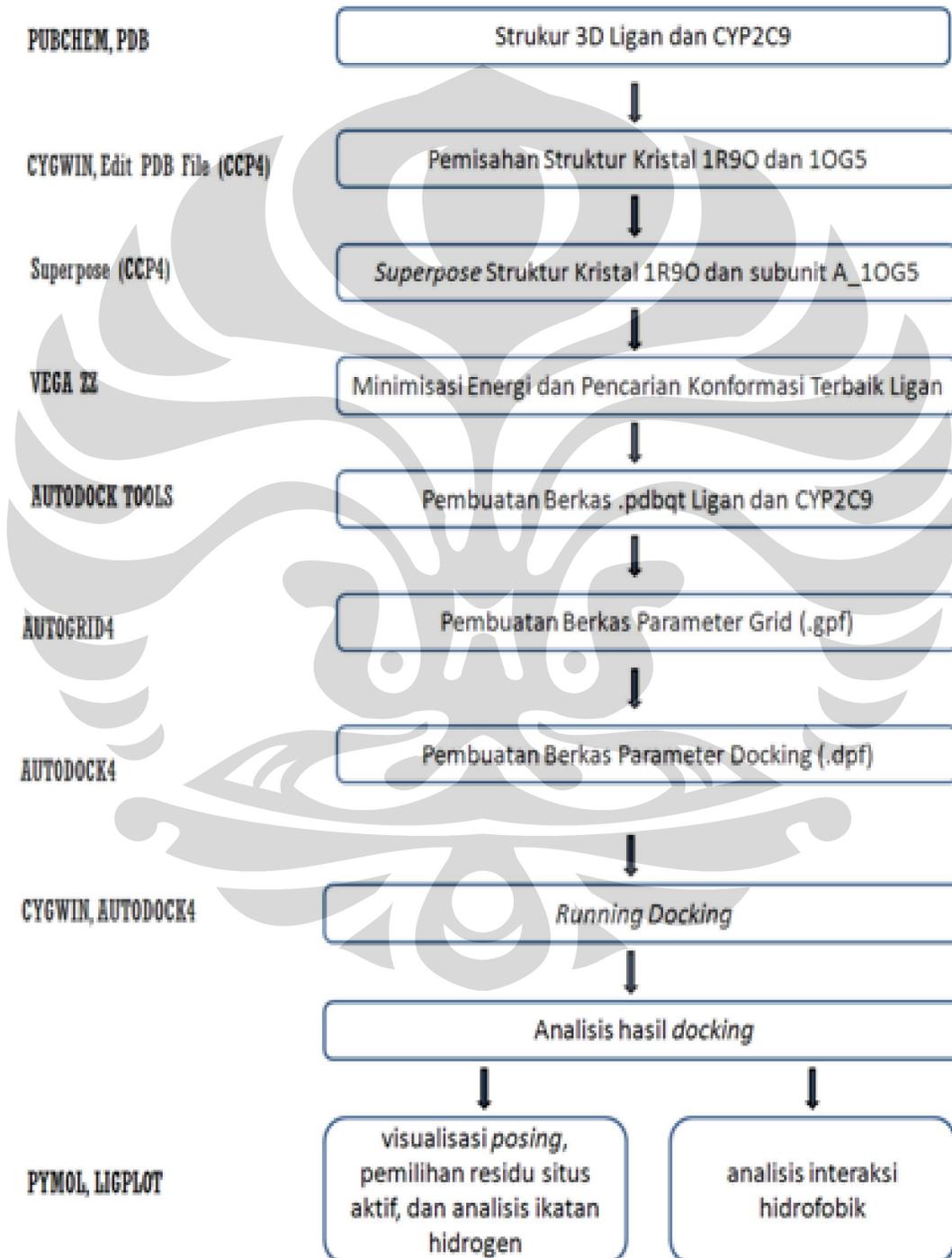
1R9O		1OG5	
Fenitoin	Simetidin	Fenitoin	Simetidin
Leu362	Leu362	Leu362	Leu362
Ile205	Ile205	Ala297	Ala297
Glu300	Glu300	Gly296	Gly296
Thr301	Thr301	Leu366	Leu366
Phe114	Val479	Val113	Ile205
Leu366	Leu361	Ala477	Leu208
Val113	Ala477		Leu201
Ala297	Phe476		Thr301
	Ser209		Glu300
	Thr304		Phe295
			Asn204



LAMPIRAN

Lampiran 1

Bagan alur kerja penelitian



Lampiran 2

Tampilan berkas .pdbqt ligan

```

REMARK 6 active torsions:
REMARK status: ('A' for Active; 'I' for Inactive)
REMARK 1 A between atoms: S_1 and C_9
REMARK 2 A between atoms: S_1 and C_10
REMARK 3 A between atoms: N_3 and C_11
REMARK I between atoms: N_3 and C_15
REMARK I between atoms: N_5 and C_15
REMARK 4 A between atoms: N_5 and C_17
REMARK 5 A between atoms: C_8 and C_9
REMARK 6 A between atoms: C_10 and C_11
ROOT
ATOM 1 S UNK 1 8.152 6.035 3.033 1.00 0.00 -0.161 SA
ENDROOT
BRANCH 1 2
ATOM 2 C UNK 1 7.035 5.784 1.620 1.00 0.00 0.135 C
BRANCH 2 3
ATOM 3 C UNK 1 7.784 5.965 0.334 1.00 0.00 0.067 A
ATOM 4 N UNK 1 7.424 6.963 -0.627 1.00 0.00 -0.246 NA
ATOM 5 C UNK 1 8.123 6.780 -1.701 1.00 0.00 0.207 A
ATOM 6 N UNK 1 8.953 5.647 -1.522 1.00 0.00 -0.353 N
ATOM 7 C UNK 1 8.676 5.140 -0.230 1.00 0.00 0.032 A
ATOM 8 H UNK 1 9.628 5.250 -2.219 1.00 0.00 0.166 HD
ATOM 9 C UNK 1 9.297 3.908 0.355 1.00 0.00 0.070 C
ENDBRANCH 2 3
ENDBRANCH 1 2
BRANCH 1 10
ATOM 10 C UNK 1 8.746 7.745 2.828 1.00 0.00 0.094 C
BRANCH 10 11
ATOM 11 C UNK 1 9.713 8.141 3.943 1.00 0.00 0.148 C
BRANCH 11 12
ATOM 12 N UNK 1 10.883 7.252 3.935 1.00 0.00 -0.225 N
ATOM 13 C UNK 1 11.946 7.293 4.769 1.00 0.00 0.682 C
ATOM 14 N UNK 1 12.957 6.412 4.649 1.00 0.00 -0.126 N
ATOM 15 N UNK 1 11.993 8.231 5.736 1.00 0.00 -0.230 N
ATOM 16 H UNK 1 13.725 6.459 5.279 1.00 0.00 0.197 HD
ATOM 17 C UNK 1 13.055 8.406 6.736 1.00 0.00 0.165 C
ATOM 18 H UNK 1 11.221 8.864 5.752 1.00 0.00 0.177 HD
ATOM 19 H UNK 1 10.944 6.611 3.170 1.00 0.00 0.177 HD
BRANCH 14 20
ATOM 20 C UNK 1 12.979 5.451 3.712 1.00 0.00 0.196 C
ATOM 21 N UNK 1 12.988 4.617 2.890 1.00 0.00 -0.171 NA
ENDBRANCH 14 20
ENDBRANCH 11 12
ENDBRANCH 10 11
ENDBRANCH 1 10
TORSDOF 8

```

Lampiran 3

Tampilan berkas .pdbqt makromolekul

REMARK	4	XXXX COMPLIES WITH FORMAT V. 2.0										
ATOM	1	N	ARG	A	26	17.782	23.589	-34.971	1.00	52.43	-0.058	N
ATOM	2	HN1	ARG	A	26	18.463	23.777	-35.707	1.00	0.00	0.276	HD
ATOM	3	HN2	ARG	A	26	17.029	24.276	-34.950	1.00	0.00	0.276	HD
ATOM	4	HN3	ARG	A	26	17.214	22.765	-35.166	1.00	0.00	0.276	HD
ATOM	5	CA	ARG	A	26	18.504	23.492	-33.670	1.00	52.89	0.255	C
ATOM	6	C	ARG	A	26	17.469	23.206	-32.552	1.00	52.05	0.259	C
ATOM	7	O	ARG	A	26	17.531	22.164	-31.888	1.00	52.85	-0.271	OA
ATOM	8	CB	ARG	A	26	19.335	24.751	-33.422	1.00	54.29	0.042	C
ATOM	9	CG	ARG	A	26	20.287	24.645	-32.244	1.00	57.13	0.027	C
ATOM	10	CD	ARG	A	26	21.429	23.688	-32.542	1.00	60.42	0.116	C
ATOM	11	NE	ARG	A	26	22.354	23.574	-31.418	1.00	65.18	-0.212	N
ATOM	12	HE	ARG	A	26	22.157	24.120	-30.580	1.00	0.00	0.178	HD
ATOM	13	CZ	ARG	A	26	23.436	22.804	-31.418	1.00	66.36	0.666	C
ATOM	14	NH1	ARG	A	26	23.732	22.076	-32.485	1.00	69.58	-0.235	N
ATOM	15	1HH1	ARG	A	26	23.128	22.108	-33.307	1.00	0.00	0.174	HD
...												
...												
...												
TER	4448		HIS	A	492							
HETATM	4448	Fe	HEM	500		5.890	24.568	-1.058	1.00	18.80	0.000	Fe
HETATM	4449	CHA	HEM	500		7.671	24.995	-3.803	1.00	17.00	0.038	C
HETATM	4450	CHB	HEM	500		3.065	24.073	-3.002	1.00	13.18	0.038	C
HETATM	4451	CHC	HEM	500		3.952	24.623	1.703	1.00	13.91	0.038	C
HETATM	4452	CHD	HEM	500		8.530	25.222	0.846	1.00	15.55	0.038	C
HETATM	4453	NA	HEM	500		5.437	24.438	-3.083	1.00	17.15	-0.246	NA
HETATM	4454	C1A	HEM	500		6.362	24.609	-4.075	1.00	17.38	0.079	A
HETATM	4455	C2A	HEM	500		5.711	24.470	-5.373	1.00	17.01	-0.006	A
HETATM	4456	C3A	HEM	500		4.385	24.196	-5.123	1.00	15.32	-0.007	A
HETATM	4457	C4A	HEM	500		4.254	24.201	-3.699	1.00	16.18	0.079	A



TER	4448		HIS	A	492							
HETATM	4448	Fe	HEM	500		5.890	24.568	-1.058	1.00	18.80	3.000	Fe
HETATM	4449	CHA	HEM	500		7.671	24.995	-3.803	1.00	17.00	0.038	C
HETATM	4450	CHB	HEM	500		3.065	24.073	-3.002	1.00	13.18	0.038	C
HETATM	4451	CHC	HEM	500		3.952	24.623	1.703	1.00	13.91	0.038	C
HETATM	4452	CHD	HEM	500		8.530	25.222	0.846	1.00	15.55	0.038	C
HETATM	4453	NA	HEM	500		5.437	24.438	-3.083	1.00	17.15	-0.246	NA
HETATM	4454	C1A	HEM	500		6.362	24.609	-4.075	1.00	17.38	0.079	A
HETATM	4455	C2A	HEM	500		5.711	24.470	-5.373	1.00	17.01	-0.006	A
HETATM	4456	C3A	HEM	500		4.385	24.196	-5.123	1.00	15.32	-0.007	A
HETATM	4457	C4A	HEM	500		4.254	24.201	-3.699	1.00	16.18	0.079	A

Lampiran 4

Tampilan berkas .gpf

```
npts 50 54 60 # num.grid points in xyz
gridfld 10G5.maps.fld # grid_data_file
spacing 0.375 # spacing(A)
receptor_types A C Fe HD N NA OA SA # receptor atom types
ligand_types A C HD N NA SA # ligand atom types
receptor 10G5.pdbqt # macromolecule
gridcenter -21.105 78.284 30.093 # xyz-coordinates or auto
smooth 0.5 # store minimum energy w/in rad(A)
map 10G5.A.map # atom-specific affinity map
map 10G5.C.map # atom-specific affinity map
map 10G5.HD.map # atom-specific affinity map
map 10G5.N.map # atom-specific affinity map
map 10G5.NA.map # atom-specific affinity map
map 10G5.SA.map # atom-specific affinity map
elecmap 10G5.e.map # electrostatic potential map
dsolvmap 10G5.d.map # desolvation potential map
dielectric -0.1465 # <0, AD4 distance-dep.diel;>0, constant
```

Lampiran 5

Tampilan berkas .dpf

```
outlev 1 # diagnostic output level
intelec # calculate internal electrostatics
seed pid time # seeds for random generator
ligand types A C HD N NA SA # atoms types in ligand
fld 1R90.maps.fld # grid_data_file
map 1R90.A.map # atom-specific affinity map
map 1R90.C.map # atom-specific affinity map
map 1R90.HD.map # atom-specific affinity map
map 1R90.N.map # atom-specific affinity map
map 1R90.NA.map # atom-specific affinity map
map 1R90.SA.map # atom-specific affinity map
elecmap 1R90.e.map # electrostatics map
desolvmap 1R90.d.map # desolvation map
move Cime.pdbqt # small molecule
about 10.2963 6.5216 2.4972 # small molecule center
tran0 random # initial coordinates/A or random
quat0 random # initial quaternion
ndihe 8 # number of active torsions
dihe0 random # initial dihedrals (relative) or random
tstep 2.0 # translation step/A
qstep 50.0 # quaternion step/deg
dstep 50.0 # torsion step/deg
torsdof 8 0.274000 # torsional degrees of freedom and coefficient
rmstol 2.0 # cluster_tolerance/A
extnrg 1000.0 # external grid energy
e0max 0.0 10000 # max initial energy; max number of retries
ga_pop_size 150 # number of individuals in population
ga_num_evals 25000000 # maximum number of energy evaluations
ga_num_generations 27000 # maximum number of generations
ga_elitism 1 # number of top individuals to survive to next generation
ga_mutation_rate 0.02 # rate of gene mutation
ga_crossover_rate 0.8 # rate of crossover
ga_window_size 10 #
ga_cauchy_alpha 0.0 # Alpha parameter of Cauchy distribution
ga_cauchy_beta 1.0 # Beta parameter Cauchy distribution
set_ga # set the above parameters for GA or LGA
sw_max_its 300 # iterations of Solis & Wets local search
sw_max_succ 4 # consecutive successes before changing rho
sw_max_fail 4 # consecutive failures before changing rho
sw_rho 1.0 # size of local search space to sample
sw_lb_rho 0.01 # lower bound on rho
ls_search_freq 0.06 # probability of performing local search on individual
set_sw1 # set the above Solis & Wets parameters
compute_unbound_extended # compute extended ligand energy
ga_run 100 # do this many hybrid GA-LS runs
analysis # perform a ranked cluster analysis
```

Lampiran 6

Tampilan berkas .dlg

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus-ter Rank	Lowest Binding Energy	Run	Mean Binding Energy	Num in Clus	Histogram							
					5	10	15	20	25	30	35	
1	-7.55	43	-7.50	29	#####							
2	-7.38	87	-7.29	18	#####							
3	-7.33	89	-7.23	3	###							
4	-7.30	10	-7.26	3	###							
5	-7.25	100	-7.25	40	#####							
6	-7.10	1	-7.10	1	#							
7	-7.05	35	-7.00	3	###							
8	-7.04	76	-7.04	2	##							
9	-6.83	14	-6.83	1	#							

FINAL LAMARCKIAN GENETIC ALGORITHM DOCKED STATE

```

State:      7.004 32.476 -3.334  0.423 0.898 0.121 157.058  135.11 158.64 115.25 -56.88 -0.30

DOCKED: MODEL      1
DOCKED: USER      Run = 1
DOCKED: USER      DPF = 25jt2.dpf
DOCKED: USER
DOCKED: USER      Estimated Free Energy of Binding = -7.10 kcal/mol [(1)+(2)+(3)-(4)]
DOCKED: USER      Estimated Inhibition Constant, Ki = 6.21 uM (micromolar) [Temperature = 298.15 K]
DOCKED: USER
DOCKED: USER      (1) Final Intermolecular Energy = -7.60 kcal/mol
DOCKED: USER      vdW + Hbond + desolv Energy = -7.58 kcal/mol
DOCKED: USER      Electrostatic Energy = -0.02 kcal/mol
DOCKED: USER      (2) Final Total Internal Energy = -1.09 kcal/mol
DOCKED: USER      (3) Torsional Free Energy = +1.10 kcal/mol
DOCKED: USER      (4) Unbound System's Energy = -0.49 kcal/mol
DOCKED: USER
DOCKED: USER
DOCKED: USER      NEWDPF move Sulf.pdbqt
DOCKED: USER      NEWDPF about 1.356400 1.614500 2.608100
DOCKED: USER      NEWDPF tran0 7.003908 32.475806 -3.333561
DOCKED: USER      NEWDPF quaternion0 0.414944 0.879882 0.118649 0.198876
DOCKED: USER      NEWDPF axisangle0 0.423401 0.897816 0.121068 157.057552
DOCKED: USER      NEWDPF quat0 0.423401 0.897816 0.121068 157.057552 # deprecated
DOCKED: USER      NEWDPF dihe0 135.11 158.64 115.25 -56.88 -0.30
DOCKED: USER
DOCKED: REMARK    5 active torsions:
DOCKED: REMARK    status: ('A' for Active; 'I' for Inactive)
DOCKED: REMARK    1 A between atoms: S_1 and N_5
DOCKED: REMARK    2 A between atoms: S_1 and C_9
DOCKED: REMARK    3 A between atoms: N_4 and C_10
DOCKED: REMARK    4 A between atoms: N_5 and C_8
DOCKED: REMARK    5 A between atoms: N_7 and C_19
  
```

(lanjutan)

Lampiran 6

RMSD TABLE

Rank	Sub-Rank	Run	Binding Energy	Cluster RMSD	Reference RMSD	Grep Pattern
1	1	43	-7.55	0.00	29.35	RANKING
1	2	49	-7.54	0.07	29.35	RANKING
1	3	53	-7.53	0.13	29.33	RANKING
1	4	21	-7.53	0.14	29.33	RANKING
1	5	91	-7.52	0.09	29.32	RANKING
1	6	22	-7.52	0.12	29.34	RANKING
1	7	7	-7.52	0.12	29.33	RANKING
1	8	59	-7.51	0.55	29.47	RANKING
1	9	44	-7.51	0.57	29.45	RANKING
1	10	2	-7.51	0.54	29.46	RANKING
1	11	65	-7.50	0.27	29.43	RANKING
1	12	15	-7.50	0.70	29.39	RANKING
1	13	11	-7.50	0.65	29.37	RANKING
1	14	30	-7.50	0.16	29.32	RANKING
1	15	20	-7.49	0.39	29.26	RANKING
1	16	61	-7.49	0.39	29.35	RANKING
1	17	23	-7.49	0.47	29.39	RANKING
1	18	72	-7.49	0.69	29.41	RANKING
1	19	24	-7.49	0.78	29.41	RANKING
1	20	29	-7.49	0.59	29.47	RANKING
1	21	40	-7.48	0.74	29.42	RANKING
1	22	52	-7.48	0.75	29.43	RANKING
1	23	36	-7.48	0.73	29.41	RANKING
1	24	81	-7.48	0.25	29.27	RANKING
1	25	45	-7.48	0.74	29.44	RANKING
1	26	25	-7.48	0.78	29.46	RANKING
1	27	37	-7.48	0.75	29.41	RANKING
1	28	5	-7.47	0.79	29.46	RANKING
1	29	92	-7.46	0.29	29.35	RANKING
2	1	87	-7.38	0.00	28.88	RANKING

Lampiran 7

Perintah Cygwin (46)

1. **cat 1R9O.pdb | grep FLP > key_1R9O.pdb**

Input : 1R9O.pdb

Output : key_1R9O.pdb

2. **cat 1R9O.pdb | grep -v FLP > lock_1R9O.pdb**

Input : 1R9O.pdb

Output : lock_1R9O.pdb

3. **cat lock_1R9O.pdb | grep -v HOH > lock_1R9O_HOH.pdb**

Input : lock_1R9O.pdb

Output : lock_1R9O_HOH.pdb

4. **vi lock_1R9O_HOH.pdbqt**

Input : lock_1R9O_HOH.pdbqt (Fe 0)

Output : lock_1R9O_HOH.pdbqt (Fe 3+)

5. **autogrid4 -p 1R9O_Phe.gpf -l 1R9O_Phe.glg &**

Input : 1R9O_Phe.gpf

Output : 1R9O_Phe.maps.fld, 1R9O_Phe.maps.xyz,
1R9O_Phe.glg, 1R9O_Phe.A.map, 1R9O_Phe.N.map,
1R9O_Phe.HD.map, 1R9O_Phe.OA.map,
1R9O_Phe.d.map, 1R9O_Phe.e.map

6. **autodock4 -p 1R9O_Phe.dpf -l 1R9O_Phe.dlg &**

Input : 1R9O_Phe.dpf

Output : 1R9O_Phe.dlg

Lampiran 8

Tampilan Berkas *Protein Data Bank* CYP2C9 (1OG5) (56)

1og5  DOI 10.2210/pdb1og5/pdb

Red - Derived Information

Title STRUCTURE OF HUMAN CYTOCHROME P450 CYP2C9

Authors Williams, P.A., Cosme, J., Ward, A., Angove, H.C., Matak Vinkovic, D., Jhoti, H.

Primary Citation Williams, P.A., Cosme, J., Ward, A., Angove, H.C., Matak Vinkovic, D., Jhoti, H. (2003) Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature* 424: 464-468
[\[Abstract\]](#) [PubMed](#)

History Deposition 2003-04-24 Release 2003-07-17

Experimental Method Type X-RAY DIFFRACTION Data N/A

Parameters

Resolution(Å)	R-Value	R-Free	Space Group
2.55	0.225 (obs.)	0.257	P 3 2 1

Unit Cell

Length [Å]	a	b	c
164.76	164.76	110.76	

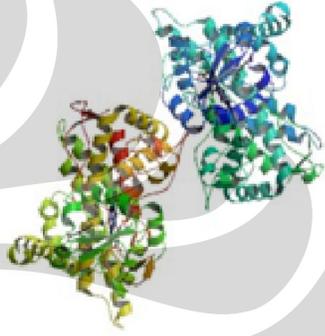
Angles [°] alpha 90.00 beta 90.00 gamma 120.00

Molecular Description Asymmetric Unit Polymer: 1 Molecule: CYTOCHROME P450 2C9 Fragment: SOLUBLE DOMAIN, RESIDUES 30-490 Mutation: YES
 Chains: A,B EC no: 1.14.14.1 [EC](#)
 Structure Weight: 110192.09 [Go to IUBMB EC entry](#)

Classification Electron Transport

Source Polymer: 1 Scientific Name: *Homo sapiens* [Common Name: Human](#) Expression system: *Escherichia coli*

Images and Visualization << Biological Molecule >>

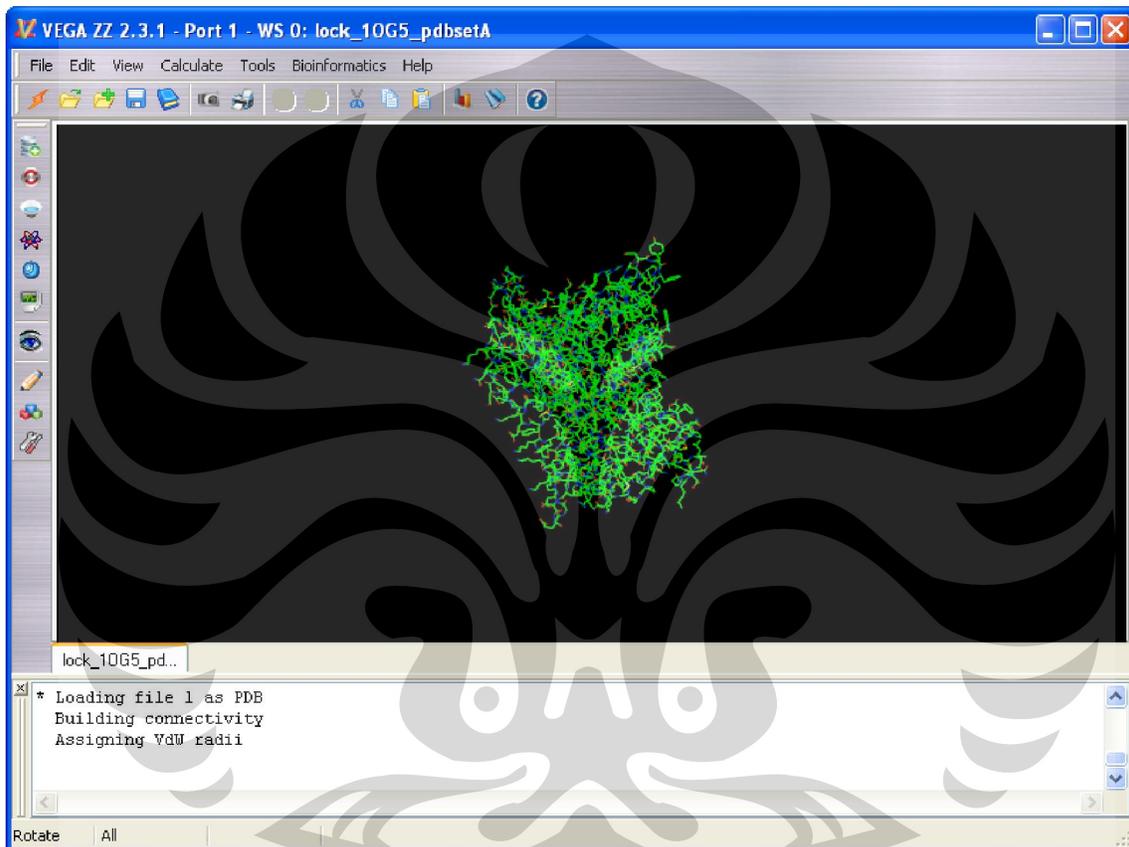


Display Options [KING](#) [Jmol](#) [WebMol](#) [MBT SimpleViewer*](#) [MBT Protein Workshop](#) [QuickPDB](#) [All Images](#)

* Capable of displaying biological molecules.

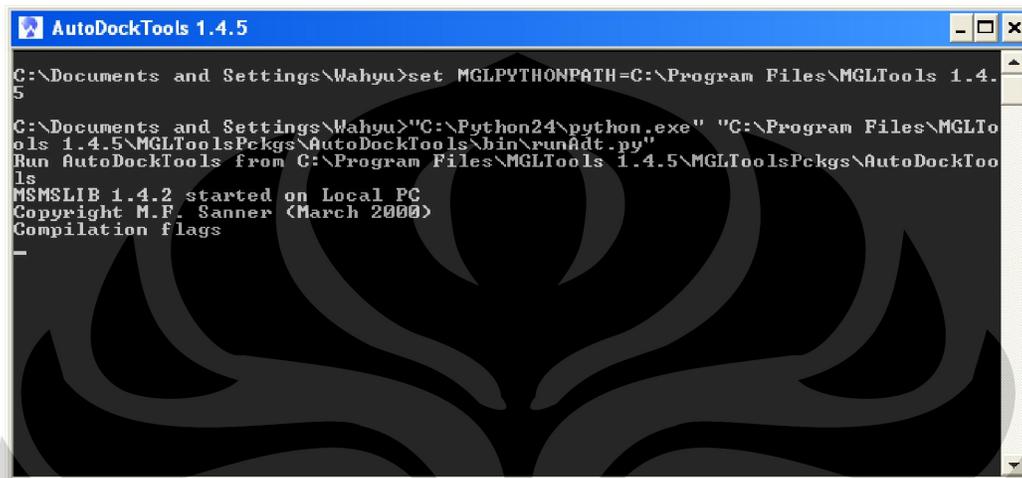
Lampiran 9

Tampilan program VegaZZ

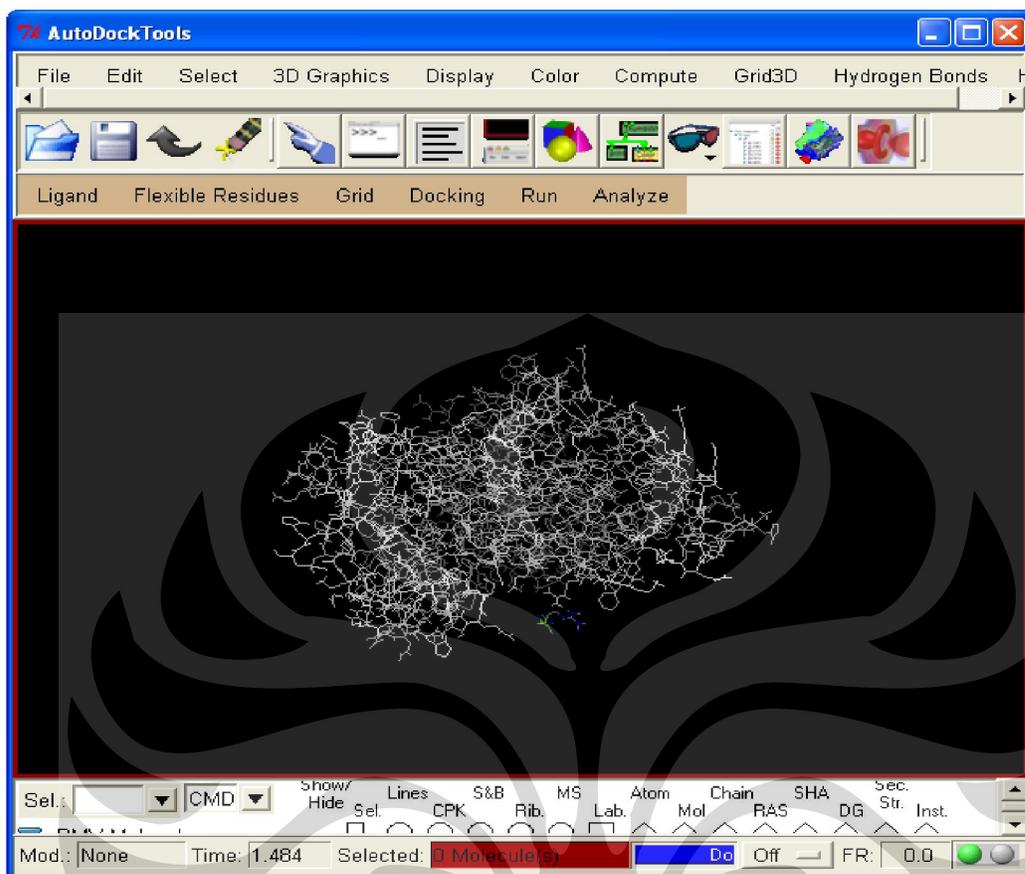


Lampiran 10

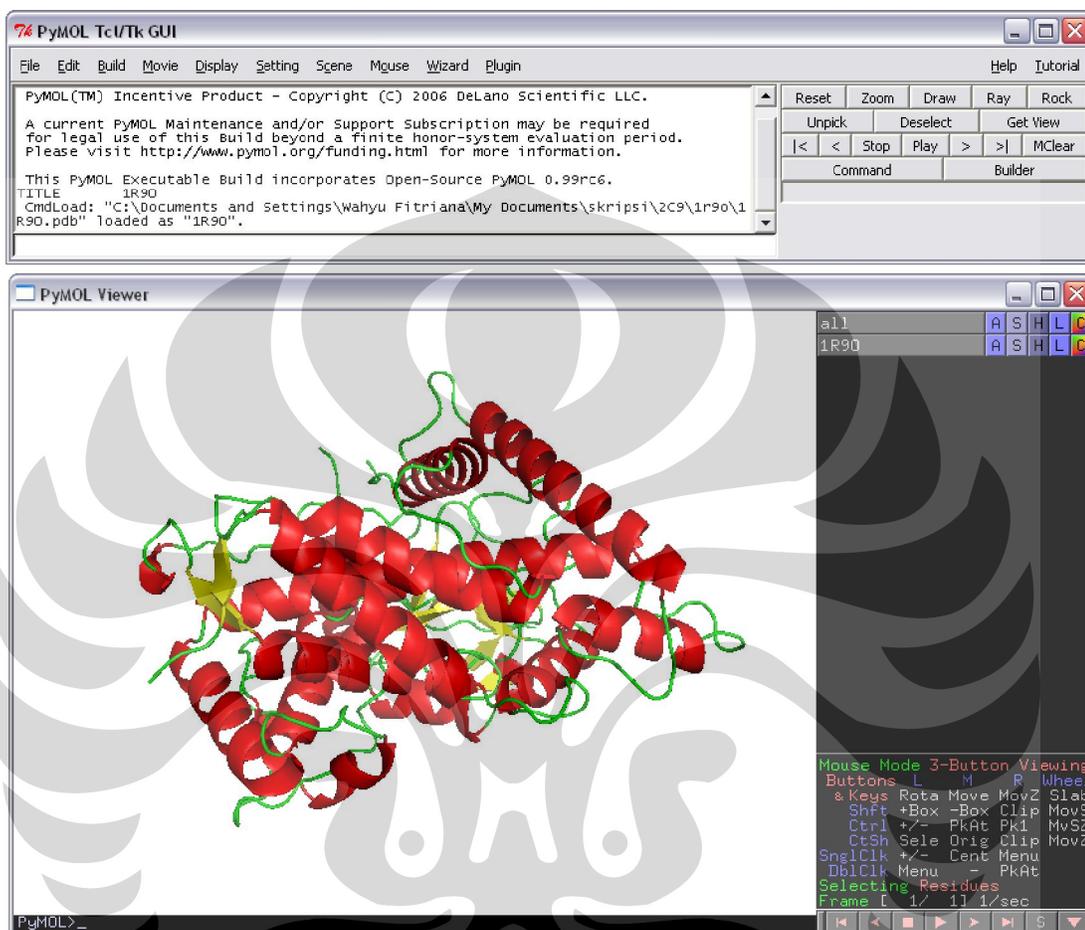
Tampilan program AutoDock



```
AutoDockTools 1.4.5
C:\Documents and Settings\Wahyu>set MGLPYTHONPATH=C:\Program Files\MGLTools 1.4.5
C:\Documents and Settings\Wahyu>"C:\Python24\python.exe" "C:\Program Files\MGLTools 1.4.5\MGLToolsPckgs\AutoDockTools\bin\runAdt.py"
Run AutoDockTools from C:\Program Files\MGLTools 1.4.5\MGLToolsPckgs\AutoDockTools
MSMSLIB 1.4.2 started on Local PC
Copyright M.F. Sanner (March 2000)
Compilation flags
-
```



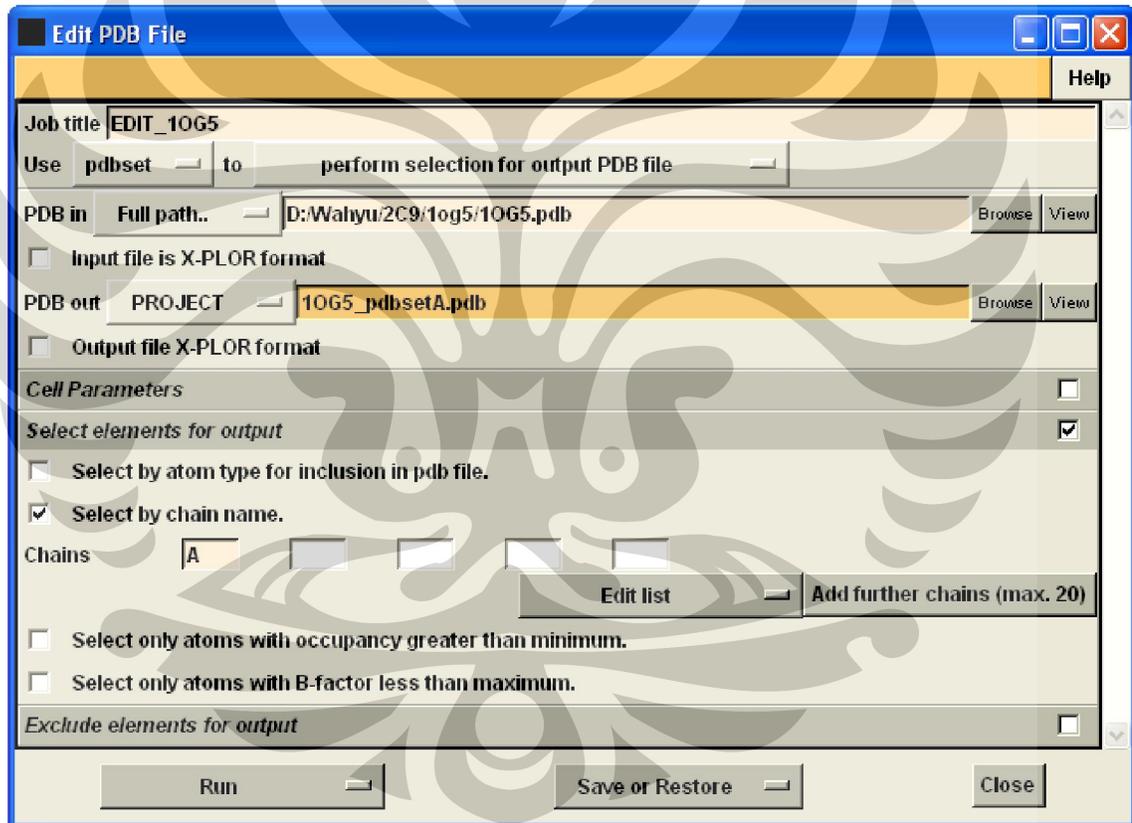
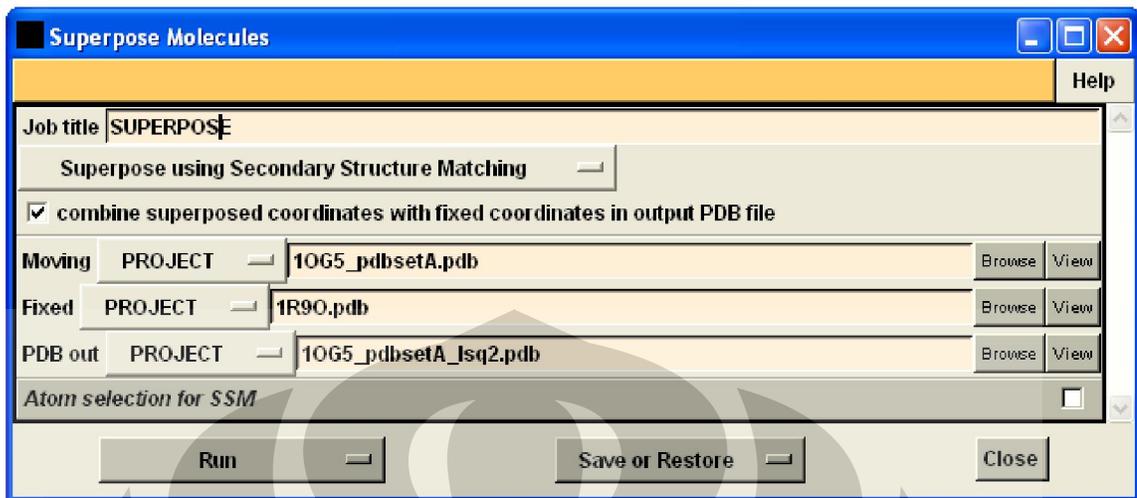
Lampiran 11
Tampilan program PyMOL



Lampiran 12

Tampilan program Superpose dan Edit PDB File





Lampiran 13

Tampilan berkas program Cygwin

```

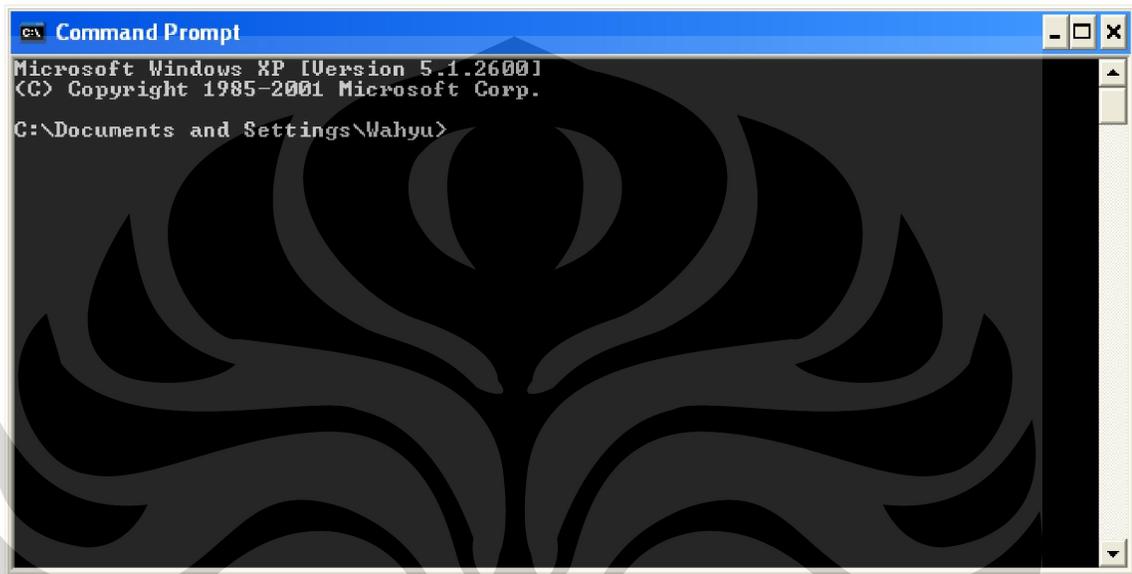
Your group is currently "mkpasswd". This indicates that
the /etc/passwd (and possibly /etc/group) files should be rebuilt.
See the man pages for mkpasswd and mkgroup then, for example, run
mkpasswd -l [-d] > /etc/passwd
mkgroup -l [-d] > /etc/group
Note that the -d switch is necessary for domain users.
Wahyu@protein ~
$ -

```



Lampiran 14

Tampilan berkas program Ligplot (pada Command Prompt)



```
Command Prompt
Microsoft Windows XP [Version 5.1.2600]
(C) Copyright 1985-2001 Microsoft Corp.
C:\Documents and Settings\Wahyu>
```

Lampiran 15
Residu Asam Amino (59)



