

**STUDI INTERAKSI PENGIKATAN ASAM MEFENAMAT DAN
PIROKSIKAM PADA ALBUMIN MANUSIA DENGAN METODE
PENAMBATAN MOLEKULER SECARA *IN SILICO***

HAMKA DECKY PURNAMA

0305050329



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN FARMASI
DEPOK
2010**

**STUDI INTERAKSI PENGIKATAN ASAM MEFENAMAT DAN
PIROKSIKAM PADA ALBUMIN MANUSIA DENGAN METODE
PENAMBATAN MOLEKULER SECARA *IN SILICO***

**Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi**

Oleh:

HAMKA DECKY PURNAMA

0305050329



DEPOK

2010

SKRIPSI : STUDI INTERAKSI PENGIKATAN ASAM MEFENAMAT DAN
PIROKSIKAM PADA ALBUMIN MANUSIA DENGAN
METODEPENAMBATAN MOLEKULER SECARA *IN SILICO*

NAMA : HAMKA DECKY PURNAMA

NPM : 0305050329

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, Januari 2010

DR.ARRY YANUAR, MS.
PEMBIMBING I

PHARM. DR. JOSHITA DJAJADISAstra M.S., Ph.D.,
PEMBIMBING II

Tanggal lulus Ujian Sidang Sarjana: Desember 2009

Penguji I : Dra. Maryati K., M. Si. (.....)

Penguji II : Dr. Hasan Rachmat Marsono, MS. (.....)

Penguji III : Dra. Syafrida Siregar (.....)

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa karena atas berkat, rahmat dan perlindungan-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Skripsi ini disusun dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia. Penulis menyadari adanya bantuan dan bimbingan yang sangat berarti dari berbagai pihak dalam penyusunan skripsi ini, oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Dr. Arry Yanuar, MS., selaku Pembimbing I yang telah memberikan bimbingan, saran, bantuan, dukungan, dan solusi terhadap berbagai permasalahan yang dihadapi selama penelitian berlangsung.
2. Ibu Pharm. Dr. Joshita Djajadisastra M.S., Ph.D., selaku Pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, saran, dan selama penulis menjalani perkuliahan hingga penelitian.
3. Ibu Dra. Azizahwati M.S., Apt., selaku Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan, saran, bantuan, dan dukungan selama penulis menjalani perkuliahan hingga penelitian.
4. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS., selaku Ketua Departemen Farmasi, FMIPA, UI.

5. Seluruh staf pengajar serta karyawan Departemen Farmasi, FMIPA, UI, atas bantuannya selama penulis menimba ilmu.
6. Ama dan Ayah tersayang, kedua kakak, dan adikku yang telah memberikan dukungan, doa, semangat, saran dan bantuan dalam menyelesaikan skripsi ini.
7. Mmmbeem (Editha Renesteen) yang telah memberikan semangat, dukungan, doa, saran, dan bantuan, serta senantiasa menemani penulis dengan sabar dalam suka dan duka dalam menyelesaikan skripsi ini.
8. Rindo, Radit, Yuhendi, M Haqqi, Sepoy, Kucel, Yose, Eko P, yang telah memberikan doa, dukungan dan semangat kepada penulis.
9. Sahabat-sahabatku dan teman-teman farmasi 2005 serta rekan satu tim di laboratorium penelitian (Rezi, Anne, kak Shelly) atas bantuan dan dukungan yang diberikan selama penelitian.
10. Semua pihak, yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, yang telah membantu dalam proses penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis juga menyadari adanya kekurangan yang terdapat pada skripsi ini, tetapi penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya di bidang farmasi.

Penulis

2010

ABSTRAK

Suatu obat dapat menggeser obat-obat lain dari ikatannya dengan protein plasma, sehingga menyebabkan kenaikan respon farmakologi secara tiba-tiba karena adanya kenaikan konsentrasi obat bebas. Pergeseran obat sangat penting ketika senyawa tersebut berikatan kuat dengan protein, misalnya perubahan ikatan dari 98% menjadi 94% dapat meningkatkan fraksi obat bebas menjadi tiga kali lipat, dari 2% menjadi 6%. Mengetahui adanya interaksi antara asam mefenamat dan piroksikam dalam berikatan dengan protein plasma, dalam hal ini albumin manusia, sangatlah penting, untuk memvisualisasikan interaksi antara kedua obat tersebut dalam berikatan dengan albumin dimana telah terbukti secara *in vitro*. Metode *in silico* menggunakan teknik penambatan molekuler menggunakan program AutoDock 4.0 menghasilkan visualisasi pengikatan yang terjadi antara asam mefenamat dengan albumin, dan juga piroksikam dengan albumin, dan juga menghasilkan nilai energi pengikatan (ΔG) dan konstanta inhibisi (K_i) dari masing-masing pengikatan. Hasil penambatan menunjukkan bahwa nilai (ΔG) dan K_i asam mefenamat dan piroksikam secara berturut-turut adalah -5,47 kkal/mol, 98,59 μM dan -7,46 kkal/mol, 3,42 μM . Kesimpulan yang diperoleh bahwa ikatan asam mefenamat dengan albumin dapat digantikan oleh piroksikam karena nilai (ΔG) dan K_i asam mefenamat lebih tinggi dari piroksikam. Ini dapat diperkirakan bahwa interaksi akan meningkatkan konsentrasi asam mefenamat yang bebas pada plasma darah dan menyebabkan efek toksik.

Kata kunci: albumin, asam mefenamat, piroksikam, penambatan molekuler
x + 62 halaman, gambar, tabel, lampiran

Bibliografi: 22 (1995 – 2009)

ABSTRACT

Drug can shift another drugs from his bond with protein, then it increases farmacology activity by increasing free drug concentration in plasma. Drugs shifting is important when its bonds fraction with protein is high, for example protein binding change from 98% to 94% can increase fraction of free dugs triple fold, from 2% to 6%. Knowing about an interaction between mefenamic acid and piroxicam to bind plasma protein, albumin, is very important , to visualize the interactions between both of drugs to bind with albumin those are proven by *in vitro* method. *In silico* method using molecular docking technique by AutoDock 4.0 poduce the visualization of bods those are occurred between mefenamic acid and albumin, and piroxicam as well, and also calculate binding energy (ΔG) and inhibition constant (K_i) of each bonding. The result show ΔG and K_i binding of albumin with mefenamic acid and piroxicam are -5,47 kcal/mol, 98,59 μM and -7,46 kcal/mol, 3,42 μM respectively. The conclusion is mefenamic acid could be replaced from its binding with albumin by piroxicam because of its higher value of ΔG and K_i than piroxicam. It could be predicted that interaction will increase concentration of free mefenamic acid in blood plasma and causes toxic effect.

Key words: albumin, mefenamic acid, piroxicame, molecular docking
x + 62 pages, pictures, tables, appendices

Bibliography: 22 (1995 – 2009)

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
ABSTRAK	iii
ABSTRACT	iv
DAFTAR ISI	v
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. LATAR BELAKANG	1
B. TUJUAN PENELITIAN	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
A. ALBUMIN	5
B. KARAKTERISTIK LIGAN	6
C. DATABASE	9
D. CLUSTALW	11
E. CCP4	11
F. VEGA ZZ	12
G. PyMOL	13
H. CYGWIN	14
I. PENAMBATAN MOLECULAR (MOLECULAR DOCKING)	15
J. AUTODOCK	17
BAB III. ALAT, BAHAN, DAN CARA KERJA	20
A. ALAT	20
B. BAHAN	20

C. CARA KERJA	20
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
A. HASIL	27
B. PEMBAHASAN	29
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	37
A. KESIMPULAN	37
B. SARAN	37
DAFTAR ACUAN	38
GAMBAR	40
TABEL	49
LAMPIRAN	52

DAFTAR GAMBAR

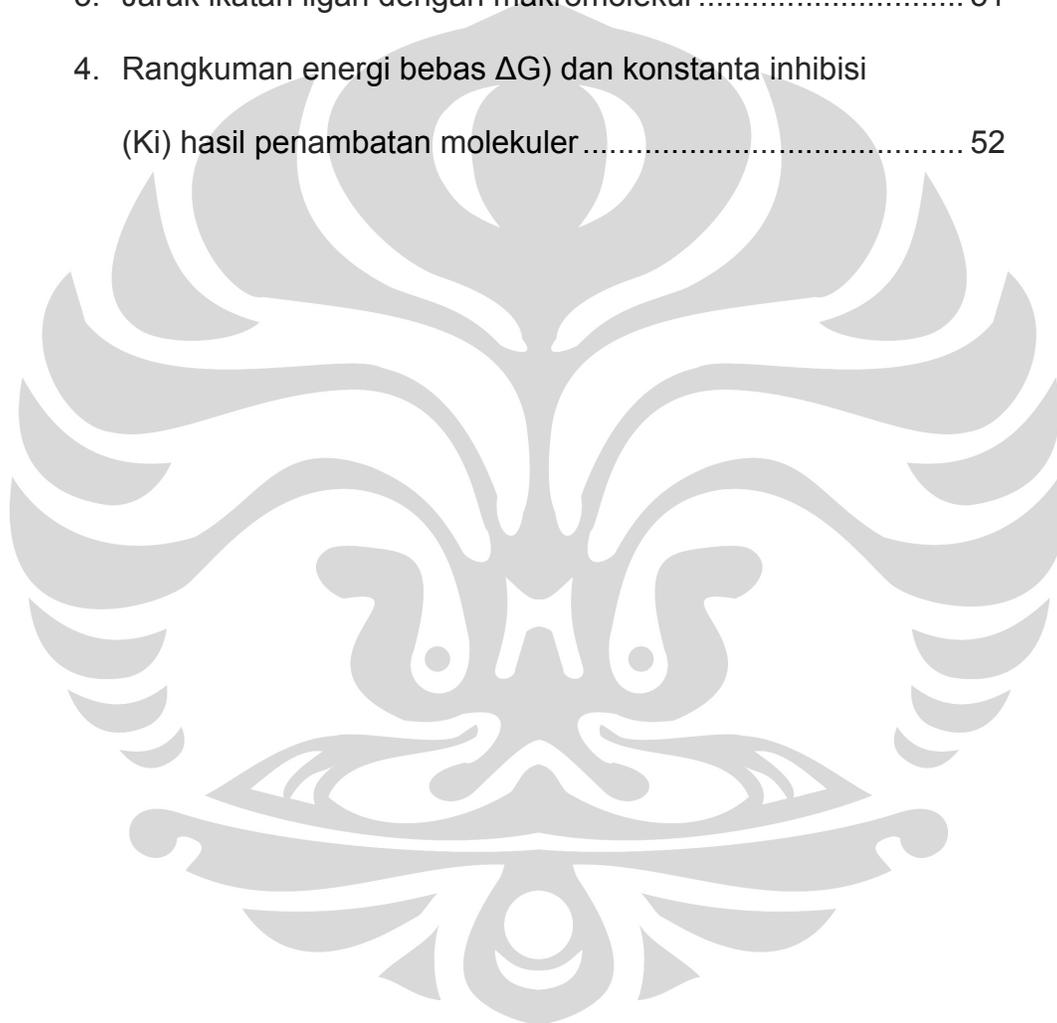
Gambar	Halaman
1. Struktur tiga dimensi albumin	40
2. Struktur 3D albumin 1E78 <i>chain A</i>	41
3. Struktur asam mefenamat	42
4. Struktur piroksikam.....	42
5. Hasil <i>docking</i> asam mefenamat terhadap struktur krista2 1E78 <i>chain A</i> dengan nilai <i>Number of GA Runs</i> 100 dan <i>Maximum Number of Energy Evaluation</i> 25 M (25 000 000).....	43
6. Ikatan hasil <i>docking</i> piroksikam terhadap struktur kristal 1E78_ <i>chain A</i> dengan nilai <i>Number of GA Runs</i> 100 dan <i>Maximum Number of Energy Evaluation</i> 25 M (25 000 000).....	44
7. Hasil <i>docking</i> piroksikam terhadap struktur kristal 1E78 <i>chain A</i> dengan nilai <i>Number of GA Runs</i> 100 dan <i>Maximum Number of Energy Evaluation</i> 25 M (25 000 000).....	45
8. Ikatan hasil <i>docking</i> piroksikam terhadap struktur kristal 1E78 <i>chain A</i> dengan nilai <i>Number of GA Runs</i> 100 dan <i>Maximum Number of Energy Evaluation</i> 25 M (25 000 000).....	46

9. Hasil <i>superpose</i> kompleks asam mefenamat-albumin dengan piroksikam-albumin.....	47
10. Ikatan hasil <i>superpose</i> kompleks asam mefenamat-albumin dengan piroksikam-albumin.....	48



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Rangkuman <i>Superpose</i> struktur 3D albumin.....	49
2. Hasil penambatan molekuler	50
3. Jarak ikatan ligan dengan makromolekul	51
4. Rangkuman energi bebas ΔG) dan konstanta inhibisi (K_i) hasil penambatan molekuler	52



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sekuens Asam Amino 1E78 <i>chain A</i>	53
2. Skema Kerja	54
3. Tampilan berkas <i>Protein Data Bank</i>	55
4. Tampilan program CCP4-Superpose.....	56
5. Tampilan program VegaZZ	57
6. Tampilan program PyMOL.....	58
7. Perintah Cygwin.....	59
8. Tampilan program cygwin.....	59
9. Tampilan program AutoDock	60
10. Tampilan berkas .dlg kompleks albumin-asam mefenamat ..	61
11. Tampilan berkas .dlg kompleks albumin-piroksikam.....	62

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Telah diketahui bahwa aktivitas farmakologi obat bergantung dari konsentrasinya di reseptor, yang secara langsung berhubungan dengan konsentrasi obat bebas dalam plasma. Perubahan fraksi obat bebas dalam plasma, salah satunya akibat dari interaksi dengan obat lain, dapat terdeteksi secara *in vitro* dengan berbagai metode penentuan ikatan protein. Dalam berbagai kondisi klinik, pengukuran konsentrasi obat total tidak memberikan informasi yang dibutuhkan mengenai fraksi obat bebas dalam plasma yang tersedia untuk distribusi, eliminasi dan aksi farmakodinamik. Jadi pengukuran yang akurat terhadap konsentrasi obat bebas dalam plasma sangat penting dalam pengawasan klinik. Konsentrasi obat bebas di dalam plasma dipengaruhi oleh perubahan ikatan obat-protein. Ikatan protein plasma dengan obat mempunyai efek yang bermakna pada farmakokinetik dan farmakodinamik klinik, dimana karakteristik ini digambarkan oleh parameter ikatan obat-protein yang meliputi jumlah jenis tempat ikatan, jumlah tempat ikatan, dan afinitas atau kekuatan ikatan obat-protein.(1)

Suatu obat dapat menggeser obat lain dari ikatannya dengan protein plasma sehingga menyebabkan kenaikan respon farmakologik

secara tiba-tiba karena adanya kenaikan konsentrasi obat bebas. Pergeseran obat sangat penting ketika senyawa tersebut terikat kuat dengan protein, misalnya perubahan ikatan dari 98% menjadi 94% bisa meningkatkan fraksi obat bebas menjadi tiga kali lipat, yaitu dari 2% menjadi 6%. Sedangkan untuk obat yang terikat pada protein plasma dalam jumlah kecil akan mengalami pendesakan dari ikatannya dengan protein dan hanya menyebabkan kenaikan aktivitas farmakologiknya tidak bermakna secara klinis.(1)

Penelitian yang memberikan informasi tentang adanya interaksi antara dua obat dalam berikatan dengan protein plasma sangat penting untuk dilakukan. Banyak metode yang tersedia untuk menentukan jumlah obat yang terikat pada protein plasma, tetapi dalam evaluasi klinik dari terapi obat, dialisis kesetimbangan dan ultrafiltrasi adalah metode yang paling sering digunakan. Kedua metode tersebut telah terbukti dapat dipercaya secara percobaan dan hasilnya cukup untuk memberikan data tentang ikatan protein.(1)

Obat yang digunakan dalam penelitian ini adalah asam mefenamat dan piroksikam. Piroksikam adalah salah satu obat antiinflamasi non steroid dan asam mefenamat adalah salah satu obat analgesik yang digunakan secara luas oleh masyarakat. Kedua obat bersifat asam lemah, sehingga mempunyai afinitas yang besar untuk berikatan dengan albumin. Penggunaan obat analgesik-antiinflamasi non

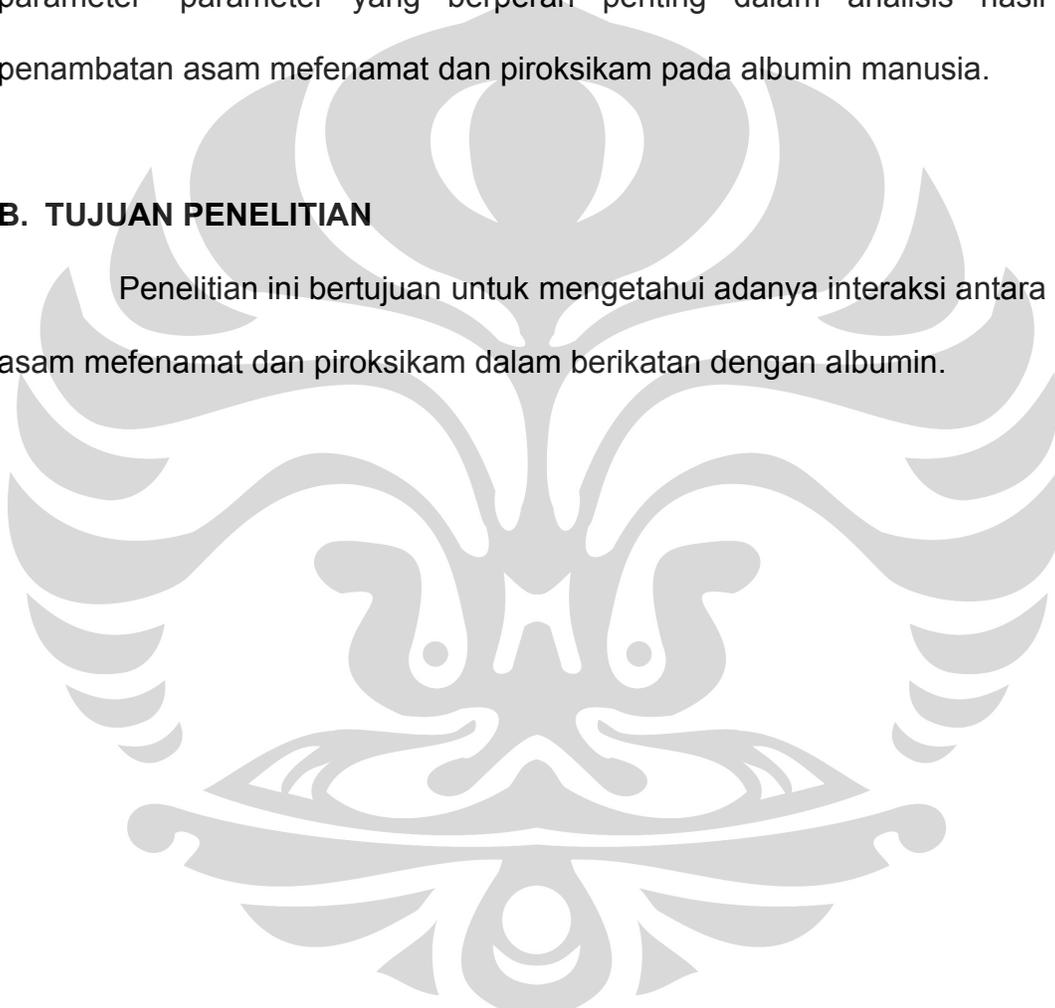
steroid (AINS) secara bersamaan untuk mengatasi nyeri pada penyakit reumatik, memungkinkan terjadinya interaksi antara kedua obat tersebut yang terutama terjadi di dalam plasma, yaitu berhubungan dengan kedua obat tersebut, yaitu berhubungan dengan ikatannya pada albumin. Penelitian yang mengamati interaksi antara kedua obat berguna untuk pengembangan kedua obat tersebut dan informasi bagi praktisi kesehatan mengenai keamanan penggunaan kedua obat pada pasien.(1)

Telah dilakukan penelitian secara *in vitro* untuk melihat adanya interaksi yang terjadi antara asam mefenamat dan piroksikam dalam berikatan dengan albumin jika diberikan secara bersamaan. Dari penelitian tersebut didapatkan hasil persentase ikatan obat dengan protein, dimana persentase asam mefenamat yang terikat albumin adalah 98,53 % dengan nilai konstanta asosiasi sebesar $1,24 \times 10^5$ liter/mol, sedangkan persentase piroksikam yang terikat albumin adalah 95,06 % dengan konstanta asosiasi $4,36 \times 10^4$ liter/mol. Ketika asam mefenamat dan piroksikam diberikan secara bersamaan, maka terjadi interaksi antara kedua obat tersebut dalam berikatan dengan albumin, dimana persentase piroksikam yang terikat albumin meningkat dari 95,06 % menjadi 96,71 % sedangkan persentase asam mefenamat yang terikat albumin menurun dari 98,53 % menjadi 95,39 %. Namun mekanisme interaksi yang terjadi belum dapat dijelaskan.(1)

Oleh karena itu, penelitian secara *in silico* untuk melihat adanya interaksi antara asam mefenamat dan piroksikam dalam berikatan dengan albumin perlu dilakukan. Percobaan *in silico* dengan metode penambatan molekuler dilakukan dengan program Autodock 4.0 akan menghasilkan parameter- parameter yang berperan penting dalam analisis hasil penambatan asam mefenamat dan piroksikam pada albumin manusia.

B. TUJUAN PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya interaksi antara asam mefenamat dan piroksikam dalam berikatan dengan albumin.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. ALBUMIN

Komponen utama protein plasma yang bertanggung jawab terhadap ikatan obat adalah albumin. Protein lain seperti globulin yang dapat berikatan dengan obat-obat hanya merupakan bagian terkecil dari keseluruhan ikatan protein plasma. Albumin adalah protein dengan berat molekul 69.000 dan disintesis oleh hati. Dalam tubuh albumin didistribusikan secara vaskular dalam plasma dan secara ekstrvaskular dalam kulit, otot dan beberapa jaringan lain. Waktu paruh eliminasi albumin adalah 17 – 18 hari. Secara normal kadar albumin dalam kompartemen plasma dipertahankan pada kadar yang relatif konstan kira-kira 3,5 – 4,5% (b/v). Obat-obat asam lemah seperti salisilat, fenilbutazon dan penisilina terikat kuat oleh albumin. Kekuatan ikatan obat dengan albumin berbeda untuk masing-masing obat. Obat-obat basa lemah seperti propanolol dan lidokaina juga berikatan, khususnya dengan α_1 -glikoprotein dan lipoprotein.(2)

Albumin mempunyai sedikitnya dua situs pengikatan yg dikenal dengan Sudlow site I dikenal sebagai situs pengikatan warfarin dan terletak pada subdomain IIA, dan Sudlow site II, dikenal sebagai situs pengikatan benzodiazepin dan terletak pada subdomain IIIA (3). Albumin

kadangkala dapat difungsikan pada beberapa kasus klinik. Pada aplikasinya, biasanya albumin digunakan sebagai pembawa (*carrier*) untuk mengantar beberapa jenis obat untuk mencapai target dari obat tersebut (4)

Untuk strukturnya dapat dilihat pada gambar 1 dan 2. Sekuens utama dari albumin menunjukkan bahwa proteinnya merupakan polipeptida tunggal dengan 585 residu asam amino (lampiran 1) yang terdiri dari 17 pasang jembatan disulfida dan satu sistein bebas. Struktur dari albumin itu sendiri terdiri dari tiga domain, yaitu domain I (residu 1 – 195), domain II (residu 196 – 283), dan domain III (residu 284 – 585) (lampiran 1). Masing-masing daerah tersusun atas subdomain a dan b, yg tersusun atas 6 dan empat α -heliks, dimana subdomain a tersusun atas 4 α -heliks ($a-h_1 - a-h_2$) dan dua α -heliks pendek ($a-h_5 - a-h_6$), dan subdomain b tersusun atas empat α -heliks ($b-h_1 - b-h_4$) (4)

B. KARAKTERISTIK LIGAN

Ligan yang digunakan pada penambatan molekuler memenuhi persyaratan *Lipinski'serum Rule*, 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 (atom oksigen atau nitrogen dengan satu atau lebih atom hidrogen)

4. Bilangan akseptor ikatan hidrogen kurang dari 10 (atom oksigen atau atom nitrogen)
5. Bilangan *rotatable bond* kurang dari 10

1. Asam Mefenamat

Struktur asam mefenamat dapat dilihat pada gambar 3. Senyawa ini umumnya digunakan sebagai analgesik, sebagai antiinflamasi asam mefenamat kurang efektif dibandingkan aspirin. Asam mefenamat terikat sangat kuat pada protein plasma, yaitu 98,53% (1). Dengan demikian interaksi terhadap obat antikoagulan harus diperhatikan. Efek samping terhadap saluran cerna sering timbul misalnya dispepsia dan gejala iritasi lain terhadap mukosa lambung. Pada orang usia lanjut efek samping diare hebat lebih sering dilaporkan. Efek samping lain yang berdasarkan hipersensitivitas adalah eritem kulit dan bronkokonstriksi. Anemia hemolitik pernah dilaporkan. Dosis asam mefenamat adalah 2 – 3 kali 250 – 500 mg sehari. karena efek toksiknya maka obat ini tidak dianjurkan untuk diberikan kepada anak dibawah 14 tahun dan wanita hamil, dan pemberian tidak melebihi 7 hari (6).

Asam mefenamat bekerja sebagai inhibitor kompetitif dari siklooksigenase 2 (COX-2), dimana COX-2 merupakan kontributor utama pada efek farmakologi golongan Anti Inflamasi Nonsteroid (AINS) (7).

2. Piroksikam

Struktur piroksikam dapat dilihat pada gambar 4. Obat ini merupakan salah satu AINS dengan struktur baru yaitu oksikam. Waktu paruh dalam plasma lebih dari 45 jam sehingga dapat diberikan hanya sekali sehari (6,8). Absorpsi berlangsung cepat di lambung, terikat 95,06% pada protein plasma.(1) Obat ini menjalani siklus enterohepatik. Kadar taraf mantap dicapai sekitar 7 – 10 hari dan kadar dalam plasma kira-kira sama dengan kadar di cairan sinovia (6).

Frekuensi kejadian efek samping dengan piroksikam mencapai 11 – 46%, dan 4 – 12% dari jumlah penderita terpaksa menghentikan obat ini. Efek samping tersering adalah gangguan saluran cerna, antara lain yang berat adalah tukak lambung. Efek samping adalah pusing, tinitus, nyeri kepala dan eritem kulit. Piroksikam tidak dianjurkan diberikan pada wanita hamil, penderita tukak lambung dan penderita yang sedang minum antikoagulan. Indikasi piroksikam hanya untuk penyakit inflamasi sendi misalnya arthritis reumatoid, osteoarthritis, spondilitis ankilosa dengan dosis 10 – 20 mg sehari (6,8). Respon yang memuaskan dari piroksikam bisa didapatkan dengan konsentrasi plasma yang lebih tinggi dari 5 – 6 µg/ml (8).

Piroksikam bekerja sebagai inhibitor kompetitif dari siklooksigenase 2 (COX-2), dimana COX-2 merupakan kontributor utama pada efek farmakologi golongan Anti Inflamasi Nonsteroid (AINS) (9).

C. DATABASE

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 (5).

1. Protein Data Bank

Protein Data Bank (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb>) merupakan tempat penyimpanan tunggal mengenai data struktur makromolekuler dari seluruh dunia (11). 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 Magnet Resonance) dan *cryo-electron microscopy* (12). Struktur yang

ada berasal dari penelitian perseorangan maupun organisasi *database* negara-negara di seluruh dunia. 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 nomor identitas yang terdiri dari empat karakter kombinasi huruf dan angka. PDB didirikan oleh *Brookhaven International Laboratories* pada tahun 1971. Data struktur tiga dimensi yang terdapat dalam PDB terus bertambah, mulai dari 7 struktur pada tahun 1971 hingga lebih dari 18,800 molekul pada Oktober 2002 (13). Pada 1998, PDB dikelola oleh Research Collaboratory for Structure Bioinformatics (RSCB) (12). Tampilan Protein Data Bank diberikan pada lampiran 3.

2. Pubchem (14)

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*.

D. CLUSTALW

ClustalW adalah suatu program *multiple sequence alignment* (15) yang digunakan untuk melakukan *alignment* (penyejajaran) sekuens. *Multiple sequence alignment* merupakan suatu metode dalam komputisasi biologi yang dilakukan untuk memperoleh gambaran mengenai bagian-bagian homolog antara protein-protein yang berada dalam satu famili (15) dan untuk mengetahui residu-residu fungsional yang dapat menjelaskan sejarah evolusi dari famili-famili pada protein (16). Alignment pada ClustalW didasari pada sistem perhitungan yang rumit dengan adanya penyesuaian parameter terhadap karakter sekuens yang diproses, seperti panjang sekuens, divergensi, dan lain-lain (16).

E. CCP4 (17)

CCP4 (*Collaborative Computational Project No. 4*) adalah *software* untuk makromolekul hasil kristalografi sinar X. 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 didapatkan dari berbagai sumber yang luas, namun dihubungkan dengan format berkas data standar. Program yang akan 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 Progame*. Tampilan program CCP4 diberikan pada lampiran 4.

F. VEGA ZZ (18)

VegaZZ merupakan perkembangan baru dari VegaZZ OpenGL. Program ini dapat digunakan untuk membuat molekul kecil, minimisasi

energi (*singlepoint, steepest descent, trust, conjugate gradiens, quasi-Newton, truncated Newton, genetic algoritm, 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 perubahan 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. Tampilan program VegaZZ diberikan pada lampiran 5.

G. PyMOL (19)

PyMOL adalah suatu *free and opensource* 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 oleh MOE (Molecular Operating Environment). Tampilan program PyMOL diberikan pada lampiran 6.

H. CYGWIN (20)

Cygwin merupakan sistem operasi mirip Linux yang dapat digunakan pada Windows, dikembangkan dengan sistem operasi GNU (GNU's NOT UNIX). Cygwin terdiri dari dua kompartemen yaitu sebuah DLL (Dynamic-link library) (*cygwin.dll*) yang berperan sebagai emulasi Linu 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 (lampiran 6) untuk menjalankan program Autodock. Tampilan program *cygwin* diberikan pada lampiran 8.

I. PENAMBATAN MOLEKULER (*MOLECULAR DOCKING*) (19)

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 serta untuk mengkalkulasikan nilai suatu kompleks $[E + I] = [EI]$ protein-ligan (*scoring function*), yang dikenal sebagai energi bebas ikatan (*free energy of binding*)(21). 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 berajat 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 dipahami 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*)(21).

Program penambatan menerapkan fungsi energi empiris untuk menentukan dan mengoptimalkan energi interaksi di antara 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 di antara ikatan yang berurutan), serta apakah ikatan tersebut dapat berotasi (*rotatable bond*) atau tidak. 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*.(21)

Blid docking merupakan proses penambatan yang ditujukan pada seluruh bagian makromolekul, dimana ukuran kotak grid disesuaikan

dengan ukuran makromolekul tersebut, yang dimaksudkan agar kotak grid tersebut dapat menutup seluruh permukaan makromolekul, sehingga target penambatan terletak pada seluruh bagian dari makromolekul tersebut. Teknik ini digunakan jika belum diketahuinya bagian sisi aktif dari makromolekul target penambatan. Selain itu, *blind docking* juga dapat digunakan sebagai pembanding hasil proses penambatan.

J. AUTODOCK (22)

Saat ini banyak terdapat pemrograman yang digunakan untuk penambatan molekuler. *Software* yang banyak digunakan saat ini adalah Dock, FlexX, dan AutoDock. Di antara ketiga program tersebut, AutoDock adalah program 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 pengalkulasi dari grid tersebut. Pada model grid, molekul diposisikan dalam suatu kotak grid. 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. 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.

AutoDock menggunakan model kinematik untuk ligan yang dapat berotasi. Ligan memulai proses pencarian secara acak di luar 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 method*). 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. Tampilan program AutoDock diberikan pada lampiran 9.



BAB III

ALAT, BAHAN, DAN CARA KERJA

A. ALAT

Komputer dengan spesifikasi memori RAM minimal satu gigabyte dan dilengkapi perangkat lunak PyMol, VegaZZ, CCP4, Cygwin, dan AutoDock.

B. BAHAN

1. Struktur tiga dimensi dari albumin manusia yang diunduh dari PDB dengan identitas PDB 1ao6, 1bm0, 1e78
2. Struktur tiga dimensi dari asam mefenamat yang diunduh dari pubchem.
3. Struktur tiga dimensi dari piroksikam yang diunduh dari pubchem.

C. CARA KERJA

1. Pemisahan *Chain* Struktur Kristal 1AO6, 1BM0, dan 1E78

Struktur kristal albumin terdiri dari dua *chain*, yaitu A dan B. Untuk proses *docking*, maka digunakan salah satu dari *chain* tersebut. Untuk memisahkan *chain* pada struktur kristal albumin, maka digunakan program PyMOL, sehingga diperoleh struktur kristal

1AO6 *chain* A dan B, 1BM0 *chain* A dan B, serta 1E78 *chain* A dan B.

2. **Superpose Struktur Kristal 1AO6, 1BM0, dan 1E78**

Berdasar pada telaah *virtual screening*, struktur kristal yang digunakan dari 1E78 adalah *chain* A. Struktur 1E78 *chain* A yang diperoleh, dari CCP4 dilakukan *superpose* dengan struktur kristal 1E78 *chain* B, 1AO6 *chain* A dan *chain* B, serta 1BM0 *chain* A dan *chain* B. *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 (asam mefenamat dan piroksikam) yang akan digunakan pada penambatan molekuler diminimisasi energinya dengan menggunakan program VegaZZ. Program ini menerima *input* berupa ligan dengan semua berkas. 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 dilakuakn 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.

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 meilih 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 dimensi dari 1E78 chain A. Kotak grid harus mampu menampung molekul ketika berotasi bebas, umumnya dua kali jarak atom terjauh ligan dan dapat mencakup area situs pengikatan dari makromolekul.

Teknik penambatan yang digunakan adalah *blind docking*, dimana penambatan ligan diorientasikan pada seluruh permukaan makromolekul target, dalam hal ini albumin. Berdasar pada ukuran dimensi dari albumin, maka digunakan ukuran kotak grid 160 x 160 x 60 poin, satu poin berukuran 0,500 Å (4). 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 (lampiran 7) pada *Cygwin*.

6. Pembuatan Berkas Parameter Penambatan

Berkas parameter penambatan menjelaskan kepada modul Autodock4 (lampiran 7) 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 dimodelkan 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 program Docking pada AutoDock Tools, membutuhkan *input* ligan dan makromolekul dengan berkas *.pdbqt* yang akan menghasilkan berkas *output* berupa *.dpf* (*docking parameter file*).

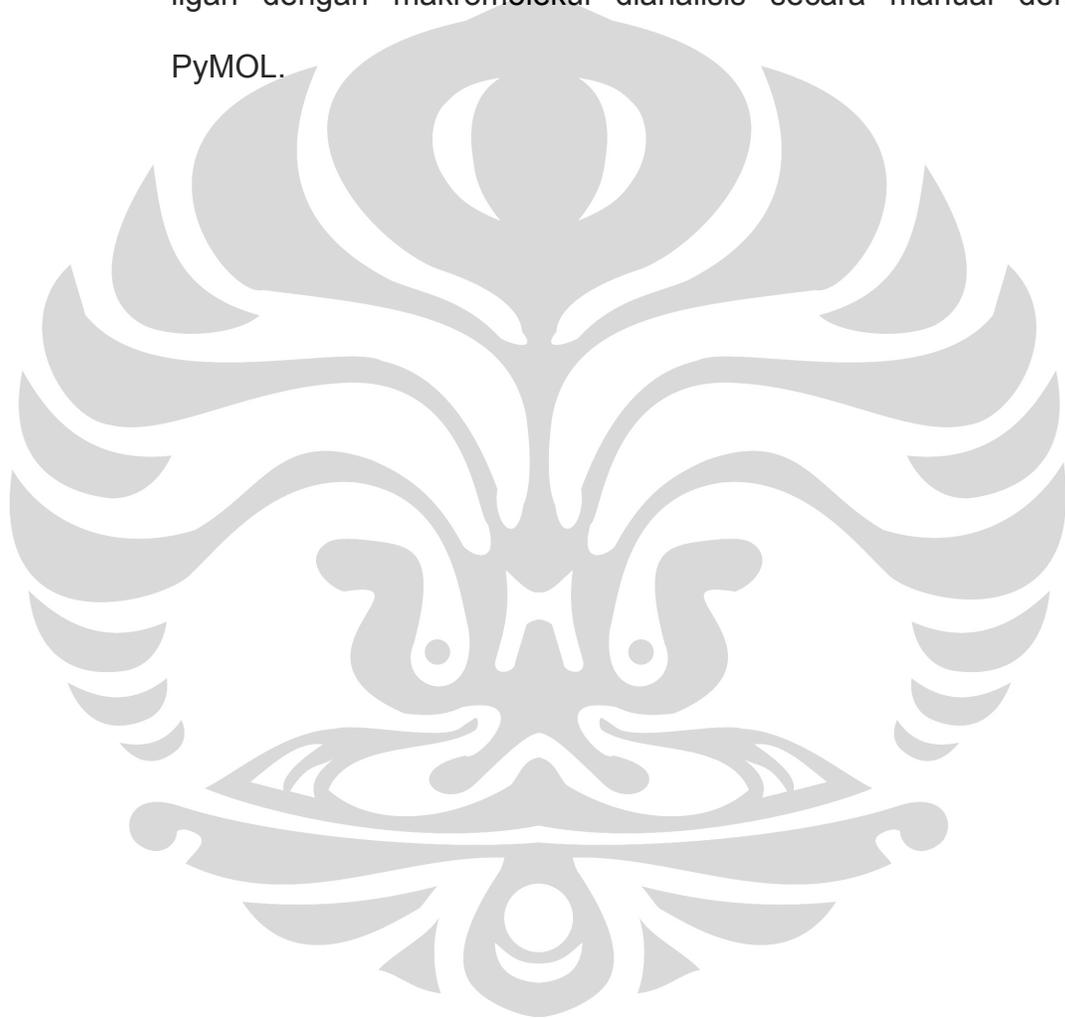
Parameter yang digunakan untuk membuat parameter *docking* adalah parameter *default* yang terdapat pada program Docking. Algoritma yang digunakan adalah LGA dengan nilai *Number of GA Runs* 100 dan *Maximum Number of Energy Evaluation* 25 M (25 000 000). Selanjutnya, berkas *.dpf* ini digunakan sebagai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

7. Analisis Hasil Penambatan

Hasil penambatan berupa berkas dengan ekstensi .dlg 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* (lampiran 10,11). 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* (lampiran 10,11). *Cluster-cluster* tersebut menunjukkan penyebaran data dari seratus konformasi hasil *docking*. Maka dikenal dengan adanya *cluster best dock* dan *cluster best cluster* (tabel 2). Hasil konvergen dihasilkan bila hanya terdapat *cluster best dock* (lampiran 11). Sedangkan hasil divergen dihasilkan bila *best dock* dan *best cluster* terdapat dalam *cluster* yang terpisah (lampiran 10).

Apabila dari masing-masing 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 secara visual dianalisis pada situs aktifnya menggunakan program visualisasi molekuler PyMOL. Ikatan hidrogen yang terjadi antara ligan dengan makromolekul dianalisis secara manual dengan PyMOL.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Pemisahan Struktur Kristal

Struktur kristal 1AO6, 1BM0, dan 1E78 memiliki dua subunit, A dan B. Program Edit PDB File dalam kumpulan program CCP4 memisahkan subunit A dengan subunit B pada masing-masing kristal. Hasilnya adalah struktur kristal 1AO6 *chain* A dan B, 1BM0 *chain* A dan B, serta 1E78 *chain* A dan B. Untuk penambatan, digunakan struktur kristal 1E78 *chain* A sebagai makromolekul target. Pemilihan ini didasarkan atas kesamaan struktur dari ketiga struktur albumin yang ada, dan dilakukan secara acak.

2. *Superpose* Struktur Kristal 1AO6, 1BM0, dan 1E78

Hasil *Superpose* dengan program *Superpose* pada kumpulan program CCP4 dari 1E78 *chain* A dan B memiliki nilai RMSD sebesar 0,566 Å (tabel 1). Nilai ini menjelaskan bahwa tidak terdapat perbedaan yang berarti pada kedua struktur tersebut (RMSD kurang dari 2 Å).

3. Penyusutan Energi (*Energy Minimization*) dan Pencarian Konformasi Terbaik Struktur Ligan

Program Vega ZZ menghasilkan konformasi terbaik dari asam mefenamat dan piroksikam dengan energi terendah. Konformasi terbaik dengan energi terendah sangatlah penting dalam proses penambatan molekuler untuk memperoleh hasil terbaik dari penambatan molekuler.

4. Pembuatan Berkas Ligan dan Makromolekul

AutoDock Tools menghasilkan ligan dan makromolekul dengan berkas *.pdbqt*. Ligan dan makromolekul yang dihasilkan ini siap digunakan sebagai *input* proses *docking*. Ini karena proses penambatan menggunakan AutoDock hanya dapat menerima *input* dengan berkas *.pdbqt* (22).

5. Pembuatan Berkas Parameter Grid

Ukuran kotak grid yang digunakan disesuaikan dengan ukuran albumin sebagai makromolekul, yaitu 160 x 160 x 60 (space 0,5 Å) dengan makromolekul sebagai pusat dari kotak grid (4). Tiap ligan memiliki masing-masing *map e* (elektrostatik) dan *map d* (desolvasi). Seluruh berkas *map* memiliki ekstensi *.map*. 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* elektostatik dan desolvasi (10).

6. Pembuatan Berkas Parameter Penambatan (*docking*)

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

7. Analisis Hasil Penambatan

Hasil penambatan molekuler terdapat dalam berkas .dlg. Penambatan asam mefenamat pada 1E78 *chain* A memberikan hasil divergen (lampiran 10). *Posing* dari asam mefenamat yang memiliki energi bebas terkecil *cluster best cluster* dan *cluster best dock* terdapat pada *cluster* yang berbeda (lampiran 10). Piroksikam memiliki hasil yang relatif konvergen pada 1E78 *chain* A, dimana *posing* dari piroksikam yang memberikan energi bebas terkecil *cluster best cluster* dan *cluster best dock* terdapat pada satu *cluster* (lampiran 11).

B. PEMBAHASAN

Albumin telah diketahui sebagai transport utama utama obat dan menjadi telaah ikatan dan interaksi obat dengan obat. Salah satu interaksi obat yang diperkirakan yang terjadi pada albumin adalah kompetisi antara

asam mefenamat dan piroksikam dalam berikatan dengan albumin menyebabkan peningkatan konsentrasi terapeutik asam mefenamat dalam darah (1). Suatu metode, *in silico*, penambatan molekuler, digunakan untuk menganalisis interaksi antara asam mefenamat dan piroksikam dalam berikatan dengan albumin 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 (22). 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 dan kualitas kecocokan geometri. Struktur ligan yang digunakan untuk telaah penambatan dioptimasi menggunakan *force field* SP4 pada *software* VegaZZ (18).

Struktur 3D yang digunakan pada studi ini adalah struktur kristal albumin serum manusia (PDB ID: 1E78, 1AO6, dan 1BM0) yang diunduh dari situs Protein Data Bank (PDB) (11,12). Dari ketiga struktur tersebut, 1E78 memiliki nilai resolusi kristalisasi sinar X terbesar (2,60 Å)

dibandingkan dua struktur kristal lainnya. Kristal 1BM0 dan 1AO6 memiliki nilai R yang sama, yaitu sebesar 2,50 Å. Makromolekul target mempengaruhi kualitas *posing* dan *scoring* dari hasil penambatan molekuler, sehingga pemilihan dan persiapan model struktur dari makromolekul target merupakan variable yang penting(10).

Hasil dari *superpose* 1E78, 1BM0 dan 1AO6 memberikan kesamaan struktur tiga dimensi (nilai RMSD kurang dari 2 Å), dimana 1E78 dan 1AO6 dengan nilai RMSD 0,839 Å, 1E78 dan 1BM0 dengan nilai RMSD 0,858 Å, dan 1AO6 dan 1E78 dengan nilai RMSD 0,241 Å (tabel 1). Karena albumin terdiri dari dua subunit, dilakukan *superpose* dari masing-masing subunit tersebut. Hasil dari *superpose* memberikan kesamaan struktur tiga dimensi, dimana pada 1AO6 dengan nilai RMSD 0,357 Å, 1BM0 dengan nilai RMSD 0,278 Å, dan 1E78 dengan nilai RMSD 0,566 Å (tabel 1).

Asam mefenamat merupakan senyawa yang memiliki 3 torsi aktif yang terdeteksi oleh AutoDock Tools, sedangkan piroksikam memiliki 2 torsi aktif. Banyaknya ikatan yang dapat berotasi pada suatu ligan menentukan fleksibilitas ligan (10). Fleksibilitas ligan berpengaruh besar terhadap prediksi konformasi yang tepat dibandingkan polaritas dan ukuran ligan, dimana fleksibilitas ligan berkaitan dengan *posing* dan hasil *docking*. Faktor tersebut menyebabkan adanya kesulitan untuk membedakan hasil pencarian konformasi, yaitu antara *posing* yang

kurang baik namun memiliki energi bebas (ΔG) yang kecil dengan hasil konformasi yang baik namun memiliki nilai energi bebas yang besar pada hasil penambatan yang divergen (lampiran 10)

Proses pembuatan berkas parameter grid disiapkan menggunakan program AutoDock Tools, dan diperoleh berkas dengan ekstensi .gpf sebagai output, yang kemudian dijalankan menggunakan program *cygwin* dengan perintah *autogrid4* (lampiran 7). Dari proses tersebut diperoleh berkas dengan ekstensi .glg, maps.fld, maps.xyz.

Pembuatan berkas parameter penambatan disiapkan menggunakan program AutoDock Tools, dan diperoleh berkas dengan ekstensi .dpf sebagai output, dimana terdapat parameter-parameter untuk *docking*, kemudian dijalankan menggunakan program *cygwin* dengan perintah *autodock4* (lampiran 7). Hasil dari proses ini adalah berkas dengan ekstensi .dlg, yang menyimpan semua data hasil penambatan. Dari berkas .dlg inilah dapat dilihat penyebaran cluster, ΔG , dan K_i yang digunakan untuk analisis hasil penambatan (lampiran 10,11, tabel 2,4).

Hasil konformasi terbaik dari asam mefenamat memiliki nilai ΔG dan konstanta inhibisi (K_i) pada struktur 1E78 *chain A* adalah -5,47 kkal/mol dan 98,59 μM . Sedangkan hasil konformasi terbaik dari piroksikam memiliki nilai ΔG -7,46 kkal/mol dan K_i sebesar 3,42 μM (tabel 4). Nilai ΔG menggambarkan interaksi antara ligan dan makromolekul, dimana semakin kecil nilai ΔG , maka energi yang dibutuhkan ligan untuk

menempati situs pengikatan lebih kecil menyebabkan interaksi yang terjadi akan semakin kecil, sehingga ligan tersebut relatif lebih nyaman berada di dalam makromolekul target. Sedangkan nilai K_i menggambarkan seberapa besar hambatan yang diberikan oleh makromolekul kepada ligan, dimana semakin kecil nilai K_i , maka semakin kecil hambatan yang diterima ligan dalam berikatan dengan makromolekul. Parameter ini dapat memberikan pengaruh kekuatan ikatan yang terjadi antara ligan dengan makromolekul, sehingga terlihat ada tidaknya interaksi yang terjadi antara ligan satu dengan ligan lainnya dalam berikatan dengan satu makromolekul yang sama.

Hasil penambatan memperlihatkan bahwa asam mefenamat terikat pada domain II yang merupakan binding site I, dimana asam mefenamat berikatan dengan asam amino arginin pada sekuens ke-218 (R_{218}) (gambar 5,6) dengan jarak ikatan 1,83 Å (tabel 3). Sedangkan piroksikam terikat pada domain I yang bukan merupakan binding site I ataupun II, dimana piroksikam berikatan dengan asam amino arginin pada sekuens ke-145 (R_{145}) (gambar 7,8) dengan jarak ikatan 1,91 Å (tabel 3). Ikatan yang terjadi merupakan ikatan hidrogen, dimana pada analisis ikatan hidrogen yang digunakan adalah ikatan hidrogen yang memiliki jarak kurang dari 4 Å (10). Hal ini menggambarkan bahwa antara asam mefenamat dan piroksikam tidaklah menempati daerah yang sama dalam berikatan dengan albumin, sehingga interaksi yang terjadi antara asam

mefenamat dan piroksikam bukan merupakan kompetisi dalam memperebutkan satu situs aktif yang sama. Perbedaan tempat ikatan antara asam mefenamat dan piroksikam disebabkan karena adanya perbedaan struktur yang jelas, dimana piroksikam memiliki gugus sulfon (SO_2) (gambar 4).

Hasil *superpose* antara asam mefenamat-albumin dan piroksikam-albumin, menunjukkan adanya interaksi antara asam mefenamat dan piroksikam dalam berikatan dengan albumin. Hal ini terlihat pada adanya satu sekuens asam amino yang berikatan relatif kuat pada kedua ligan tersebut, yaitu asam amino lisin pada sekuens ke 195 (K_{195}) (gambar 9,10). Interaksi ini memungkinkan adanya kompetisi antara asam mefenamat dan piroksikam dalam berikatan dengan albumin dimana ikatan asam mefenamat dengan albumin lebih dekat ($4,84 \text{ \AA}$) daripada piroksikam dengan albumin ($5,64 \text{ \AA}$) (tabel 3).

Penelitian secara *in vitro* menunjukkan bahwa jumlah asam mefenamat yang terikat albumin plasma manusia 98,53 % dan piroksikam 95,06 %. Asam mefenamat memiliki nilai konstanta asosiasi sebesar $1,24 \times 10^5$ liter/mol dalam berikatan dengan albumin, sedangkan piroksikam memiliki nilai konstanta asosiasi sebesar $4,36 \times 10^4$ liter/mol dalam berikatan dengan albumin. Faktor yang menyebabkan lebih banyaknya asam mefenamat dibandingkan piroksikam yang terikat albumin karena asam mefenamat memiliki tiga tempat ikatan primer dan tiga tempat

ikatan sekunder, sedangkan piroksikam hanya memiliki satu tempat ikatan primer dan tiga tempat ikatan sekunder. Ketika asam mefenamat dan piroksikam diberikan secara bersamaan untuk berikatan dengan albumin, terjadi interaksi antara kedua obat tersebut, dimana persentase piroksikam yang terikat albumin meningkat dari 95,06 % menjadi 96,71 % sedangkan persentase asam mefenamat yang terikat albumin menurun dari 98,53 % menjadi 95,399 %. Namun mekanisme interaksi yang terjadi belum dapat dijelaskan.(1)

Secara *in silico* pada penambatan molekuler asam mefenamat dengan makromolekul target 1E78 chain A, afinitas asam mefenamat terhadap albumin lebih lemah dibandingkan afinitas piroksikam, yang dibuktikan dari nilai energi pengikatan asam mefenamat lebih besar (-5,47 kkal/mol) dibandingkan dengan energi pengikatan piroksikam (-7,46 kkal/mol). Nilai konstanta inhibisi asam mefenamat terhadap 1E78 chain A (98,59 μ M) jauh lebih besar daripada piroksikam (3,42 μ M) (tabel 4). Hal ini memungkinkan adanya interaksi antara asam mefenamat dan piroksikam dalam berikatan dengan albumin. Sama halnya dengan penelitian secara *in vitro*, mekanisme interaksi yang terjadi belum dapat dijelaskan dalam penelitian ini.

Berdasar pada hasil penambatan molekuler, piroksikam memiliki afinitas yang lebih kuat dengan albumin dibandingkan dengan kompleks asam mefenamat-albumin. Selain itu, nilai K_i piroksikam lebih kecil

dibandingkan nilai K_i dari asam mefenamat. Kedua parameter itu dapat menunjukkan bahwa adanya kemungkinan piroksikam untuk dapat mengusir asam mefenamat dari ikatannya dengan albumin. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian secara *in vitro*, dan hal ini memungkinkan bahwa adanya interaksi antara asam mefenamat dan piroksikam dalam berikatan dengan albumin jika dilakukan pemberian secara bersamaan.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Penambatan molekuler asam mefenamat dan piroksikam pada albumin tidak menempati pada satu situs yang sama, dimana asam mefenamat terikat pada domain II albumin, dan piroksikam terikat pada domain I albumin. Namun terdapat beberapa interaksi yang terjadi antara keduanya, dimana nilai ΔG piroksikam lebih kecil daripada asam mefenamat, dan nilai K_i dari piroksikam jauh lebih kecil dari asam mefenamat, sehingga dimungkinkan adanya mekanisme pengusiran asam mefenamat oleh piroksikam dari albumin jika kedua obat ini diberikan secara bersamaan. Hal ini dapat meningkatkan kadar asam mefenamat bebas di dalam darah, sehingga dapat meningkatkan efek terapeutik dari asam mefenamat.

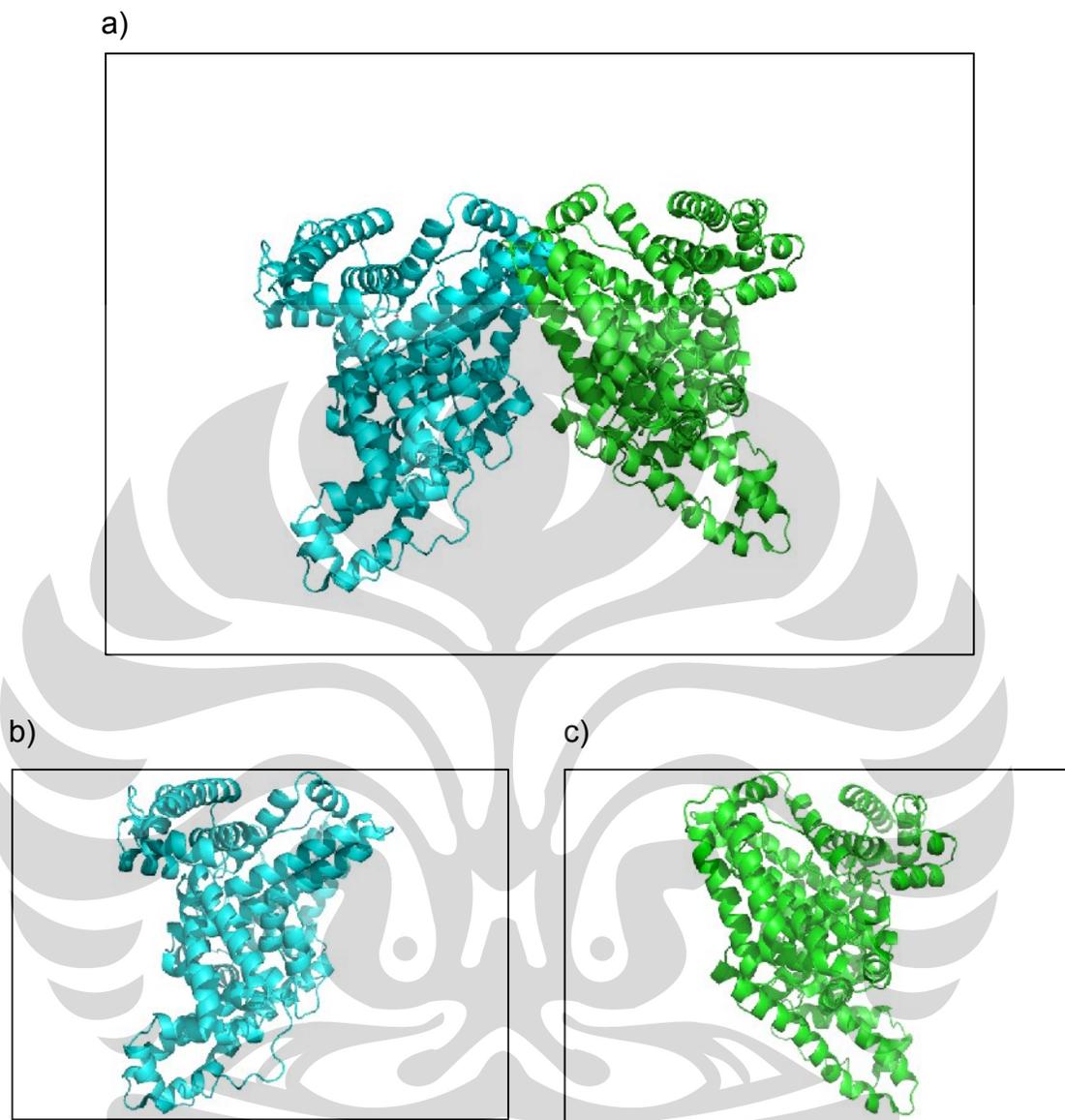
B. SARAN

1. Perlu dilanjutkan kembali dengan mengarahkan pada situs aktif pada albumin.
2. Waktu proses penambatan sebaiknya ditambah, mengingat beberapa hasil dari penambatan molekuler terdapat pada penyebaran yang divergen.

DAFTAR ACUAN

1. Djajadisastra, Joshita., dkk.. "Penentuan Nilai Parameter Ikatan Protein asam mefenamat dan piroksikam serta Kemungkinan Adanya Interaksi Kedua Obat Menggunakan Metode Dialisis Kesetimbangan". Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI. 2005
2. Shargel, Leon., Andrew B.C.YU.. "Biofarmasetika dan Farmakokinetika Terapan Edisi kedua". Surabaya: Penerbit Universitas Airlangga., 1988
3. Quantum pharmaceuticals. Binding Affinity Calculation of Known Drugs to Human Serum Albumin.2009
4. Sugio et al. Crystal Structure of Human Serum Albumin at 2.5 Å Resolution. 2009
5. Park H & Jeon YH. Toward the Virtual Screening of Cdc 25 Å phosphatase inhibitors with the homology modeled protein structure. *J. Mol. Mode.* 2008. **14**: 833 - 841
6. Ganiswarna, Sulistia G., dkk.. "Farmakologi dan Terapi Edisi 4. Jakarta: Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia., 1995
7. Prusakiewicz, Jeffery J., et al..Differential Sensitivity and Mechanism of Inhibition of COX-2 Oxygenation of Arachidonic Acid and 2-Arachidonoylglycerol by Ibuprofen and Mefenamic Acid. 2009
8. Maghsoudi, Hemmat., Behnam Askary.The Effect of Piroxicam on the Formation of Postoperative, Intraabdominal Adhesion in Rats. 2009
9. Souza, Carlos H. de M. Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: Clinical features,cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. 2009
10. Fitriana, Wahyu. Penambatan Molekuler Sitokrom P450 Isoform 2C9 dengan Fenitoin dan Simetidin. Skripsi Sarjana Farmasi. Depok: FMIPA UI. 2009: 35, 36, 41, 45.
11. Westbrook J., et al. "The Protein Data Bank: Unifying the Archive." *Nuc. Ac. Res.* 2002, Vol. 30, No. 1: 245-248.

12. Bourne, Phillip E., et al. "The Distribution and Query Systems of the RCSB Protein Data Bank." *Nuc. Ac. Res.* 2004, Vol. 32, Database Issue: D223-225.
13. Schwede T., Manuel Peitsch. *Computational Structural Biology: Methods and Applications*. Singapore: World Scientific Publishing, 2008.
14. Anonim. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> . 10 september 2009, pk. 12.50
15. Thompson, J. D., et al. "DbClustal: rapid and reliable global multiple alignments of protein sequences detected by database searches." *Nuc. Ac. Res.* 2000, Vol. 28, No. 15: 2919-2926.
16. Katoh, Kazutaka, et al. "MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform." *Nuc. Ac. Res.* 2002, Vol. 30, No. 14: 3059-3066.
17. Maiti, R., et al. "SuperPose: A Simple Server for Sophisticated Structural Superposition." *Nuc. Ac. Res.* 2004, Vol. 32: 590-594.
18. Anonim. VEGAZZ. 5 hlm. <http://www.ddl.unimi.it/vega/history.htm>
19. DeLano, W. L. PyMol User's Guide. Style Sheet. <http://pymol.sourceforge.net/newman/userman.pdf>
20. Anonim. CYGWIN. 1hlm. <http://www.cygwin.com/html>. 10 September 2009. Pk. 15.45
21. Kitchen DB, Decornez H, Furr JR & Bojorath J. Docking and Scoring Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Application. *Nature Review: Drug Discovery*. 2004. **3**: 936 - 949
22. Morris, G. M., et al. User Guide AutoDock: Automated Docking of Flexible Ligands to Receptors.

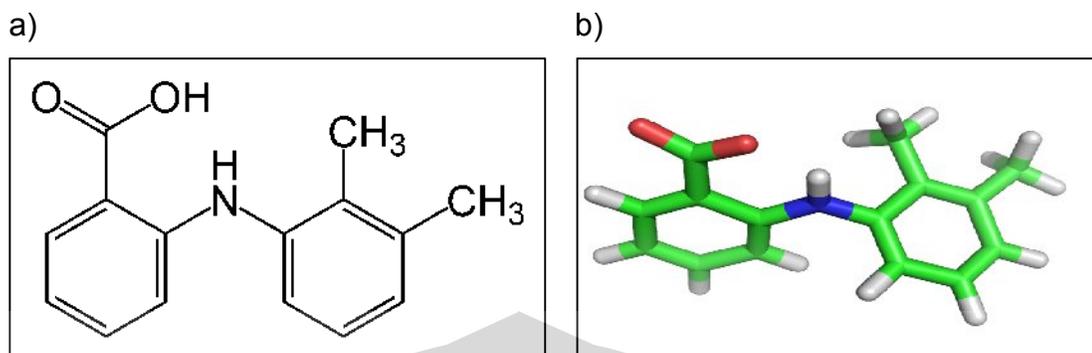


Gambar 1. a) Struktur tiga dimensi albumin

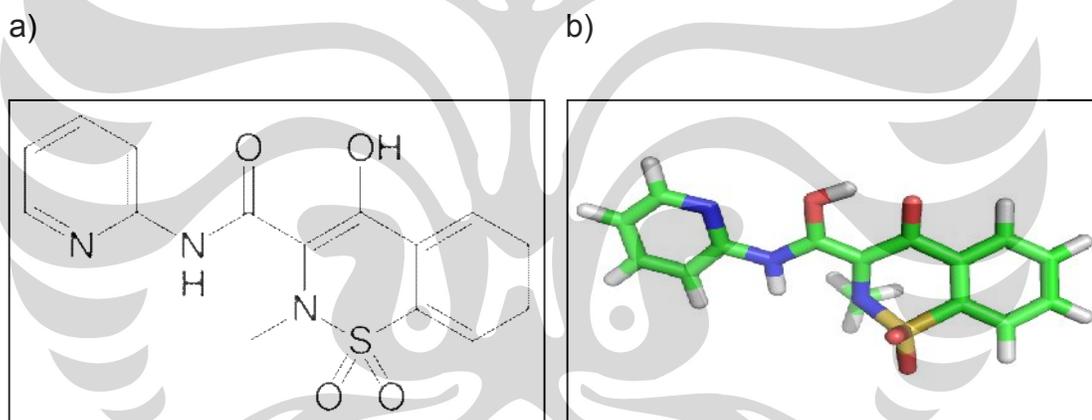
b) Subdomain A

c) Subdomain B

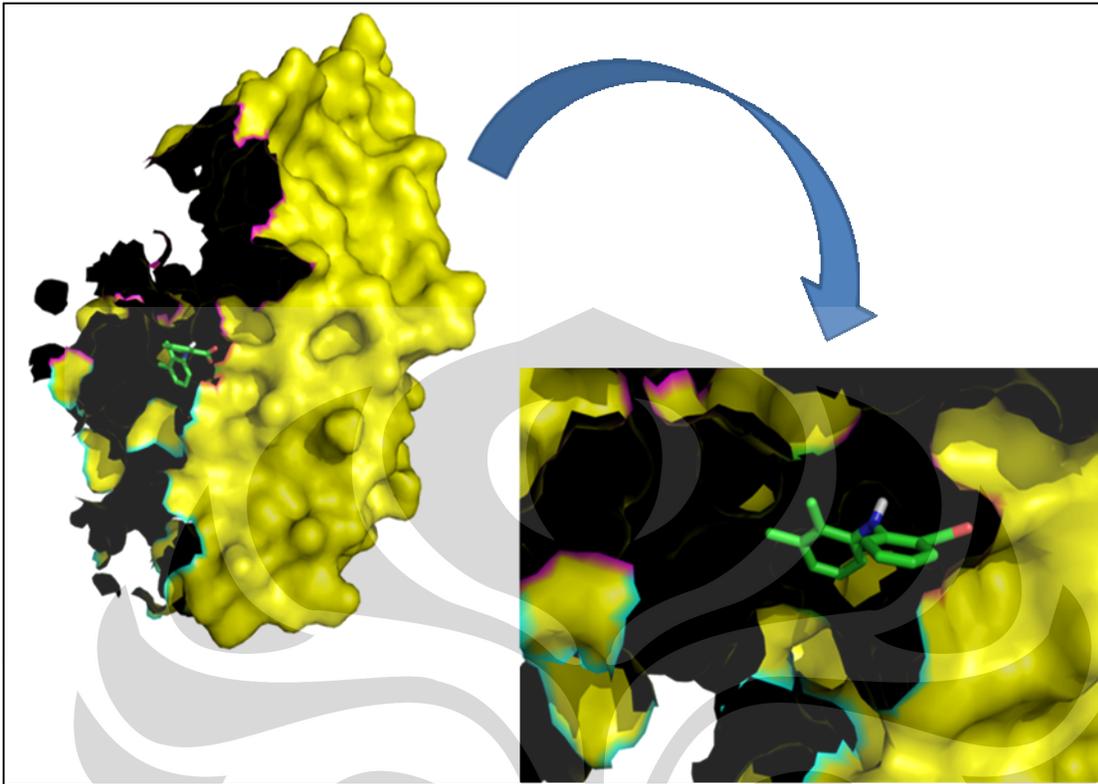




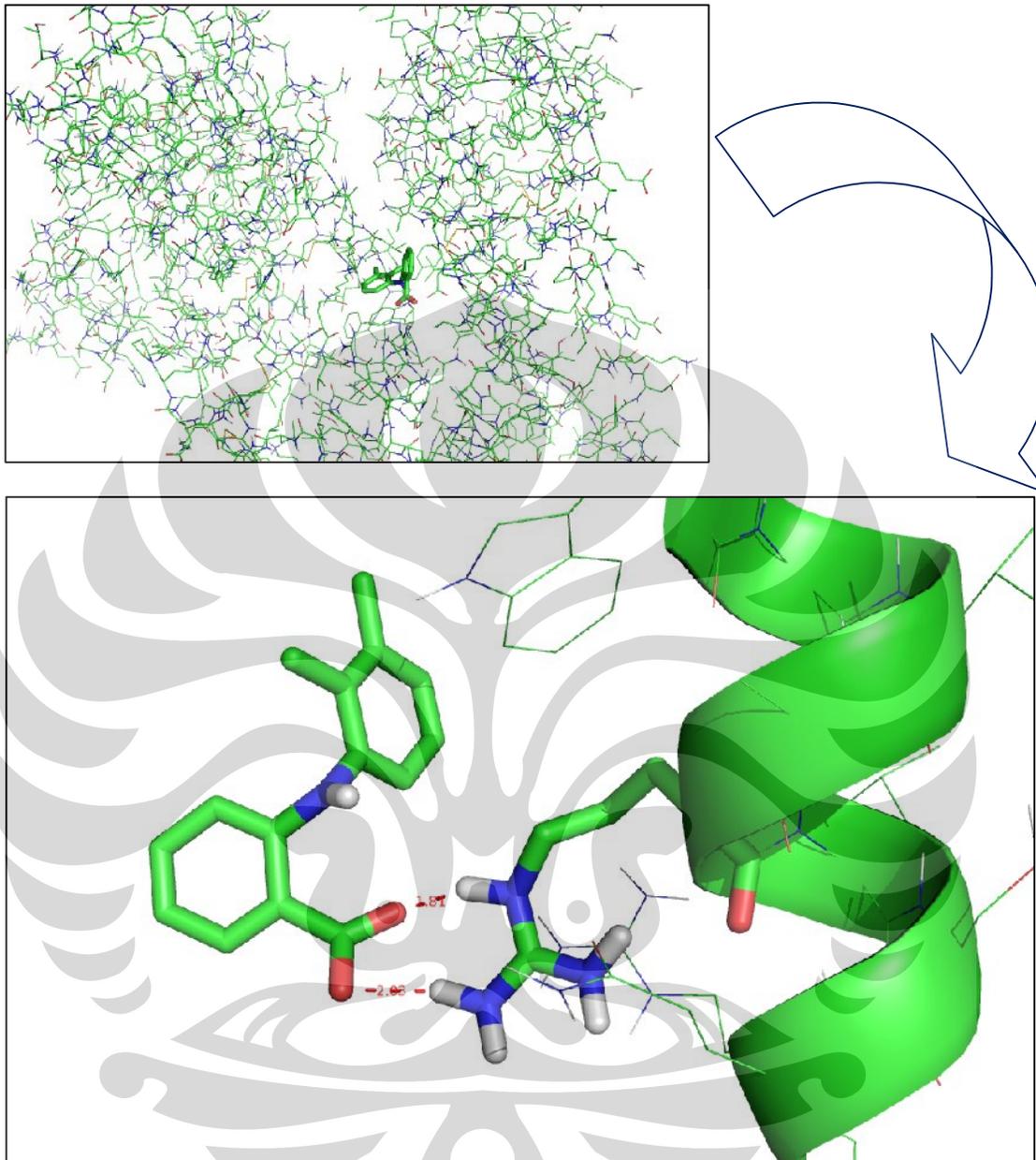
Gambar 2. a) Struktur dua dimensi asam mefenamat b) Struktur tiga dimensi asam mefenamat



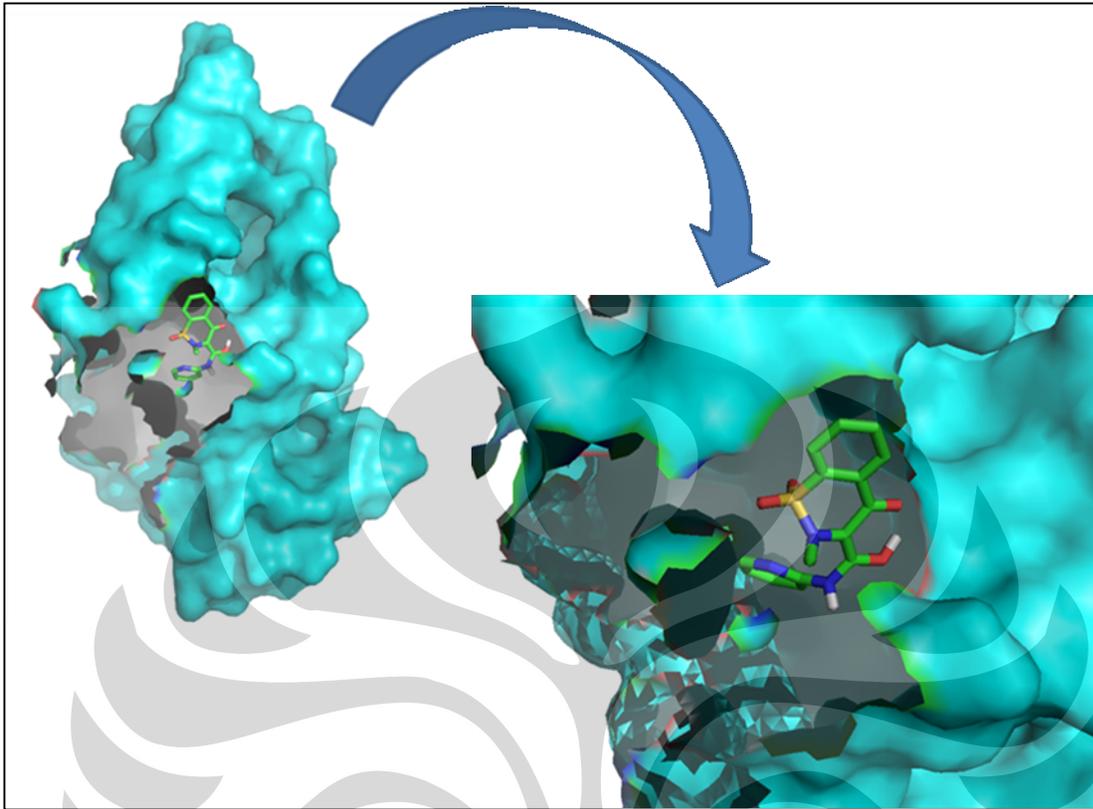
Gambar 3. a) Struktur dua dimensi piroksikam b) Struktur tiga dimensi piroksikam



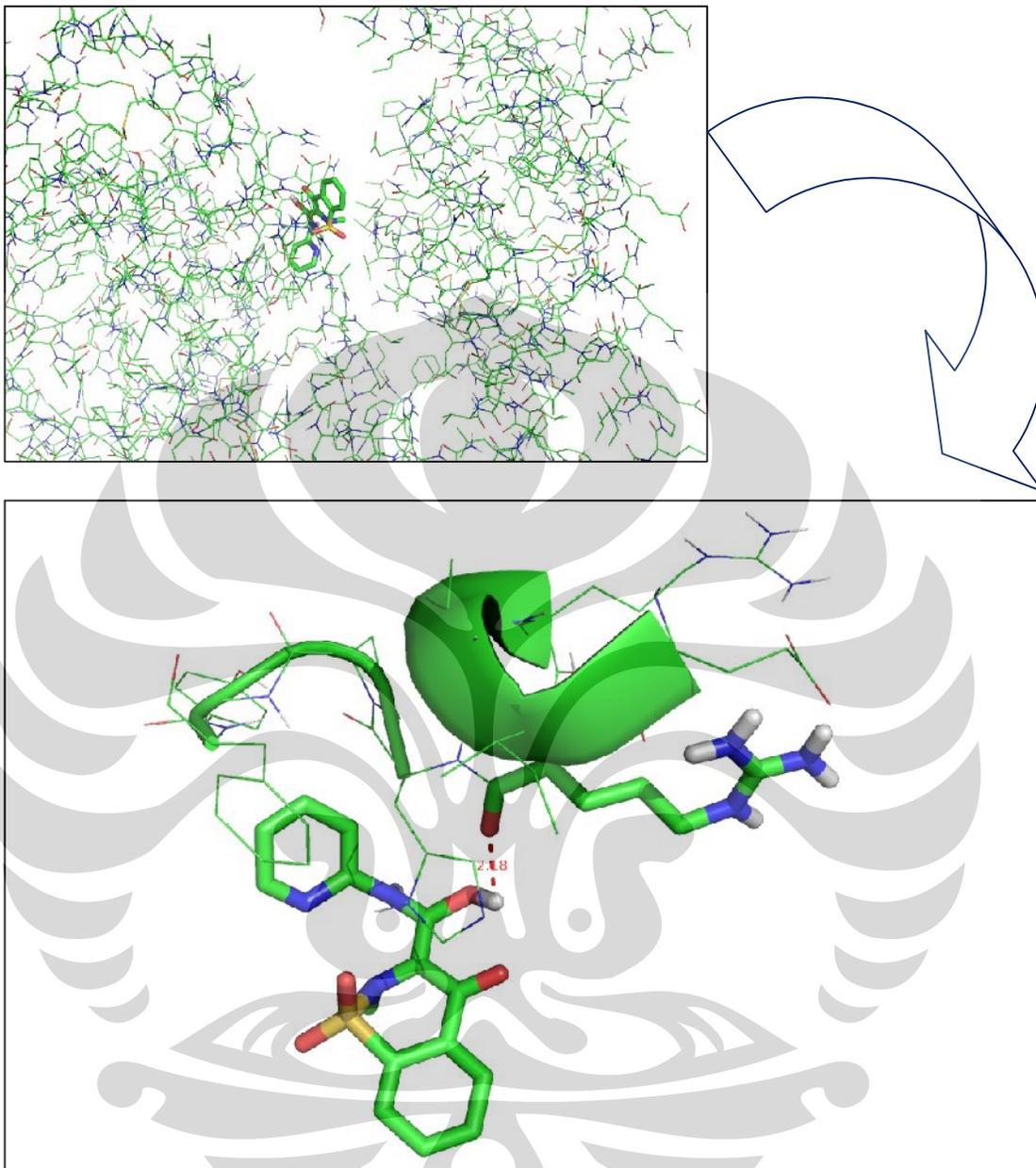
Gambar 4. Hasil *docking* asam mefenamat terhadap struktur kristal 1E78 *chain A* dengan nilai *Number of GA Runs* 100 dan *Maximum Number of Energy Evaluation* 25 M (25 000 000)



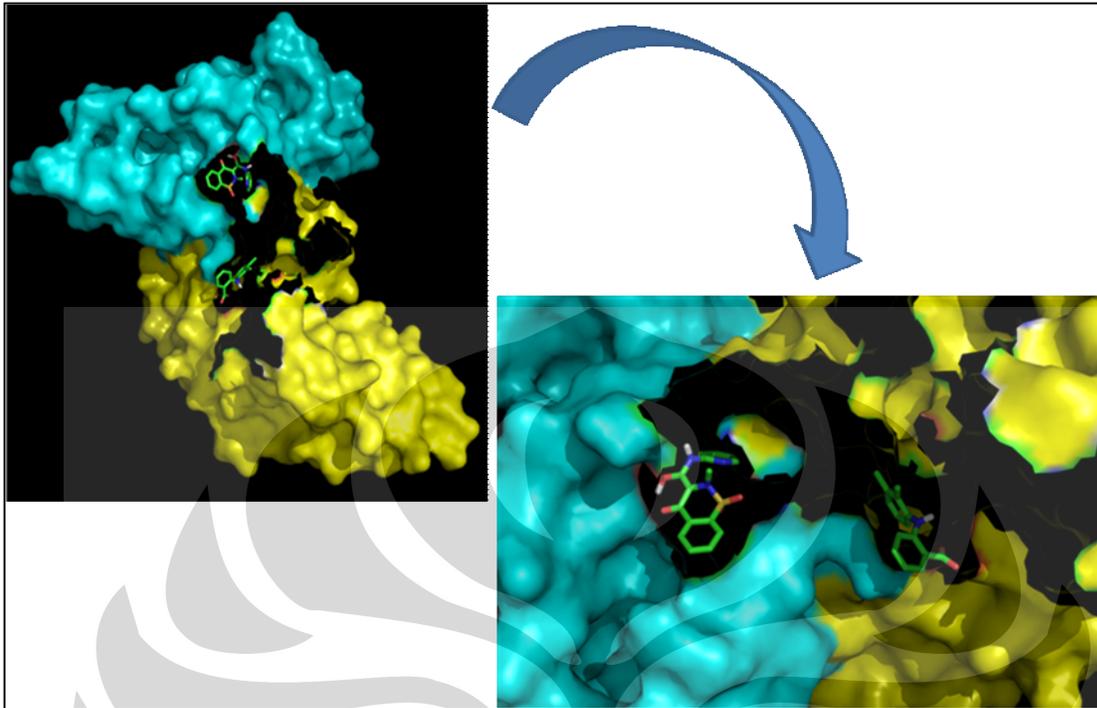
Gambar 5. Ikatan hasil *docking* asam mefenamat terhadap struktur kristal 1E78 *chain A* dengan nilai *Number of GA Runs* 100 dan *Maximum Number of Energy Evaluation* 25 M (25 000 000)



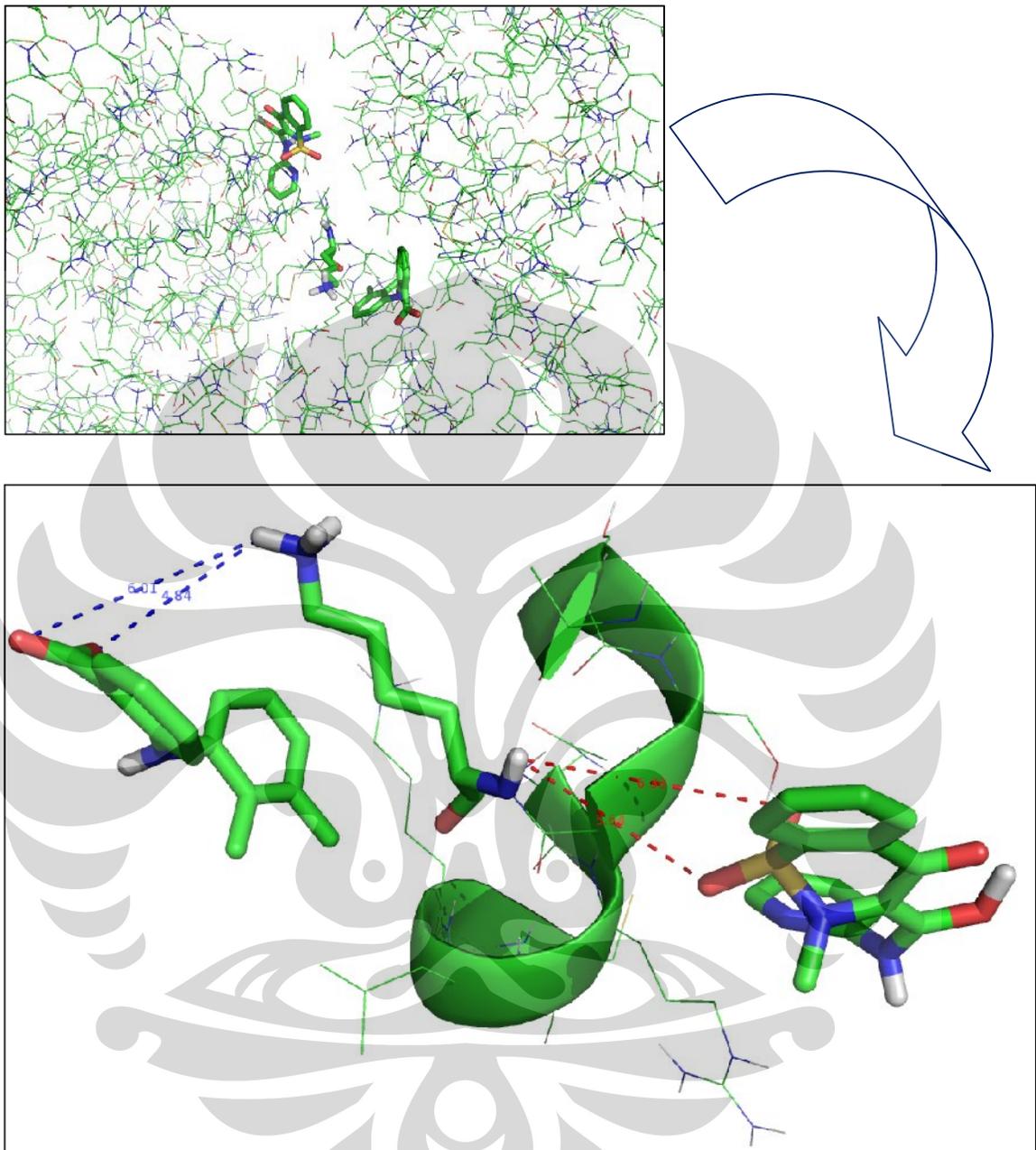
Gambar 6. Hasil *docking* piroksikam terhadap struktur kristal 1E78 *chain A* dengan nilai *Number of GA Runs* 100 dan *Maximum Number of Energy Evaluation* 25 M (25 000 000)



Gambar 7. Ikatan hasil *docking* piroksikam terhadap struktur kristal 1E78 *chain A* dengan nilai *Number of GA Runs* 100 dan *Maximum Number of Energy Evaluation* 25 M (25 000 000)



Gambar 8. Hasil *superpose* kompleks asam mefenamat-albumin dengan piroksikam-albumin



Gambar 9. Ikatan hasil *superpose* kompleks asam mefenamat-albumin dengan piroksikam-albumin

Tabel 1
Rangkuman *Superpose* Struktur 3D Albumin

Moving	Fix	RMSD (Å)
1AO6	1E78	0,839
1E78	1BM0	0,858
1BM0	1AO6	0,241
1AO6 chainA	1AO6 chain B	0,357
1BM0 chain A	1BM0 chain B	0,278
1E78 chain A	1E78 chain B	0,566

Tabel 2
 Hasil Penambatan Molekuler

Ligan	Percobaan	Kategori <i>Posing</i>	ΔG (kkal/mol)	%	Ki (μM)
asam mefenamat	Perc I	Best Dock	-6,13	4	32,27
		Best Cluster	-5,43	45	104,05
	Perc II	Best Dock	-6,36	7	21,65
		Best Cluster	5,47	35	98,59
piroksikam	Perc I	Best Dock	-7,82	84	1,84
		Best Cluster	-7,82	84	1,84
	Perc II	Best Dock	-7,46	51	3,42
		Best Cluster	-7,46	51	3,42

Tabel3
Jarak Ikatan Ligan dengan Makromolekul

Ligan	Asam amino	Jarak ikatan (Å)
Asam mefenamat	Arginin 218	1,81 & 2,03
Piroksikam	Arginin 145	2,18
Asam mefenamat	Lisin 195	4,84
Piroksikam	Lisin 195	5,64

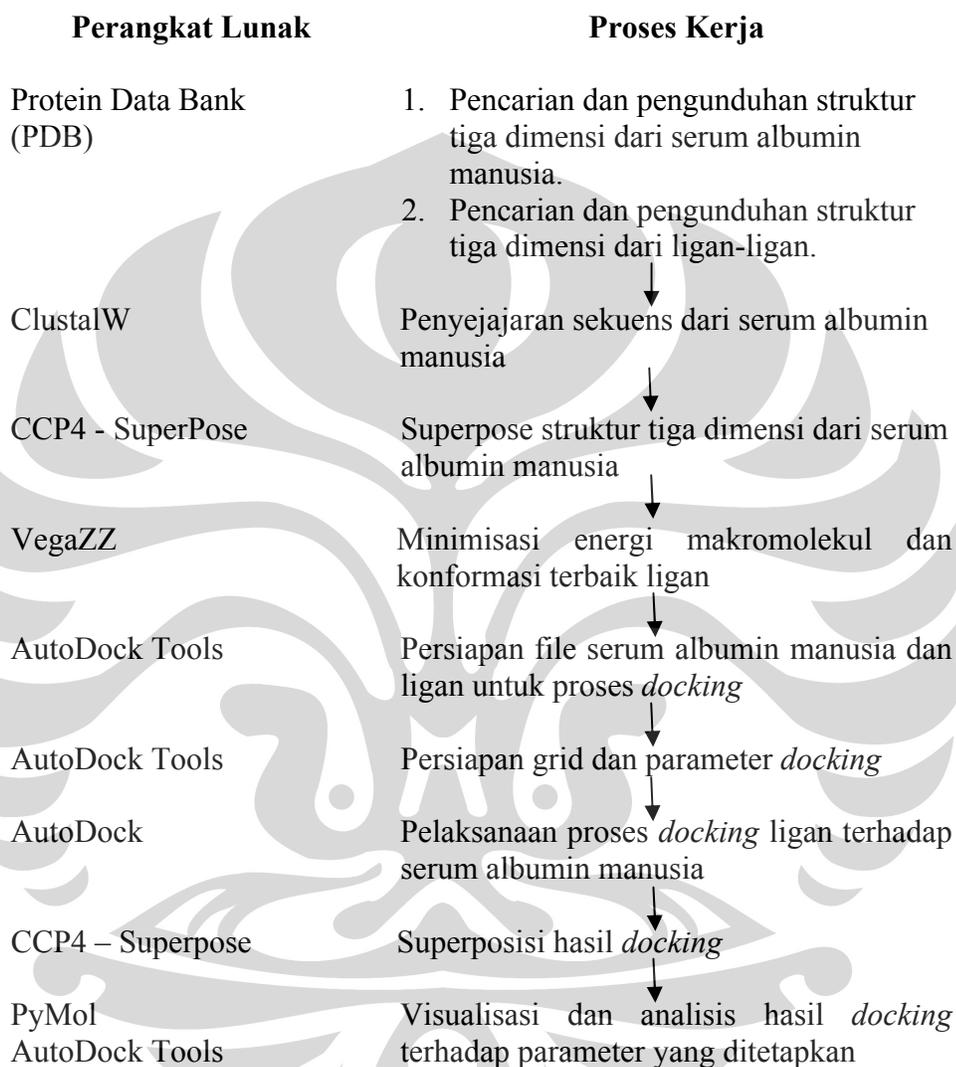
Tabel 4
Rangkuman Energi Bebas (ΔG) dan Konstanta Inhibisi (K_i) Hasil
Penambatan Molekuler Terpilih

	ΔG (kkal/mol)		K_i (μM)
makromolekul			
	asam mefenamat	piroksikam	asam mefenamat piroksikam
1E78_chainA	-5,47	-7,46	98,59 3,42



lampiran 2

skema Kerja



lampiran 3

Tampilan Berkas *Protein Data Bank*

RCSB PDB: Structure Summary for 1A06 - CRYSTAL STRUCTURE OF HUMAN SERUM ALBUMIN - Mozilla Firefox

File Edit View History Bookmarks Tools Help

https://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1A06

News & Publications
Policies
FAQ
Contact
Feedback
About Us

CRYSTAL STRUCTURE OF HUMAN SERUM ALBUMIN

1A06

Display Files
Download Files
Print this Page
Share this Page

DOI:10.2210/pdb1a06/pdb

Deposition Hide

All Deposit Services
Electron Microscopy
NMR
Validation Server
BioSync Beamline
Related Tools

Primary Citation

Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution.
Sugio, S.¹, Kashima, A.¹, Mochizuki, S.¹, Noda, M.¹, Kobayashi, K.¹
PubMed: 10388840

Search Related Articles in PubMed

PubMed Abstract:

A new triclinic crystal form of human serum albumin (HSA), derived either from pool plasma (pHSA) or from a Pichia pastoris expression system (rHSA), was obtained from polyethylene glycol 4000 solution. Three-dimensional structures of pHSA and rHSA were determined at 2.5 Å resolution from the new triclinic crystal form by molecular replacement, using atomic coordinates derived from a multiple isomorphous replacement work with a known tetragonal crystal form. The structures of pHSA and rHSA are virtually identical, with an r.m.s. deviation of 0.24 Å for all α atoms. The two HSA molecules involved in the asymmetric unit are related by a strict local twofold symmetry such that the α helices of the two molecules can be superimposed with an r.m.s. deviation of 0.28 Å in pHSA. Cys34 is the only cysteine with a free sulfhydryl group which does not participate in a disulfide linkage with any external ligand. Domains II and III both have a pocket formed mostly of hydrophobic and positively charged residues and in which a very wide range of compounds may be accommodated. Three tentative binding sites for long-chain fatty acids, each with different surroundings, are located at the surface of each domain.

Keywords:

Binding Sites; Crystallization; Crystallography; X-Ray; Disulfides; Humans; Models; Molecular; Pichia; Protein; Structure; Secondary; Protein; Structure; Tertiary; Recombinant; Proteins; Serum Albumin; Sulfhydryl; Compounds

Related Structures:

Primary Citation of: 1A06 1BMD

Organizational Affiliation:

Osaka Laboratories, Yoshitomi Pharmaceutical Industries Ltd, 2-25-1, Shodai-Ohtari, Hirakata, Osaka 573-1153, Japan.

Journal:

(1999) Protein Eng. 12: 439-446

Click on abstract words and keywords to add them to the search box.

Search PubMed Abstracts

Biological Assembly 1 ?

More Images...

View in Jmol SimpleViewer
Other Viewers Protein Workshop

Biological assembly 1 assigned by authors

Explorer:

Last Structure: 1A06

Tools Hide

File Downloads
FTP Services
File Formats
Services: RESTful | SOAP
Widgets
Compare Structures

Education Hide

Looking at Structures
Molecule of the Month
Educational Resources

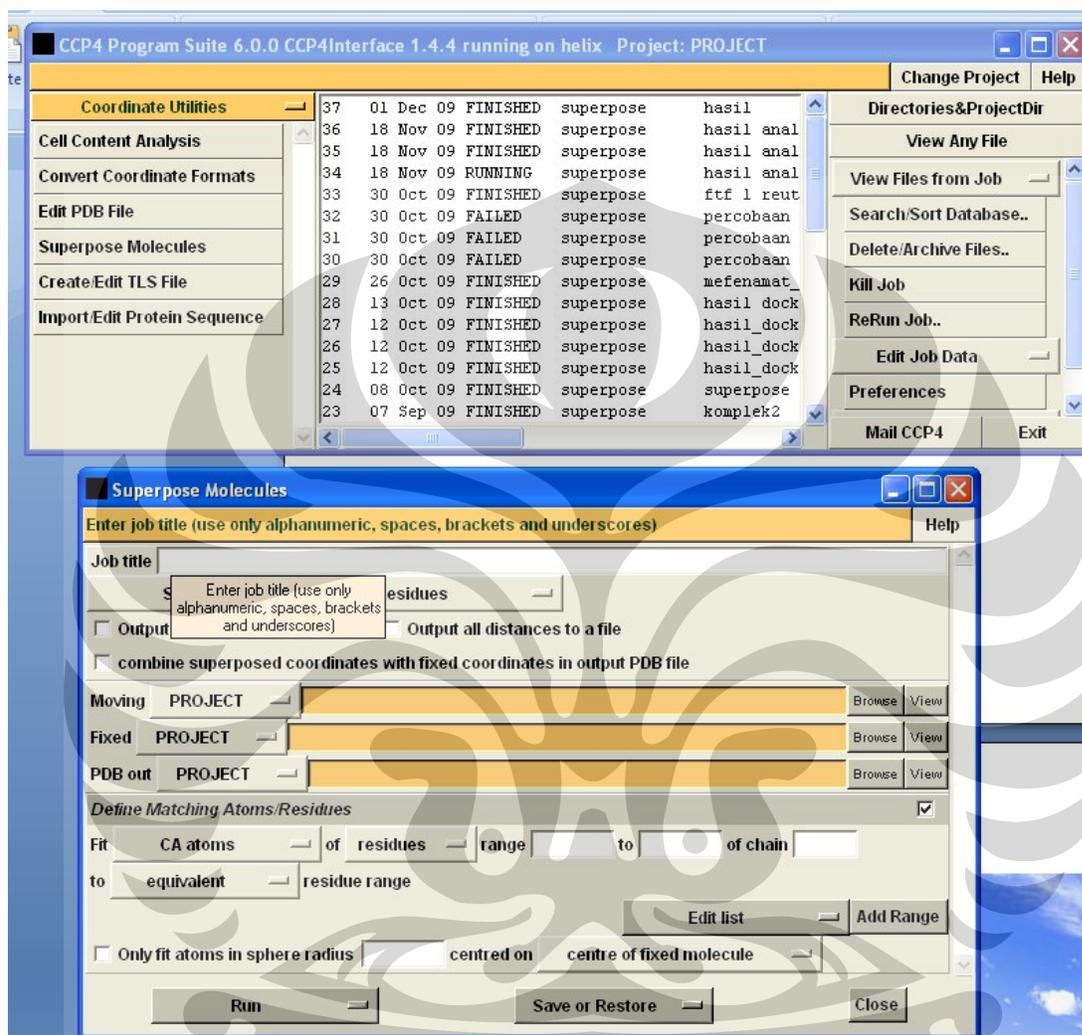
Deposition Summary Hide

Authors: Sugio, S.¹, Mochizuki, S.¹, Noda, M.¹, Kashima, A.¹

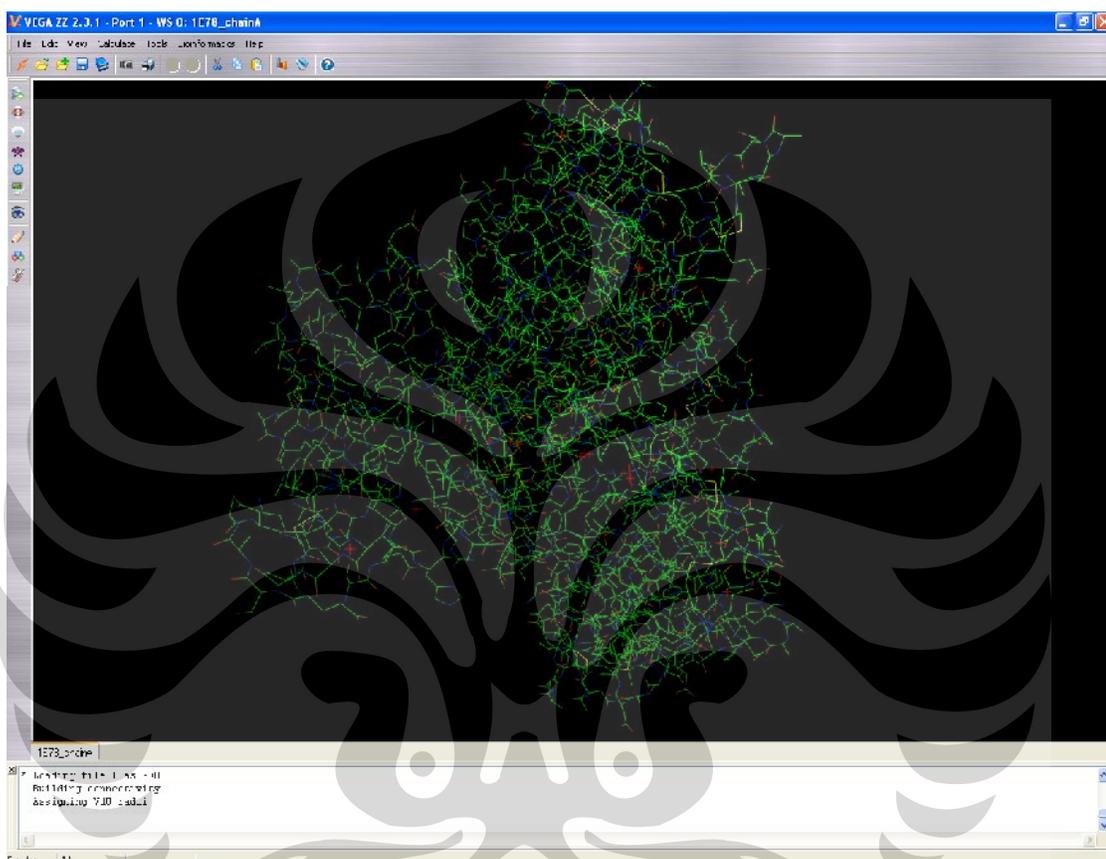
Deposition: 1997-07-18
Release: 1998-05-27
Last Modified (REVDAT): 2009-02-24

http://www.rcsb.org/pdb/images/1a06_bio_r_300.jpg

Lampiran 4

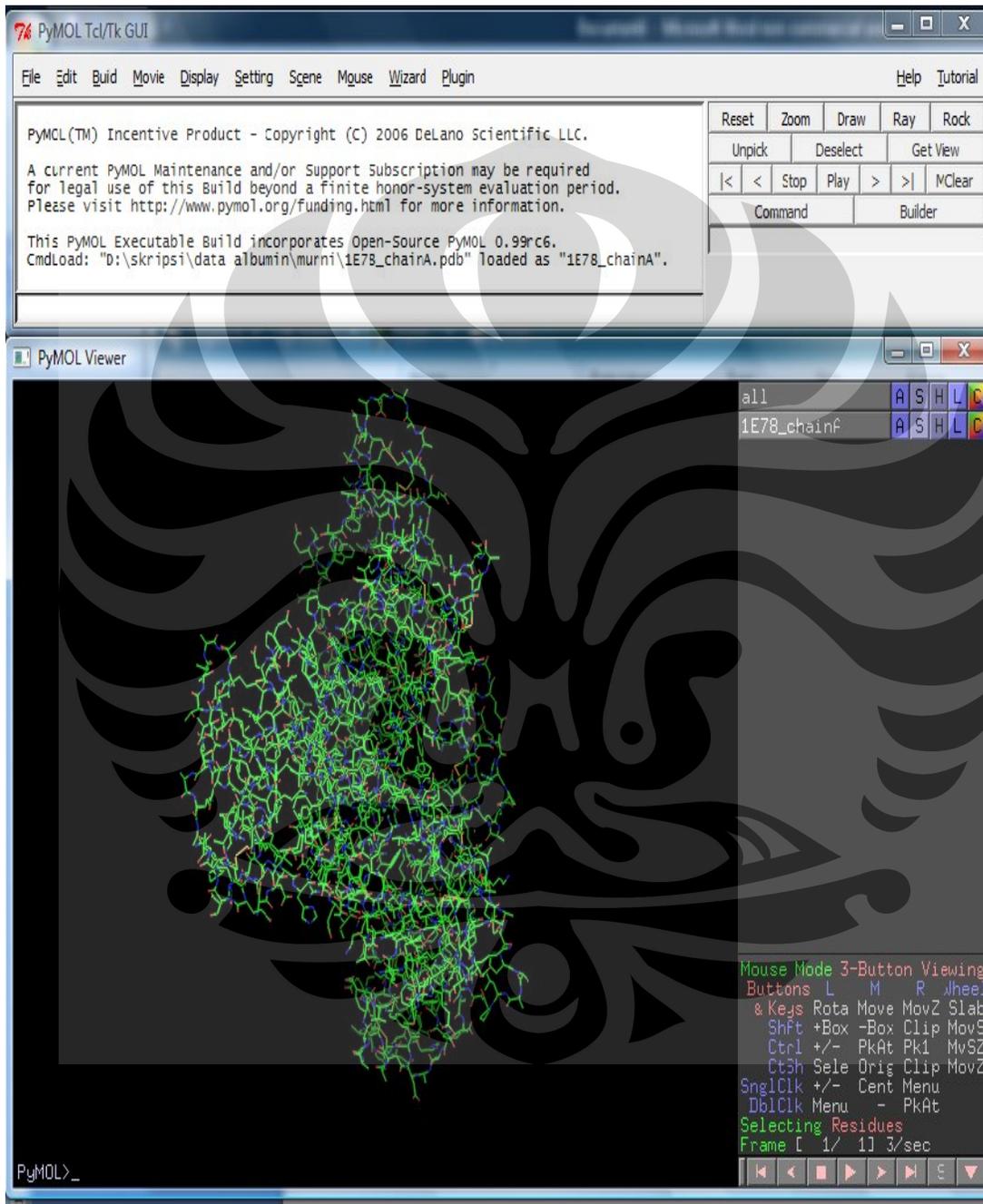
Tampilan Program ccp4 *Superpose*

Lampiran 5
Tampilan Program VegaZZ



Lampiran 6

Tampilan Program PyMOL



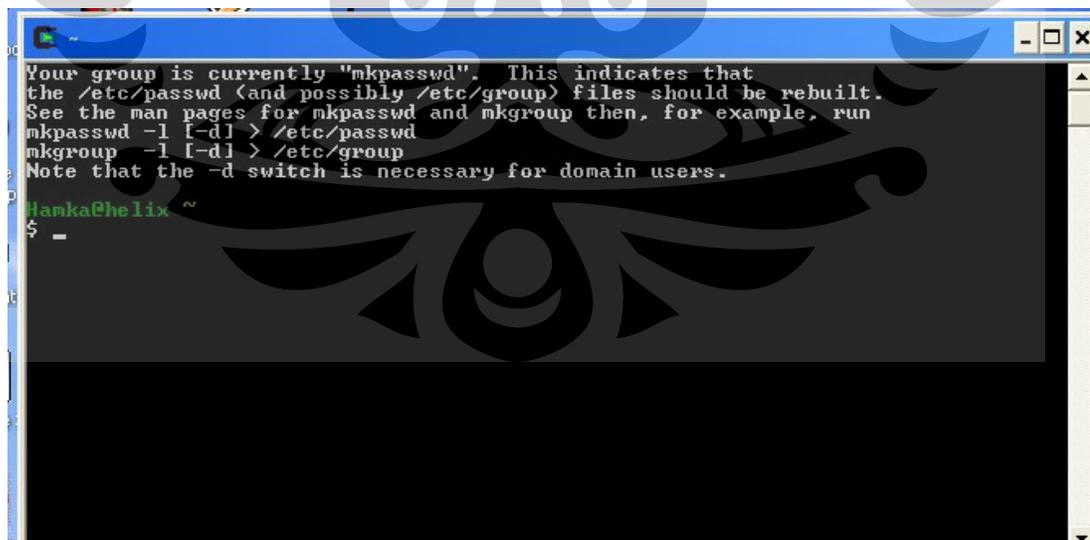
Lampiran 7

Perintah Cygwin

1. `autogrid4 -p 1E78_chainA.gpf -l 1E78_chainA.glg &`
input : 1E78_chainA.gpf
output : 1E78_chainA.maps.fld, 1E78_chainA.maps.xyz,
1E78_chainA.glg, 1E78_chainA.A.map,
1E78_chainAN.map, 1E78_chainA.HD.map,
1E78_chainA.OA.map, 1E78_chainA.d.map,
1E78_chainA.e.map
2. `autodock4 -p 1E78_chainA.dpf -l 1E78_chainA.dlg &`
input : 1E78_chainA.dpf
output : 1E78_chainA.dlg

Lampiran 8

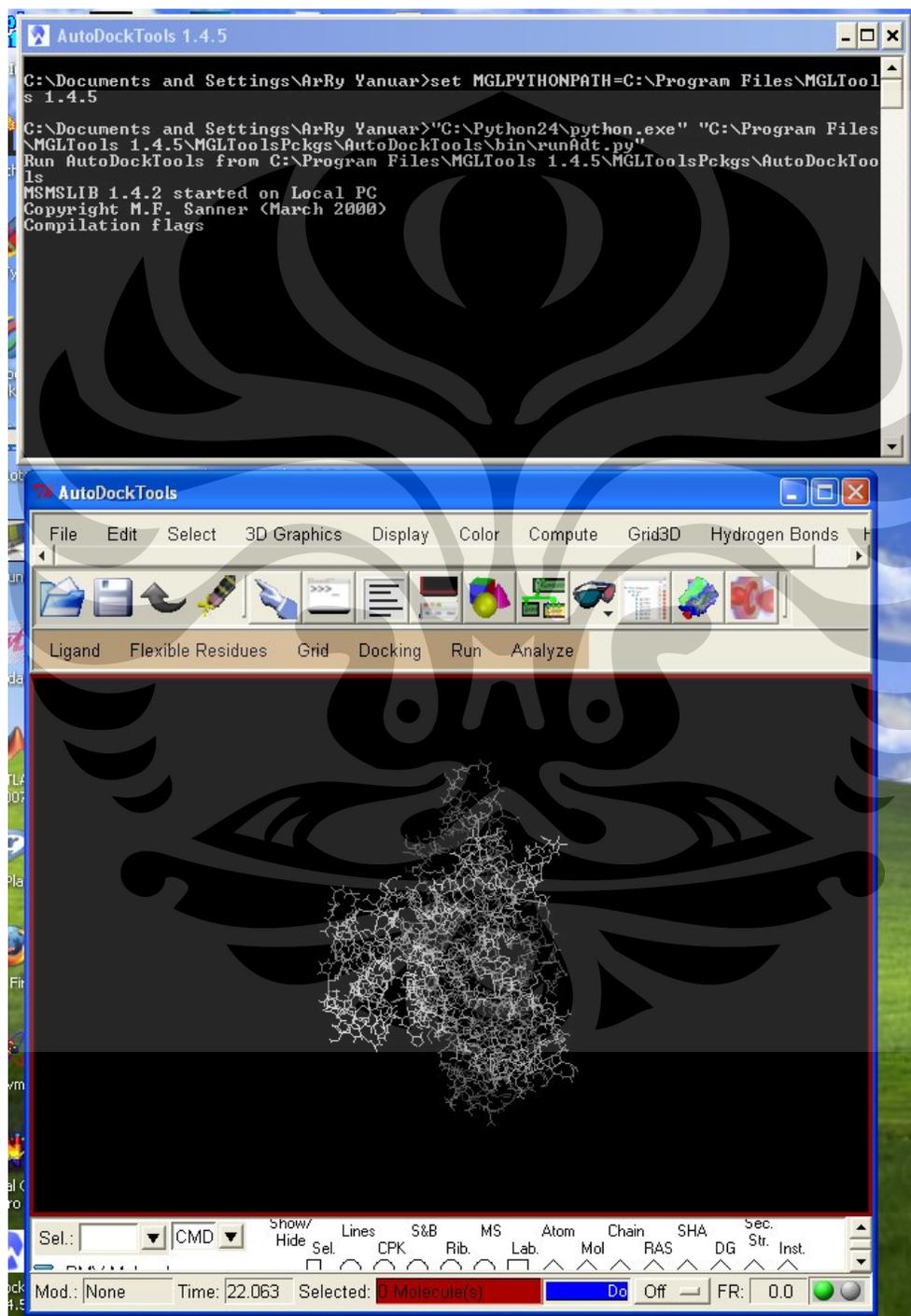
Tampilan Program Cygwin



```
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.
Hamka@helix ~
$ -
```

Lampiran 9

Tampilan Program AutoDock



Lampiran 10

Tampilan berkas .dlg kompleks albumin-asam mefenamat

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus- ter Rank	Lowest Binding Energy	Run	Mean Binding Energy	Num in Clus	Histogram
30	35				5 10 15 20 25
					: : :
1	-6.36	100	-6.07	7	#####
2	-6.33	38	-6.26	4	####
3	-5.62	39	-5.62	1	#
4	-5.51	55	-5.31	19	#####
5	-5.47	11	-5.28	35	#####
6	-5.15	24	-5.06	8	#####
7	-4.96	45	-4.96	1	#
8	-4.82	75	-4.73	21	#####
9	-4.28	65	-4.24	4	####

```

ENDMDL
MODEL      11
USER      Run = 11
USER      Cluster Rank = 5
USER      Number of conformations in this cluster = 35
USER
USER      RMSD from reference structure      = 7.047 A
USER
USER      Estimated Free Energy of Binding    = -5.47 kcal/mol [(1)+
(2)+(3)-(4)]
USER      Estimated Inhibition Constant, Ki  = 98.59 uM (micromolar)
[Temperature = 298.15 K]
USER
USER      (1) Final Intermolecular Energy    = -6.38 kcal/mol
USER      vdW + Hbond + desolv Energy        = -5.97 kcal/mol
USER      Electrostatic Energy               = -0.41 kcal/mol
USER      (2) Final Total Internal Energy    = -0.16 kcal/mol
USER      (3) Torsional Free Energy          = +0.82 kcal/mol
USER      (4) Unbound System's Energy        = -0.25 kcal/mol
USER
  
```

Lampiran 11

Tampilan berkas .dlg kompleks albumin-piroksikam

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus-ter Rank	Lowest Binding Energy	Run	Mean Binding Energy	Num in Clus	Histogram
1	-7.46	2	-7.45	51	5 10 15 20 25 : : : : :
2	-7.38	4	-7.37	12	#####
3	-7.31	11	-7.23	29	#####
4	-7.17	91	-7.16	4	####
5	-6.30	89	-6.30	2	##
6	-6.29	8	-6.23	2	##

```

MODEL      2
USER      Run = 2
USER      Cluster Rank = 1
USER      Number of conformations in this cluster = 51
USER
USER      RMSD from reference structure      = 11.141 A
USER
USER      Estimated Free Energy of Binding   = -7.46 kcal/mol [(1)+
(2)+(3)-(4)]
USER      Estimated Inhibition Constant, Ki  = 3.42 uM (micromolar)
[Temperature = 298.15 K]
USER
USER      (1) Final Intermolecular Energy   = -7.36 kcal/mol
USER      vdW + Hbond + desolv Energy       = -7.28 kcal/mol
USER      Electrostatic Energy              = -0.08 kcal/mol
USER      (2) Final Total Internal Energy   = -0.97 kcal/mol
USER      (3) Torsional Free Energy         = +0.55 kcal/mol
USER      (4) Unbound System's Energy       = -0.32 kcal/mol
USER

```