



UNIVERSITAS INDONESIA

**ANALISIS SIMULASI DINAMIKA MOLEKULER
KOMPLEKS 12-LIPOKSIGENASE DENGAN BEBERAPA
SENYAWA ANTIINFLAMASI GOLONGAN KURKUMIN
HASIL PENAMBATAN MOLEKULER**

SKRIPSI

FEBRIANE TRENDY TASBICHATY

0305050248

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

DEPARTEMEN FARMASI

DEPOK

JULI 2010



UNIVERSITAS INDONESIA

**ANALISIS SIMULASI DINAMIKA MOLEKULER
KOMPLEKS 12-LIPOKSIGENASE DENGAN BEBERAPA
SENYAWA ANTIINFLAMASI GOLONGAN KURKUMIN
HASIL PENAMBATAN MOLEKULER**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

FEBRIANE TRENDY TASBICHATY

0305050248

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN FARMASI
DEPOK
JULI 2010**

ii

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Febriane Trenady Tasbichaty

NPM : 0305050248

Tanda Tangan :

Tanggal : 6 Juli 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Febriane Trendy Tasbichaty
NPM : 0305050248
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Analisis Simulasi Dinamika Molekuler Kompleks 12-Lipoksigenase dengan Beberapa Senyawa Antiinflamasi Golongan Kurkumin Hasil Penambatan Molekuler

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dr. Arry Yanuar, M.Si (.....)

Pembimbing : Dr. Yahdiana Harahap, M.Si (.....)

Penguji : Dr. Harmita, Apt (.....)

Penguji : Prof. Dr. Heru Suhartanto, M.Sc., Ph.D. (.....)

Penguji : Dr. Silvia Surini, M.Pharm.Sc. (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 4 Juli 2010

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah Tuhan semesta alam yang dengan rahmat dan karunia-Nya telah mengizinkan penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

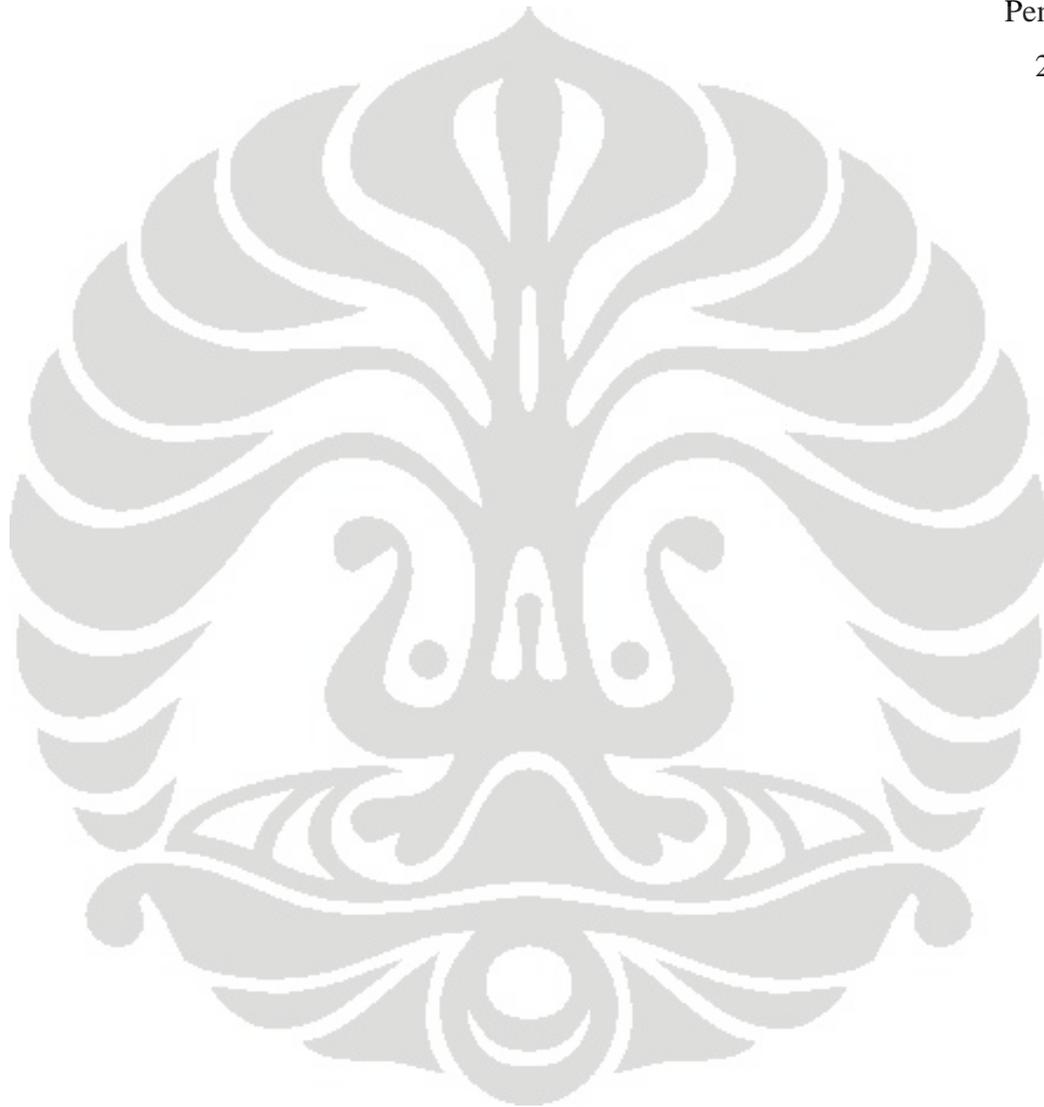
Penulis mengucapkan terima kasih yang setulus-tulusnya kepada:

1. Bapak Dr. Arry Yanuar, M.Si. selaku pembimbing I atas segala bimbingan, bantuan, kesabaran dan saran selama penelitian berlangsung juga penyusunan skripsi,
2. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, M.Si. selaku pembimbing II atas segala bimbingan, bantuan, dan saran selama penelitian berlangsung juga penyusunan skripsi, sekaligus selaku Ketua Departemen Farmasi atas kesempatan yang telah diberikan untuk melakukan penelitian ini,
3. Ibu Prof. Dr. Atiek Soemiati, M.Si. selaku pembimbing akademis yang telah membimbing penulis dari semester 1 hingga sekarang,
4. Seluruh staf pengajar Departemen Farmasi yang dengan tulus memberikan bekal ilmu kepada penulis,
5. Seluruh staf dan karyawan Departemen Farmasi atas segala bantuannya,
6. Orang tua yang telah memberikan dukungan dan doanya untuk penulis,
7. Ventry, yang telah bersedia menjadi mentor dalam penelitian ini; rekan-rekan seperjuangan di Ruang Penelitian yang telah berjuang bersama dalam menyelesaikan penelitian ini; rekan-rekan seperjuangan yang sama-sama melakukan penelitian di semester ini; serta teman-teman angkatan 2005 dan 2006 lainnya atas segala bantuan, doa dan dukungan semangat selama masa kuliah ini; rekan-rekan serta sahabat di KSM EP UI selaku motivator penulis. Semoga persahabatan dan ukhuwah ini selalu terjaga hingga kapan pun.

8. Seluruh sahabat dan pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu, selaku motivator dan dukungannya dalam penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam skripsi ini. Namun penulis berharap bahwa skripsi ini dapat memberikan kontribusi bagi semua pihak, khususnya dalam ilmu pengetahuan.

Penulis
2010



**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Febriane Trendy Tasbichaty

NPM : 0305050248

Program Studi : Farmasi

Departemen : Farmasi

Fakultas : MIPA

Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Analisis Simulasi Dinamika Molekuler Kompleks 12-Lipoksigenase dengan Beberapa Senyawa Antiinflamasi Golongan Kurkumin Hasil Penambatan Molekuler

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, pengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 6 Juli 2010

Yang menyatakan

(Febriane Trendy Tasbichaty)

ABSTRAK

Nama : Febriane Trendy Tasbichaty
Program Studi : Farmasi
Judul : Analisis Simulasi Dinamika Molekuler Kompleks 12-Lipoksigenase dengan Beberapa Senyawa Antiinflamasi Golongan Kurkumin Hasil Penambatan Molekuler

Produksi mediator inflamasi secara abnormal perlu ditangani dengan obat antiinflamasi. Kurkumin merupakan salah satu inhibitor lipoksigenase (LOX), suatu enzim yang berperan pada awal inflamasi, yang memiliki bentuk tautomer yang dapat mempengaruhi interaksi ligan dengan protein target secara signifikan, terutama dalam pengikatan hidrogen. Penelitian ini bertujuan mengamati dinamika interaksi inhibisi ikatan kurkumin dan turunannya dengan mempelajari pergerakan kompleks 12-LOX, salah satu tipe LOX, dengan kurkumin dan turunannya hasil penambatan molekuler penelitian sebelumnya. Struktur kristal 12-LOX yang digunakan dalam penelitian tersebut terputus sehingga terlebih dahulu perlu dilakukan pemodelan homologi. Pengujian dinamika interaksi dilakukan secara *in silico* melalui simulasi dinamika molekuler selama sepuluh nanodetik menggunakan GROMACS 4.0. Simulasi pada kompleks 12-LOX dengan kurkumin menunjukkan konformasi yang cenderung stabil, sedangkan kompleks dengan demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin menunjukkan perubahan konformasi pada situs pengikatan 12-LOX berturut-turut menjadi konformasi tertutup dan terbuka. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ketiga kompleks memiliki dinamika inhibisi yang berbeda.

Kata kunci : 12-LOX, antiinflamasi, pemodelan homologi, simulasi dinamika molekuler
xv +108 halaman : 28 gambar; 14 tabel; 21 lampiran
Daftar acuan : 57 (1986-2010)

ABSTRACT

Name : Febriane Trendy Tasbichaty
Study Program : Pharmacy
Title : Molecular Dynamics Simulation Analysys of 12-Lipoxygenase Complex with Curcuminoid as Antiinflammation Compound from Docking Result

Abnormally inflammatory mediator's production needs medicated treatment with anti-inflammatory drug. Curcumin is one of lipoxygenase (LOX) inhibitor, an enzyme that has role in initiation of inflammation and has tautomer form that could modify its interaction significantly between ligand, especially on hydrogen binding. This aim of this research is to analyze the dynamics of inhibition's interaction curcumin bonds and derivatives by observing 12-LOX complex movement with its ligands docking result from previous research. Crystal structure of 12-LOX which was used in the previous research was disordered so that homology modelling needs to do. Molecular dynamic (MD) simulation was done with *in silico* method, GROMACS 4.0. The result of MD simulation during 10 nanoseconds showed that complex 12-LOX with curcumin tend to form a stable conformation whereas complex with demetoxycurcumin and bisdemetoxycurcumin showed the conformation change of binding site of 12-LOX to closed and opened conformation respectively. The conclusion of this research was these complexes have different inhibition dynamics.

Keywords : 12-LOX, anti inflammation, homology modelling, molecular dynamics simulation

xv+ 108 pages : 28 figures; 14 tables; 21 appendices

Bibliography : 57 (1986-2010)

DAFTAR ISI

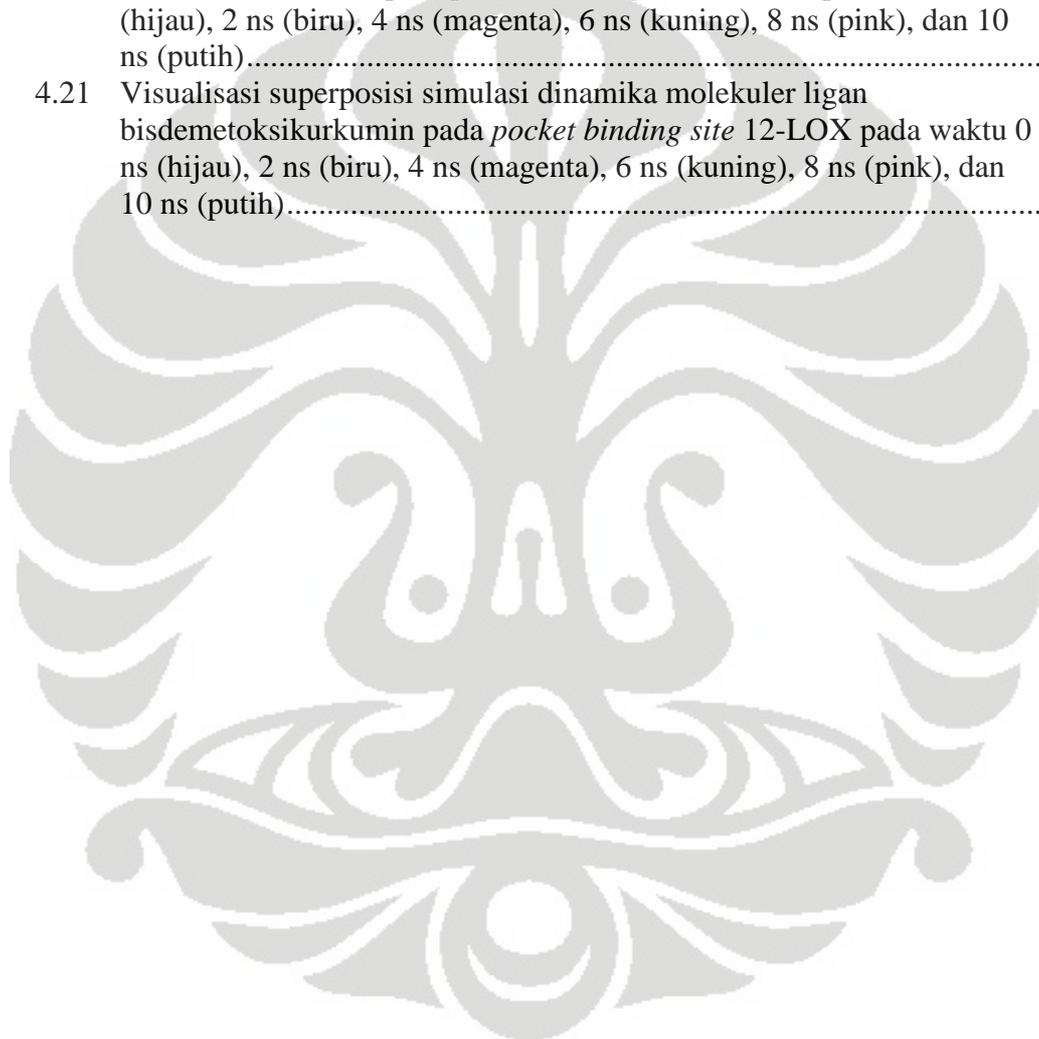
	Halaman
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI.....	vii
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Protein	4
2.2 Reseptor	6
2.3 Inhibisi Enzim	7
2.4 Ikatan.....	8
2.5 Interaksi Ligan-Reseptor	9
2.6 12-Lipoksigenase.....	10
2.7 Inhibisi Lipoksigenase	13
2.8 Inflamasi	13
2.9 Kurkumin.....	14
2.10 Bioinformatika	18
2.11 Pemodelan Homologi.....	18
2.12 Penambatan Molekuler (<i>Docking</i>)	19
2.13 Dinamika Molekuler	20
2.14 PSI-BLAST	21
2.15 ClustalW2.....	22
2.16 PyMOL	22
2.17 MODELLER 9v7	22
2.18 Vega ZZ.....	23
2.19 CCP4 Packages.....	23
2.20 Superpose.....	24
2.21 PLOT RAMACHANDRAN	24
2.22 MOE (<i>The Molecular Operating Environment</i>).....	26
2.23 AutoDock.....	26
2.24 PRODRG.....	27
2.25 GROMACS (<i>Gronigen Machine for Chemical Simulations</i>).....	27
2.26 VMD (<i>Visual Molecular Dynamics</i>) NAMD	28

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN	29
3.1 Bahan.....	29
3.2 Alat	29
3.3 Cara Kerja.....	30
3.3.1 Pembuatan Model Lipoksigenase	30
3.3.2 Optimasi Makromolekul dan Ligan.....	32
3.3.3 Penambatan molekuler Ligan terhadap Target Model Lipoksigenase	33
3.3.4 Analisis Hasil Penambatan Molekuler	33
3.3.5 Simulasi Dinamika Molekuler.....	34
3.3.6 Analisis Hasil Simulasi Dinamika Molekuler	36
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	38
4.1 Pembuatan Model Lipoksigenase.....	38
4.2 Optimasi Makromolekul dan Ligan.....	41
4.3 Penambatan Molekuler Ligan terhadap Target Model Lipoksigenase	42
4.4 Analisis Hasil Penambatan Molekuler	43
4.5 Simulasi Dinamika Molekuler.....	45
4.6 Analisis Hasil Simulasi Dinamika Molekuler	47
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	55
5.1 Kesimpulan.....	55
5.2 Saran.....	55
DAFTAR ACUAN.....	56

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur protein (a) α -heliks, (b) lipatan paralel dan antiparalel β , dan (c) struktur tersier protein.....	61
2.2. Diagram alur metabolisme asam arakidonat pada jalur 12-LOX disertai struktur kimianya.....	11
2.3. Struktur (a) kurkumin (1,7 bis (4-hidroksi-3-metoksifenil) 1,6-heptadien-3,5-dion); (b) demetoksikurkumin; dan (c) bisdemetoksikurkumin.	14
2.4. Tautomerisasi senyawa kurkumin.....	15
2.5. Struktur kurkumin dan metabolitnya.....	17
2.6. Sudut (ϕ) dan (ψ) pada struktur asam amino.....	24
2.7. Daerah struktur sekunder pada plot Ramachandran.....	25
4.1. Hasil permodelan homologi pada target 12-LOX.....	62
4.2. Visualisasi hasil permodelan homologi wilayah yang <i>disorder</i> pada (a) <i>loop</i> I, (b) <i>loop</i> II, dan (c) <i>loop</i> III.....	42
4.3. Plot Ramachandran hasil permodelan homologi.....	64
4.4. Konformasi ligan kurkumin setelah <i>docking</i> , titik-titik hijau menunjukkan ikatan hidrogen ligan dengan 12-LOX.....	65
4.5. Konformasi ligan demetoksikurkumin setelah <i>docking</i> terhadap 12-LOX, titik-titik hijau menunjukkan ikatan hidrogen ligan dengan 12-LOX.....	65
4.6. Konformasi ligan bisdemetoksikurkumin setelah <i>docking</i> terhadap 12-LOX.....	65
4.7. Perbandingan visualisasi hasil <i>docking</i> kurkumin sebelum pemodelan homologi (biru) dan sesudah pemodelan homologi berupa tautomer keto (kuning) dan tautomer enol (jingga) terhadap target 12-LOX.....	66
4.8. Perbandingan visualisasi hasil <i>docking</i> demetoksikurkumin sebelum pemodelan homologi (biru) dan sesudah pemodelan homologi berupa tautomer keto (kuning) dan tautomer enol (jingga) terhadap target 12-LOX.....	66
4.9. Perbandingan visualisasi hasil <i>docking</i> bisdemetoksikurkumin sebelum pemodelan homologi (biru) dan sesudah pemodelan homologi berupa tautomer keto (kuning) dan tautomer enol (jingga) terhadap target 12-LOX.....	66
4.10. Grafik energi potensial 12-LOX tanpa ligan selama simulasi 10 ns.....	47
4.12. Grafik RMSF C- α LOX keempat sistem setelah simulasi dinamika molekuler selama 10 ns.....	49
4.13. Grafik ikatan hidrogen 12-LOX dengan kurkumin selama simulasi dinamika molekuler selama 10 ns.....	50
4.14. Grafik ikatan hidrogen 12-LOX dengan demetoksikurkumin selama simulasi dinamika molekuler selama 10 ns.....	51
4.15. Grafik ikatan hidrogen 12-LOX dengan bisdemetoksikurkumin selama simulasi dinamika molekuler selama 10 ns.....	51

4.16.	Interaksi ikatan 12-LOX dengan kurkumin selama simulasi dinamika molekuler (0 ns, 2 ns, 4 ns, 6 ns, 8 ns, 10 ns).....	67
4.17.	Interaksi ikatan 12-LOX dengan demetoksikurkumin selama simulasi dinamika molekuler (0 ns, 2 ns, 4 ns, 6 ns, 8 ns, 10 ns).....	70
4.18.	Interaksi ikatan 12-LOX dengan bisdemetoksikurkumin selama simulasi dinamika molekuler (0 ns, 2 ns, 4 ns, 6 ns, 8 ns, 10 ns).....	73
4.19	Visualisasi superposisi simulasi dinamika molekuler ligan kurkumin pada <i>pocket binding site</i> 12-LOX pada waktu 0 ns (hijau), 2 ns (biru), 4 ns (magenta), 6 ns (kuning), 8 ns (pink), dan 10 ns (putih)	76
4.20	Visualisasi superposisi simulasi dinamika molekuler ligan demetoksikurkumin pada <i>pocket binding site</i> 12-LOX pada waktu 0 ns (hijau), 2 ns (biru), 4 ns (magenta), 6 ns (kuning), 8 ns (pink), dan 10 ns (putih).....	76
4.21	Visualisasi superposisi simulasi dinamika molekuler ligan bisdemetoksikurkumin pada <i>pocket binding site</i> 12-LOX pada waktu 0 ns (hijau), 2 ns (biru), 4 ns (magenta), 6 ns (kuning), 8 ns (pink), dan 10 ns (putih).....	76



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1. Beberapa jenis interaksi obat–reseptor	7
2.2. Distribusi kurkumin pada serum dan jaringan setelah pemberian oral pada manusia	16
4.1. Tampilan antarmuka <i>output</i> homolog target LOX dari PSI-BLAST	38
4.2. Data hasil pencarian homolog target LOX dari PSI-BLAST	39
4.3. Data hasil superposisi homolog target LOX terhadap target LOX4	39
4.5. Perbandingan hasil penambatan molekuler	43
4.6. Perbandingan konstanta inhibisi (K_i).....	44
4.7. Pengukuran jarak ikatan hidrogen	77
4.8. Data analisis simulasi dinamika molekuler dengan MOE.....	52
4.9. Hasil analisis penambatan molekuler pada penelitian sebelumnya.....	78
4.10. Interaksi 12-LOX dengan ligan kurkumin selama simulasi dinamika molekuler	79
4.11. Interaksi 12-LOX dengan ligan kurkumin selama simulasi dinamika molekuler	81
4.12. Interaksi 12-LOX dengan ligan kurkumin selama simulasi dinamika molekuler	83

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Tampilan antarmuka PSI-BLAST	85
2. Tampilan antarmuka Vega ZZ.....	86
3. Tampilan antarmuka PyMOL.....	86
4. Tampilan antarmuka <i>software</i> UCSF Chimera	87
5. Tampilan antarmuka <i>software</i> interaktif ClustalW2	88
6. Tampilan antarmuka hasil penyejajaran sekuens oleh <i>software</i> ClustalW2	89
7. Tampilan pengaturan alignment.ali	90
8. Pengaturan model-multiple.py.....	94
9. Tampilan pengaturan model-loop-define.py	94
10. Tampilan antarmuka <i>superpose</i> dan PROCHECK pada <i>software</i> CCP4 <i>package</i>	95
11. Tampilan antarmuka AutoDock	96
12. Tampilan antarmuka <i>software</i> PRODRG2.....	99
13. Tampilan antarmuka MOE	100
14. Berkas em.mdp sistem 12-LOX berligan	101
15. Berkas pr.mdp sistem 12-LOX berligan.....	102
16. Berkas md.mdp sistem 12-LOX berligan.....	103
17. Perintah LINUX yang dipakai dalam penelitian ini	104
18. Perintah AutoDock	104
19. Perintah GROMACS 4.0	105
20. Jenis asam amino penyusun protein	107
21. Skema kerja penelitian.....	108

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Inflamasi merupakan tanda terjadinya kerusakan jaringan yang ditandai dengan timbulnya gejala nyeri atau radang. Nyeri dapat bersifat mengganggu jika intensitasnya berlebihan karena produksi mediator inflamasi secara abnormal, yang memicu timbulnya berbagai penyakit inflamasi seperti asma, artritis, dan tukak lambung sehingga perlu diatasi dengan obat antiinflamasi. Obat antiinflamasi didesain mempengaruhi sintesis mediator inflamasi yang berkaitan dengan metabolisme asam arakidonat. Salah satu enzim yang berperan pada reaksi tersebut adalah lipoksigenase (LOX), suatu oksigenase non-heme mengandung Fe yang mengkonversi asam arakidonat dan asam lemak tidak jenuh ganda lainnya menjadi derivat hidrosiperoksida seperti asam hidroperoksieikosatetraenoat (HPETE), dan asam hidroksieikosatetraenoat (HETE), leukotrien, dan lipoksin, yang penting dalam sistem pertahanan tubuh dan homeostasis secara metabolik (Toledo, Masgrau, Marechal, Lluch, & Lafont, 2010).

Penjualan obat antiinflamasi menduduki peringkat lima belas besar pada perdagangan obat dunia (Top 15 Global Therapeutic Classes, 2009) menandakan prospek pengembangan obat tersebut cukup menjanjikan. Sayangnya, pengembangan obat antiinflamasi berbasis inhibisi LOX selama ini kurang mendapat perhatian. Beberapa obat inhibitor LOX telah terbukti efektif mengatasi inflamasi (Whitehouse & Rainsford, 2006). Untuk menunjang proses pengembangan obat baru berdasarkan prinsip terapeutik inhibitor LOX, diperlukan pengetahuan tentang mekanisme molekulernya.

Banyak studi mengenai inhibitor LOX diupayakan untuk meneliti sifat antikankernya. Mayoritas risiko/aktivator kanker pada karsinogenesis merangsang proliferasi sel dan metastasis melalui mekanisme inflamasi (Hyde & Missailidis, 2009). Mekanisme inhibisi LOX terhadap obat antiinflamasi lipoksigenase menarik untuk diteliti, salah satunya adalah inhibisi dengan senyawa dari tanaman obat. Salah satu tanaman obat yang bekerja sinergik mengurangi inflamasi kronik

adalah kurkumin (Ikawati, Asmara, & M., 2007). Kurkumin telah terbukti bermanfaat dalam pencegahan dan pengobatan sejumlah penyakit inflamasi berkaitan dengan aktivitas antiinflamasinya (Aggarwal, Sundaram, Malani, & Ichikawa, 2006). Kurkumin memiliki efek antiinflamasi non imunologis melalui mekanisme penghambatan aktivitas siklooksigenase dan lipoksigenase (Ikawati, Asmara, & M., 2007).

Mekanisme interaksi antara lipoksigenase dengan berbagai molekul termasuk inhibitorynya, dapat diteliti melalui berbagai metode yang meliputi penelitian *in vivo*, *in vitro*, dan *in silico*. Dalam penelitian ini digunakan 12-LOX, salah satu tipe LOX yang terdapat pada manusia. Penelitian terhadap interaksi enzim dengan ligan, dalam hal ini 12-LOX dengan inhibitor kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin akan lebih efisien jika dilakukan dengan metode *in silico* dibandingkan *in vivo* dan *in vitro*. Metode *in silico* yang dapat digunakan untuk menganalisis interaksi inhibisi tersebut adalah penambatan molekuler (*docking*), sedangkan untuk menganalisis dinamika interaksi inhibisinya dapat digunakan simulasi dinamika molekuler.

Penelitian mengenai interaksi inhibisi tingkat molekuler 12-LOX (Identitas PDB: 3D3L) terhadap senyawa aktif antiinflamasi kurkumin dan turunannya alaminya (demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin) dengan penambatan molekuler telah dilakukan oleh Utami (2009). Untuk melakukan simulasi dinamika molekuler diperlukan *input* struktur protein yang lengkap, sedangkan 12-LOX yang digunakan dalam penambatan molekuler tersebut merupakan struktur 12-LOX dengan rantai terputus (*disorder*) pada tiga tempat sehingga perlu dilakukan pemodelan homologi terhadap 12-LOX.

Kurkumin memiliki dua bentuk tautomer, yaitu enol dan keto (Sharma, Gescher, & Steward, 2005). Tautomer memiliki perbedaan pengikatan hidrogen sehingga dapat mengubah kemungkinan interaksi antara ligan dan protein secara signifikan (Kalliokoski, Salo, Lahtela-Kakkonen, & Poso, 2009). Penambatan molekuler oleh Utami (2009) hanya menambatkan tautomer keto dari kurkumin dan turunan alaminya sehingga perlu dilakukan penambatan molekuler kembali antara ligan kurkumin dan turunan alaminya (sebagai tautomer keto dan enol)

dengan model 12-LOX yang lengkap sebelum melakukan simulasi dinamika molekuler.

Pada analisis hasil penambatan molekuler kompleks oleh Utami (2009) diperoleh konformasi terbaik dimana His360, His365, dan His540 berperan penting dalam pengikatan substrat pada 12-LOX disertai adanya ikatan hidrogen yang bertanggung jawab pada aktivitas inhibisi enzim tersebut. Analisis tersebut memperlihatkan nilai kekuatan interaksi senyawa dari tanaman obat terhadap struktur 12-LOX yang bersifat kaku (*rigid*). Kekakuan struktur pada proses penambatan molekuler bermakna bahwa 12-LOX tersebut dibekukan terhadap ruang dan waktu, yang merupakan keterbatasan proses tersebut. Namun pada kondisi sebenarnya, molekul protein seperti 12-LOX memiliki torsi sehingga ia bersifat dinamis, seperti bergerak, menekuk, memuai, relaksasi maupun kontraksi (Teodoro, Jr., & Kavraki, 2001). Analisis penambatan molekuler tersebut belum mengamati kestabilan ikatan yang terjadi terhadap ruang dan waktu. Oleh karena itu, simulasi dinamika molekuler perlu dilakukan untuk mengamati interaksi secara lebih lanjut, melihat kestabilan ikatan yang terjadi. Upaya mengamati mekanisme inhibisi 12-LOX dengan dinamika molekuler ini diharapkan dapat menjadi pendekatan terapeutik baru dalam perancangan obat antiinflamasi berbasis inhibitor lipoksigenase.

1.2 Tujuan Penelitian

1. Membandingkan hasil penambatan molekuler ligan kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin antara bentuk keto dan enol terhadap model lengkap 12-Lipoksigenase hasil pemodelan homologi
2. Menganalisis pergerakan kompleks molekul 12-Lipoksigenase tanpa ligan, dengan ligan kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin bentuk tautomer terpilih hasil perbandingan penambatan molekuler menggunakan simulasi dinamika molekuler

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Protein

Protein adalah polimer dari asam amino yang bersama-sama dihubungkan oleh ikatan amida (Bruice, 2004). Meskipun tidak ada sistem klasifikasi yang bisa diterima secara universal, protein diklasifikasikan berdasarkan kelarutan, bentuk, fungsi biologi, atau struktur tiga dimensinya. Dalam bentuk keseluruhannya, protein diklasifikasikan menjadi protein globular dan protein fibrosa. Protein globular mempunyai rantai polipeptida berpilin serta berlipat secara padat dengan rasio aksial (rasio panjang terhadap lebar) kurang dari 10 serta umumnya tidak lebih dari 3-4. Protein fibrosa memiliki rasio aksial lebih besar dari 10.

Berdasarkan fungsi biologinya, protein diklasifikasikan sebagai enzim (dehidrogenase, kinase), protein penyimpanan (ferritin, mioglobulin), protein pengatur (protein pengikat-DNA, hormon peptida), protein struktural (kolagen, proteoglikan), protein pelindung (faktor pembekuan darah, imunoglobulin), protein pengangkut (hemoglobin, lipoprotein plasma), dan protein kontraktil seperti aktin dan tubulin (Murray, Granner, Mayes, & Rodwell, 2003).

Protein diklasifikasikan dalam 2 tipe utama berdasarkan komposisinya, yakni protein sederhana, seperti serum albumin darah, yang hanya menghasilkan asam amino jika terhidrolisis dan protein terkonjugasi, menghasilkan substansi lain selain asam amino jika terhidrolisis. Protein terkonjugasi diklasifikasikan lagi sesuai kandungan non-asam aminonya, seperti glikoprotein yang mengandung karbohidrat, lipoprotein yang mengandung bagian berlemak, nukleoprotein yang mengandung bagian asam nukleat. Saat mendeskripsikan struktur protein, para ahli kimia membagi empat tingkatan berbeda, yaitu struktur primer, sekunder, tersier, dan kuartener (Mc Murry, 1992). Protein tersusun dari dua elemen struktur sekunder utama, heliks dan *sheet*, dimana bersama dengan *loop*, tersusun bersama membentuk struktur super-sekunder dan tersier (Seshasayee, 2005).

1. Struktur Primer

Struktur protein yang paling sederhana disebut struktur primer, yaitu sekuens dari residu asam amino terikat bersama (Mc Murry, 1992). Struktur primer rantai polipeptida sebuah protein adalah susunan bagaimana asam-asam amino disatukan oleh ikatan peptida dan mencakup lokasi setiap ikatan disulfida (Murray, Granner, Mayes, & Rodwell, 2003).

2. Struktur Sekunder

Struktur sekunder protein mencakup konformasi regular berupa heliks- α , lembaran- β dan tekukan- β (β -*bend*), dan konformasi ireguler yang disebut gelung (*loop*) dan kumparan (*coil*) (Gambar 2.1). Heliks- α merupakan struktur berbentuk spiral dengan rantai utama (*backbone*) melingkar mengelilingi suatu axis dari molekul protein, dan rantai samping (gugus R) yang menghadap ke arah luar sumbu heliks untuk meminimalkan gangguan sterik. Permukaan lembaran- β rantai utama polipeptida meluas berstruktur zigzag menyerupai bentuk lipatan sehingga seringkali disebut lembaran terlipat (*pleated sheet*). Adanya struktur tekukan- β mengubah arah dari suatu rantai polipeptida. Tekukan- β dibentuk oleh 4 asam amino, diantaranya prolin atau glisin. Gelungan atau kumparan tersusun secara tidak teratur dan umumnya berperan sebagai tempat interaksi ligan. Konformasi pada struktur sekunder ini distabilkan oleh interaksi non-kovalen diantaranya ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, interaksi elektrostatik, dan interaksi Van der Waals (Murray, Granner, Mayes, & Rodwell, 2003; Bruice, 2004).

3. Struktur Tersier

Struktur tersier merujuk pada keseluruhan konformasi tiga dimensi dari suatu polipeptida (Gambar 2.1). Struktur tersier menggambarkan posisi struktur sekunder dalam membentuk suatu domain dan hubungan antara domain-domain yang terbentuk. Domain adalah bagian dari struktur protein yang dapat melakukan aktivitas tertentu secara fisika atau kimia, misalnya pengikatan ligan (Murray, Granner, Mayes, & Rodwell, 2003).

Sebagian besar struktur tersier protein ditentukan dengan kristalografi sinar-x. Kristal pertama yang ditemukan adalah mioglobin (1957). Hingga kini, ribuan Kristal lainnya telah ditentukan, didepositkan dalam format koordinat

kristalografi, dan secara bebas dapat diakses di Protein Data Bank (PDB) (Carey, 2000).

4. Struktur Kuartener

Struktur kuartener menggambarkan komposisi rantai polipeptida dari protein oligomerik dan hubungan spasial antara subunit-subunit protein tersebut. Rantai polipeptida penyusun protein oligomerik dapat berupa rantai yang sama (homo) atau berbeda (hetero) (Seshasayee, 2005).

2.2 Reseptor

Reseptor adalah suatu makromolekul jaringan sel hidup yang mengandung gugus fungsional atau atom-atom terorganisasi, reaktif secara kimia dan bersifat spesifik, dapat berinteraksi secara reversibel dengan molekul obat yang mengandung gugus fungsi spesifik dan menghasilkan respon biologis yang spesifik pula. Untuk dapat berinteraksi dengan reseptor spesifik, molekul obat harus mempunyai faktor sterik dan distribusi muatan yang spesifik pula (Harmita, Harahap & Hayun, 2006). Kebanyakan obat berikatan dengan reseptor, kemudian obat-obatan tersebut memulai serangkaian reaksi biokimia yang mengubah fisiologi sel. Reseptor umumnya berupa protein atau glikoprotein yang ada pada permukaan sel, pada organel di dalam sel atau dalam sitoplasma. Reseptor obat merupakan makromolekul fungsional yang mencakup 2 konsep penting, yaitu obat dapat mengubah kecepatan kegiatan faal tubuh dan obat tidak menimbulkan suatu fungsi baru, tetapi hanya memodulasi fungsi yang sudah ada.

Setiap komponen makromolekul fungsional dapat berperan sebagai reseptor obat, tetapi sekelompok sekelompok reseptor obat tertentu juga berperan sebagai reseptor untuk ligan endogen seperti hormon dan neurotransmitter. Substansi yang efeknya menyerupai senyawa endogen disebut agonis, sedangkan senyawa yang tidak mempunyai aktivitas intrinsik tetapi menghambat secara kompetitif efek suatu agonis di tempat ikatan agonis (*agonist binding site*) disebut antagonis (Ganiswarna, 1995). Berdasarkan respon farmakologi maksimum yang terjadi bila semua reseptor telah digunakan, maka agonis dibagi dalam 2 kelas, yaitu agonis parsial, yang menghasilkan respon maksimum lebih rendah pada penggunaan semua reseptor, dibandingkan agonis penuh (Harmita & Radji, 2005).

Universitas Indonesia

Ikatan obat dengan reseptor dapat berupa ikatan ion, hidrogen, hidrofobik, van der Waals, atau kovalen, tetapi umumnya merupakan campuran berbagai ikatan di atas (Tabel 2.1). Ikatan kovalen merupakan ikatan yang kuat sehingga lama kerja obat seringkali panjang. Meski demikian, ikatan non kovalen yang afinitasnya tinggi juga dapat bersifat permanen (Ganiswarna, 1995). Semakin besar energi interaksi obat reseptor yang diperlukan, semakin kuat ikatan yang terbentuk. Berikut ini adalah jenis interaksi obat–reseptor dan energi yang menyertainya (Tabel 2.1).

Tabel 2.1. Beberapa jenis interaksi obat–reseptor

Jenis Ikatan	Energi Antaraksi (kkal/mol)
Ikatan Kovalen	-(170 - 460)
Ikatan Ionik Diperkuat	-10
Ikatan Ionik	-20
Ikatan Ion – Dipol	-(4 - 30)
Ikatan Dipol – dipol	-(4 - 30)
Ikatan Hidrogen	-(4 - 30)
Alih Muatan	-(4 - 30)
Antaraksi Hidrofobik	-4
Antaraksi Van der Waals	-(2 - 4)

[Sumber: Harmita, Harahap & Hayun, 2006]

Langley dan Ehrlich pertama kali mengemukakan bahwa kerja obat diperantarai oleh reseptor kimia. Tahun 1933, Clark mengembangkan teori dosis-respon yang menyatakan bahwa peningkatan respon terhadap obat bergantung pada peningkatan ikatan obat dengan reseptor. Pada tahun 1956, Stephenson menyajikan teori respon dosis yang telah dimodifikasi, yaitu respon obat bergantung pada afinitas obat terhadap reseptornya, maupun pada kemanjuran obat (Olson).

2.3 Inhibisi Enzim (Harmita, Harahap & Hayun, 2006)

Inhibisi enzim oleh obat dapat bersifat reversibel dan ireversibel dengan dua tipe inhibisi, yaitu inhibisi kompetitif dan non kompetitif. Disebut inhibisi

kompetitif apabila obat membentuk kompleks dengan enzim atau enzim substrat dengan kemudahan yang sama, tetapi pada sisi yang berbeda dengan sisi untuk substrat. Inhibisi non kompetitif dapat dikaitkan dengan inhibisi allosterik.

Enzim dapat dihambat oleh inhibitor allosterik, suatu senyawa kimia yang strukturnya tidak mirip dengan substrat. Aksinya dapat berkompetisi langsung dengan senyawa aktivator. Adanya inhibitor allosterik menyebabkan perubahan konformasi permukaan aktif, sehingga menurunkan afinitas substrat dengan permukaan katalitik.

Inhibitor allosterik berikatan dengan enzim pada tempat di luar bagian aktif enzim sehingga hambatan ini tidak bisa diatasi dengan penambahan substrat dalam jumlah besar. Terbentuknya ikatan antara enzim dengan inhibitor mempengaruhi konformasi enzim sehingga bagian aktif mengalami perubahan bentuk. Akibatnya adalah penggabungan substrat pada bagian aktif enzim terhambat. Hambatan allosterik ini dapat diakibatkan oleh hasil akhir dari serangkaian reaksi kimia. Inhibisi allosterik disebut inhibisi umpan balik atau inhibisi produk akhir.

2.4 Ikatan (Fessenden & Fessenden, 1986)

Atom dapat terikat menjadi molekul dengan berbagai cara karena memiliki struktur elektron berbeda-beda. G. N. Lewis dan W. Kossel (1916) mengemukakan teori mengenai ikatan ion dan ikatan kovalen. Ikatan ion dihasilkan dari perpindahan elektron dari satu atom ke atom yang lain. Ikatan kovalen dihasilkan dari penggunaan sepasang elektron secara bersama-sama oleh dua atom. Tiap ikatan memiliki panjang dan sudut ikatan. Jarak yang memisahkan inti dari dua atom yang terikat kovalen disebut panjang ikatan. Panjang ikatan kovalen dapat ditentukan secara eksperimental dan memiliki selang harga dari 0,74 Å hingga 2Å. Bila ada lebih dari dua atom dalam molekul, ikatan membentuk sudut yang disebut sudut ikatan. Sudut ikatan bervariasi dari kira-kira 60° hingga 180°.

Kecuali dalam gas yang terdispersi, molekul saling tarik-menarik dan tolak menolak, terutama timbul dari antaraksi dipol-dipol, yaitu tarik-menarik antara muatan yang berlainan tanda dan tolak-menolak antara muatan yang sama tanda.

Disebut gaya London, jika molekul non polar saling ditarik oleh antaraksi dipol-dipol yang lemah. Gaya ini timbul dari dipol yang diinduksi dalam satu molekul oleh molekul yang lain. Antaraksi berbagai dipol-dipol (tarikan dan tolakan) secara kolektif disebut gaya Van der Waals. Jarak antar molekul memiliki pengaruh penting terhadap gaya ini. Jarak dimana gaya adalah terbesar disebut jari-jari Van der Waals. Bila dua atom saling mendekat lebih dekat dari jari-jari Van der Waals, timbul tolakan antara kedua inti dan antara kedua perangkat elektron. Bila jarak antara kedua molekul menjadi lebih besar dari jari-jari Van der Waals, gaya tarik antara kedua molekul berkurang.

Jenis antaraksi dipol-dipol yang teristimewa kuat terjadi antara molekul yang mengandung atom hidrogen yang terikat kuat pada nitrogen, oksigen atau fluor. Atom hidrogen yang parsial positif dari satu molekul ditarik oleh pasangan elektron sunyi dari atom suatu molekul lain yang elektronegatif. Tarikan ini disebut ikatan hidrogen.

2.5 Interaksi Ligan-Reseptor (Schneider & Baringhaus, 2008)

Secara termodinamika, interaksi ligan dengan reseptor dapat terjadi apabila kompleks ligan-reseptor yang dihasilkan memiliki energi yang lebih rendah. Perubahan energi bebas (ΔG) yang menyertai interaksi ligan dengan reseptor didefinisikan melalui persamaan Gibbs:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Berdasarkan persamaan tersebut, perubahan energi bebas dipengaruhi oleh perubahan entalpi (ΔH) dan perubahan entropi (ΔS). Perubahan entalpi mengacu pada gaya molekuler yang terlibat dalam interaksi ligan-reseptor, seperti ikatan hidrogen, interaksi ionik (polar), interaksi aromatik, dan interaksi van der Waals, sedangkan perubahan entropi terkait dengan perubahan derajat bebas dari suatu sistem molekuler. Tanda negatif untuk perubahan entropi menunjukkan bahwa interaksi ligan dengan reseptor cenderung disertai peningkatan entropi. Penurunan derajat bebas molekul ligan dan reseptor pada saat berinteraksi menyebabkan penurunan entropi, tetapi penurunan entropi ini dikompensasi oleh peningkatan entropi yang disebabkan peningkatan derajat bebas molekul air yang terlepas dari permukaan ligan dan reseptor pada saat ligan dan reseptor berinteraksi.

Konstanta disosiasi (K_d) atau lebih dikenal sebagai konstanta inhibisi (K_i) dari suatu ligan terhadap suatu makromolekul umumnya ditentukan melalui *biochemical competition assays*. K_i ini diperkirakan dari konstanta disosiasi ligan referensi (K_d^{ref}) dan konsentrasi ligan yang diperlukan untuk menyebabkan 50% ligan referensi terlepas dari ikatannya dengan makromolekul (IC_{50}) melalui persamaan Cheng-Prusoff:

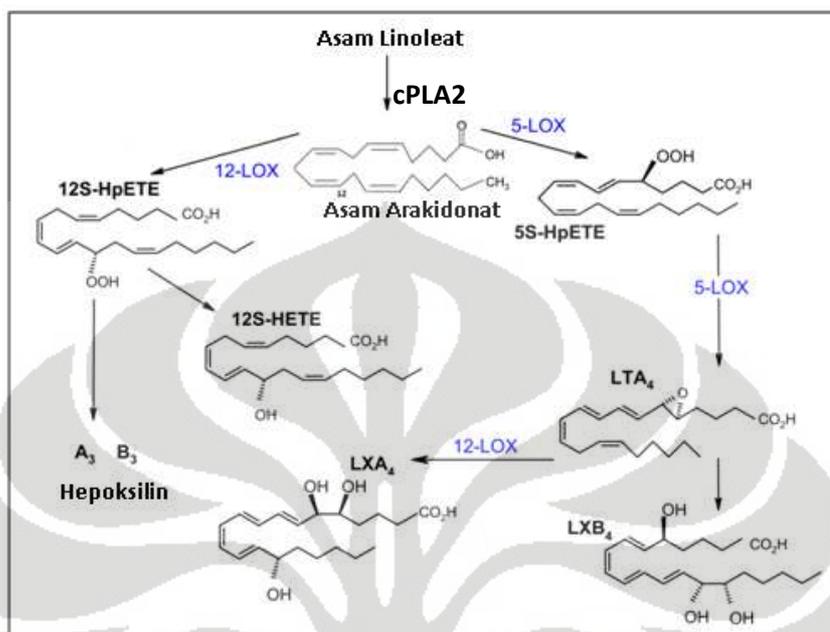
$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[Ligan\ ref]}{K_d^{ref}}}$$

Interaksi ligan-reseptor untuk tujuan modeling umumnya membedakan jenis-jenis interaksi ke dalam beberapa kategori seperti elektrostatis, van der Waals, ikatan hidrogen, lipofilik, aromatik, dan polar. Ikatan hidrogen yang terjadi antara protein dengan ligan umumnya memiliki jarak rata-rata 3 Å dan jumlah ikatan hidrogen yang terbentuk tidak menunjukkan korelasi langsung dengan nilai K_i karena adanya perbedaan kekuatan ikatan hidrogen yang bergantung pada jenis atom yang berinteraksi dan geometri ikatan hidrogen. Interaksi kation dengan muatan parsial negatif dikenal dengan interaksi kation- π dan interaksi ini umumnya terjadi antara kation dan elektron π yang terdelokalisasi pada cincin aromatik. Cincin aromatik umumnya memiliki muatan parsial negatif pada daerah tengah cincin dan muatan parsial positif pada tepi cincin sehingga dua cincin aromatik dapat berinteraksi melalui interaksi aromatik. Gugus alifatik juga dapat membentuk interaksi hidrofobik dan jarak interaksi dari interaksi hidrofobik dapat mencapai 6 Å. Interaksi hidrofobik merupakan jenis interaksi yang penting untuk pengikatan inhibitor tetapi tidak terlalu berperan dalam pengenalan ligan secara selektif.

2.6 12-Lipoksigenase

Lipoksigenase (LOX) merupakan enzim anggota kelas dioksigenase yang membentuk hidroperoksi asam lemak dengan konfigurasi posisi dan stereo yang berbeda. Sesuai dengan nomenklatur yang kini digunakan, LOX diklasifikasikan dengan mempertimbangkan spesifisitas posisi oksigenasi asam arakidonat. LOX ditemukan pada tahun 1974, diketahui terdapat dalam tiga isoform berdasarkan distribusinya dalam jaringan yaitu tipe platelet, tipe leukosit dan tipe epitel. Pada

sel manusia, secara umum terdapat empat tipe lipoksigenase, yaitu 5-LOX, 12-LOX, 15-LOX-1, dan 15-LOX-2.



[Sumber: Hyde & Missailidis, 2009 “telah diolah kembali”]

Gambar 2.2. Diagram alir metabolisme asam arakidonat pada jalur 12-LOX disertai struktur kimianya

LOX mengkatalisis reaksi konversi asam arakidonat dan asam lemak poli-tak jenuh ganda lainnya menjadi turunan hidroksiperoksida. Senyawa-senyawa ini antara lain adalah asam hidroperoksieikosatetraenoat (HpETE), asam hidroksieikosatetraenoat (HETE), leukotrien (LTs), lipoksin, dan hepoksilin (Gambar 2.2). Secara kolektif, LOX mengkatalisis dioksidasi asam arakidonat menjadi HpETE yang kemudian dikonversi menjadi HETE, mendorong pembentukan LHs, lipoksin, dan hepoksilin (Coffa & Alan, 2004; Roome, 2007; Hyde & Missailidis, 2009; Roome, 2007).

Sintesis berkenaan dengan LOX ini dimulai dengan hidrolisis asam arakidonat (AA) dari fosfolipid oleh fosfolipase sistolik A₂ (cPLA2). Kemudian, 12/15-lipoksigenase (12-LOX) mengkonversi asam arakidonat menjadi 12S-HETE. Sebagai alternatif, 5-lipoksigenase (5-LOX) berinteraksi dengan protein pengaktivasi 5-lipoksigenase, mendorong konversi asam arakidonat menjadi leukotrien (LT) A₄. Leukotrien A₄ dapat dimetabolisme lebih lanjut, baik oleh leukotrien A₄ hidrolase untuk menghasilkan leukotrien B₄, maupun oleh

leukotrien C₄ sintase untuk memproduksi leukotrien C₄. Leukotrien C₄ dimetabolisme lebih lanjut menjadi sistenil leukotrien lainnya, yaitu leukotrien D₄ dan E₄. Leukotrien memainkan peranan penting dalam proses anti inflamasi. Eikosanoid sebagai hasil dioksigenasi asam arakidonat, diketahui penting dalam patogenesis keadaan inflamasi kronik seperti asma, arthritis, dan kolitis.

Pada stimulasi kanal ion kalsium A23187, 12-LOX melintasi membran sel, kemudian berikatan dengan substrat dan mengkatalisis reaksi dengan menggabungkan molekul oksigen pada atom C-12. Penggabungan ini menghasilkan metabolit asam-12S-hidroksi-5,8,10,14-eikosatetraenoat (12(S)-HPETE) yang kemudian dikonversi menjadi 12-HETE (Roome, 2007). 12S-HETE berperan pada berbagai macam proses biologik, termasuk oksidasi LDL pada arterogenesis, pertumbuhan sel kanker dan apoptosis neuron setelah stress oksidatif. 12S-HETE memiliki efek proinflamasi seperti kemotaksis dan regulasi pelekatan leukosit (Hyde & Missailidis, 2009).

12-LOX tipe platelet dan 12-HETE menaikkan pertumbuhan sel maligna, proliferasi, dan angiogenesis. Over ekspresi 12-LOX dan peningkatan level 12-HETE telah diamati pada berbagai macam tipe kanker termasuk kanker mulut, payudara, prostat, dan saluran cerna. 12-HETE mengatur agragasi platelet dan neurotransmisi. Ia merupakan kemotaktik poten dan agen kemokinetik, dengan demikian ia terlibat dalam permulaan inflamasi. Kenaikan level 12-HETE juga berhubungan dengan penyakit inflamasi dan imun seperti inflamasi saluran cerna dan psoriasis (Roome, 2007).

Struktur kristal 12-LOX merupakan sebuah unit asimetrik yang terdiri dari dua unit monomer serupa, dengan atom besi pada tiap monomer. Pada N-terminal terdapat 8 *loop* antiparalel β -*barrel* dan pada C-terminal membentuk daerah katalitik enzim dan terdapat 4 *loop* antiparalel β -*sheet*. Dua buah struktur heliks yang panjang terletak berseberangan di atas daerah situs aktif dari 12-LOX. Dalam heliks tersebut terdapat residu-residu asam amino yang penting dalam hal pengikatan pada daerah sisi aktif.

Beberapa residu asam amino histidin berada pada posisi 360, 365, 425, dan 540 berperan penting terhadap pengikatan Fe. Masing-masing residu histidin ini berperan penting sebagai agen pengkhelat atom besi. Daerah sekitar pengikatan

ini merupakan daerah situs aktif 12-LOX yang dijaga oleh struktur α heliks α -1. Struktur ini terdiri dari residu asam amino ke-181 hingga 196. Adanya residu isoleusin di sekitar daerah situs aktif berperan penting dalam menjaga ukuran rongga dari daerah situs aktif 12-LOX. Rongga tersebut merupakan pusat dari terjadinya reaksi oksigenasi dan pengikatan substrat (Khana, et al., 2003).

2.7 Inhibisi Lipoksigenase

Inhibisi LOX dapat dilakukan oleh antioksidan, alkaloid benzoisokuinolin, sebaik protoberberin, alkaloid aporfin, dan agen peroksidase (Rackova, Marek, Daniela, Viktor, & Lydia, 2007; Hyde & Missailidis, 2009). Inhibisi oleh antioksidan dapat tercapai dengan khelasi Fe non-heme yang terikat pada LOX atau oleh reduksi bentuk feri, dimana terjadi semacam inhibisi kompetitif. Akan tetapi, inhibisi non-kompetitif atau inhibisi campuran kompetitif/non-kompetitif LOX juga terjadi pada tokoferil asetat atau β -karoten.

Sifat inhibisi LOX diuji pada arakidonat-12-LOX yang telah dimurnikan dari fraksi sitosol paru-paru tikus. 12-HETE, merupakan mediator poten inflamasi dan salah satu regulator kesehatan pembuluh paru-paru, dan produksinya meningkat selama cedera pembuluh paru-paru. Hasilnya meliputi sejumlah kejadian biologik seperti inflamasi. 12-HETE terlibat dalam perkembangan arthritis rematik, psoriasis, respon asma, dan nefritis glomerular (Coffa & Alan, 2004).

LOX memiliki kesamaan tipe pelipatan protein. Meski demikian, interaksi molekular LOX bervariasi pada enzim yang satu dengan enzim lainnya. Mekanisme pembedanya terletak pada ukuran, bentuk, dan mode interaksi kesatuan katalitik dari saluran pengikatan substratnya. Substrat LOX dipercaya berikatan dengan protein melalui elektron π , muatan, dan interaksi hidrofobik. Dalam keadaan khusus, diduga bahwa terdapat ikatan rangkap pada C_{11} yang terkandung dalam asam arakidonat yang berperan dalam interaksi π - π dalam saluran pengikatan substrat (Hyde & Missailidis, 2009).

2.8 Inflamasi

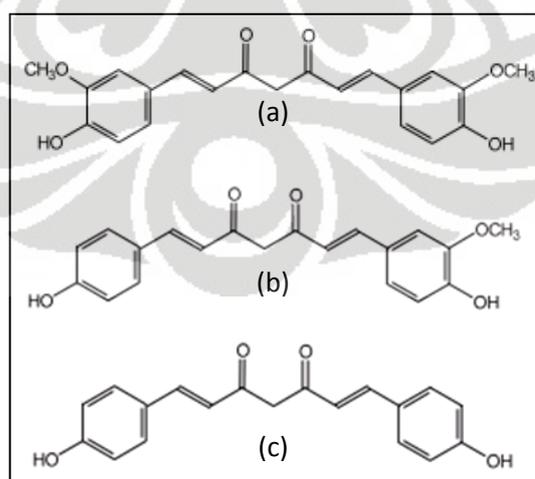
Inflamasi berasal dari bahasa latin, *inflamme* yang artinya terbakar. Inflamasi merupakan proses terpenting dalam pertahanan organisme melawan cedera lokal

dan infeksi. Inflamasi dapat berkembang menjadi nyeri atau penyakit kronik berbahaya sehingga memerlukan pengobatan secara farmakologi. Inflamasi kronik dapat menambah perkembangan bermacam penyakit termasuk kanker, kardiovaskuler, dan gangguan neurodegeneratif (Roome, 2007).

Fenomena inflamasi meliputi kerusakan mikrovaskuler, meningkatnya permeabilitas kapiler, dan migrasi leukosit ke jaringan radang. Gejala inflamasi yang sudah dikenal adalah kalor, rubor, tumor, dolor, dan *fuctio laesa*. Selama proses inflamasi berlangsung, banyak mediator kimiawi dilepaskan secara lokal, antara lain histamin, 5-hidroksitriptamin (5-HT), faktor kemotaktik, bradikinin, leukotrien, dan prostaglandin (PG) (Ganiswarna, 1995).

2.9 Kurkumin

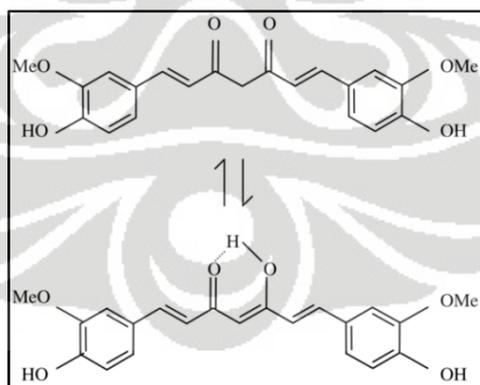
Kurkumin merupakan konstituen kimia berupa pigmen kuning yang terkandung dalam rimpang tanaman *Curcuma xanthorrhizae* (temulawak) dan juga *Curcuma longa*. Pada *Curcuma xanthorrhizae* terkandung 1,2-2% kurkumin dan monodemetoksikurkumin, sedangkan pada *Curcuma longa* terkandung 3-4% kurkumin, monodemetoksikurkumin / demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin (Gambar 2.3). Kurkumin relatif tak larut air, tetapi larut dalam aseton, dimetil sulfoksida dan etanol. Kurkumin mutu komersial mengandung demetoksikurkumin (BM 338, sejumlah 10-20%), dan bisdemetoksikurkumin (BM 308, sejumlah kurang dari 5%).



Gambar 2.3. Struktur (a) kurkumin (1,7 bis (4-hidroksi-3-metoksifenil) 1,6-heptadien-3,5-dion); (b) demetoksikurkumin; dan (c) bisdemetoksikurkumin

Kurkumin beraksi sebagai antioksidan melawan radikal aktif oksigen, juga menunjukkan efek antiinflamasi yang ekivalen dengan beberapa OAINS pada model inflamasi akut dan setengah poten pada inflamasi kronik. Ia menghambat lipoksigenase, sikloksigenase juga pembentukan leukotrien dan prostaglandin, menghambat produksi radikal peroksinitrit dan nitrit pendorong inflamasi, juga menghambat ekspresi gen pendorong inflamasi (Wiryo Widagdo, 2000).

Kurkumin dapat mengalami tautomerisasi dari bentuk keto menjadi bentuk enol, dan sebaliknya. Dalam pH netral maupun asam (pH kurang dari 7), kurkumin terdapat dalam bentuk keto, sedangkan dalam pH di atas 8 berbentuk senyawa enol. Pada pH 3–7, kurkumin berperan sebagai donor atom H yang luar biasa poten. Ini disebabkan pada kurkumin bentuk keto, sambungan heptadienon antara dua cincin metoksifenol mengandung atom karbon yang sangat aktif, dan ikatan-ikatan C-H pada karbon ini sangat lemah karena delokalisasi elektron tak berpasangan pada oksigen-oksigen yang berdekatan (Gambar 2.4). Sebaliknya, dibawah pH 8, bentuk enolat dari rantai heptadienon lebih menonjol, dan kurkumin berperan utama sebagai donor elektron, sebuah mekanisme yang lebih khas untuk aktivitas antioksidan golongan fenol. Bentuk bis-keto dari kurkumin banyak terdapat pada larutan asam encer, larutan netral, dan membran sel. Meskipun demikian, ia terdapat dalam kondisi setimbang dengan bentuk tautomernya berupa senyawa bis-enol (Sharma, Gescher, & Steward, 2005).



[Sumber: Sharma, Gescher, & Steward, 2005]

Gambar 2.4. Tautomerisasi senyawa kurkumin

Beberapa sumber menghubungkan aktivitas antiinflamasi kurkumin dengan adanya gugus hidroksil dan fenol pada molekulnya penting dalam menghambat prostaglandin dan leukotrien. Di sisi lain, sumber lainnya mengatakan aksi

antiinflamasi kurkumin berhubungan dengan adanya sistem β -dikarbonil yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi (dien). Adanya sistem dien diketon memberikan sifat lipofil pada senyawa (Araujo & Leon, 2001).

Gugus o-metoksi dapat mempengaruhi densitas elektron gugus diketo sehingga dapat mempengaruhi kemampuan khelasi senyawa tersebut. Hidrogenase dari heptadien pada kurkumin sehingga terbentuk tetrahidrokurkumin akan menurunkan aktivitas antiinflamasi secara signifikan. Bagian hidroksifenil pada kurkumin memberi aktivitas antiinflamasi karena asilasi dan alkilasi gugus hidroksifenolik diketahui dapat secara drastis menurunkan aktivitas antiinflamasi.

Beberapa studi sifat antiinflamasi dari kurkuminoid secara *in vitro* dan *in vivo* telah dilaporkan. Kurkumin dan demetoksikurkumin memiliki potensi yang hampir sama dalam menghambat 12-O-tetradekanoilforbol-13-asetat (TPA) yang menginduksi inflamasi pada telinga tikus, dibandingkan dengan bisdemetoksikurkumin.

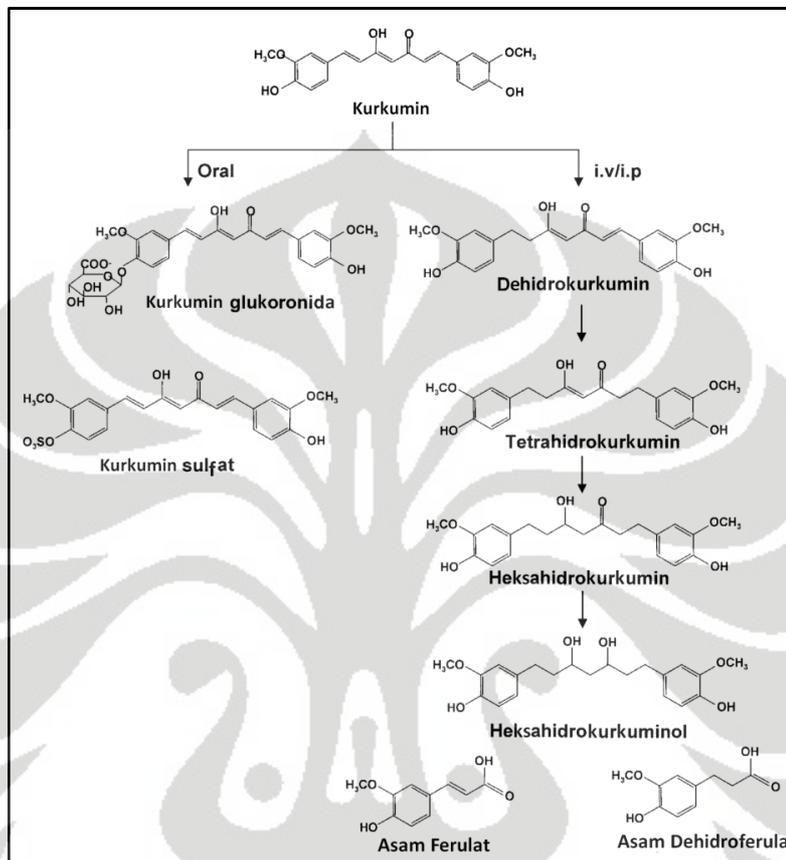
Tabel 2.2. Distribusi kurkumin pada serum dan jaringan setelah pemberian oral pada manusia

Dosis	Plasma/jaringan	Level
2 g/kg	Serum	$0,006 \pm 0,005 \mu\text{g/mL}$
4-8 g	Serum	0,4 – 3,6 μM
10 g	Serum	50,5 ng/m
12 g	Serum	51,2 ng/mL
3,6 g	Plasma	$11,1 \pm 0,6 \text{ nmol/mL}$
0,4 – 3,6 g	kolorektum	7 – 20 nmol/g

[Sumber: Anand, Kunnumakkara, Newman, & Aggarwal, 2007 “telah diolah kembali”]

Beberapa studi mengenai distribusi kurkumin di jaringan dapat dilihat pada tabel 2.2. Kurkumin memiliki absorpsi yang buruk dan dimetabolisme dengan cepat. Studi klinis fase I dengan 15 pasien dan kurkumin dengan pemberian oral dengan dosis 36 - 180 mg kurkumin per hari yang diberikan selama 4 bulan menunjukkan tidak ditemukan adanya kurkumin dan metabolitnya di sampel urin. Waktu paruh absorpsi dan eliminasi kurkumin pada tikus dari dosis 2 g/kg

dilaporkan $0,31 \pm 0,07$ jam dan $1,7 \pm 0,5$ jam. Pada manusia, uji dengan konsumsi oral dengan dosis kurkumin 3,6 g per hari tidak dapat diukur karena level serum kurkumin dan konjugat sulfat maupun glukoronida dari kurkumin berada dibawah limit deteksi (5 pmol/mL).



[Sumber: Anand, Kunnumakkara, Newman, & Aggarwal, 2007 “telah diolah kembali”]

Gambar 2.5. Struktur kurkumin dan metabolitnya

Kurkumin mengalami konjugasi melalui proses sulfatasi dan glukoronidasi pada berbagai jaringan, terutama pada hati (Gambar 2.5). Holder *et al.* melaporkan dari studi pada tikus bahwa metabolit mayor kurkumin oleh empedu adalah tetrahidrokurkumin, sedangkan metabolit minornya adalah asam dehidroferulat bersama dengan sejumlah kecil asam ferulat. Sebagai tambahan, konjugat glukoronida ditemukan dalam jumlah kecil pada urin. Hidrolisis dari sampel plasma yang mengandung konjugat glukoronida oleh Pan *et al.* menunjukkan bahwa 99% kurkumin pada plasma terdapat dalam bentuk glukoronida. Kurkumin sulfat dan kurkumin glukoronida diidentifikasi pada jaringan kolorektal dari pasien kanker kolorektal yang diberi kapsul kurkumin.

Kurkumin juga direduksi secara luas, kemungkinan besar melalui alkohol dehidrogenase diikuti dengan reaksi konjugasi (Anand, et al., 2008).

2.10 Bioinformatika

Bioinformatika, sesuai dengan asal katanya yaitu “bio” dan “informatika”, adalah gabungan antara ilmu biologi dan ilmu teknik informasi (TI). Pada umumnya, Bioinformatika didefinisikan sebagai aplikasi dari alat komputasi dan analisa untuk menangkap dan menginterpretasikan data-data biologi. Ilmu ini merupakan ilmu baru yang mencakup berbagai disiplin ilmu termasuk ilmu komputer, matematika dan fisika, biologi, dan ilmu kedokteran, dimana semuanya saling menunjang dan saling bermanfaat satu sama lainnya.

Ilmu bioinformatika lahir atas inisiatif para ahli ilmu komputer berdasarkan kecerdasan artifisial. Mereka berpikir bahwa semua gejala yang ada di alam ini bisa dibuat secara artifisial melalui simulasi dari gejala-gejala tersebut. Untuk mewujudkan hal ini diperlukan data-data yang menjadi kunci penentu tindak-tanduk gejala alam tersebut, yaitu gen yang meliputi DNA atau RNA. Perangkat utama bioinformatika adalah program perangkat lunak (*software*) dan didukung oleh kesediaan internet.

Dalam bidang pengobatan, bioinformatika berguna dalam mengelola data-data klinis pasien melalui *Electrical Medical Record* (EMR), mengidentifikasi atau mendiagnosis penyakit baru melalui analisis genom dan sekuens, juga menemukan obat baru melalui teknik pemodelan homologi maupun penambatan molekuler.

Walaupun senyawa yang berinteraksi dan menekan fungsi suatu enzim dapat diperkirakan dengan sarana bioinformatika, hasilnya harus dikonfirmasi melalui eksperimen di laboratorium. Namun dengan bioinformatika, semua proses ini bisa dilakukan lebih cepat sehingga lebih efisien baik dari segi waktu maupun finansial (Utama, 2003).

2.11 Pemodelan Homologi

Pemodelan homologi adalah pembuatan model struktur berdasarkan perbandingan sekuens homolog antara protein target dengan cetakan protein lain

yang telah diketahui struktur tiga dimensinya. Dasar metode ini adalah kesamaan pelipatan antara dua protein yang berkembang dari protein yang memiliki keturunan yang sama. Pelipatan lebih kekal melewati evolusi dibandingkan sekuens. Kualitas model yang dihasilkan bergantung pada persamaan residu antar protein homolog, yaitu protein yang memiliki kesamaan sekuens. Untuk menghasilkan model terbaik dibutuhkan kesamaan antar sekuens target dengan cetakan lebih dari 30%. Protein dengan persamaan residu relatif lebih besar dapat menghasilkan model dengan RMSD kurang dari 1 Å (Sanchez & Sali, 1997).

2.12 Penambatan Molekuler (*Docking*)

Proses pencarian ligan yang dapat cocok pada sisi aktif (*binding site*) protein, baik secara geometrik maupun dengan energi, secara komputasional disebut penambatan molekuler (Utama, 2003). Proses penambatan molekuler ini memiliki kelemahan dimana terbatas pada molekul yang kaku (*rigid*), sedangkan molekul tersebut, yaitu protein, bersifat fleksibel. Kebanyakan metode penambatan molekuler yang dipakai pada akademik dan riset industri saat ini, mengasumsikan bahwa protein bersifat kaku. Metodologi tersebut digunakan pada program-program seperti Autodock, Dock, dan FlexX.

Autodock menggunakan model kinematika untuk ligan dimana ligan tersebut mulai proses pencarian secara acak diluar *binding site* dan dengan menyelidiki nilai translasi, rotasi dan derajat bebas internal, hingga secepatnya mencapai konformasi tertuju. Metode penambatan molekuler kini mengikuti asumsi bahwa struktur protein merupakan kesatuan yang kaku dan adanya ligan dapat mengubah struktur tiga dimensi dari protein tersebut selama proses pengikatan untuk menemukan ruang (*spatial*) terbaik dan kecocokan energi pada sisi pengikatan protein. Asumsi ini mengikuti model pengikatan *lock-and-key* yang pertama kali diusulkan oleh Fischer (Teodoro, Jr., & Kavraki, 2001).

Deskripsi mekanisme interaksi antara protein dan ligannya diberikan oleh Koshland pada tahun 1958 dengan model sesuai bentuk (*induced-fit*). Pada model ini, baik protein dan ligannya bersifat fleksibel. Saat protein dan ligan berinteraksi membentuk kompleks, kedua struktur tersebut mengubah konformasinya

membentuk energi minimum yang *perfect-fit* (Toledo, Masgrau, Marechal, Lluch, & Lafont, 2010).

2.13 Dinamika Molekuler

Pemahaman terhadap hubungan antara struktur tiga dimensi dinamika suatu protein sangatlah penting dalam rangka memahami cara kerja suatu protein. Namun, eksperimen lebih mendalam terhadap dinamika protein cukup sulit dilakukan secara nyata. Oleh karenanya dikembangkan simulasi dinamika molekuler sebagai metode eksperimen virtual yang dapat menganalisis hubungan antara struktur dan dinamika protein dengan melibatkan eksplorasi terhadap energi konformasi molekul protein bersangkutan. Dinamika molekuler merupakan perhitungan pergerakan atom dalam sistem molekuler menggunakan mekanika molekuler yang menunjukkan struktur molekuler, pergerakan dan fungsi suatu molekul. Dinamika suatu molekul protein dipengaruhi oleh struktur protein dan merupakan elemen penting dari fungsi khusus maupun umum protein tersebut.

Dinamika molekuler merupakan teknik simulasi yang menyelesaikan persamaan pergerakan Newton pada sistem atomik: $F_i = m_i a_i$, dimana F adalah gaya, m adalah massa dan a adalah percepatan. Gaya pada tiap atom dikalkulasi dari perubahan energi potensial (pada umumnya berdasarkan hubungan mekanika molekuler) diantara posisi saat ini dan posisi baru: $F_i = -(dE/r_i)$, dimana r adalah jarak. Gaya atom dan massa kemudian dipakai untuk menentukan posisi atom daripada seri irama waktu yang sangat kecil: $F_i = m_i (d^2r/dt^2)$, dimana t adalah waktu. Ini memberikan perubahan trayek posisi atom terhadap waktu. Singkatnya akan lebih mudah untuk menentukan posisi atom bergantung waktu dengan menghitung percepatan a_i dari gaya dan massa, lalu kecepatan v_i dari $a = dv/dt$ dan akhirnya, menentukan posisi dari $v_i = dr/dt$ (Kitchen, Decornez, Furr, & Bajorath, 2004).

Simulasi dinamika molekuler terhadap protein pertama kali dilaporkan pada tahun 1977 dan terdiri dari lintasan 9,2 ps untuk protein kecil dalam ruang vakum. Sebelas tahun kemudian dilaporkan simulasi protein yang sama selama 210 ps dan dilakukan dalam air. Perbaikan signifikan pada fungsi potensial berdampak simulasi menjadi makin stabil dan akurat.

Hingga kini, perkembangan terhadap simulasi dinamika molekuler terus berlanjut. Simulasi dinamika molekuler secara luas digunakan untuk memperoleh informasi mengenai pergerakan serta perubahan konformasi struktur suatu protein maupun makromolekul biologis lainnya tiap satuan waktu. Melalui simulasi dinamika molekuler ini pula, informasi kinetika dan termodinamika suatu protein dapat ditelusuri (Karplus & Kuriyan, 2005).

Jika model tiga dimensi (dengan konformasi tertentu atau konfomer) yang didapat belum mencapai kondisi stabil (energi besar) perlu dilakukan minimisasi energi. Pada suatu fase dimana konfomer masih memiliki energi yang tinggi, pendekatan *steepest descent* dilakukan. Tiap atom digerakkan ke satu arah dalam ruang dan perubahan energi yang terjadi direkam. Saat semua atom berpindah tempat, konfomer berubah arah menuju penurunan energi total terbesar. Proses ini berhenti setelah sejumlah langkah atau jika perbedaan energi yang terekam cukup kecil.

Steepest descent merupakan pencarian kondisi minimum secara lambat dan berdekatan, sedangkan perbaikan penyetulan konformasi dilakukan dengan metode alternatif. Salah satu metode tersebut adalah konjugat gradien, suatu metode yang dilakukan dengan merekam langkah sebelumnya dan mereferensikan rekaman tersebut untuk penentuan langkah selanjutnya. Ini mencegah suatu proses minimisasi kembali ke kondisi semula. Dibandingkan dengan *steepest descent*, konjugat gradien memiliki kerugian, yaitu membutuhkan kekuatan komputasi dan memori yang lebih besar (Tiikkainen, 2010).

2.14 PSI-BLAST

PSI-BLAST merupakan program pencari kesamaan sekuens pada *database* protein dan DNA. Program ini merupakan pengembangan dari *Gapped BLAST* sehingga lebih sensitif. PSI-BLAST menerima sekuens protein target sebagai input dan membuat profil (*position specific scoring matrix*, PPSM) dari penyejajaran ganda/ multipel. Algoritma menghitung nilai posisi spesifik untuk setiap posisi penyejajaran dimana residu asam amino yang sama pada posisi tertentu akan diberi skor tinggi, sedangkan yang tidak sama diberi skor mendekati nol. PSI-BLAST menggunakan substitusi matriks yang menandakan nilai untuk

pasangan residu. Matriks substitusi yang berbeda dibuat untuk mendeteksi kesamaan pada jangkauan tertentu dari jarak evolusi. Validasi secara eksperimen menunjukkan bahwa matriks BLOSUM 62 sangat cocok mendeteksi hubungan evolusi (Orengo, Jones, & Thornton, 2003).

2.15 ClustalW2

ClustalW2 merupakan program yang digunakan secara luas dalam biologi molekuler untuk membuat penyejajaran ganda, baik sekuens asam nukleat atau protein dan untuk membuat silsilah filogenetik. ClustalW2 dirilis pada tahun 1994 dengan pengembangan dari ClustalV dan ClustalX, seri sebelumnya. Kini terdapat server yang menyediakan ClustalW2 seperti EBI (*European Bioinformatics Institute*) dengan URL <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> (Fiser & Sali, *Comparative protein structure modeling with MODELLER: a practical approach*, 2001).

2.16 PyMOL

PyMOL merupakan salah satu program visualisasi yang digunakan untuk memahami struktur biologi dan dapat menampilkan gambar tiga dimensi berkualitas dari suatu molekul kecil maupun makromolekul seperti protein. *Software* ini dikomersilkan oleh DeLano Scientific LLC. Visualisasi sangat penting dalam memahami dan mendalami struktur suatu molekul (DeLano & Bromberg, 2004).

2.17 MODELLER 9v7

Modeller merupakan program komputer untuk membuat struktur protein berdasarkan pemodelan homologi. MODELER melakukan pemodelan struktur protein dengan penahanan ruang yang memuaskan (*satisfaction of spatial restraints*) (Sali & Blundell, *Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints*, 1993). Input yang digunakan adalah penyejajaran sekuens cetakan dan target model yang akan dicetak, koordinat atom cetakan dan berkas perintah sederhana. Pembuatan model dengan MODELLER ini dilakukan secara otomatis. MODELLER dapat pula melakukan pekerjaan tambahan seperti *fold-assignment*, penyejajaran sekuens protein, penyejajaran sekuens dan struktur

protein ganda dan pembuatan model *loop* secara *ab initio* pada struktur protein (Fiser, Gian, Richard, & Sali, 2003). Modeller 9v7 membuat struktur dengan pengendalian ruang yang memuaskan (*satisfaction of spatial restraints*). Modeller 9v7 mengekstrak pengendalian jarak dan sudut dihedral sekuens target dari penyejajaran dengan struktur cetakan. Pengendalian diperoleh dari cetakan, dikombinasikan dengan bidang energi CHARMM, digunakan untuk mendapatkan fungsi objektif. Optimasi fungsi target dengan gradien konjugasi dan *simulated annealing* melalui dinamika molekuler menghasilkan model dengan pengendalian ruang yang memuaskan (Sali, MODELLER a program for protein structure modeling release 9v7, r6923, 2009).

2.18 Vega ZZ

Vega ZZ merupakan sebuah evolusi terkenal yang dirilis berdasarkan sebuah aplikasi komputer *VEGA OpenGL package* yang di dalamnya terdapat beberapa materi baru untuk memudahkan pengguna dalam melakukan penelitian, khususnya berkaitan dengan suatu pemodelan kimia. Vega ZZ dapat beroperasi pada sistem Windows sebagai suatu pemodelan molekuler yang lengkap. Vega ZZ dapat digunakan untuk pembacaan, analisis dan visualisasi lintasan dinamika molekuler, analisis kluster dari data lintasan secara tiga dimensi (Vega ZZ - Molecular modeling toolkit for Windows, 2006).

2.19 CCP4 Packages

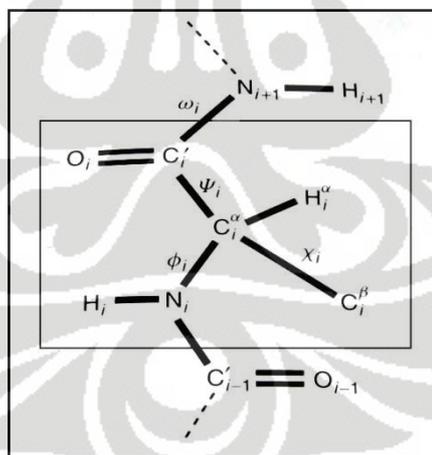
CCP4 (*The Collaborative Computational Project, Number 4*) adalah kumpulan program yang dapat digunakan untuk menentukan struktur makromolekul berdasarkan data kristalografi sinar-x. Rangkaian program ini dirancang secara fleksibel dan menyediakan beberapa metode yang dapat digunakan pengguna untuk mencapai tujuannya. CCP4 dibentuk tahun 1979 oleh sebuah grup kristalografer protein yang mengelompokkan program mereka yang digunakan untuk memproses dan menganalisis data kristalografi protein. Program yang digunakan pada penelitian ini adalah PROCHECK dan Superpose (The CCP4 Suite: Program for protein crystallography, 1994).

2.20 Superpose

Superposisi adalah penyejajaran struktur sekunder yang satu dengan struktur lainnya. Program *superpose* melakukan superposisi dengan mencocokkan struktur tiga dimensi dari protein dengan menggunakan dua berkas koordinat sebagai *input*. Struktur protein yang dijadikan tetap disebut '*fixed*' dan yang berpindah mengikuti struktur tetap disebut '*moving*'. Output yang dihasilkan adalah struktur protein *moving* yang menempati koordinat struktur *fixed*. Program *superpose* dapat dijalankan melalui kumpulan program CCP4 dengan memilih opsi *Superpose topology (TOP PROGRAM)* pada *Superpose molecule task* (Holtje, Sippl, Rognan, & Folkers, 2008).

2.21 PLOT RAMACHANDRAN

Secara umum, hanya 20 asam amino yang secara natural membentuk protein. Sifat fisikokimia dari rantai samping seperti ukuran, bentuk, hidrofobisitas, muatan dan ikatan hidrogen yang beragam. Asam-amino tersebut menghindari konformasi dengan reaktivitas kimia yang ekstrim dan juga memiliki derajat kebebasan yang terbatas, kecuali prolin.



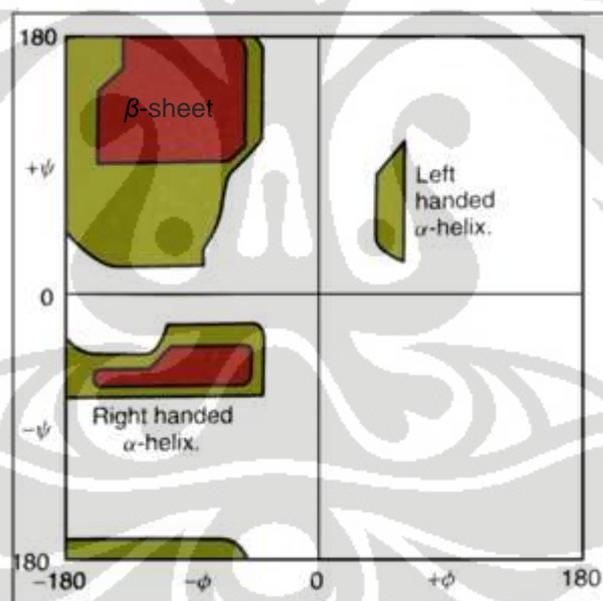
[Sumber: Orengo, Jones, & Thornton, 2003]

Gambar 2.6. Sudut (phi) dan (psi) pada struktur asam amino

Sudut torsi rantai utama dari protein disebut Φ (phi), Ψ (psi), dan ω (omega) (Gambar 2.6). Rotasi antara ikatan N dan C_α dijelaskan dengan sudut Φ , rotasi antara ikatan C_α dan C' dinamakan Ψ , rotasi antara ikatan peptide C' dan N disebut ω . Sudut torsi rantai samping disebut χ_i (chi) dimana i adalah jumlah

ikatan yang dihitung dari luar dari atom $C\alpha$. Setiap residu asam amino mempunyai satu sudut Φ dan satu sudut Ψ sehingga tiap residu dapat digambarkan sebagai satu plot. Sudut Φ dan Ψ inilah yang kemudian dianalisis pertama kali oleh Ramachandran *et al.*

Plot Ramachandran atau peta Ramachandran yang dikembangkan oleh Gopalasamudram Narayana Ramachandran, merupakan plot-plot dua dimensi yang menggambarkan residu asam amino pada struktur protein, juga visualisasi koordinat tiga dimensi protein yang telah direalisasikan melalui eksperimen ke dalam koordinat internal yang terdiri dari sudut dihedral Φ sebagai sumbu x dan sudut Ψ sebagai sumbu y residu asam amino dari struktur protein (Gambar 2.7). Plot ini memperlihatkan konformasi yang memungkinkan dari sudut Φ dan Ψ untuk polipeptida. Program yang dapat menghasilkan plot ini diantaranya PROCHECK, PyMOL, VMD, Swiss PDB Viewer, STING, dan Sirius (The CCP4 Suite: Program for protein crystallography, 1994).



[Sumber: Holtje, Sippl, Rognan, & Folkers, 2008]

Gambar 2.7. Daerah struktur sekunder pada plot Ramachandran

Plot Ramachandran terdiri dari empat kuadran dan empat daerah. Keempat daerah tersebut adalah *most favoured regions*, *additional allowed regions*, *generously allowed region*, dan *disallowed regions*. Pada plot Ramachandran, kluster yang terbentuk dari beberapa residu menunjukkan struktur sekunder yang terbentuk (Cooper, 1996).

Universitas Indonesia

Dari plot ini dapat diketahui kualitas struktur dari suatu protein dengan melihat plot residu non glisin yang terletak pada wilayah sudut dihedral yang dilarang (*disallowed region*). Glisin tidak memiliki rantai samping sehingga sudut Φ dan Ψ yang dimilikinya berada pada empat kuadran dari plot Ramachandran. Suatu struktur protein dikatakan baik jika memiliki jumlah plot residu pada *most favoured region* lebih dari 90% dan *R-factor* tidak lebih dari 20% . Karena sudut Φ dan Ψ merupakan deskripsi komplit secara virtual dari konformasi *backbone*, plot ramachandran dua dimensi ini menjadi penting dan menjadi salah satu cara dalam menganalisis validasi struktur tiga dimensi suatu protein (Holtje, Sippl, Rognan, & Folkers, 2008).

2.22 MOE (*The Molecular Operating Environment*)

MOE merupakan suatu *software* Program Pengembangan Metodologi terintegrasi yang digunakan untuk pengembangan dan penyebaran kimia komputasi. MOE mengintegrasikan visualisasi, simulasi dan pengembangan aplikasi dalam satu paket berdasarkan modul metodologi yang dikembangkan dengan bahasa program data parallel kinerja tinggi SVL (*Scientific Vector Language*). MOE didesain untuk dapat digunakan pada molekul dengan berbagai macam *force field*. MOE dapat digunakan untuk mengatur input file untuk mekanisme molekuler dan MOPAC (kalkulasi orbital) (MOE: The Molecular Operating Environment, 2009).

2.23 AutoDock

AutoDock merupakan *tool* penambatan molekuler otomatis yang didesain untuk memprediksi bagaimana molekul kecil, seperti substrat atau kandidat obat, terikat pada reseptor yang diketahui struktur tiga dimensinya. AutoDock terdiri dari dua program utama, yaitu Autodock dan Autogrid. Autodock melakukan penambatan molekuler ligan protein target dengan set grid yang telah terdeskripsi. Pendeskripsian grid ini dilakukan oleh Autogrid.

AutoDock diantaranya dapat digunakan untuk kristalografi sinar-x, perancangan obat berbasis struktur, memudahkan optimasi, skrining virtual, penambatan protein ke protein, studi mekanisme kimia (Morris, et al., 2010).

2.24 PRODRG

Seiring dengan perkembangan teknik perancangan obat berbasis struktur, diperlukan suatu program pendukung ligan atau inhibitor untuk melewati semua proses perancangan. Sebelum ligan ditambahkan ke sisi aktif protein, harus dilakukan penentuan koordinat ligan berdasarkan data difraksi sinar-x kompleks protein ligan. Oleh karena itu, diperlukan suatu program yang mendukung pembuatan informasi topologi dari input dengan berbagai format (dua dimensi dan tiga dimensi), seperti PRODRG.

PRODRG merupakan *software* pembuat informasi topologi untuk molekul kecil. Topologi ini dapat digunakan untuk perbaikan struktur sinar-x, pemodelan molekuler dan studi penambatan molekuler. Topologi yang dapat dibuat dengan PRODRG terbatas pada molekul yang mengandung H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, I, atom dengan lebih dari empat jenis ikatan, dan atom yang memiliki tipe ikatan tertentu diantara atom halogen dan atom non karbon. Berkas yang harus dikirimkan ke PRODRG dapat berupa berkas koordinat berformat PDB, penggambaran sederhana ASCII dengan mode TXT, maupun berkas berformat MDL Molfile / SDF dengan mode MOL. *Output* hasil program ini berupa berkas tabel koneksi yang terdiri dari ikatan antara atom non hidrogen, tetapan hibridisasi dan informasi kiralitas. *Output* terdapat dalam berkas .pdb dan .gro. Topologi PRODRG dapat digunakan sebagai input untuk program SDF, MOL2, O, REFMAC, Coot, CNS, SHELX, GROMOS, GROMACS, WHATIF, dan AutoDock (Schuettelkopf & van Allen, 2004).

2.25 GROMACS (*Gronigen Machine for Chemical Simulations*)

GROMACS pertama kali dikembangkan oleh grup Herman Berendsens, departemen Biofisika Kimia, Universitas Groningen, dengan kontribusi dari beberapa pengembang pendahulu dan masa kini di seluruh dunia (Supercomputing Centre, 2009). GROMACS merupakan paket *software* gratis sebagai untuk melakukan dinamika molekuler, dengan kata lain mensimulasikan persamaan gerak Newton terhadap suatu sistem yang mengandung ratusan hingga jutaan partikel. *Software* ini dirancang khusus untuk molekul biokimia seperti protein dan lipid yang memiliki banyak interaksi ikatan yang rumit. GROMACS sangat

Universitas Indonesia

cepat dalam menghitung interaksi *non-bonding* yang seringkali mendominasi simulasi, sehingga dapat digunakan untuk meneliti sistem non biologik seperti polimer.

GROMACS mudah dioperasikan dengan file topologi dan parameter yang ditulis dengan format teks yang jelas. Program ini menggunakan antarmuka (*interface*) sederhana dengan pilihan *line* perintah untuk input dan output file (Spoel, Erik, Berk, Gerrit, Alan, & Herman, 2005).

2.26 VMD (*Visual Molecular Dynamics*) NAMD

VMD merupakan *software* grafis yang didesain untuk visualisasi dan analisis struktur molekuler, khususnya biopolimer seperti protein dan asam nukleat. VMD dapat menampilkan beberapa struktur secara bersamaan menggunakan atau tanpa menggunakan seleksi, serta menggunakan metode pewarnaan dan penampilan yang bervariasi (Lampiran 6). Lintasan simulasi dinamika molekuler dapat diamati dengan VMD dengan menginput file hasil simulasi dinamika molekuler berformat *.gro* dan lintasan berupa *.trr*. atau *.xtc* (berkas *.trr* yang telah dikompresi) (Humphrey, Dalke, & Schuelten, 1996).

BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Bahan

- (1) Data ligan hasil penambatan molekuler kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin pada 12-LOX yang diperoleh dari penelitian sebelumnya
- (2) File ligan kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin bentuk tautomer enol dan tautomer keto
- (3) Struktur tiga dimensi 12-LOX dan homolognya yang diperoleh dari *database Protein Data Bank* (Berman et.al, 2000)

3.2 Alat

3.2.1 Perangkat Keras (*Hardware*)

- (1) Komputer terhubung internet dengan spesifikasi procesesor Core 2 Duo 1,8 GHz (Intel[®], Amerika), RAM 2 GB (ASUSTek Computer Inc., Amerika), *graphic card* Radeon Extreme AX 300 (ATI Technologies Inc., Taiwan), dan sistem operasi Windows (Microsoft, Amerika)
- (2) Komputer dengan spesifikasi processor Intel[®] Quad Core[™] CPU Q8200 @ 2,33 GHz (Intel[®], Amerika), RAM (*Random Access Memory*) 4 GB (ASUSTek Computer Inc., Amerika), *graphic card* nVidia GeForce GTS 250 (nVidia, Taiwan), dan sistem operasi Windows (Microsoft, Amerika)
- (3) Komputer terhubung internet dengan spesifikasi processor Intel[®] Dual Core[™] CPU Q8200 @ 2,33 GHz (Intel[®], Amerika), RAM 4 GB (ASUSTek Computer Inc., Amerika), *graphic card* nVidia GeForce GTS 250 (nVidia, Taiwan), dan sistem operasi Linux (Red Hat Inc., Amerika)
- (4) Kelengkapan komputer lainnya seperti *mouse* (Simbada, Indonesia; Logitech, Cina), *keyboard* (Microsoft, Amerika; Logitech, Cina), *monitor* (AOC, Amerika), UPS (*Uninterrupted Power Supply*) produksi APC, Amerika

3.2.2 Perangkat Lunak (*Software*)

Beberapa *software* yang digunakan dalam penelitian ini antara lain yaitu:

- (1) PSI-BLAST (National Center for Biotechnology Information, Amerika)
- (2) ClustalW2 (European Bioinformatics Institute, Inggris)
- (3) Modeller 9v7 (University of Illionis, Amerika)
- (4) CCP4 (The Collaborative Computing Project Number 4, Inggris)
- (5) UCSF Chimera (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatic, University of California san Fransisco, Amerika)
- (6) PyMol (DeLano scientific LLC, Italia)
- (7) Vega ZZ 2.3.1 (The Drug Design Laboratory, University of Milan, Italia)
- (8) PROGRG2 Server (University of Dundee, Inggris)
- (9) AutoDock Tools (The Scripps Research Institute, Amerika)
- (10) GROMACS 4.0 (University of Gronigen, Belanda) dengan perantara Cygwin (Red Hat Inc., Amerika)
- (11) MOE (Chemical Computing Group, Kanada)
- (12) VMD (University of Illionis, Amerika)

3.3 Cara Kerja

3.3.1 Pembuatan Model Lipoksigenase

Pemodelan homologi 12-LOX perlu dilakukan karena simulasi dinamika molekuler memerlukan makromolekul bersekuens lengkap (tidak ada residu yang terputus). Tahapan pembuatan model 12-LOX yaitu sebagai berikut (Sali, MODELLER A Program for Protein Structure Modeling Release 9v7, r6923, 2009):

a. Pencarian Homolog Lipoksigenase

Proses pencarian homolog Lipoksigenase dilakukan dengan mengirimkan sekuens target Lipoksigenase hasil modifikasi dari penelitian sebelumnya ke server PSI BLAST (Lampiran 1). *Input* data berkas Lipoksigenase ini berupa berkas FASTA yang diciptakan dari konversi format PDB, menggunakan *software* Vega ZZ (Lampiran 2). PSI-BLAST memberikan rekomendasi database homolog Lipoksigenase.

b. Pemilihan Homolog

Setelah didapat daftar rekomendasi database homolog dari PSI-BLAST, dilakukan pengurutan homolog berdasarkan skor kemiripan tertinggi. Karena homolog yang dapat digunakan sebagai cetakan pemodelan homologi juga adalah homolog bersekuens lengkap, maka dipilih homolog yang sesuai dari hasil rekomendasi PSI-BLAST. *Software* PyMol digunakan dalam melihat kelengkapan sekuens secara visual (Lampiran 3). Jika homolog memiliki lebih dari satu rantai (*chain*), maka perlu dilakukan seleksi salah satu *chain* dengan *software* Chimera (Lampiran 4).

c. Pembuatan Cetakan

Dalam membuat cetakan dari homolog, dapat dibuat cetakan tunggal maupun kombinasi. Homolog terpilih atau kombinasinya disejajarkan terhadap target Lipoksigenase dengan *software* ClustalW2 (Lampiran 5) yang dilakukan secara interaktif pada situs <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>. File *output* yang dihasilkan berupa berkas PIR.

d. Pembuatan Model Lipoksigenase

Berkas PIR ini disalin ke berkas `align-multiple.ali`. Subprogram Modeller 9v7 yang digunakan adalah **model-multiple.py**.

e. Pemilihan Cetakan

Struktur yang didapat dari **model-multiple.py** disuperposisi terhadap target. Superposisi dapat dilakukan dengan menjalankan fungsi *superpose* pada *software* CCP4 *Package*. Kombinasi cetakan yang dipilih adalah kombinasi dengan RMSD terkecil.

f. Pemodelan Homologi

Setelah diperoleh cetakan terbaik, dicari lokasi sekuens yang terputus untuk menentukan nomor residu asam amino yang akan dijadikan *loop* yang baru. Tahap ini dilakukan dengan menjalankan **model-loop-define.py** dari Modeller 9v7.

g. Evaluasi Model

Evaluasi Model 12-LOX mencakup evaluasi visual, stereokimia, dan RMSD (Fiser & Sali, Comparative protein structure modeling with MODELLER: a practical approach, 2001). Model 12-LOX yang dihasilkan dievaluasi secara visual menggunakan *software* PyMol. Dalam visualisasi ini diperhatikan apakah model *loop* yang didapat memiliki sekuens yang lengkap. Evaluasi secara stereokimia dilakukan dengan *software* PROCHECK (Lampiran 11) lalu dihasilkan Plot Ramachandran. Dari plot ini dilihat nilai *most favoured region* (persentase regio yang paling disukai). Evaluasi juga dilakukan dengan membandingkan rantai utama menggunakan fungsi *superpose* yang terdapat dalam *software* CCP4. Dari superposisi dapat dilihat nilai RMSD. Model yang dipilih harus unggul dalam ketiga proses evaluasi tersebut. Model Lipoksigenase terbaik dapat digunakan sebagai *input* simulasi dinamika molekuler.

3.3.2 Optimasi Makromolekul dan Ligan

Makromolekul dan ligan perlu disiapkan terlebih dahulu sebelum dilakukan penambatan molekuler. Optimasi makromolekul dilakukan dengan melakukan minimisasi terhadap model 12-LOX dengan Vega ZZ.

File-file hasil penambatan molekuler pada penelitian sebelumnya yang terdiri dari set hasil penambatan molekuler senyawa kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin pada 12-LOX dikumpulkan dalam kategori ligan masing-masing. Senyawa tiga dimensi penelitian sebelumnya tersebut dioptimasi kembali. Optimasi geometri struktur tiga dimensi ini berupa minimisasi energi struktur untuk memperoleh konformasi struktur molekul ligan terstabil dengan menggunakan piranti lunak Vega ZZ. Minimisasi energi mengubah geometri molekul ke energi yang lebih rendah dari suatu sistem dan untuk menghasilkan konformasi yang lebih stabil. Selama minimisasi berlangsung, akan dicari suatu struktur molekul yang tidak mengalami perubahan energi jika geometri molekul diubah dengan besaran tertentu.

Optimasi dengan Vega ZZ ini meliputi penambahan hidrogen, pemberian *force field* SP4 dan muatan parsial *gasteiger charges*, penerapan minimisasi dengan

metode *trust* sebanyak 1000 langkah minimisasi dan pencarian konformasi terbaik berdasarkan torsi fleksibel yang dimiliki.

3.3.3 Penambatan molekuler Ligan terhadap Target Model Lipoksigenase

Setelah diperoleh model Lipoksigenase bersekuens lengkap dan ligan yang telah dioptimasi, dilakukan penambatan molekuler ligan terhadap target model lipoksigenase. Tahapan penambatan molekuler adalah sebagai berikut (Ragno, Tramontano, Martinelli, & Tuccinardi):

- a. Struktur 12-LOX dipersiapkan pada program AutoDock (Lampiran 12), lalu ditambahkan molekul hidrogen dan dihilangkan hidrogen non polar, ditambahkan muatan Fe^{3+} dengan bantuan Wordpad, ditambahkan muatan parsial *gasteiger charges*, lalu disimpan dalam format *.pdb* dan *.pdbqt*.
- b. Struktur ligan yang telah dioptimasi juga dipersiapkan pada AutoDock untuk dikonversi menjadi format *.pdbqt* melalui *AutoDock Tools* (ADT).
- c. Pembuatan *Grid Parameter File* (*.gpf*) melalui ADT yang meliputi pembuatan berkas *map* yang disesuaikan terhadap ligan dan penentuan batasan ruang penambatan molekuler (*grid box*) yang memiliki pusat koordinat (X,Y,Z): 20.222, 2.247, 19.5 dan volum *grid box* 50 x 50 x 50 Å (Utami, 2009).
- d. Proses komputasi *.gpf* menjadi *.glg* dijalankan melalui program AutoDock melalui *software* Cygwin
- e. Pembuatan *Docking Parameter File* (*.dpf*) melalui ADT yang meliputi penentuan berkas *.pdbqt* dari makromolekul dan ligan yang akan digunakan serta penentuan parameter *docking algorithm*.
- f. Penambatan molekuler dengan Autodock melalui Cygwin dengan mengubah format *.dpf* menjadi *.dlg*

3.3.4 Analisis Hasil Penambatan Molekuler

Analisis hasil penambatan molekuler dilakukan dengan PyMol, MOE, dan ADT (*AutoDock Tools*). Ketiga *software* tersebut dapat dipakai untuk visualisasi. Dari kumpulan berkas hasil penambatan molekuler, diambil berkas-berkas yang

berada dalam format `.dlg`, kemudian dilakukan pemilihan konformasi terbaik yang disarankan dari klaster. Ekstraksi berkas-berkas tersebut menjadi file `.pdb` dilakukan dengan ADT. Ekstraksi file `.dlg` ini dilakukan untuk memisahkan hasil penambatan molekuler yang terdiri dari kumpulan konformasi ligan menjadi satuan ligan yang dipilih dari klaster terbaik. ADT juga digunakan untuk mengamati histogram dari tiap klaster yang kemudian dipilih konformasi ligan dengan *hit* penambatan molekuler terbanyak, juga ΔG hasil penambatan yang terendah. ΔG hasil penambatan dengan persentase klaster terbanyak dapat diamati dalam histogram yang sama.

Berkas hasil penambatan `.dlg` dapat dibuka dengan Wordpad untuk melihat keterangan klaster yang terbentuk. Nilai K_i untuk penambatan terbaik dan klaster terbaik dapat diamati pada *file* tersebut. Evaluasi ini kemudian dibandingkan dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya.

3.3.5 Simulasi Dinamika Molekuler

Tahap-tahap simulasi dinamika molekuler yaitu sebagai berikut (Kerrigan):

a. Pembuatan Topologi Ligan

Software GROMACS untuk simulasi dinamika molekuler tidak dapat mengkonversi berkas ligan. Oleh karena itu diperlukan bantuan PRODRG2. Berkas koordinat ligan berupa heteroatom (HETATM) yang terdapat dalam berkas `.pdb` dikirimkan ke server PRODRG2 untuk mendapatkan berkas topologi ligan tersebut. Pengaturan PRODRG2 adalah memasukkan opsi *Chirality* dan *Full charges* akan tetapi tidak memasukkan opsi *Energy Minimization*. File yang diunduh berupa arsip `.zip`. Ion Fe^{3+} tidak digunakan dalam simulasi dinamika molekuler karena memerlukan persiapan topologi khusus yang rumit.

b. Konversi Berkas PDB menjadi Berkas GROMACS

Konversi berkas struktur `.pdb` menjadi berkas GROMACS (`.gro` dan `.top`) dilakukan dengan menggunakan perintah **pdb2gmx**. Untuk simulasi 12-LOX tanpa ligan digunakan *forcefield* G43A1, sedangkan untuk simulasi 12-LOX dengan ligan digunakan *forcefield* gmx. Untuk simulasi berligan, diperlukan penyisipan ligan setelah tahap **pdb2gmx**. Penyisipan ini dilakukan dengan

menyalin koordinat dari DRGPOH.PDB ke bagian akhir berkas `lox2.pdb` dengan teks editor. Kemudian penomoran residu asam amino diubah sehingga sesuai dengan urutan jumlah atom total dalam file. Tahap berikutnya adalah mengedit berkas topologi `lox.top` dengan teks editor. Tulisan `#include "bides.itp"` ditambahkan pada bagian bawah tulisan parameter *forcefield*, lalu pada bagian [molecules] ditambahkan pula tulisan UNK di bawah kata *Compound* dan angka 1 di bawah `#mols`.

c. Pengaturan Kondisi Sistem

Pengaturan kondisi sistem terdiri dari bentuk sistem dan jenis pelarut. Bentuk sistem yang digunakan adalah kotak (*cubic*), diatur menggunakan perintah **editconf**. Pelarut yang digunakan adalah air untuk membuat simulasi berada pada kondisi mendekati nyata, diatur menggunakan perintah **genbox**.

d. Penyusutan Energi (*Energy Minimization*)

Pengaturan penyusutan energi dilakukan dengan perintah **grompp** berdasarkan berkas `em.mdp` (Lampiran 15). Parameter-parameter penyusutan energi dimasukkan dalam berkas `em.mdp` dengan bantuan teks editor. Jika pengeditan ini dilakukan dalam Windows, perlu ditambahkan perintah **dos2unix** untuk mengkonversi berkas `.mdp` menjadi bentuk unix.

Penyusutan energi harus disertai dengan proses penetralan muatan sistem. Penetralan muatan ini dilakukan dengan penambahan sejumlah kation atau anion, yang diimbangi dengan pengurangan sejumlah pelarut (SOL). Proses penetralan dilakukan dengan perintah **genion**, kemudian dilakukan pengeditan berkas topologi untuk memasukkan keterangan ion yang ditambahkan dan menyesuaikan jumlah atom pelarut. Penyusutan energi dilakukan dengan perintah **mdrun**.

e. Penahanan Posisi

Penahanan posisi diatur dalam berkas `pr.mdp` (Lampiran 16). Pengaturan parameter dilakukan dengan perintah **grompp**, sementara penahanan posisi dijalankan dengan menggunakan perintah **mdrun**. Parameter yang diatur adalah temperatur.

f. Simulasi Dinamika Molekuler

Simulasi dijalankan dengan menggunakan perintah **mdrun**, yang dijalankan dari Unix *shell* Cygwin. Simulasi dinamika molekuler dilakukan terhadap 12-Lipoksigenase dengan ligan dan atau tanpa ligan kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin (blanko negatif). Tahapan menjalankan MD dengan Gromacs ini terdiri dari penentuan kondisi sistem (kotak dan pelarut), penyusutan energi, penahanan posisi, dan pengaturan parameter. Penentuan kondisi kotak dilakukan dengan perintah **editconf**. Penentuan parameter dapat dilakukan dengan perintah **grompp**. Parameter yang dapat diatur pada berkas *md.mdp* (Lampiran 17) diantaranya waktu simulasi, temperatur, dan jenis pelarut. Simulasi berlangsung selama 10 nanodetik, temperatur yang digunakan adalah 300°K, dan jenis pelarut yang digunakan adalah air.

3.3.6 Analisis Hasil Simulasi Dinamika Molekuler

Setelah diperoleh hasil simulasi dinamika molekuler terhadap kompleks 12-Lipoksigenase dengan ligan kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin, dilakukan analisis terhadap:

(1) Energi Potensial

Energi potensial dievaluasi untuk menentukan waktu untuk mengevaluasi RMSF. Data energi potensial diperoleh dari sistem dengan perintah **g_energy**. Data hasil dari perintah tersebut dikonversi menjadi berkas *Microsoft Excel*, kemudian dibuat plot energi potensial terhadap waktu.

(2) RMSD (*Root Mean Square Deviation*) atau akar kuadrat rata-rata deviasi

Data RMSD dari sistem diperoleh dengan perintah **g_rms** dengan memilih opsi protein dan ligan. Data hasil dari perintah tersebut dikonversi menjadi berkas *Microsoft Excel*, kemudian dibuat plot RMSD terhadap waktu. Evaluasi RMSD dilakukan untuk membandingkan konformasi struktur pada waktu tertentu terhadap konformasi semula pada awal simulasi.

(3) RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*) atau akar kuadrat rata-rata fluktuasi

Data RMSF dari sistem diperoleh dengan perintah **g_rmsf**. Data hasil dari perintah tersebut dikonversi menjadi berkas *Microsoft Excel*, kemudian dibuat plot RMSF terhadap waktu. Evaluasi RMSF dilakukan untuk menganalisis fleksibilitas protein pada sistem selama simulasi berlangsung.

(4) Kondisi Ikatan Hidrogen (perintah **g_hbond**)

Data kondisi ikatan hidrogen dari sistem diperoleh dengan perintah **g_hbond** dengan memilih opsi protein dan ligan. Data dari perintah tersebut dikonversi menjadi berkas *Microsoft Excel*, kemudian dibuat plot jumlah ikatan hidrogen (dalam data jumlah donor dan akseptor atom hidrogen) terhadap waktu.

(5) Visualisasi lintasan simulasi dinamika molekuler

Pergerakan molekuler yang dinamis dapat diamati secara visual dengan *software* VMD. VMD memerlukan *input* berkas *.gro* sebagai molekul dan *.trr* sebagai data pergerakan tiap *frame*. Pengamatan interaksi ligan terhadap residu 12-LOX secara lebih lanjut dilakukan dengan *software* MOE dan PyMOL dengan mengambil *frame* simulasi setiap 2 nanodetik dengan fungsi **trjconv** dari GROMACS.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pembuatan Model Lipoksigenase

a. Pencarian Homolog Lipoksigenase

Pencarian protein homolog 12-LOX dengan server PSI-BLAST (Lampiran 1) menghasilkan 23 homolog yang memiliki kemiripan sekuens dengan 12-LOX. Homolog-homolog tersebut diurutkan menurut skor dan *E-value* dari yang terbesar hingga yang terkecil (Tabel 4.1).

Tabel 4.1. Tampilan antarmuka *output* homolog target LOX dari PSI-BLAST

Sequences producing significant alignments:			Score (Bits)	E Value
NEW	<input type="checkbox"/>	pdb 3D3L A Chain A, The 2.6 Å Crystal Structure Of The Lipoxy...	887	0.0
NEW	<input type="checkbox"/>	pdb 1LOX A Chain A, Rabbit Reticulocyte 15-Lipoxygenase	605	9e-174
NEW	<input type="checkbox"/>	pdb 2POM A Chain A, Revised Structure Of Rabbit Reticulocyte ...	604	2e-173
NEW	<input type="checkbox"/>	pdb 3FG3 A Chain A, Crystal Structure Of Delta413-417:gs I805...	259	2e-69
NEW	<input type="checkbox"/>	pdb 3FG4 A Chain A, Crystal Structure Of Delta413-417:gs I805...	259	2e-69
NEW	<input type="checkbox"/>	pdb 3FG1 A Chain A, Crystal Structure Of Delta413-417:gs Lox ...	259	2e-69
NEW	<input type="checkbox"/>	pdb 3DY5 A Chain A, Allene Oxide Synthase 8r-Lipoxygenase Fro...	259	2e-69
NEW	<input type="checkbox"/>	pdb 2FNQ A Chain A, Insights From The X-Ray Crystal Structure...	258	3e-69
NEW	<input type="checkbox"/>	pdb 2IUI A Chain A, Crystal Structure Of Soybean Lipoxygenase-B	150	9e-37
NEW	<input type="checkbox"/>	pdb 1ROY A Chain A, Lipoxygenase-3 Treated With Cumene Hydrop...	145	4e-35
NEW	<input type="checkbox"/>	pdb 1IK3 A Chain A, Lipoxygenase-3 (Soybean) Complex With 13(...	144	5e-35
NEW	<input type="checkbox"/>	pdb 1FGQ A Chain A, Lipoxygenase-1 (Soybean) At 100k, Q495e M...	137	8e-33
NEW	<input type="checkbox"/>	pdb 3BWE A Chain A, Lipoxygenase-1 (Soybean) I553a Mutant	136	2e-32
NEW	<input type="checkbox"/>	pdb 3BND A Chain A, Lipoxygenase-1 (Soybean), I553v Mutant	136	2e-32
NEW	<input type="checkbox"/>	pdb 2SBL B Chain B, The Three-Dimensional Structure Of An Ara...	136	2e-32
NEW	<input type="checkbox"/>	pdb 3BNC A Chain A, Lipoxygenase-1 (Soybean) I553g Mutant	136	2e-32
NEW	<input type="checkbox"/>	pdb 2IUK A Chain A, Crystal Structure Of Soybean Lipoxygenase...	136	2e-32
NEW	<input type="checkbox"/>	pdb 3BNE A Chain A, Lipoxygenase-1 (Soybean) I553l Mutant	136	2e-32
NEW	<input type="checkbox"/>	pdb 1FGO A Chain A, Lipoxygenase-1 (Soybean) At 100k, Q495a M...	135	4e-32
NEW	<input type="checkbox"/>	pdb 1FGR A Chain A, Lipoxygenase-1 (Soybean) At 100k, Q697e M...	135	5e-32
NEW	<input type="checkbox"/>	pdb 1FGT A Chain A, Lipoxygenase-1 (Soybean) At 100k, Q697n M...	134	7e-32
NEW	<input type="checkbox"/>	pdb 1FGM A Chain A, Lipoxygenase-1 (Soybean) At 100k, N694h M...	134	9e-32
NEW	<input type="checkbox"/>	pdb 1V4K A Chain A, Lipoxygenase-1 (Soybean) At 100k, N694g M...	134	1e-31

Homolog protein yang berkualitas baik akan digunakan sebagai protein cetakan. Kualitas yang harus dipenuhi adalah memiliki kesamaan sekuens yang tinggi terhadap sekuens target, jumlah, dan panjang celah (*gap*) yang rendah, serta memiliki resolusi yang baik. Nilai resolusi yang semakin kecil menunjukkan struktur protein tersebut semakin baik (Sali & Tom, Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints, 1993).

b. Pemilihan Homolog

Diantara 23 homolog hasil pencarian PSI-BLAST tersebut, dipilih 8 homolog yang memiliki persen kemiripan dengan 12-LOX diatas 30%, yaitu homolog dengan kode protein 3D3L, 1LOX, 2P0M, 3FG3, 3FG4, 3FG1, 3DY5, 2FNQ. Kedelapan homolog tersebut disuperposisi terhadap target 12-LOX dengan CCP4, kemudian dilihat kelengkapan sekuensnya (Tabel 4.2).

Tabel 4.2. Data hasil pencarian homolog target LOX dari PSI-BLAST

Identitas PDB	Persen Kemiripan (%)	Identitas PDB	Persen Kemiripan
3D3L	92	3BNE	25
1LOX	58	3BND	25
2P0M	58	3SBL	25
3FG3	31	3BNC	25
3FG4	32	2IUUK	26
3FG1	32	3BNB	25
3DY5	32	1FGO	25
2FNQ	31	1FGR	24
1IUJ	26	1FGT	24
1ROV	27	1FGM	24
1IK3	27	1Y4K	24
3FGQ	25		

Dari 8 homolog tersebut diperoleh 2P0M adalah satu-satunya homolog bersekuens lengkap, dengan RMSD (*Root Mean Square Deviation*) 0,973 (Tabel 4.3). Ranking teratas hasil PSI-BLAST dimiliki oleh struktur 3D3L dengan persentase kemiripan sebesar 91,5% sehingga 3D3L digunakan sebagai peningkat keakuratan model.

Tabel 4.3. Data hasil superposisi homolog target LOX terhadap target LOX

Identitas PDB	RMSD Homolog terhadap Target_Lox (Å)	Jumlah Regio yang Terputus
3D3L	0,001	3
1LOX	0,866	3
2P0M	0,973	0
3FG1	1,302	1
3DY5	1,499	5
3FG3	1,372	1
3FG4	1,331	2

c. Pembuatan Cetakan

Penyejajaran sekuens 12-LOX dilakukan dengan program *ClustalW2*, lalu dihasilkan berkas PIR (Lampiran 7). Homolog 2P0M, 1LOX, 3FG3, 3FG4, 3FG1, 3DY5, 2FNQ digunakan sebagai cetakan, dengan target 12-LOX. Hasil penyejajaran sekuens disalin pada berkas `align-multiple.ali` dengan menggunakan Wordpad (Lampiran 8).

d. Pembuatan Model Lipoksigenase

Berkas PIR yang telah disalin ke berkas `align-multiple.ali` (Lampiran 8) dijalankan melalui subprogram Modeller 9v7 bernama **model-multiple.py** (Lampiran 9).

e. Pemilihan Cetakan

Model hasil yang didapat akan digunakan sebagai cetakan, sehingga tidak perlu dilakukan pemilihan cetakan.

f. Membuat Model *Loop* Lipoksigenase

Model yang akan dibuat perlu pendefinisian nomor residu terputus yang disusun dalam berkas `model-loop-define.py`. Penomoran residu ini mengubah residu pertama enzim (Trp176) sebagai residu pertama (Trp1) dan seterusnya. Untuk menentukan nomor *loop* yang akan dibuat, model hasil **model-multiple.py** disuperposisi dengan target 12-LOX. Berdasarkan visualisasi hasil superposisi dengan PyMOL (Gambar 4.1), diperoleh residu yang sejajar adalah 111-117 (*loop* I), 220-238 (*loop* II), dan 423-428 (*loop* III). Penomoran ini mengikuti penomoran model hasil **model-multiple.py**. Model *loop* dibuat menggunakan cetakan dengan mengisi penomoran residu yang akan dibuat *loop* pada subprogram **model-loop-define.py** (Lampiran 10). Dari hasil pemodelan ini didapat 12 variasi model dengan struktur rantai utama yang mirip dengan target (Gambar 4.2).

g. Evaluasi Model

Dari evaluasi visual, didapatkan model BL99.pdb merupakan satu-satunya model yang memiliki α -heliks pada *loop* II. Persentase residu yang berada pada

daerah *most favoured* dari Plot Ramachandran adalah petunjuk terbaik untuk mengetahui kualitas stereokimia model protein. Idealnya, suatu struktur dikatakan baik apabila memiliki lebih dari 90% residu pada daerah tersebut (The CCP4 Suite: Program for protein crystallography, 1994). Dari evaluasi stereokimia dengan Plot Ramachandran didapatkan model BL99 .pdb sebagai model terbaik dengan *most favoured region* 91,5% dan *disallowed region* 0% (Gambar 4.3, Tabel 4.4).

Tabel 4.4. Data Plot Ramachandran

Model	Plot Ramachandran				Jumlah Disallowed Regions	RMSD Model terhadap 3D3L_A (Å)
	<i>Most Favoured Regions</i> (%)	<i>Additional Allowed Region</i> (%)	<i>Generously Allowed Region</i> (%)	<i>Disallowed Regions</i> (%)		
LOX						
B99	91,5	7,5	0,9	0,0	0	1,048
BL01	87,7	9,4	1,4	1,4	6	1,062
BL02	87,0	8,5	3,3	1,2	5	1,077
BL03	88,2	9,2	2,1	0,5	2	1,046
BL04	89,4	8,7	1,4	0,5	2	1,083
BL05	88,2	9,2	1,9	0,7	3	1,043
BL06	88,7	9,9	1,2	0,2	1	1,043
BL07	90,1	8,7	0,9	0,2	1	1,076
BL08	89,6	9,2	1,2	0,0	0	1,024
BL09	89,9	9,0	1,2	0,0	0	1,060
BL10	88,9	8,3	2,1	0,7	3	1,074
IL00	85,1	9,4	3,1	2,4	10	1,108
B99min*	81,8	16,5	1,2	0,5	2	1,107

*B99 yang telah diminimisasi

RMSD terkecil dimiliki oleh model BL08 .pdb sedangkan B99 .pdb terdapat pada urutan ke-5 terkecil, yaitu 1,048 Å (Tabel 4.4). Model Lipoksigenase terbaik dapat digunakan sebagai *input* simulasi dinamika molekuler. Oleh karena itu, model B99 .pdb dipilih sebagai model 12-LOX yang digunakan pada tahap berikutnya.

4.2 Optimasi Makromolekul dan Ligan

Hasil minimisasi makromolekul 12-LOX dievaluasi dengan melihat Plot Ramachandran (Tabel 4.4). Saat dilakukan perbandingan antara model 12-LOX setelah dan sebelum diminimisasi, diketahui bahwa model 12-LOX yang telah diminimisasi memberikan hasil yang tidak lebih baik karena memiliki *most*

favoured region sebesar 81,8% dan *dissallowed region* sebesar 0,5 %. Oleh karena itu, 12-LOX yang digunakan dalam tahap penambatan molekuler adalah model 12-LOX tanpa minimisasi.

Dari literatur, diketahui bahwa kurkumin memiliki 2 tautomer karena terjadi tautomerisasi antara bentuk keto dan bentuk enol yang dipengaruhi oleh pH (Sharma, Gescher, & Steward, 2005). Tautomerisasi dapat mengubah kemungkinan interaksi antara ligan dan protein secara signifikan karena tautomer memiliki perbedaan pengikatan hidrogen (Kalliokoski, Salo, Lahtela-Kakkonen, & Poso, 2009). Gardner (1989) menemukan bahwa pH mempengaruhi spesifitas LOX pada kedelai dimana berhubungan dengan bentuk asam atau anion dari substrat (Xhen & Funk, 1993). Oleh karena itu, penambatan molekuler akan dilakukan dengan ligan kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin bentuk enol dan keto. Modifikasi molekul ligan dilakukan menggunakan *software* MOE (Lampiran 14), kemudian optimasi ligan dilakukan menggunakan Vega ZZ (Lampiran 2) dengan menambahkan hidrogen, pemberian *force field* SP4, muatan parsial *gasteiger charges*. Dan minimisasi dengan metode *trust* sebanyak 1000 langkah minimisasi. Struktur yang paling baik akan diperoleh di akhir minimisasi. Makin banyak torsi pada tiap ligan akan menambah lamanya proses ini.

4.3 Penambatan Molekuler Ligan terhadap Target Model Lipoksigenase

Penambatan molekuler dijalankan dengan program **Autodock4** melalui Cygwin dengan algoritma *Lamarckian Genetic Algorithm* karena algoritma ini merupakan perpaduan dari *local search* (pencarian optimum lokal) dan *genetic algorithm* (pencarian optimum global). Penambatan molekuler dilakukan terhadap ligan kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin bentuk tautomer enol dan keto. Pada penelitian ini dilakukan penambatan molekuler menggunakan pengaturan *grid* penelitian sebelumnya (Lampiran 14). Penambatan molekuler dilakukan di komputer Windows Quad Core dan berlangsung selama 61 jam (kurkumin), selama 56 jam (demetoksikurkumin), dan selama 55 jam (bisdemetoksikurkumin).

Secara ringkas, perbedaan penambatan molekuler ini dengan penelitian sebelumnya mencakup tiga hal. Pertama, muatan Fe yaitu +3 ditambahkan pada makromolekul 12-LOX dengan bantuan Wordpad, sedangkan Fe dibuat netral pada penelitian sebelumnya. Kedua, 12-LOX yang digunakan pada penelitian ini telah dilengkapi dengan pemodelan homologi sehingga dapat langsung digunakan untuk tahap berikutnya, yaitu simulasi dinamika molekuler. Ketiga, struktur ligan yang digunakan meliputi tautomer enol dan keto.

4.4 Analisis Hasil Penambatan Molekuler

Afinitas dan selektivitas ligan yang ditambatkan terhadap target makromolekul dapat dilihat dari skor penambatan molekuler dari hasil penambatan molekuler. Skor ini mencakup energi bebas (ΔG) dan konstanta inhibisi (K_i). Semakin rendah nilai konstanta inhibisi maka semakin efektif aktivitas hambatan protein target. Kedua parameter penambatan molekuler tersebut dicantumkan dalam berkas .dlg berupa data yang telah diranking dalam klaster. Dari hasil penambatan molekuler makromolekul 12-Lipoksigenase dengan ketiga ligan, diambil klaster terbaik (Tabel 4.5). File tersebut diekstraksi menjadi file .pdb dengan menggunakan ADT.

Tabel 4.5. Perbandingan hasil penambatan molekuler

Nama Ligan	Tautomer Enol			Tautomer Keto			ΔG^* (kcal/mol)
	ΔG (kcal/mol)	Ran-king	Σ Klaster	ΔG (kcal/mol)	Ran-king	Σ Klaster	
Kurkumin	+7,64	1	58	-0,25	1	23	-7,72
Demetoksi- kurkumin	-0,93	1	3	-2,73	1	61	-8,12
Bisdemetok sikurkumin	+4,93	2	93				
	-4,85	1	11	-6,64	1	5	-8,06
	+2,53	5	47	-3,60	2	90	

*dilakukan pada 12-LOX *disorder* [Sumber: Utami, 2009]

Pada tabel 4.5 dapat dilihat bahwa terdapat perbedaan menonjol dari penambatan molekuler ligan kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin bentuk enol dan keto. Pada bentuk enol dihasilkan ΔG yang bernilai positif, yaitu +7,64 kkal/mol untuk kurkumin, +4,93 kkal/mol untuk demetoksikurkumin, dan +2,53 kkal/mol untuk bisdemetoksikurkumin. Ini menunjukkan tidak terjadinya ikatan antara ligan tautomer enol dengan 12-LOX.

Universitas Indonesia

Dari penambatan molekuler bentuk keto dihasilkan ΔG bernilai negatif yaitu -0,25 kkal/mol untuk kurkumin, -2,73 kkal/mol untuk demetoksikurkumin, dan -3,60 kkal/mol untuk bisdemetoksikurkumin, menandakan terjadinya ikatan ligan enzim yang kuat pada kompleks 12-LOX dengan ligan tautomer keto. Oleh karena itu, simulasi dinamika molekuler dibatasi pada tautomer keto dari kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin.

Konstanta inhibisi (K_i) penambatan dari ketiga ligan tautomer keto dengan 12-LOX menunjukkan nilai K_i sebesar 657,19 mMolar (mM), demetoksikurkumin 10,4 mM, dan bisdemetoksikurkumin 2,28 mM (Tabel 4.6). Terdapat beda yang sangat jauh dibandingkan penelitian sebelumnya, yaitu 2,22 μM untuk kurkumin, 1,13 μM untuk demetoksikurkumin, dan 1,24 μM untuk bisdemetoksikurkumin.

Tabel 4.6. Perbandingan konstanta inhibisi (K_i)

Senyawa	K_i Docking* (μM)	K_i Jurnal ⁺ (μM)	K_i Docking(mM)
Kurkumin	2,22	1,7 - 4,3 (41)	657,19
Demetoksikurkumin	1,13	1,7 - 4,3	10,4
Bisdemetoksikurkumin	1,24	1,7 - 4,3	2,28

*dilakukan pada 12-LOX disorder [Sumber: Utami, 2009]

⁺[Sumber: Khana, 2009]

Selain ΔG dan K_i , dapat pula diketahui interaksi ligan antara senyawa aktif tanaman obat terpilih dengan protein target dengan membuka file .dlg dibantu ADT. Pada hasil penambatan molekuler keto, diketahui bahwa interaksi ligan kurkumin dengan 12-LOX memiliki 2 ikatan hidrogen, yaitu pada residu Glisin 590 dengan jarak 1,692 Å dan Leusin 597 dengan jarak 2,054 Å (Gambar 4.4). Ligan Demetoksikurkumin memiliki 1 ikatan hidrogen dengan 12-LOX, yaitu pada residu Trp176 dengan jarak 2,774 Å (Gambar 4.5). Ligan bisdemetoksikurkumin tidak memiliki ikatan hidrogen (Gambar 4.6). Perbandingan konformasi hasil penambatan molekuler ketiga ligan dari penelitian ini dengan penelitian sebelumnya ditunjukkan pada gambar 4.7 hingga gambar 4.9.

Kegagalan penambatan molekuler (*stuck dump*) sempat terjadi karena belum dilakukannya pengaturan torsi ligan pada tahap minimisasi ligan. Tahap ini tidak

dapat dilakukan jika minimisasi dilakukan dengan *software* MOE. Pada tahap minimisasi ligan, Vega ZZ digunakan untuk menambahkan hidrogen dengan opsi *generic organic*, menghilangkan molekul air, lalu mengkalkulasikan muatan dan potensial dengan *force field* SP4 sesuai dengan *force field* yang direkomendasikan program Vega ZZ untuk ligan. Muatan parsial yang digunakan berupa *gasteiger charges*, sesuai dengan muatan parsial yang direkomendasikan oleh program AutoDock4. Kemudian minimisasi dilakukan dengan *trust* sebanyak 1000 langkah.

Berdasarkan “Rule of five”, senyawa yang digunakan dalam penambatan molekuler dari sejumlah besar senyawa adalah senyawa dengan berat molekul kurang dari 500, nilai cLogP antara -5 hingga +5, gugus donor ikatan hidrogen kurang dari 5, gugus akseptor ikatan hidrogen kurang dari 10, dan jumlah ikatan yang dapat berotasi (torsi fleksibel) kurang dari 10 (Felton, 2000). Torsi ketiga ligan yang ditambahkan telah memenuhi syarat ini, yaitu berjumlah 7 torsi (kurkumin), 6 torsi (demetoksikurkumin), dan 5 torsi (bisdemetoksikurkumin). Pengaturan torsi sebaiknya dilakukan dengan meninjau letak torsi ligan dengan membuka ADT bersamaan dengan Vega ZZ. ADT dibuka hingga tahap persiapan ligan untuk membantu menunjukkan letak torsi, sedangkan Vega ZZ digunakan untuk meminimisasi torsi. Setelah dilakukan pengaturan semua torsi pada Vega ZZ dilakukan minimisasi, lalu berkas ligan disimpan pada ADT dalam format *.pdbqt*.

4.5 Simulasi Dinamika Molekuler

a. Pembuatan Topologi Ligan

Topologi ligan dibuat dengan mengirimkan berkas PDB ke server PRODRG2 (Lampiran 13). Sebagai hasil, diperoleh arsip berisi parameter topologi ligan. Dari arsip tersebut, hanya DRGGMX.ITP dan DRGPOH.PDB yang digunakan dalam simulasi dinamika molekuler. Untuk mempermudah kerja, DRGGMX.ITP diubah nama menjadi nama ligan masing-masing (*cur.itp*, *des.itp*, *bis.itp*) dan DRGPOH.PDB diubah nama menjadi nama ligan masing-masing (*cur.pdb*, *des.pdb*, *bis.pdb*).

b. Konversi Berkas PDB menjadi Berkas GROMACS

Berkas hasil perintah **pdb2gmx** adalah `lox2.pdb` dan `lox.top`, *Output* PRODRG yang akan digunakan dikelompokkan dalam direktori yang sama dengan berkas GROMACS, kemudian dilakukan penyisipan ligan bisdemetoksikurkumin untuk simulasi dinamika molekuler berligan.

c. Pengaturan Kondisi Sistem

Pengaturan kondisi sistem dilakukan sebelum proses simulasi dinamika molekuler. Dari perintah **editconf** dihasilkan berkas `lox2.pdb`. *Output* ini dimasukkan ke dalam kotak simulasi berisi pelarut air supaya mendekati kondisi nyata dengan perintah **genbox**, lalu dihasilkan berkas `lox_b4ion.pdb` dan `lox.top`. **Genbox** membaca struktur 12-LOX dengan ukuran kotak dan sejumlah air akan ditambahkan sesuai dengan kebutuhan hingga memenuhi kotak. Hasil **genbox** ini berupa struktur 12-LOX yang terlarut dalam air dan tentunya akan mengubah berkas topologi dimana air disertakan. Jenis air yang digunakan adalah SPC216 (*Simple Point Charge*).

d. Penyusutan Energi (*Energy Minimization*)

Sistem `lox` bermuatan negatif sehingga perlu dilakukan penetralan. Sistem 12-LOX tanpa ligan dan dengan ligan bisdemetoksikurkumin masing-masing bermuatan -5 sehingga dilakukan penambahan lima buah ion Na^+ . Proses penambahan ion ini dilakukan dengan perintah **genion** dengan *input* `lox_b4ion.tpr` dan menghasilkan *output* `lox_b4em.pdb`, lalu diikuti dengan penggantian sejumlah pelarut dengan empat ion Na^+ yang telah dimasukkan ke dalam sistem dengan perintah **grompp**. Dengan **grompp**, prosesor GROMACS membaca berkas topologi molekuler, mengecek kevalidan berkas, mengembangkan topologi dari deskripsi molekuler menjadi deskripsi atomik.

Setelah dilakukan penetralan sistem, perintah **mdrun** untuk penyusutan energi dijalankan untuk menghilangkan kontak *van der Waals* yang buruk antara atom 12-LOX dengan molekul air. Penyusutan energi dilakukan hingga mencapai energi maksimum kurang dari 1000 kJ/mol. Pengaturan ini diletakkan pada berkas `em.mdp` yang akan disiapkan dengan perintah **grompp** lalu jalankan dengan perintah **mdrun**. *Time step* yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1 femto

detik. *Output* hasil keluaran perintah ini adalah berkas `lox_em.trr`, `lox_em.edr`, `lox_em.gro`.

e. Penahanan Posisi

Penahanan posisi diberlakukan terhadap sistem yang kemudian menghasilkan *output* `lox_pr.trr`, `lox_pr.edr` dan `lox_md.gro`.

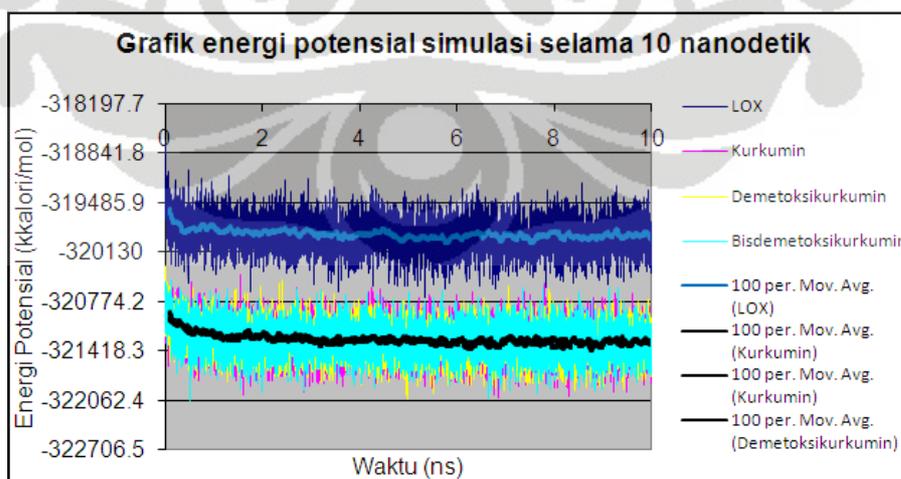
f. Simulasi Dinamika Molekuler

Simulasi dinamika molekuler dilakukan dengan komputer *Linux* berprosesor empat. Simulasi dinamika molekuler blanko berlangsung selama 779,19 jam, kurkumin selama 1001,90 jam, demetoksikurkumin selama 991,63 jam, dan bisdemetoksi selama 997,35 jam. *Output* yang dihasilkan adalah `topol.trr`, `topol.edr` dan `topol.gro`.

4.6 Analisis Hasil Simulasi Dinamika Molekuler

(1) Energi Potensial

RMSF ditentukan dari waktu saat energi potensial memiliki fluktuasi minimal. Dari grafik keempat sistem (Gambar 4.10) terlihat adanya penurunan energi potensial di awal simulasi hingga satu nanodetik. Penurunan energi potensial ini menunjukkan terjadinya relaksasi sistem pada awal simulasi yang disebabkan terjadinya penyesuaian diri dari 12-LOX dengan lingkungannya yang berupa air SPC216.

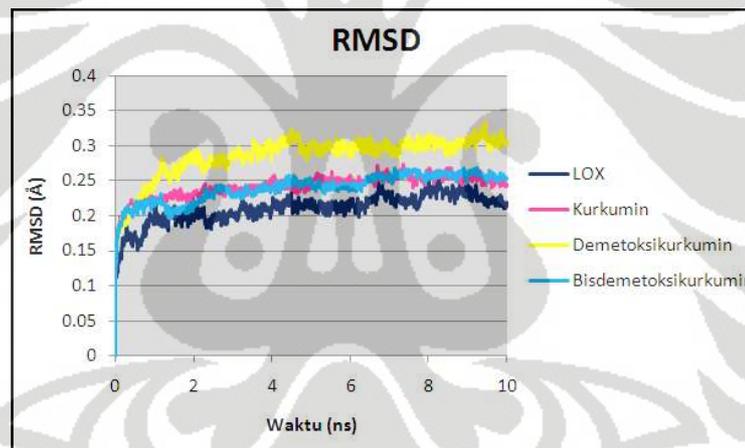


Gambar 4.10. Grafik energi potensial 12-LOX tanpa ligan selama simulasi 10 ns

Mulai dari 1 nanodetik hingga akhir simulasi, sistem berusaha mencapai kestabilan internal. Oleh karena itu, simulasi hingga 1 nanodetik tidak dimasukkan dalam evaluasi RMSF. Selama simulasi 12-LOX tanpa ligan, kisaran energi potensial berada pada -19950 kkal/mol. Pada simulasi 12-LOX dengan ligan memiliki kisaran energi potensial -321250 kkal/mol. Perbedaan kisaran energi potensial ini menunjukkan terjadinya pengikatan ligan.

(6) RMSD (*Root Mean Square Deviation*) atau akar kuadrat rata-rata deviasi

Selama simulasi berlangsung hingga mencapai waktu 4 nanodetik, keempat sistem mengalami peningkatan RMSD *backbone* yang menunjukkan bahwa struktur enzim mulai terbuka (*unfold*). RMSD *backbone* keempat sistem mulai stabil dari nanodetik ke-4. Mungkin ini disebabkan terjadi interaksi antar residu pada enzim sehingga protein cenderung mempertahankan strukturnya pada tahap ini (Gambar 4.11).

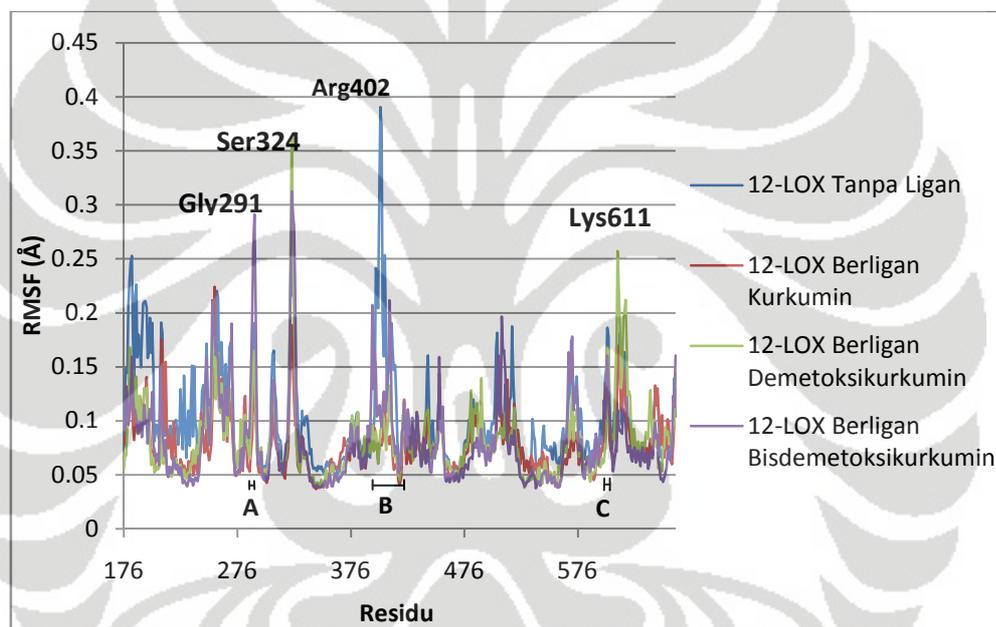


Gambar 4.11. Grafik RMSD *backbone* 12-LOX tanpa ligan, dengan ligan

Sistem berligan demetoksikurkumin cenderung stabil pada kisaran 0,3 Å hingga akhir simulasi. RMSD tertinggi dicapai oleh sistem 12-LOX berligan demetoksikurkumin. RMSD *backbone* dari sistem 12-LOX dengan ligan kurkumin, dan bisdemetoksikurkumin memiliki kecenderungan yang mirip, yaitu berkisar 0,25 Å. Sedangkan blanko 12-LOX memiliki RMSD *backbone* terendah, yaitu pada kisaran 0,23 Å dan terus mengalami peningkatan secara bertahap hingga akhir simulasi.

(7) RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*) atau akar kuadrat rata-rata fluktuasi

RMSF diukur saat energi potensial memiliki fluktuasi terkecil, yaitu dimulai dari 1 nanodetik hingga simulasi berakhir. Secara keseluruhan terdapat fleksibilitas yang tinggi pada residu hasil pemodelan homologi. Fleksibilitas yang tinggi ditunjukkan oleh grafik evaluasi RMSF (Gambar 4.12), terutama pada *loop* II, yaitu pada residu Arg402 (puncak) dan sekitarnya. Ini membuktikan bahwa terputusnya sebagian residu pada hasil kristalografi protein disebabkan oleh tingginya fleksibilitas residu protein. Wilayah yang terputus senantiasa bergerak sehingga densitas elektron membentuk pola yang tidak jelas sehingga sulit terbaca dan tidak dapat diterjemahkan dalam bentuk struktur tiga dimensi.



Gambar 4.12. Grafik RMSF C- α LOX keempat sistem setelah simulasi dinamika molekuler selama 10 ns

Puncak grafik RMSF tanpa ligan dicapai oleh residu Arg402 dengan nilai RMSF 0,39 Å. Jika disejajarkan dengan 15-LOX (Identitas PDB: 2P0M), Arg402 ini ekuivalen dengan Arg403. Arg403 ini penting dalam interaksi LOX, yaitu dimana Arg403 merupakan posisi pengikatan spesifik dari substrat 15-LOX. Arg403 dipostulasikan dapat berinteraksi dengan ujung metil dari asam arakidonat (Toledo, Masgrau, Marechal, Lluch, & Lafont, 2010).

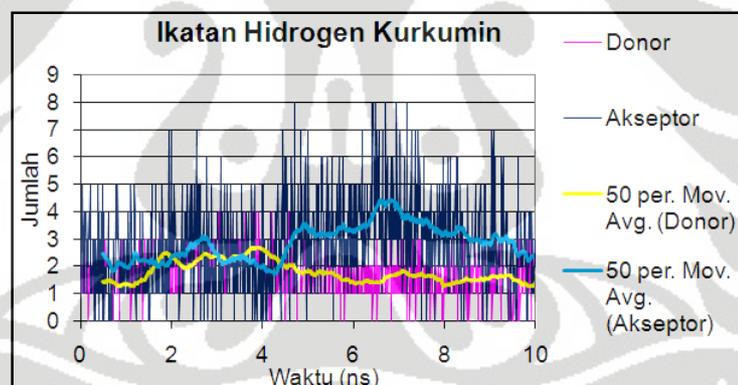
Grafik RMSF sistem 12-LOX tanpa ligan memperlihatkan adanya puncak tertinggi pada Arg402, dan puncak sedang pada Ala182, Ser324, dan Pro326.

Pada 12-LOX berligan kurkumin terdapat puncak sedang pada Gly256, berligan demetoksikurkumin terdapat puncak tertinggi pada Ser324, juga puncak sedang pada Lys611 dan Glu612, berligan bisdemetoksikurkumin memiliki puncak tertinggi pada Ser324 dan Gly291. Jika keempat grafik ini digabungkan, maka terlihat perbedaan fleksibilitas terhadap perbedaan jenis ligan.

Fleksibilitas 12-LOX dipengaruhi oleh adanya ligan yang berinteraksi. Secara umum, terdapat penurunan fleksibilitas secara drastis saat simulasi 12-LOX dengan ketiga ligan pada *loop II*. Ini terlihat dari perbedaan signifikan RMSF pada *loop II* sistem 12-LOX berligan dibanding RMSF simulasi tanpa ligan. Penurunan RMSF juga terjadi pada *loop I*.

(2) Kondisi Ikatan Hidrogen

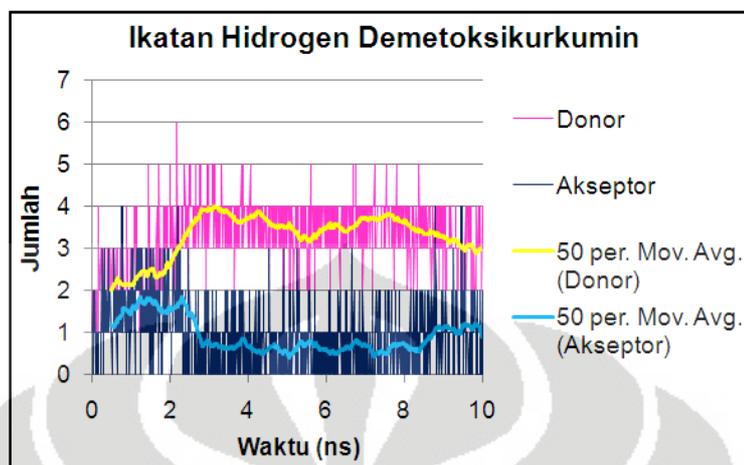
Kondisi ikatan hidrogen pada simulasi 12-LOX dengan ligan kurkumin terjadi fluktuasi akseptor hidrogen dan peningkatan yang cenderung membentuk siklus pada donor hidrogennya (Gambar 4.13). Jumlah akseptor hidrogen kompleks tersebut dicapai pada jumlah 8.



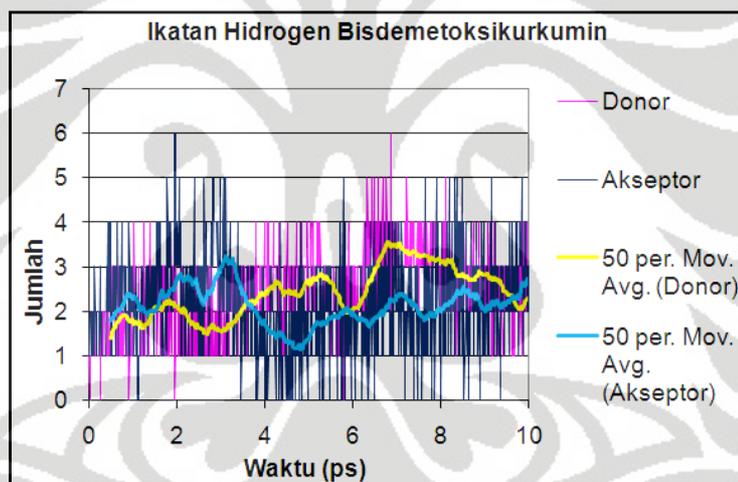
Gambar 4.13. Grafik ikatan hidrogen 12-LOX dengan kurkumin selama simulasi dinamika molekuler selama 10 ns

Kompleks 12-LOX dengan ligan demetoksikurkumin menunjukkan kenaikan jumlah donor hidrogen sebanyak 4 buah dari awal simulasi hingga 3 nanodetik, sedangkan jumlah akseptor hidrogen mencapai kestabilan sebanyak 1 buah dari 2,5 hingga akhir simulasi (Gambar 4.14). Pada kompleks 12-LOX dengan ligan bisdemetoksikurkumin terjadi peningkatan ikatan hidrogen dari sisi donor secara bertahap hingga 7 nanodetik (Gambar 4.15). Akseptor hidrogen pada kompleks tersebut juga mengalami peningkatan bertahap seperti siklus hingga 3 nanodetik,

kemudian menurun hingga 5 nanodetik sebelum terjadi kenaikan bertahap kembali.



Gambar 4.14. Grafik ikatan hidrogen 12-LOX dengan demetoksikurkumin selama simulasi dinamika molekuler selama 10 ns



Gambar 4.15. Grafik ikatan hidrogen 12-LOX dengan bisdemetoksikurkumin selama simulasi dinamika molekuler selama 10 ns

Analisis ikatan hidrogen dengan **g_hbond** diamati lebih lanjut dengan mengambil *frame* simulasi dinamika molekuler pada puncak grafik analisis ikatan hidrogen (Tabel 4.7). Terdapat kesamaan residu yang terlibat dalam interaksi ketiga ligan dengan 12-LOX, yaitu terlibatnya Trp176 sebagai akseptor hidrogen. Interaksi hidrogen 12-LOX dengan kurkumin diperlihatkan oleh Arg599 sebagai donor hidrogen, dengan demetoksikurkumin oleh Val418 sebagai donor hidrogen, dan dengan bisdemetoksikurkumin oleh Ser594. Ser594 merupakan

rantai samping polar yang berpotensi membentuk ikatan hidrogen dengan inhibitor (Utami, 2009). Residu-residu tersebut merupakan residu terdekat yang memberikan interaksi ikatan hidrogen dan berjarak kurang dari 3Å dengan masing-masing ligan.

Tabel 4.8. Data analisis simulasi dinamika molekuler dengan MOE

Waktu (ns)	Kurkumin		Demetoksikurkumin		Bisdemetoksikurkumin	
	Residu	Jarak	Residu	Jarak	Residu	Jarak
0	His365	2,70	Trp176	2,70	Trp176	2,64
	His 540	2,84				
2	Asn544	2,67	Trp176	2,73	Trp176	2,91
			Val418	3,03	Lys179	2,93
4	Trp176	2,75	Trp176	2,70	Trp176	2,61
	Ser594	2,61			Ser594	2,75
6	Trp176	2,69	Trp176	2,66	Trp176	2,85
	Arg599	2,89	Val418	2,85	Ser594	2,80
					Arg599	3,05
8	Trp176	2,88	Trp176	2,76	His540	2,92
	Arg600	2,92	Val418	2,97	Ser594	3,09
			Ala417	2,80		
10	Trp176	2,78	Trp176	2,67	Trp176	2,80
					His365	3,06
					Ser594	2,95

Secara keseluruhan, simulasi dinamika molekuler selama 10 nanodetik cukup menggambarkan stabilitas ikatan antara 12-LOX dan mekanisme inhibisi dengan ligan. Jika waktu simulasi ingin diperpanjang, sebaiknya dilakukan dengan memanfaatkan kluster, suatu komputer paralel dengan beberapa prosesor, sehingga lamanya waktu komputasi lebih pendek. Akan lebih baik lagi jika simulasi dinamika molekuler memunculkan Fe^{3+} sehingga simulasi makin mendekati kondisi sebenarnya.

(3) Visualisasi Lintasan Simulasi

Untuk menjalankan visualisasi dengan VMD diperlukan berkas `topol.gro` sebagai molekul hasil dan `topol.trr` sebagai lintasan. Dari hasil pengamatan visualisasi simulasi dinamika molekuler selama 10 nanodetik dengan VMD, diperoleh bahwa perbedaan pergerakan ligan yang cenderung stabil. Selama simulasi berlangsung, ion Na^+ tetap berada pada tempatnya.

Dari data pengambilan *frame* simulasi dinamika molekuler setiap 2 nanodetik dengan **trjconv**, dapat diamati interaksi ligan terhadap residu 12-LOX yang divisualisasi dengan MOE. Dari visualisasi tersebut dapat dilihat pergerakan molekul 12-LOX terhadap ligan (Gambar 4.16-4.18, Tabel 4.8). Terlihat beberapa kesamaan residu terdekat dengan ketiga ligan, seperti Trp176. Pada struktur kristal 12-LOX, residu Trp176 merupakan bagian pada C-terminal yang membentuk daerah katalitik enzim (Khana, 2003).

Pada 15-LOX, residu Ile418, Phe353, dan Ile593 dipostulasikan berinteraksi dengan ujung metil dari asam arakidonat (Toledo, Masgrau, Marechal, Lluch, & Lafont, 2010). Jika disetarakan dengan 12-LOX, residu-residu tersebut ekuivalen dengan Val418, Phe352, dan kemungkinan antara Ile593 dan Ser594. Dari keempat residu tersebut, Val418 berada pada residu *disorder loop* II sehingga residu tersebut tidak dapat diamati pada penelitian sebelumnya. Val418 muncul pada visualisasi simulasi dengan MOE (Tabel 4.10-4.11). Pada penelitian sebelumnya, residu Phe352, Ile593, dan Ser594 teramati dapat berinteraksi dengan ketiga ligan (Tabel 4.9). Terjadi kestabilan ikatan Val418, Ile593, dan Ser594 pada simulasi 12-LOX dengan kurkumin, Ile593 dan Ser594 pada simulasi 12-LOX dengan demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin dengan Phe352 yang fluktuatif. Residu lainnya yang tidak dapat diamati tetapi muncul pada visualisasi ini antara lain Phe414, Ala417, Lys416, Ile408, Ile413 pada *loop* II, dan Cys559 pada *loop* III.

Residu Val418, Phe352, Ile593, dan Ser594 membentuk suatu kantung (*pocket*) hidrofobik pada 12-LOX yang menjadi target penambatan ligan. Selama simulasi dinamika molekuler berlangsung, kurkumin tertambat pada *pocket binding site* hidrofobik tersebut. Terdapat perbedaan fleksibilitas antara ujung metoksi yang satu dengan yang lain. Salah satu ujung metoksi yang tertambat pada kantung hidrofobik 12-LOX terlihat kurang fleksibel (Gambar 4.19).

Pada awal simulasi 12-LOX dengan ligan demetoksikurkumin, ujung metoksi dari ligan berada dekat terhadap *pocket* hidrofobik. Namun, terlihat perubahan bentuk kantung sisi aktif secara signifikan yang dapat diamati dengan seksama pada visualisasi tiap 2 nanodetik dimana mekanisme *induced fit* 12-LOX dapat

teramati dengan jelas. Bentuk kantung sisi aktif menjadi tertutup sehingga ligan demetoksikurkumin terperangkap didalamnya (Gambar 4.20).

Pada simulasi 12-LOX dengan ligan bisdemetoksikurkumin yang diamati secara visual, terlihat perubahan kantung *binding site* yang ada pada awal simulasi perlahan terbuka membentuk suatu terowongan (Gambar 4.21). Mungkin ini disebabkan hilangnya kedua gugus metoksi membuat hidrofobisitas ligan bisdemetoksi menurun sehingga interaksi hidrofobik yang dapat terjadi pada ujung kantung hidrofobik tidak terjadi.

Situs aktif 12-LOX terbentuk oleh atom Fe non heme yang dibatasi heliks α_1 . Residu asam amino yang penting diantaranya His360, His365, His453, dan His540 yang berperan penting sebagai agen pengkhelat besi (Utami, 2009). Pada awal simulasi 12-LOX dengan kurkumin terdapat interaksi donor hidrogen dari rantai samping His365 dan His540. Pada simulasi 12-LOX dengan kurkumin dan bisdemetoksikurkumin dapat dilihat terdapat interaksi dengan residu His360 dan His365 yang stabil, sedangkan pada demetoksikurkumin terdapat interaksi dengan His365 yang relatif stabil.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Hasil penambatan molekuler menunjukkan bahwa tautomer keto memiliki aktivitas inhibisi terhadap 12-LOX dilihat dari perbandingan nilai ΔG yaitu bernilai negatif untuk tautomer keto dan bernilai positif untuk tautomer enol.
2. Simulasi dinamika molekuler 12-LOX dengan ketiga ligan menunjukkan terdapat perbedaan mode pengikatan ligan dari kompleks 12-LOX dengan masing-masing ligan, yaitu simulasi pada kompleks 12-LOX dengan kurkumin menunjukkan konformasi yang cenderung stabil, sedangkan kompleks dengan demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin menunjukkan perubahan konformasi pada situs pengikatan 12-LOX berturut-turut menjadi konformasi tertutup dan terbuka.

5.2 Saran

1. Simulasi dinamika molekuler 12-LOX perlu dikembangkan dengan membangun topologi ion Fe^{3+} supaya lebih mirip dengan kondisi sebenarnya.
2. Memperpanjang waktu simulasi dinamika molekuler untuk melihat pergerakan 12-Lipoksigenase secara lengkap menggunakan komputer kluster untuk mempersingkat proses simulasi.
3. Prosedur simulasi dinamika molekuler dengan GROMACS perlu dikembangkan lebih lanjut sehingga dapat diperoleh parameter ΔG yang dapat mendukung analisis secara lebih mendalam.

DAFTAR ACUAN

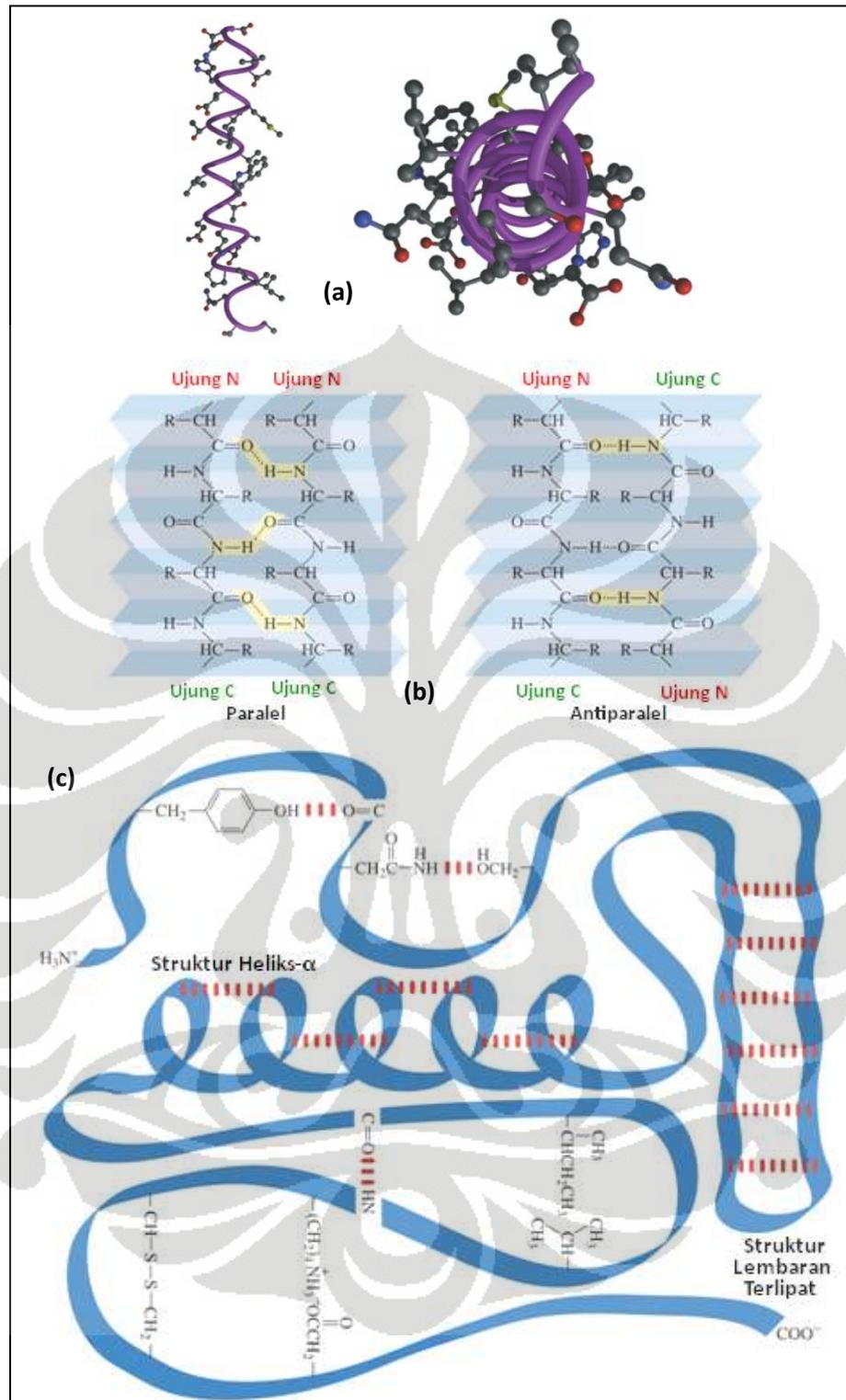
- Abedon, ST. Important words and concepts from stryer biochemistry, 4th Ed. Diunduh tanggal 29 Oktober 2009 pukul 17.17 dari <http://www.mansfield.osu.edu/~sabedon/biochem511.htm>
- Aggarwal, B. B., Sundaram, C., Malani, N., & Ichikawa, H. (2006). Curcumin: The Indian solid gold. *ETO*.
- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Newman, R. A., & Aggarwal, B. B. (2007). Bioavailability of Curcumin: Problems and promises. *Mol. Pharmaceutics* , 4 (6), 807-818.
- Araujo, C. A., & Leon, L. L. (2001). Biological activities of *Curcuma longa* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz* , 96 (5), 723-728.
- Berman, HM. The protein data bank (2000). *Nucleic Acid Research*. 28, 235-242. www.rcsb.org/pdb/
- Bruice, P. Y. (2004). *Organic chemistry* (4th ed.).
- Carey, F. A. (2000). *Organic chemistry* (4th ed.). USA: McGraw-Hill.
- Coffa, G., & Alan, R. B. (2004). Single Active Residue Directs Oxygenation Stereospecificity in Lipxygenases: Stereocontrol is Linked to the Posotion of Oxygenation. *PNAS* , 101 (44), 15579-15584.
- Cooper, J. (1996, Februari 4). *The Ramachandran Plot*. Diunduh tanggal 28 Oktober 2008 pukul 08.27 dari [ttp://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS2/course/section3/rama.html](http://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS2/course/section3/rama.html)
- DeLano, W. L., & Bromberg, S. (2004). *Pymol user's guide*. Diunduh tanggal 28 Mei 2009 pukul 10.32 dari <http://pymol.sourceforge.net/newman/yserman.pdf>
- Felton, M. J. (2000). Survival of the fittest in drug design. *Mod. Drug Disc.* , 3 (9), 49-54.
- Fessenden, R. J., & Fessenden, J. S. (1986). *Organic chemistry* (3rd ed.). California: Wadsworth.
- Fiser, A., & Sali, A. (2001). *Comparative protein structure modeling with MODELLER: a practical approach*. Diunduh tanggal 19 September 2009 pukul 09.23 dari <http://salilab.org/modeller/methenz/andras/andras.html>

- Fiser, A., Gian, D., Richard, K., & Sali, A. (2003). Modelling of loops in protein structure. *Bioinformatics*, *19*, 2500-2501.
- Ganiswarna, S. G. (1995). *Farmakologi dan terapi edisi ke-4*. Jakarta: FKUI.
- Harmita, & Radji, M. (2005). *Buku ajar analisis hayati*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Harmita, Harahap, Y., & Hayun. (2006). *Buku ajar kimia medisinal*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Holtje, H. D., Sippl, W., Rognan, D., & Folkers, G. (2008). *Molecular modeling, basic principles and application*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schuelten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.*, *14*, 33-38.
- Hyde, C. A., & Missailidis, S. (2009). Inhibition of arachidonic acid metabolism and its implication on cell proliferation and tumour-angiogenesis. *International Immunopharmacology*.
- Ikawati, Z., Asmara, L. S., & M., S. A. (2007). *Pengaruh senyawa heksagamavunon-1 (HGV-1) terhadap inflamasi akut akibat reaksi Anafilaksis kutaneus aktif pada tikus Wistar jantan terinduksi ovalbumin*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi UGM.
- Kalliokoski, T., Salo, H. S., Lahtela-Kakkonen, M., & Poso, A. (2009). The effect of ligand-based tautomer and protomer on structure-based virtual screening. *J. Chem. Inf. Model.*, *49*, 2742-2748.
- Karplus, M., & Kuriyan, J. (2005). Molecular dynamics and protein function. *PNAS*, *102* (19), 6679-6685.
- Kerrigan, J. E. (n.d.). *GROMACS introductory tutorial for drug-enzyme complex, revised for Gromacs ver 4.0*. Diunduh tanggal 12 Juli 2009 pukul 13.45 dari http://eugen.leitl.org/chem/kerrigje/pdf_files/fwspidr_tutor.pdf
- Kerrigan, J. E. (n.d.). *GROMACS tutorial for drug-enzyme complex, revised for Gromacs ver 3.3.1*. Diunduh tanggal 12 Juli 2009 pukul 14.08 dari http://www.emdnj.edu/~kerrigje/pdf-files/trp_drug_tutor.pdf

- Khana, S. e. (2003). Molecular basis of vitamin E action. Tocotrienol modulates 12-Lipoxygenase, a key mediator of glutamate-induced neurodegeneration. *Jour. Of Biol.* , 278, 43508-43515.
- Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., & Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. *Nature Reviews, Drug Discovery* , 3.
- Mc Murry, J. (1992). *Organic chemistry* (3rd ed.). USA: Brooks/Cole Publishing Company.
- MOE: *The Molecular Operating Environment*. (2009). Diunduh tanggal 17 Februari 2010 pukul 15.47 dari <http://www.chem.ac.ru/Chemistry/Soft/MOPERENV.en.html/>
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Huey, R., Lindstrom, W., Hart, W. E., Kurowski, S., et al. (2010, 5 Februari). *Autodock*. Diunduh tanggal 10 Mei 2010 pukul 15.23 dari AutoDock: <http://autodock.scripps.edu/>
- Murray, e. a. (2003). *Harper's illustrated biochemistry* (26th ed.). USA: Mc Graw-Hill.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., & Rodwell, V. W. (2003). *Biokimia harper Edisi ke-25* (25 ed.). (A. Hartono, Terj.) Jakarta: EGC.
- Natural anti-inflammation herbs*. (n.d.). Diunduh tanggal 8 September 2009 pukul 11.34 dari <http://www.connecticutcenterforhealth.com/inflammation.html>
- Orengo, C. A., Jones, D. T., & Thornton, J. M. (2003). *Bioinformatics, genes, protein, and computer*. New York: Bios Scientific Publishers.
- Rackova, L., Marek, O., Daniela, K., Viktor, K., & Lydia, B. (2007). Free radical scavenging activity and lipoxygenase inhibition of Mahonia aquifolium extract and isoquinoline alkaloids. *J. of Inflammation* , 4, 15.
- Ragno, R., Tramontano, A., Martinelli, A., & Tuccinardi, T. (n.d.). *Molecular docking tutorial*. Diunduh tanggal 28 Juli 2009 pukul 11.35 dari <http://www.mmvsl.farm.unipi.it/>
- Roome, T. (2007). Anti-inflammatory activity of Aegiceras corniculatum and its mechanism of action using in vivo and in vitro systems. *Disertasi Doktor*.l. Pakistan: Departement of Pharmacology Faculty of Pharmacy University of Karachi.

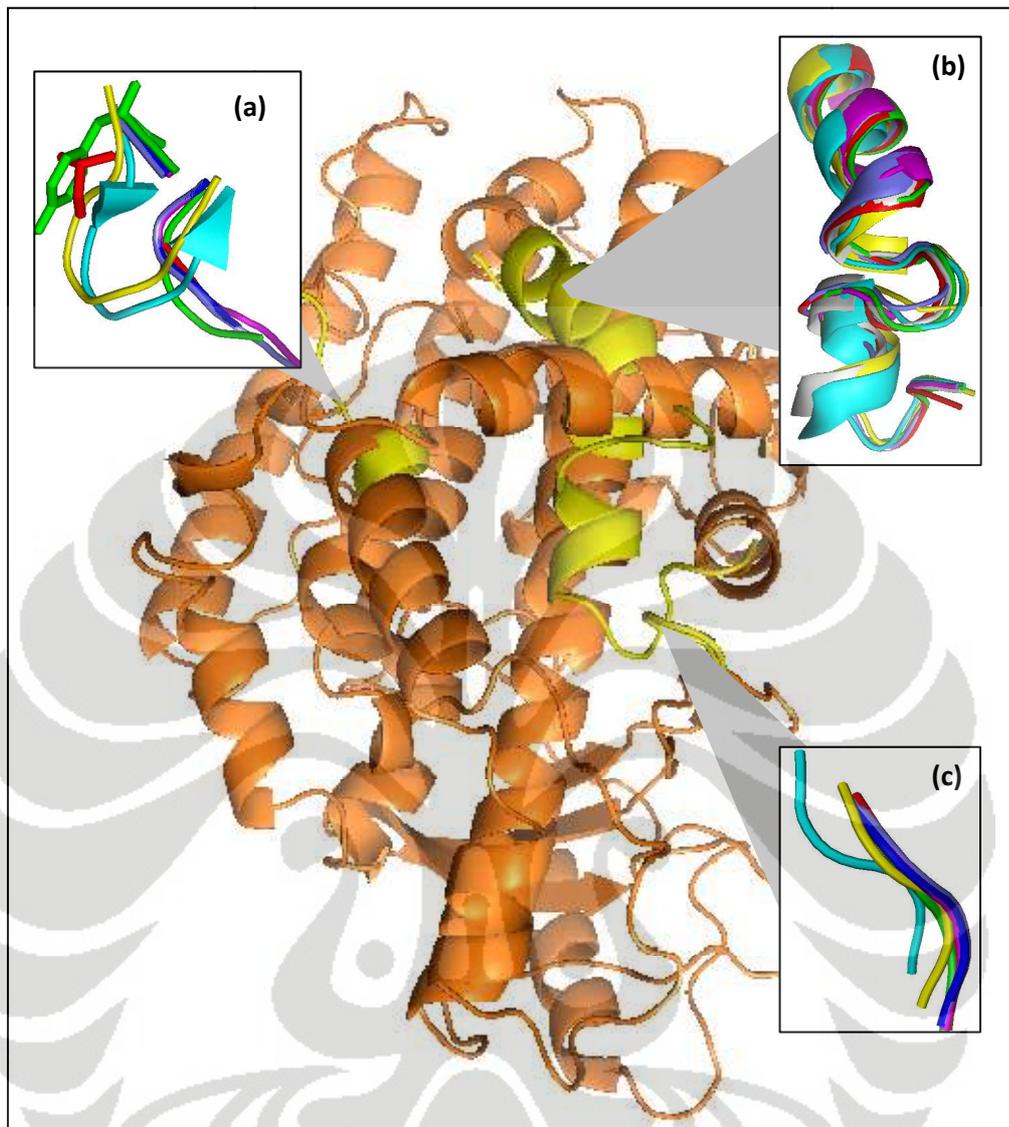
- Sali, A. (2009). *MODELLER a program for protein structure modeling release 9v7, r6923*. Diunduh tanggal 22 Oktober 2009 pukul 14.22 dari <http://salilab.org/modeller/>
- Sali, A., & Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* , 234, 779-815.
- Sali, A., & Tom, L. B. (1993). Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* , 234, 779-815.
- Sanchez, R., & Sali, A. (1997). Advances in comparative protein structures modeling. *Curr. Opin. Struct. Biol.* , 7, 206-214.
- Schuettelkopf, A. W., & van Allen, D. M. (2004). PRODRG-A tool for high throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Cryst* , D60, 1355-1363.
- Seshasayee, A. S. (2005). High-Temperature unfolding of a trp-Cage mini-protein: a molecular dynamics simulation study. *Theoretical Biology and Medical Modelling* , 2, 7.
- Sharma, R. A., Gescher, W. S., & Steward, W. P. (2005). Curcumin: The story so far. *European Journal of Cancer* , 41, 1955–1968.
- Spoel, D. V., Erik, L., Berk, H., Gerrit, G., Alan, E. M., & Herman, J. C. (2005). Gromacs: Fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.* , 26 (16), 1701-1707.
- Supercomputing Centre, L. (2009, December 10). *GROMACS: A molecular dynamics package*. Diunduh tanggal 25 Januari 2010 pukul 20.23 dari Leibniz-Rechenzentrum: <http://www.lrz-muenchen.de/services/software/chemie/gromacs/index.html>
- Teodoro, M. L., Jr., G. N., & Kavraki, L. E. (2001). Molecular docking: A problem with thousands of degrees of freedom. *IEEE International Conference on Robotics and Automation. 2001*, 960-966. Seoul: IEEE.
- The CCP4 Suite: Program for protein crystallography. (1994). *Acta Cryst* , 50, 760-763.
- Tiikkainen, P. (2010). *Study of ligand-based virtual screening tools in computer-aided drug design*. Turun Yliopisto, Finlandia: University Of Turku.

- Toledo, L., Masgrau, L., Marechal, J.-D., Lluch, J. M., & Lafont, A. G. (2010). Insights into the mechanism of binding of arachidonic acid to mammalian. *J. Phys. Chem. B*, XXXX, xxx, 000, A-I.
- Top 15 global therapeutic classes, 2009, total audited markets.* (2009, December). Diunduh tanggal 9 Juni 2010 pukul 14.33 dari IMS Health Midas: http://www.imshealth.com/deployedfiles/imshealth/Global/Content/StaticFile/Top_Line_Data/Top%2015%20Global%20Therapeutic%20Classes_2009.pdf
- Utama, A. (2003). Peranan bioinformatika dalam dunia kedokteran. *Artikel Populer IlmuKomputer.Com*.
- Utami, C. A. (2009). Screening aktivitas anti inflamasi senyawa aktif yang terkandung pada beberapa tanaman obat indonesia melalui penghambatan enzim 12-Lipoksigenase secara in silico. *Skripsi Sarjana Farmas*. Depok: FMIPA UI.
- Vega ZZ - Molecular modeling toolkit for windows.* (2006). Diunduh tanggal 8 September 2009 pukul 16.03 dari Theoretical and Computational Biophysics Group: <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/wiki/?NamdAndVEGA>
- Whitehouse, M. W., & Rainsford, K. D. (2006). Liposygenase inhibition: The Neglected frontier for regulating chronic inflammation and pain. *Inflammopharmacology*, 14, 99-102.
- Wirjowidagdo, S. (2000). *Kimia dan farmakologi bahan alam edisi pertama*. Depok: UI.
- Xhen, X.-S., & Funk, C. D. (1993). Structure-function properties of human platelet 12-Lipoxygenase: Chimeric enzyme and in vitro mutagenesis studies. *FASEB J.*, 7, 694-701.



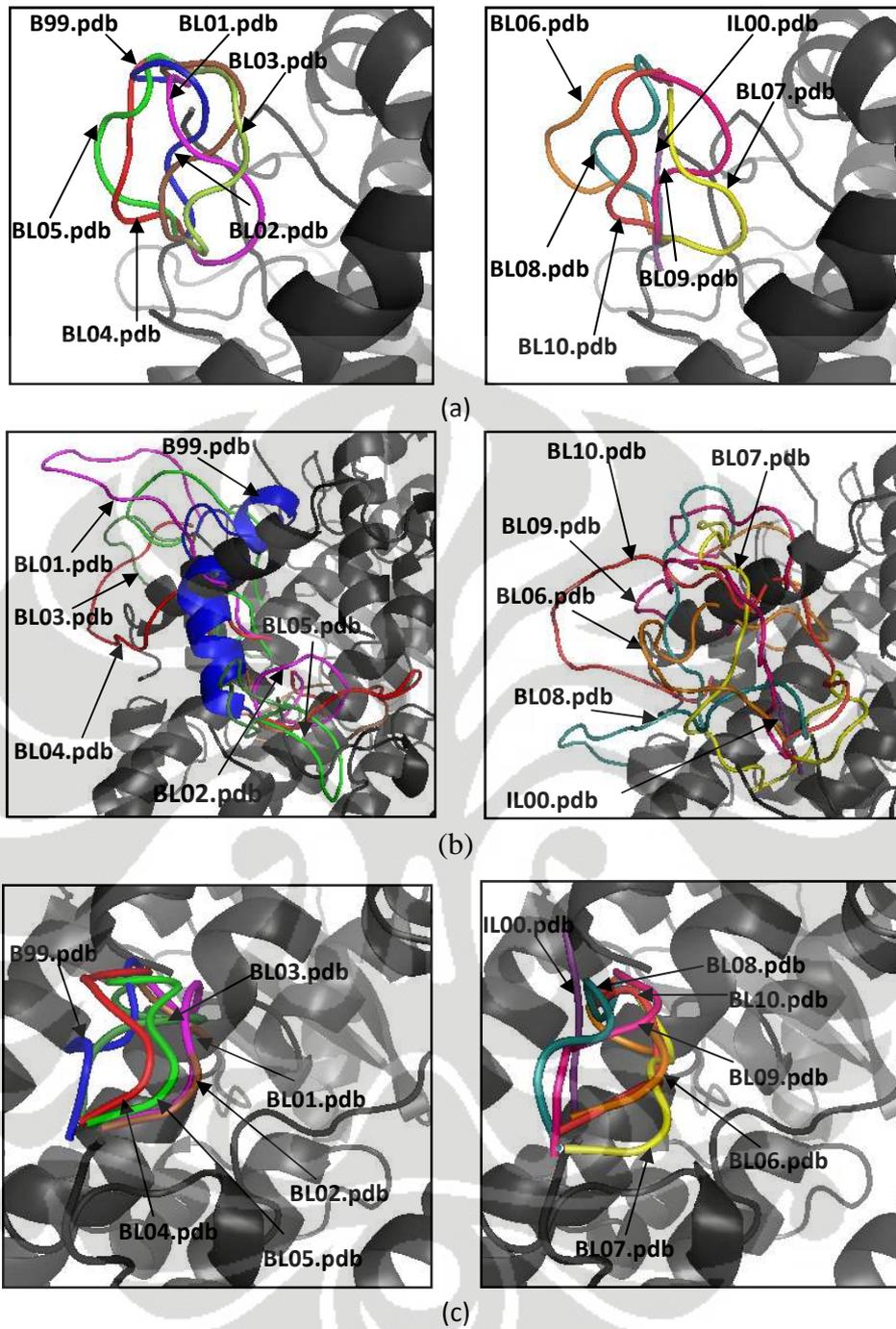
[Sumber: Bruice, 2004 "telah diolah kembali"]

Gambar 2.1 Struktur protein (a) α -heliks, (b) lipatan paralel dan antiparalel β , dan (c) struktur tersier protein



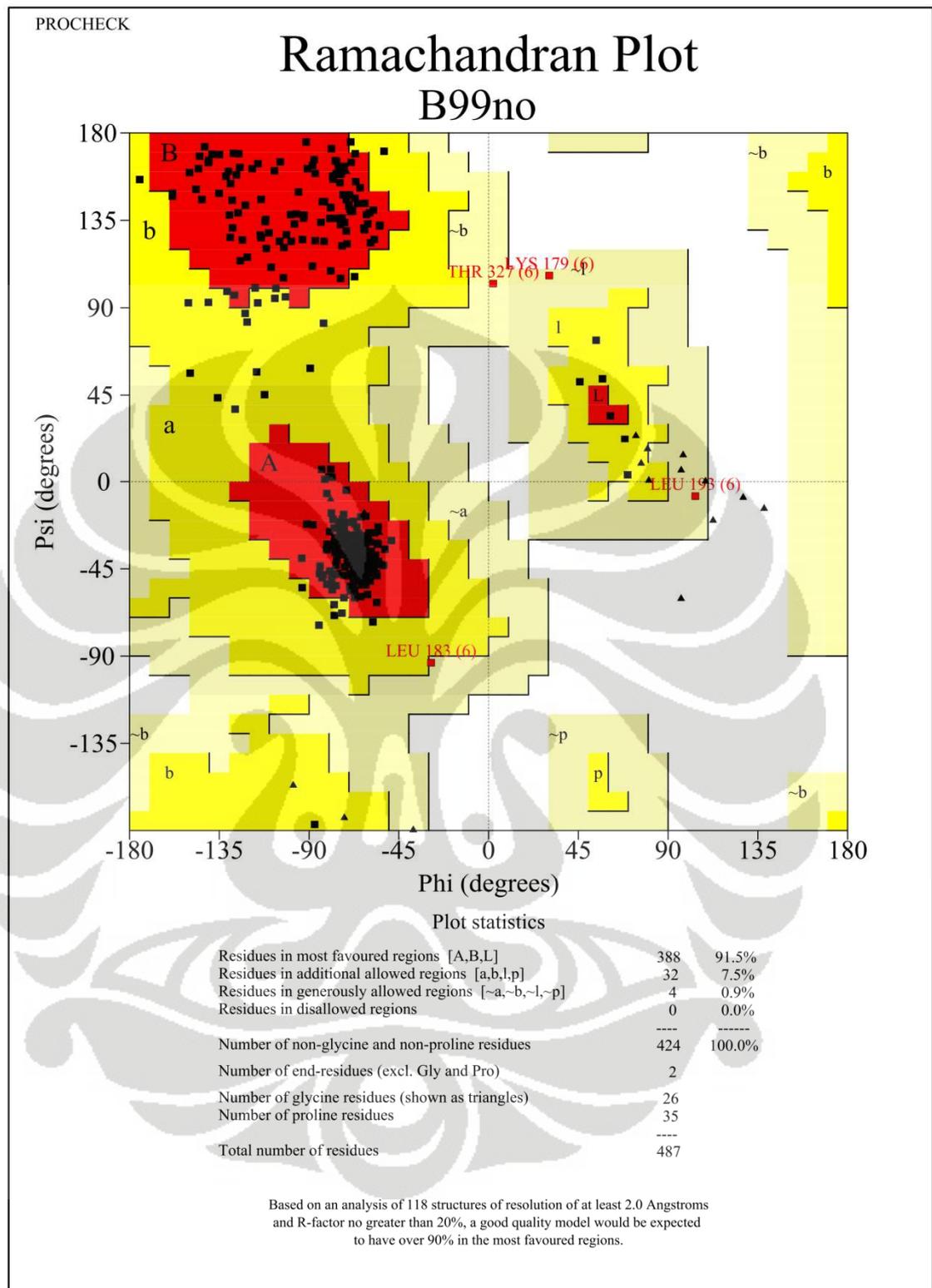
Hasil permodelan homologi ditunjukkan oleh struktur berwarna kuning pada target 12-LOX (jingga). Struktur hasil permodelan homologi ini didapat dari kombinasi homolog 12-LOX (tampak diperbesar). Model 12-LOX hasil kombinasi (kuning), 2P0M (sian), 2DY5 (hijau), 2FNQ (merah), 3FG1 (biru), 3FG3 (ungu), 3FG4 (magenta) pada: (a) loop I (residu 111-117); (b) loop II (residu 220-238); (c) loop III (residu 423-428)

Gambar 4.1. Hasil permodelan homologi pada target 12-LOX



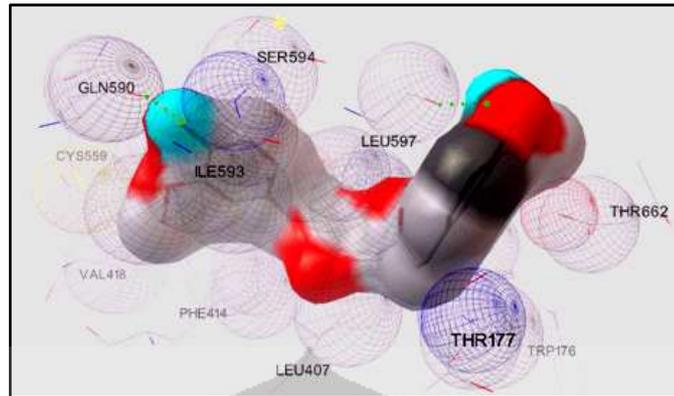
Keterangan: Hanya model B99.pdb yang memberikan konformasi α -helix. Model lainnya memberikan *loop* saja.

Gambar 4.2. Visualisasi hasil permodelan homologi wilayah yang *disorder* pada (a) *loop* I, (b) *loop* II, dan (c) *loop* III

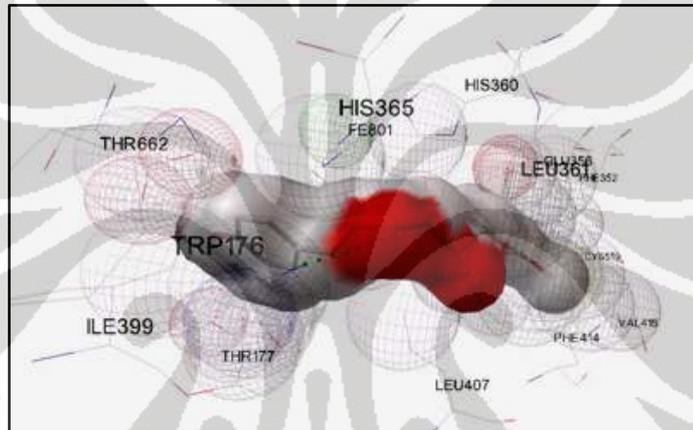


B99no_01.ps

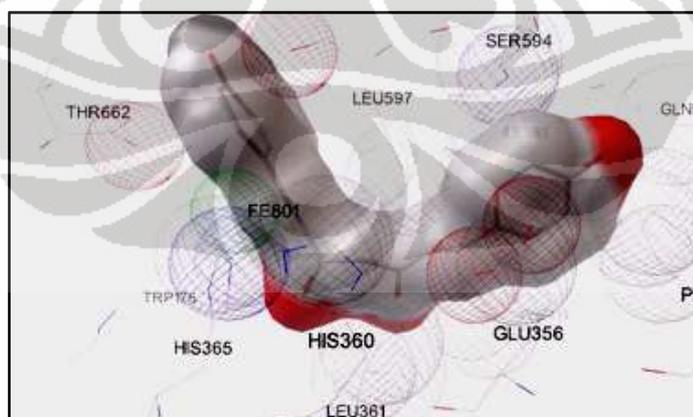
Gambar 4.3. Plot Ramachandran hasil permodelan homologi



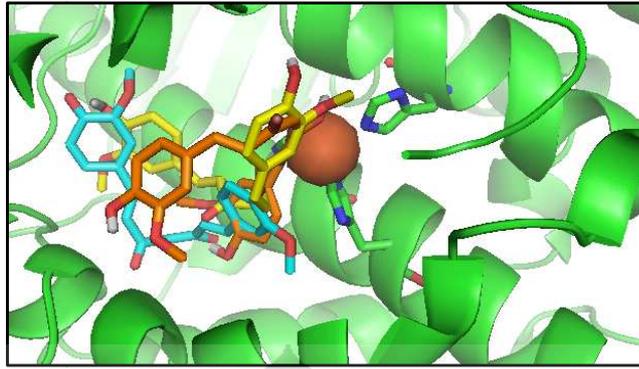
Gambar 4.4. Konformasi ligan kurkumin setelah *docking*, titik-titik hijau menunjukkan ikatan hidrogen ligan dengan 12-LOX



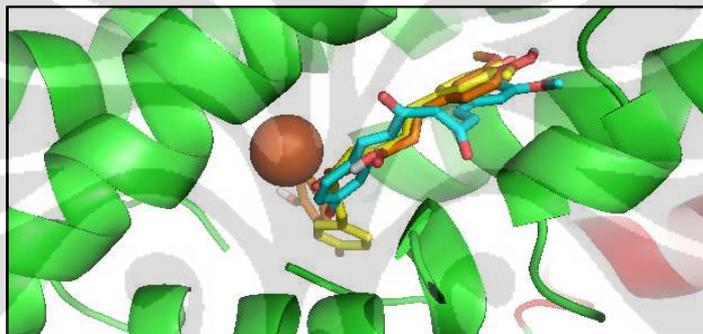
Gambar 4.5. Konformasi ligan demetoksikurkumin setelah *docking* terhadap 12-LOX, titik-titik hijau menunjukkan ikatan hidrogen ligan dengan 12-LOX



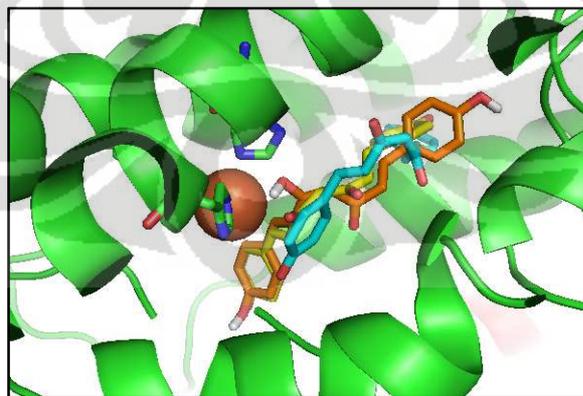
Gambar 4.6. Konformasi ligan bisdemetoksikurkumin setelah *docking* terhadap 12-LOX



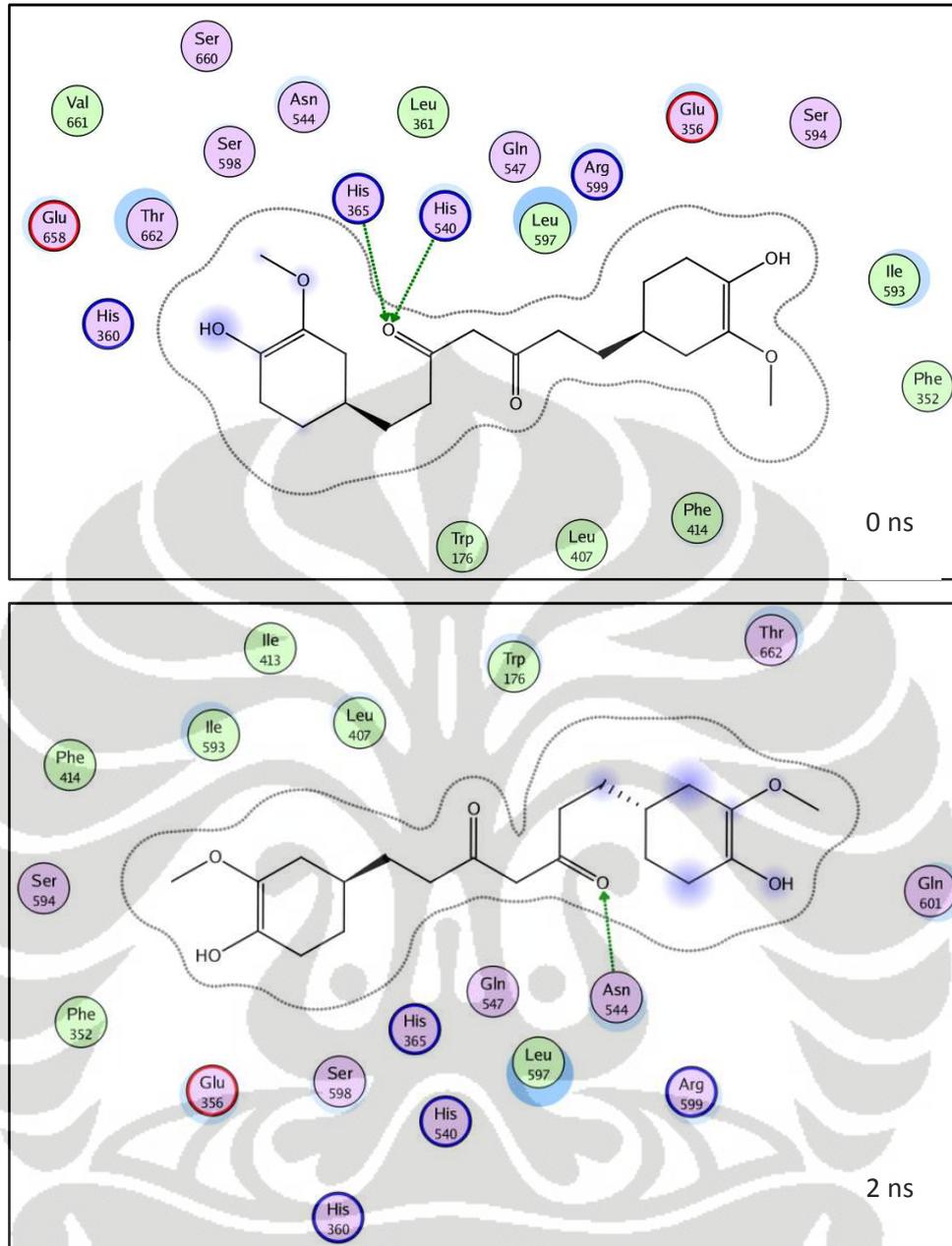
Gambar 4.7. Perbandingan visualisasi hasil *docking* kurkumin sebelum pemodelan homologi (biru) dan sesudah pemodelan homologi berupa tautomer keto (kuning) dan tautomer enol (jingga) terhadap target 12-LOX



Gambar 4.8. Perbandingan visualisasi hasil *docking* demetoksikurkumin sebelum pemodelan homologi (biru) dan sesudah pemodelan homologi berupa tautomer keto (kuning) dan tautomer enol (jingga) terhadap target 12-LOX



Gambar 4.9. Perbandingan visualisasi hasil *docking* bisdemetoksikurkumin sebelum pemodelan homologi (biru) dan sesudah pemodelan homologi berupa tautomer keto (kuning) dan tautomer enol (jingga) terhadap target 12-LOX



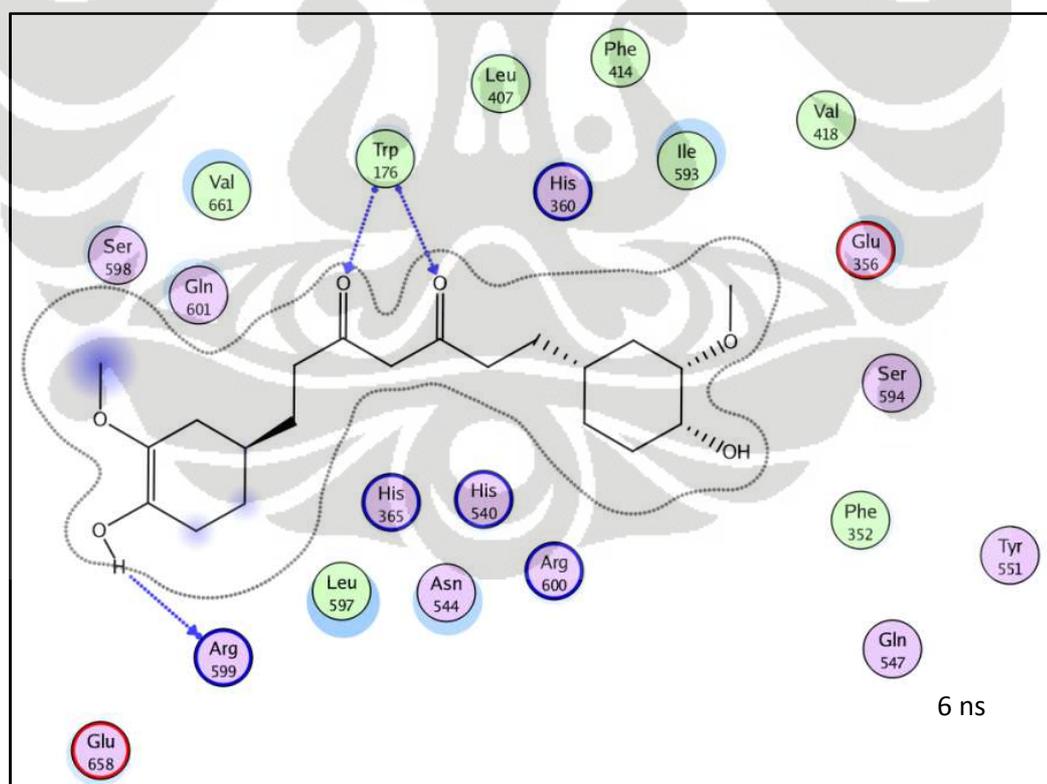
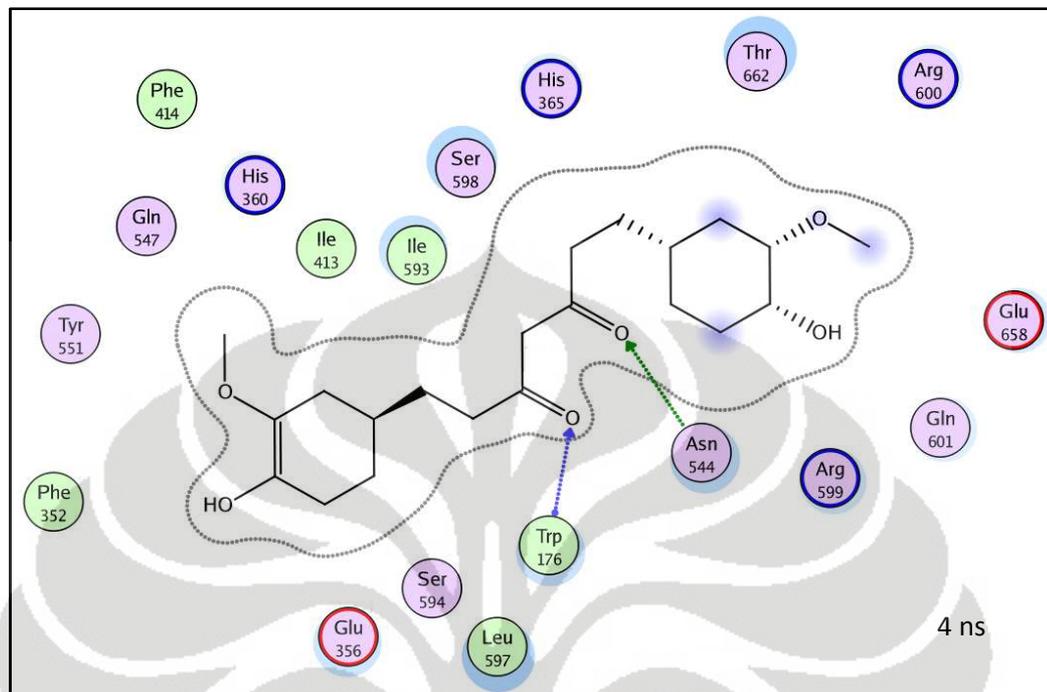
Keterangan :

- | | | | |
|------------|-------------------|-------------------|------------|
| ○ (purple) | → (green) | ○ (white) | ⊞ (green) |
| ○ (red) | → (blue) | ○ (grey) | ⊞+ (green) |
| ○ (blue) | → (yellow dashed) | ○ (purple dashed) | |
| ○ (green) | → (blue dashed) | ○ (white) | |
| ○ (dotted) | ○ (blue) | ○ (white) | |
| | ○ (white) | | |

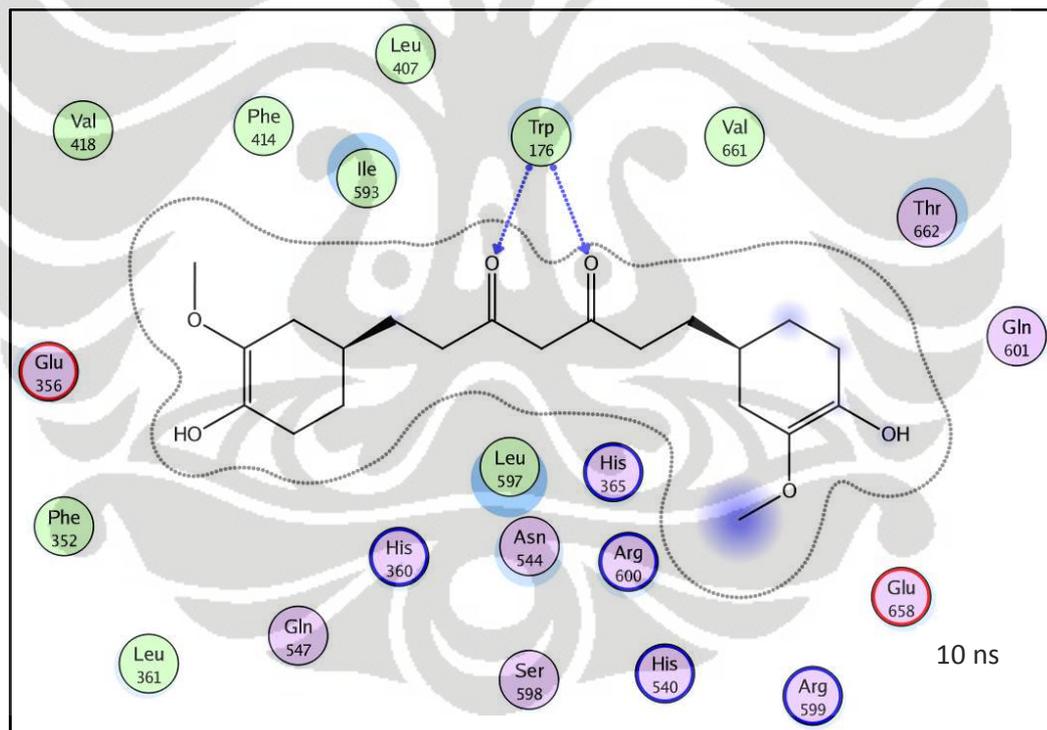
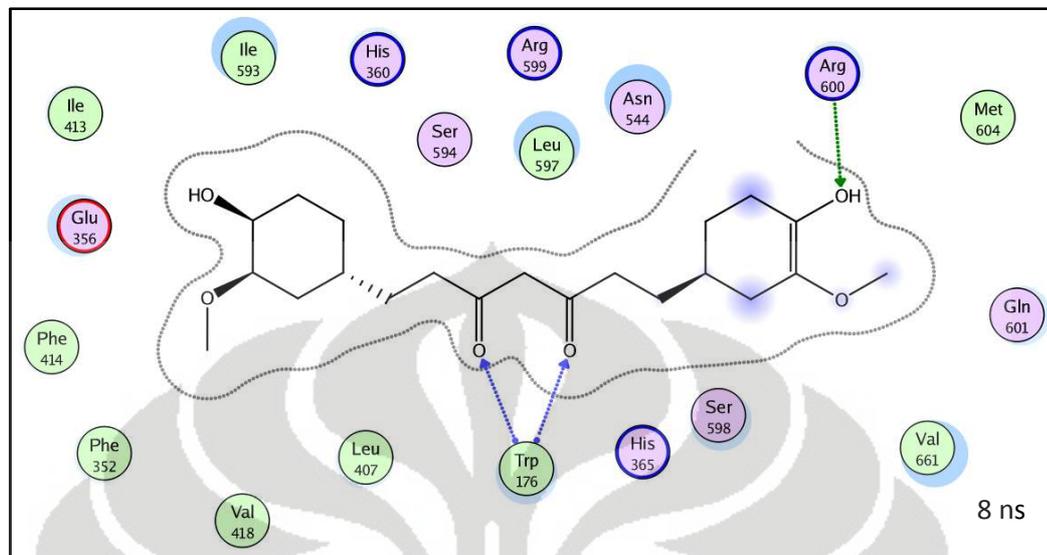
[Sumber: MOE]

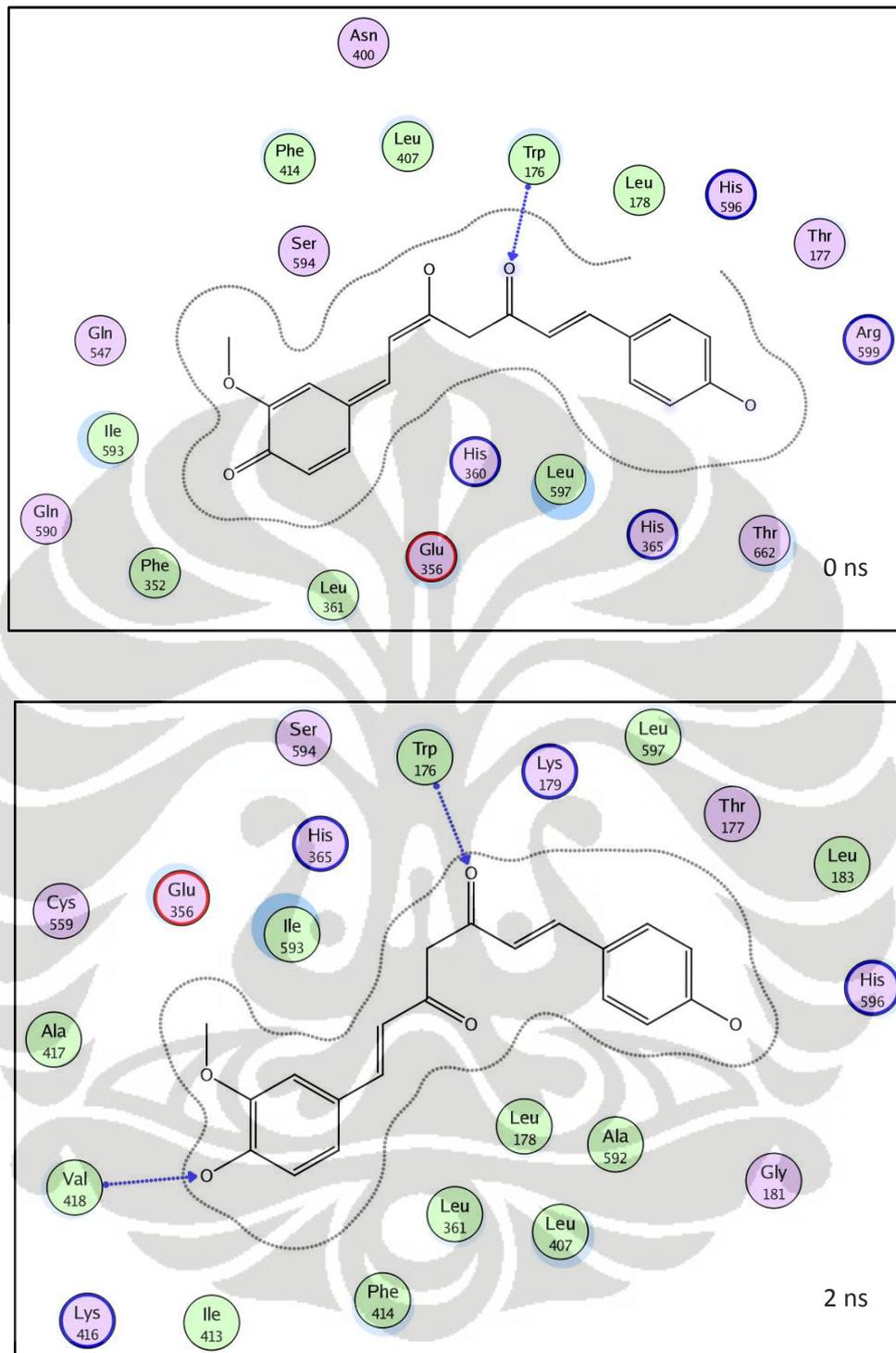
Gambar 4.16. Interaksi ikatan 12-LOX dengan kurkumin selama simulasi dinamika molekuler (0ns, 2ns, 4ns, 6ns, 8ns, 10ns)

(Lanjutan)



(Lanjutan)

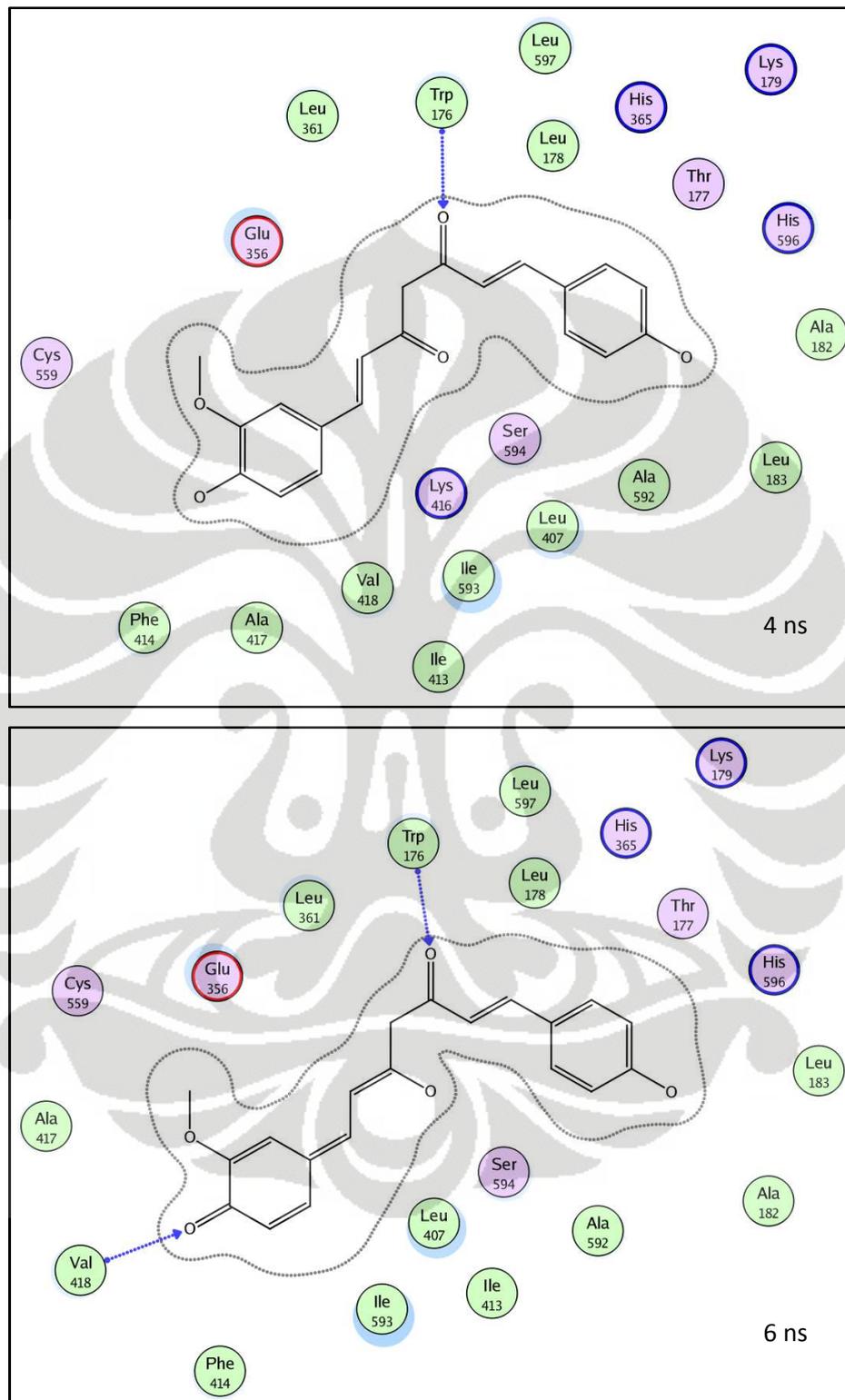




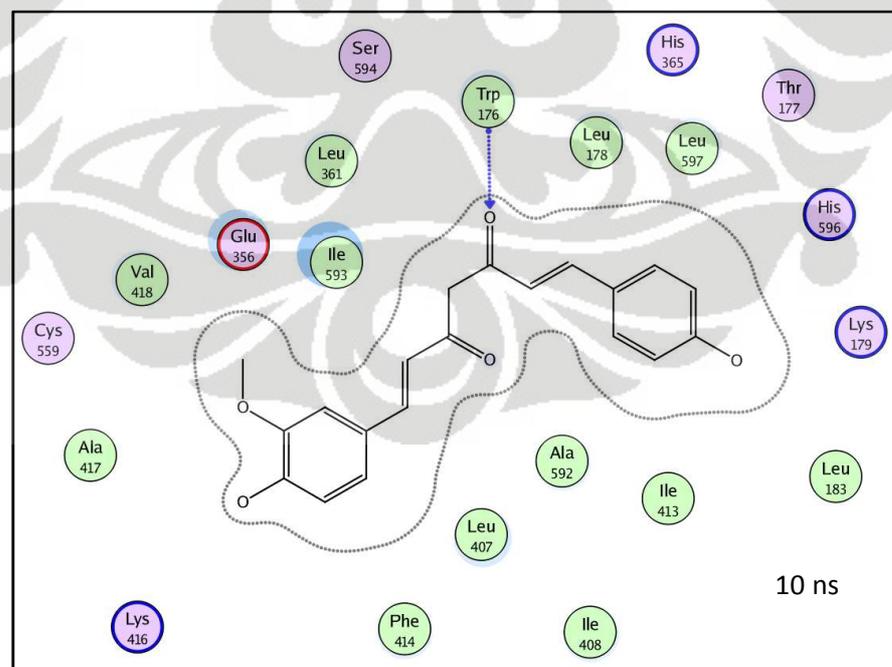
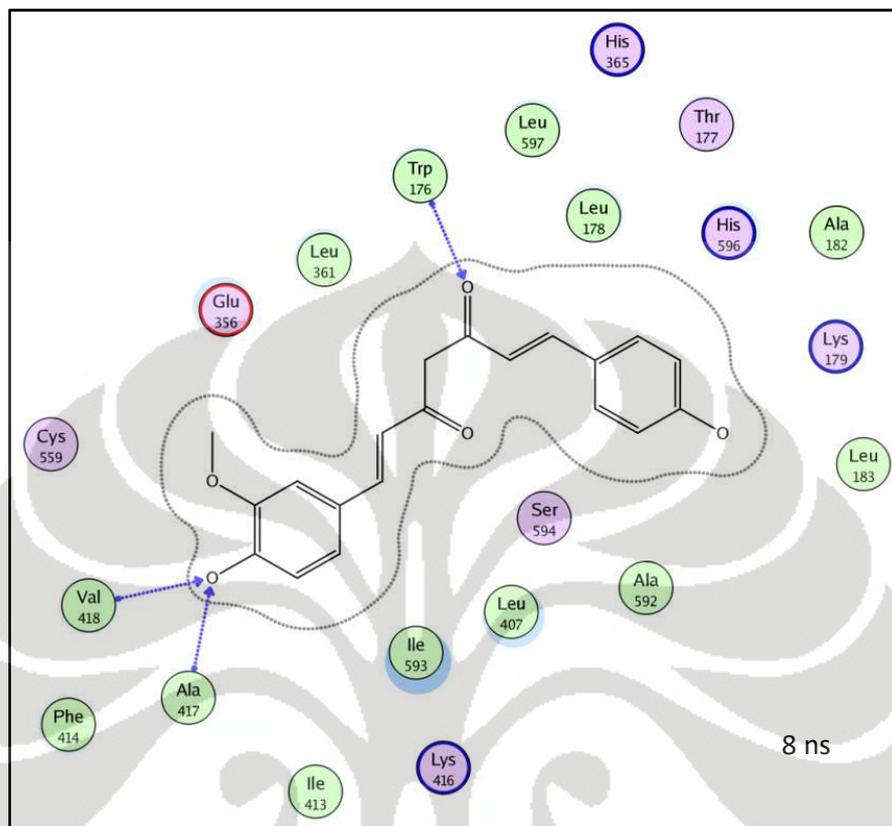
[Sumber: MOE]

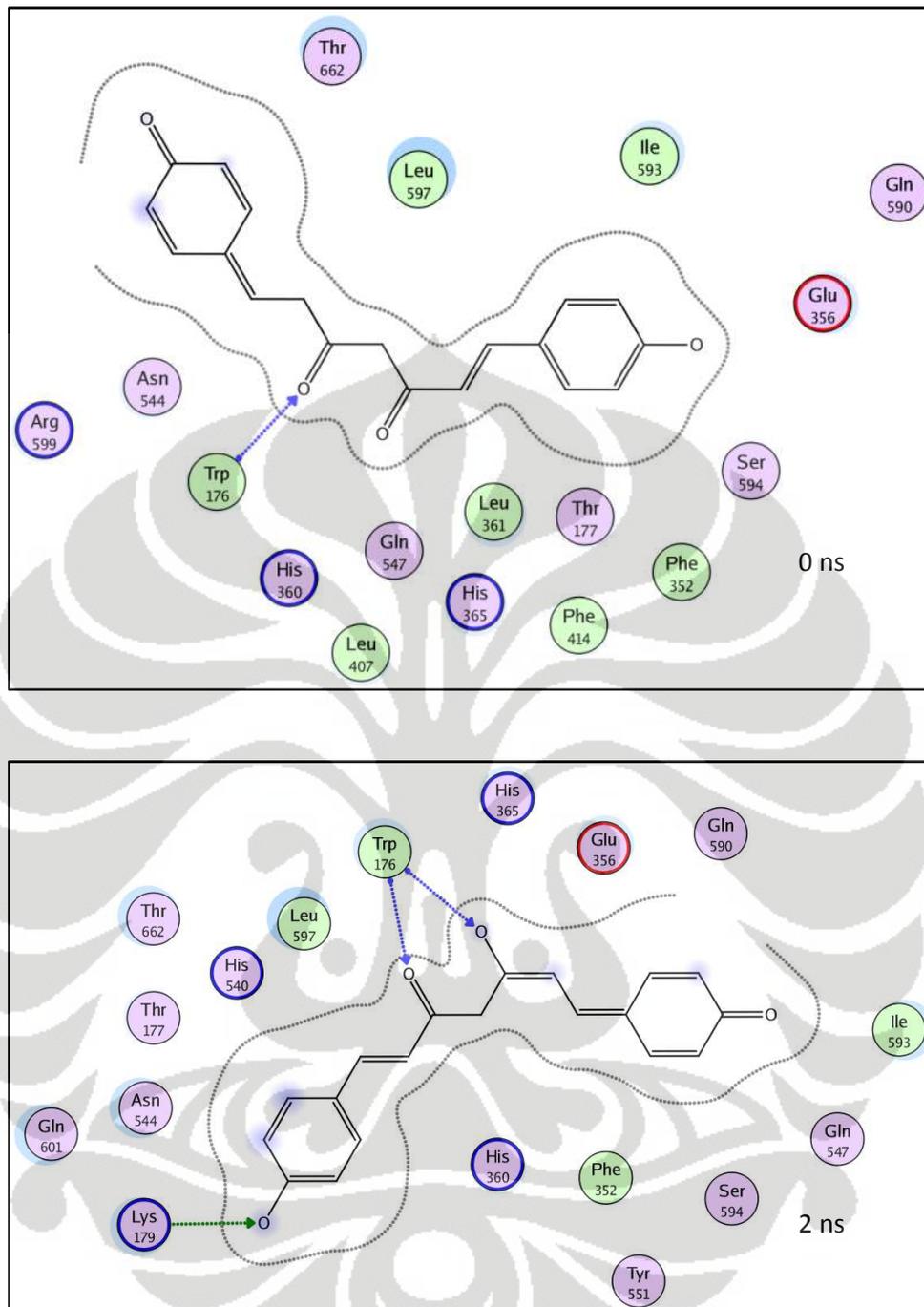
Gambar 4.17. Interaksi ikatan 12-LOX dengan demetoksikurkumin selama simulasi dinamika molekuler (0ns, 2ns, 4ns, 6ns, 8ns, 10ns)

(Lanjutan)



(Lanjutan)

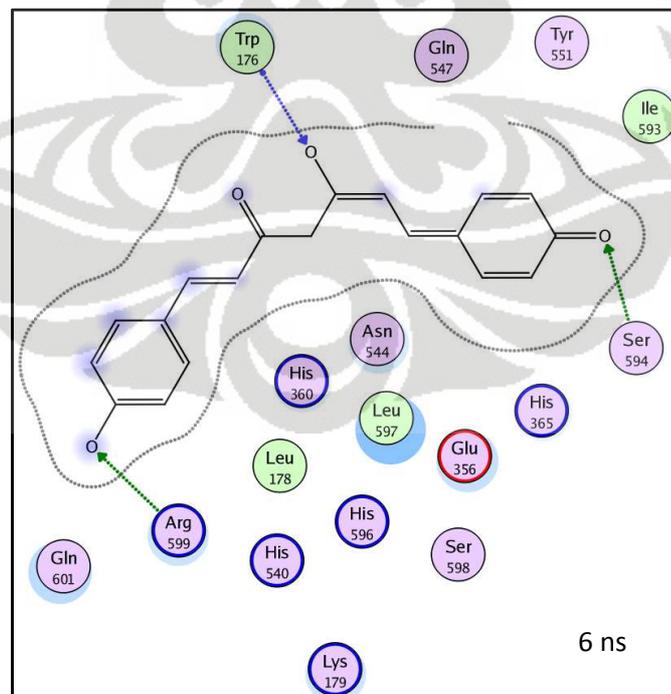
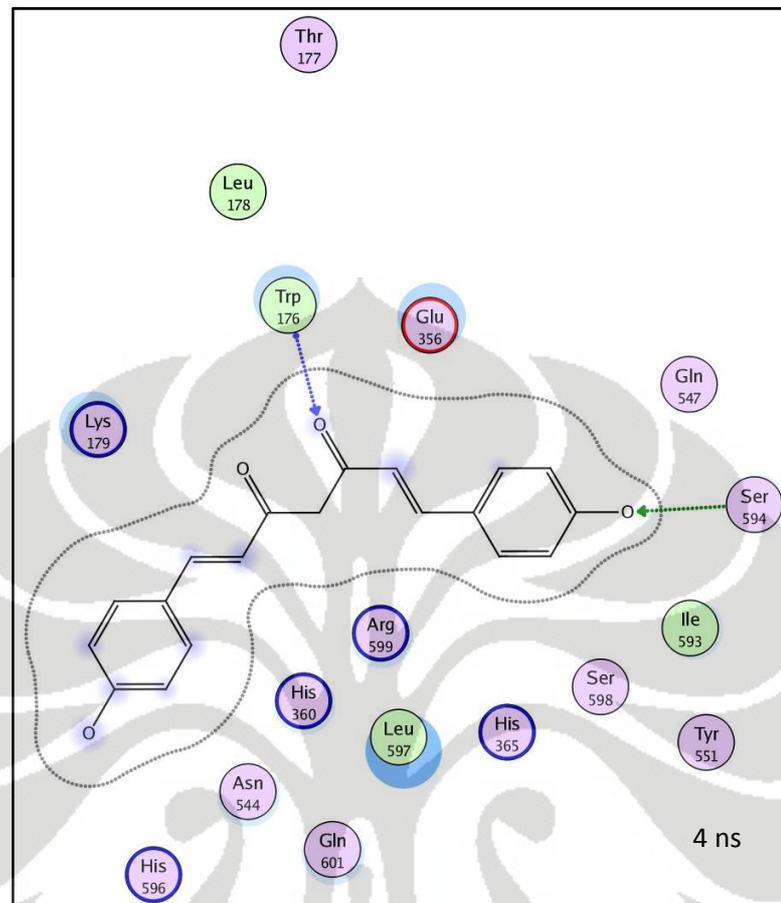




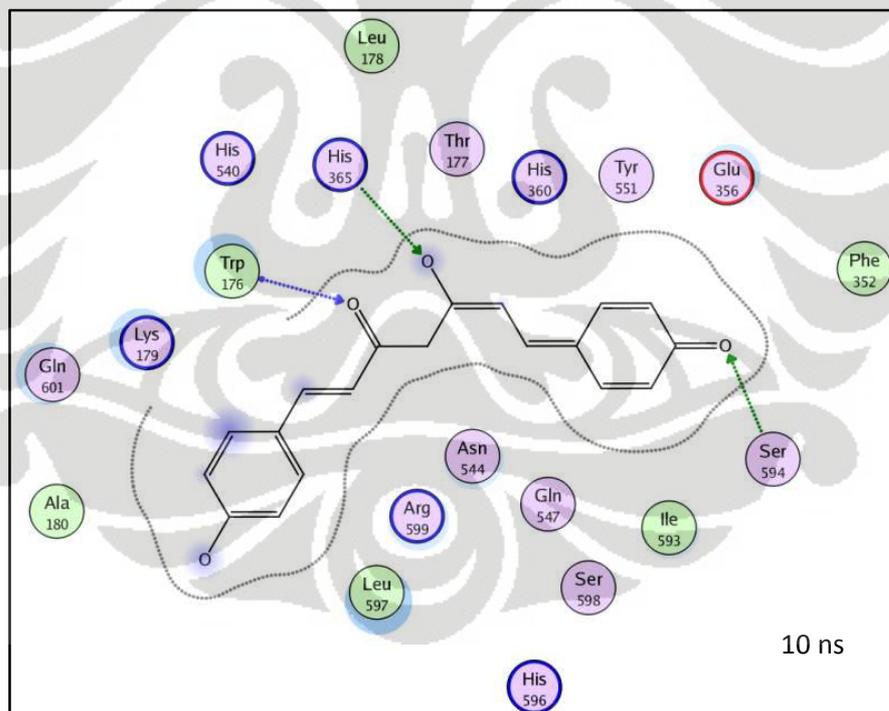
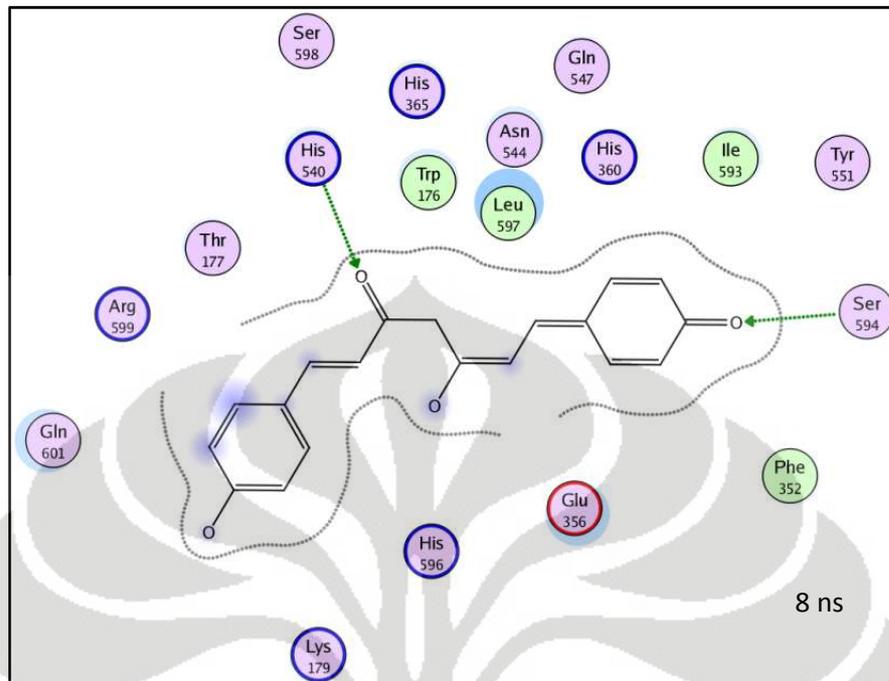
[Sumber: MOE]

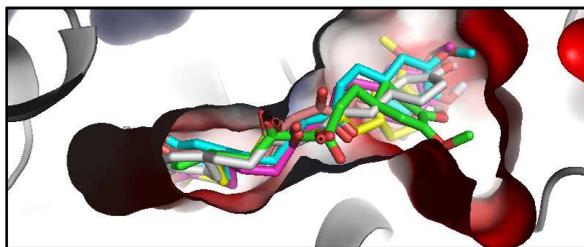
Gambar 4.18. Interaksi ikatan 12-LOX dengan bisdemetoksikurkumin selama simulasi dinamika molekuler (0ns, 2ns, 4ns, 6ns, 8ns, 10ns)

(Lanjutan)

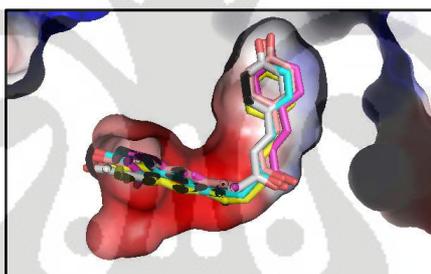
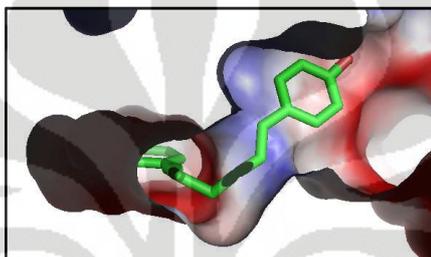


(Lanjutan)

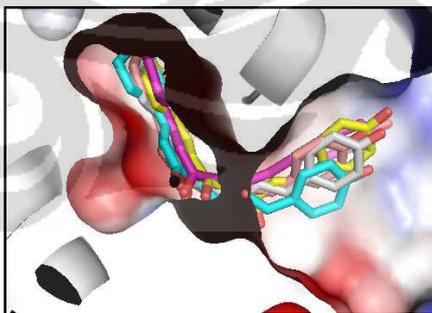
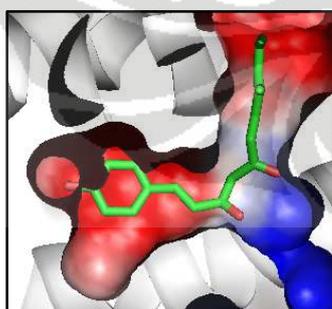




Gambar 4.19 Visualisasi superposisi simulasi dinamika molekuler ligan kurkumin pada *pocket binding site* 12-LOX pada waktu 0 ns (hijau), 2 ns (biru), 4 ns (magenta), 6 ns (kuning), 8 ns (pink) dan 10 ns (putih)



Gambar 4.20 Visualisasi superposisi simulasi dinamika molekuler ligan demetoksikurkumin pada *pocket binding site* 12-LOX pada waktu 0 ns (hijau), 2 ns (biru), 4 ns (magenta), 6 ns (kuning), 8 ns (pink) dan 10 ns (putih)



Gambar 4.21 Visualisasi superposisi simulasi dinamika molekuler ligan bisdemetoksikurkumin pada *pocket binding site* 12-LOX pada waktu 0 ns (hijau), 2 ns (biru), 4 ns (magenta), 6 ns (kuning), 8 ns (pink) dan 10 ns (putih)

Tabel 4.7. Pengukuran jarak ikatan hidrogen

Waktu (Σ Donor, Σ Akseptor)	Kurkumin		Waktu (Σ Donor, Σ Akseptor)		Demetoksikurkumin		Waktu (Σ Donor, Σ Akseptor)		Bisdemetoksikurkumin	
	Donor	Akseptor	Donor	Akseptor	Donor	Akseptor	Donor	Akseptor	Donor	Akseptor
6430 (1,7)	Ser 594 (2,79)	Trp 176 (1,93) (2,54) (2,85)	6200 (0,4)	Trp 176 (1,62) (2,83) Leu 183 (1,84)	-		3000 (1,2)	Lys 179 (2,99)	Trp 176 (1,93) (2,44)	
6500 (1,5)	Arg 599 (2,60)	His 365 (2,56) Gln 601 (2,30)	4990 (3,1)	Ala 417 (2,13) Val 418 (2,00) Leu 183 (2,15)			4830 (1,4)	Ser 594 (1,91)	Trp 176 (1,74) (2,14) His 365 (2,57) His 540 (1,86)	
6720 (2,3)	Arg 599 (1,97) Arg 600 (2,87)	Trp 176 (1,81) (2,35) Gln 601 (2,60)					7060 (2,3)	Ala 180 (1,72) Ser 594 (1,99)	Trp 176 (1,89) (2,82) Asn 544 (2,94)	

[Sumber: **g_hbond** GROMACS]

Tabel 4.9. Hasil analisis penambatan molekuler pada penelitian sebelumnya

Residu	Nama Senyawa		
	Kurkumin	Demetoksikurkumin	Bisdemetoksikurkumin
Val 190	v	v	v
Leu 193	v	-	-
Leu 194	v	v	v
Leu 361	v	v	v
Leu 589	v	v	v
Leu 597	v	v	-
Tyr 551	-	-	v
His 360	v	v	v
His 365	v	v	v
Gln 356	v	v	v
Gln 547	v	v	v
Gln 590	v	v	v
Ile 357	v	v	v
Ile 593	v	v	v
Ser 594	v	v	v
Phe 352	v	v	v

[Sumber: Utami, 2009]

Tabel 4.10. Interaksi 12-LOX dengan ligan kurkumin selama simulasi dinamika molekuler

Waktu (ns)	Val	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Tyr	Tyr	His	His	Ile	Glu	Gln	Gln	Gln	
	418	352	593	594	193	194	361	597	190	191	551	360	365	425	357	356	547	586	590
0*	-	-	V	V	V	V	V	V	V	-	-	V	V	-	V	V	V	-	V
0	-	V	V	V	-	-	V	-	-	-	-	V	V	-	V	V	V	-	-
2	-	V	V	V	-	-	-	V	-	-	-	V	V	-	V	V	V	-	-
4	-	V	V	V	-	-	-	V	-	-	V	V	-	-	V	V	V	-	-
6	-	V	V	V	-	-	-	V	-	-	V	V	V	-	V	V	V	-	-
8	V	V	V	V	-	-	-	V	-	-	-	V	-	-	V	V	-	-	-
10	V	V	V	-	-	-	V	-	-	-	-	V	V	-	V	V	V	-	-

Keterangan: * hasil *docking* penelitian sebelumnya

[Sumber: MOE]

(Lanjutan)

Waktu (ns)	Trp	His	Arg	Arg	Glu	Leu	Val	Asn	Phe	Thr	Gln	Ile	Ser	Ser	Met
	176	540	599	600	658	407	661	544	414	662	601	413	598	660	604
0	V	V	V	V	V	V	-	V	V	V	-	-	V	V	-
2	V	V	V	-	-	V	-	V	V	V	V	V	V	-	-
4	V	-	V	V	V	-	-	V	V	V	V	V	V	-	-
6	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	-	V	-	-
8	V	-	V	-	-	V	V	V	V	V	V	V	V	-	V
10	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	-	V	-	-

[Sumber: MOE]

Tabel 4.11. Interaksi 12-LOX dengan ligan demetoksikurkumin selama simulasi dinamika molekuler

Waktu (ns)	Val	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	His	His	Ile	Glu	Gln	Gln	
	418	352	593	594	194	361	589	597	190	360	365	357	356	547	590	
0*	-	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
0	-	V	V	V	-	V	-	V	-	V	-	-	V	V	V	V
2	V	-	V	V	-	V	-	V	-	-	V	-	V	-	-	-
4	V	-	V	V	-	V	-	V	-	-	V	-	V	-	-	-
6	V	-	V	V	-	V	-	V	-	-	V	-	V	-	-	-
8	V	-	V	V	-	V	-	V	-	-	V	-	V	-	-	-
10	V	-	V	V	-	V	-	V	-	-	V	-	V	-	-	-

Keterangan: * hasil *docking* penelitian sebelumnya. [Sumber: MOE]

(Lanjutan)

Waktu (ns)	Trp	His	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Asn	Phe	Thr	Thr	Ala	Ala	Ala	Lys	Lys	Ile	Ile	Cys	
0	V	V	V	V	407	178	183	181	400	414	177	662	182	417	592	416	179	408	413	559
2	V	V	-	V	V	V	V	-	V	V	V	-	V	V	V	V	-	V	V	V
4	V	V	-	V	V	V	-	-	V	V	V	V	V	V	V	V	-	V	V	V
6	V	V	-	V	V	V	-	-	V	V	V	V	V	V	V	V	-	V	V	V
8	V	V	-	V	V	V	-	-	V	V	V	V	V	V	V	V	-	V	V	V
10	V	V	-	V	V	V	-	-	V	V	V	-	V	V	V	V	V	V	V	V

[Sumber: MOE]

Tabel 4.12. Interaksi 12-LOX dengan ligan bisdemetoksikurkumin selama simulasi dinamika molekuler

Waktu (ns)	Val	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Tyr	Tyr	His	His	His	Ile	Glu	Gln	Gln	Gln
	418	352	593	594	193	194	361	589	597	190	191	551	360	365	425	357	356	547	586	590
0*	-	V	V	V	-	V	V	-	V	V	-	V	V	V	-	V	V	V	-	V
0	-	V	V	-	-	-	V	-	V	-	-	-	V	V	-	-	V	V	-	V
2	-	V	V	V	-	-	-	-	V	-	-	-	V	V	-	-	V	V	-	V
4	-	-	V	V	-	-	-	-	V	-	-	V	V	V	-	-	V	V	-	-
6	-	-	V	V	-	-	-	-	V	-	-	V	V	V	-	-	V	V	-	-
8	-	V	V	V	-	-	-	-	V	-	-	V	V	V	-	-	V	V	-	-
10	-	V	V	V	-	-	-	-	V	-	-	V	V	V	-	-	V	V	-	-

Keterangan: * hasil *docking* penelitian sebelumnya

[Sumber: MOE]

(Lanjutan)

Waktu (ns)	Trp	His	His	Arg	Leu	Leu	Leu	Asn	Phe	Thr	Thr	Ala	Lys	Gln	Tyr
0	V	-	-	V	V	-	-	V	V	V	-	-	-	-	-
2	V	V	-	-	-	-	-	V	-	V	V	-	V	V	V
4	V	-	V	V	-	V	V	V	-	V	-	-	V	V	-
6	V	V	V	V	-	V	V	V	-	-	-	-	V	V	-
8	V	V	V	V	-	-	V	V	-	V	-	-	V	V	-
10	V	V	V	V	-	-	V	V	-	V	V	V	V	V	-

[Sumber: MOE]

Lampiran 1. Tampilan antarmuka PSI-BLAST

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

My NCBI Sign In Register

NCBI/BLAST/blastp suite

blastn blastp **blastx** tblastn tblastx

Enter Query Sequence BLASTP programs search protein databases using a protein query. [more...](#) [Reset page](#) [Bookmark](#)

Enter accession number, gi, or FASTA sequence Query subrange From To

ALYAHDALRLWEIIARYVEGIVHLFYQRDDIVKGDPELQAWCREITEVGL
COAQDRGFPVSPFOSQOLCHFLTMCVFTCTAQHAAINOGQLDWYAWVPNA
PCTMRMPPTTKEDVTMATVMGSLPDVRCACLQMAISWHLSDMVPLGHKK
EKYPGPKPKAVLNQFRDLEKLEKEITARNEQLDWPYEYLPKPSCIENS
VT

Or, upload file

Job Title
Enter a descriptive title for your BLAST search

Align two or more sequences

Choose Search Set

Database be suggested Exclude
Non-redundant protein sequences(nr)
Reference proteins(refseq_protein)
Swissprot protein sequences(swissprot)
Patented protein sequences(pat)
Protein Data Bank proteins(pdb)
Environmental samples(env_nr)

Organism Optional
y 20 top taxa will be shown.

Exclude Optional

Entrez Query Optional
Enter an Entrez query to limit search

Program Selection

Algorithm blastp (protein-protein BLAST)
 PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST)
 PHI-BLAST (Pattern Hit Initiated BLAST)
Choose a BLAST algorithm

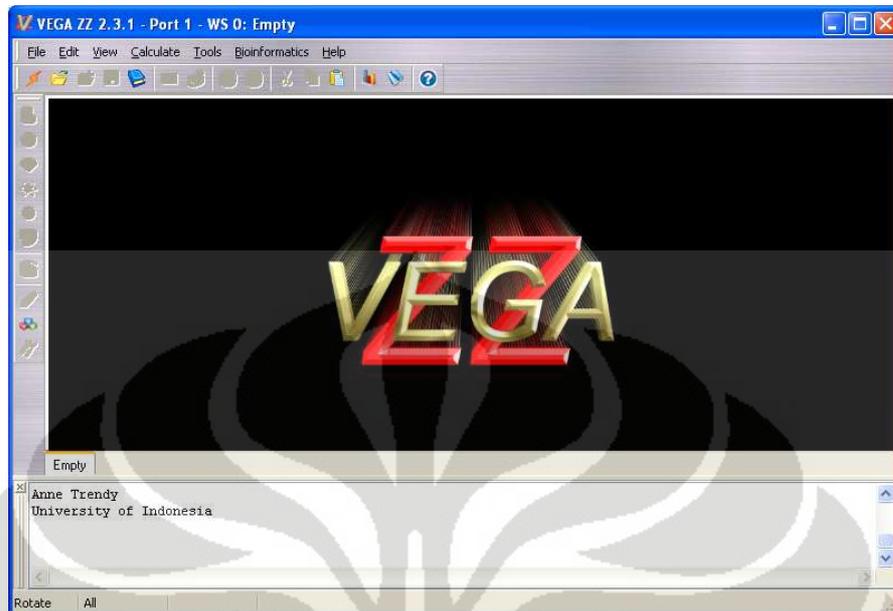
Search database Protein Data Bank proteins(pdb) using PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST)
 Show results in a new window

[Algorithm parameters](#) highlighted in yellow **Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow**

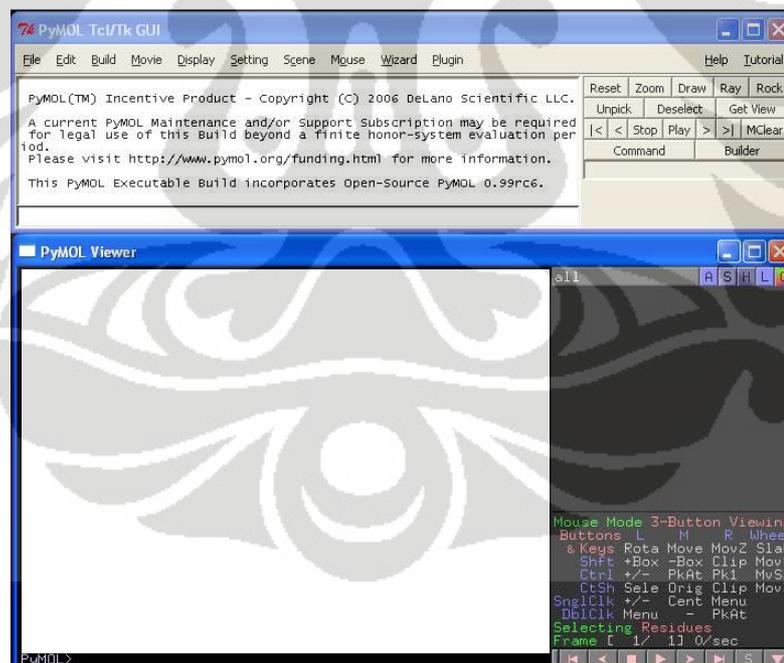
Copyright | Disclaimer | Privacy | Accessibility | Contact | Send feedback

NCBI | NLM | NIH | DHHS

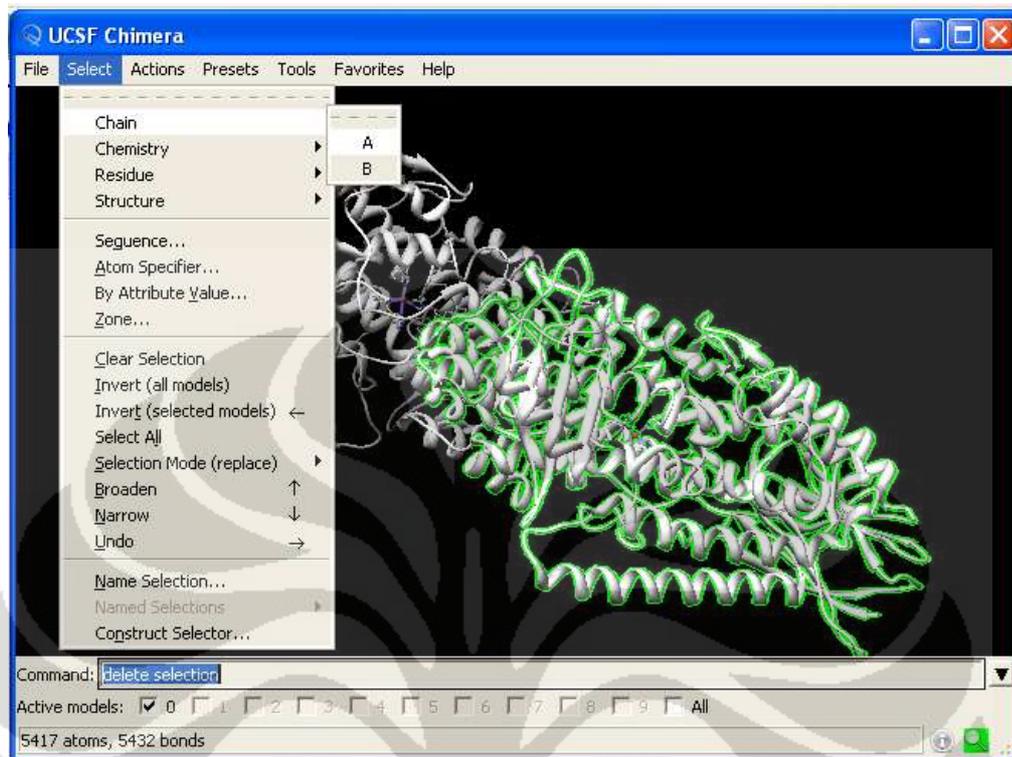
Lampiran 2. Tampilan antarmuka Vega ZZ



Lampiran 3. Tampilan antarmuka PyMOL



Lampiran 4. Tampilan antarmuka *software* UCSF Chimera



Lampiran 5. Tampilan antarmuka *software* interaktif ClustalW2

ClustalW2

ClustalW2 is a general purpose multiple sequence alignment program for DNA or proteins. It produces biologically meaningful multiple sequence alignments of divergent sequences. It calculates the best match for the selected sequences, and lines them up so that the identities, similarities and differences can be seen. Evolutionary relationships can be seen via viewing Cladograms or Phylograms.
[New users, please read the FAQ.](#)
>> Download Software



YOUR EMAIL	ALIGNMENT TITLE	RESULTS	ALIGNMENT
<input type="text"/>	<input type="text" value="Sequence"/>	<input type="text" value="interactive"/>	<input type="text" value="full"/>
KTUP (WORD SIZE)	WINDOW LENGTH	SCORE TYPE	TOPDIAG
<input type="text" value="def"/>	<input type="text" value="def"/>	<input type="text" value="percent"/>	<input type="text" value="def"/>
MATRIX	GAP OPEN	NO END GAPS	GAP EXTENSION
<input type="text" value="def"/>	<input type="text" value="def"/>	<input type="text" value="yes"/>	<input type="text" value="def"/>
	ITERATION		NUMITER
	<input type="text" value="none"/>		<input type="text" value="1"/>
OUTPUT		PHYLOGENETIC TREE	
OUTPUT FORMAT	OUTPUT ORDER	TREE TYPE	CORRECT DIST.
<input type="text" value="pir"/>	<input type="text" value="aligned"/>	<input type="text" value="none"/>	<input type="text" value="off"/>
			IGNORE GAPS
			<input type="text" value="off"/>
			CLUSTERING
			<input type="text" value="NJ"/>

Enter or paste a set of sequences in any supported format:

Upload a file:

Lampiran 6. Tampilan antarmuka hasil penyejajaran sekuens oleh *software* ClustalW2

EMBL-EBI All Databases Enter Text Here Go Reset Advanced Search Give us feedback

Databases Tools EBI Groups Training Industry About Us Help

Help
General Help
Formats
Gaps
Matrix
References
ClustalW2 Help
ClustalW2 FAQ
Jalview Help
Scores Table
Alignment
Guide Tree
Colours

ClustalW2 Results

Results of search

Number of sequences	3
Alignment score	6849
Sequence format	Pearson
Sequence type	aa
Output file	clustalw2-20091025-1434271163.output
Alignment file	clustalw2-20091025-1434271163.aln
Guide tree file	clustalw2-20091025-1434271163.dnd
Your input file	clustalw2-20091025-1434271163.input

Scores Table

Sort by

SeqA Name	Len (aa)	SeqB Name	Len (aa)	Score
1 3D3L_A.pdb	451	2 2P0M_A.pdb	662	64
1 3D3L_A.pdb	451	3 target_3D3L1JNQ.pdb_	451	100
2 2P0M_A.pdb	662	3 target_3D3L1JNQ.pdb_	451	64

PLEASE NOTE: Some scores may be missing from the above table if the alignment was done using multiple CPU mode. Please check the output.

Sort by

Alignment

>P1;3D3L_A.pdb

```
>P1;3FG3_A
structureX:3FG3_A:372      :A:1066      :::: 2.31:
```

```
-----HHAIYNVEVETGDREHAGTDATITIRITGAKGRTDY
LKLDK---GSFEAGSKEQYTVQGFVDVGDIOQLIELHSDGGGYWSGDPDFWV
NRVIIISSTQDRVYSFPCFRWVIKDMVLF--GEATLPFNEVPAIVSEQR
QKELEQRKLTYYQWDYVSDDMPGNIKAKTHDDLPRDVQFTDEKSRSYQESR
KAALVNLGIGSLFTMFENWDSYDDYHILYRNWILGGTPNMADRWHEDRWF
GYQFLNGANPVILTRCDALPSNFPVTNEHVNASLDRGKNLDEEIKDGHY
IVDFKVLVGAKSYGGPVLEDIGYKVPDEADIRYCAAPLALFYVNKLGHLM
PIAIQIN-QEPGPENPIWTPHEENEHDWMMAKFWLGVAESNFHQLNTHLL
RTHLTTESFALSTWRNLAHAHPIFKLLQPHIYGVLAI DTIGRKELWGS GG
IVDQSLSLGGGGHVTFMEKCFKEVNLQDYHLPNALKKRGVDDPSKLPGFY
YRDDGLALWEAIETFIGEIIAIFYKNDDDVKRDNEIQSWIYDVHKNRWV
NPGHQDHGVPASFESREQLKEVLTSLVFTFSCQHAAVNFSQKDHYGFTPN
APAILRHPPP KKKGEATLQSILSTLPSKSOAAKAIATVYILT KFS EDERY
LGNYSATAWEDKDALDAINRFQDKLEDISKKIKQRNENLEVPYIYLLPER
IPNGTAI*
```

```
>P1;3FG4_A
structureX:3FG4_A:373      :A:1066      :::: 2.31:
```

```
-----HAIYNVEVETGDREHAGTDATITIRITGAKGRTDY
LKLDK---GSFEAGSKEQYTVQGFVDVGDIOQLIELHSDGGGYWSGDPDFWV
NRVIIISSTQDRVYSFPCFRWVIKDMVLF--GEATLPFNEVPAIVSEQR
QKELEQRKLTYYQWDYVSDDMPGNIKAKTHDDLPRDVQFTDEKSRSYQESR
KAALVNLGIGSLFTMFENWDSYDDYHILYRNWILGGTPNMADRWHEDRWF
GYQFLNGANPVILTRCDALPSNFPVTNEHVNASLDRGKNLDEEIKDGHY
IVDFKVLVGAKSYGGPVLEDIGYKVPDEADIRYCAAPLALFYVNKLGHLM
PIAIQIN-QEPGPENPIWTPHEENEHDWMMAKFWLGVAESNFHQLNTHLL
RTHLTTESFALSTWRNLAHAHPIFKLLQPHIYGVLAI DTIGRKE----GG
IVDQSLSLGGGGHVTFMEKCFKEVNLQDYHLPNALKKRGVDDPSKLPGFY
YRDDGLALWEAIETFIGEIIAIFYKNDDDVKRDNEIQSWIYDVHKNRWV
NPGHQDHGVPASFESREQLKEVLTSLVFTFSCQHAAVNFSQKDHYGFTPN
APAILRHPPP KKKGEATLQSILSTLPSKSOAAKAIATVYILT KFS EDERY
LGNYSATAWEDKDALDAINRFQDKLEDISKKIKQRNENLEVPYIYLLPER
IPNGTAI*
```

```
>P1;3FG1_A
structureX:3FG1_A:372      :A:1066      :::: 1.85:
```

```
-----HHAIYNVEVETGDREHAGTDATITIRITGAKGRTDY
LKLDK---GSFEAGSKEQYTVQGFDVGDIOQLIELHSDGGGYWSGDPDFV
NRVIIISSTQDRVYSFPCFRWVIKDMVLF--GEATLPFNEVPAIVSEQR
QKELEQRKLTQWDYVSDMPGNIKAKTHDDLPRDVQFTDEKRSYQESR
KAALVNLGIGSLFTMFENWDSYDDYHILYRNWILGGTPNMADRWHEDRWF
GYQFLNGANPVILTRCDALPSNFPVTNEHVNASLDRGKNLDEEIKDGHY
IVDFKVLVGAKSYGGPVLEDIGYK--EADIRYCAAPLALFYVNKLGHLM
PIAIQIN-QEPGPENPIWTPHEENEHDWMMAKFWLGVAESNFHQLNTHLL
RTHLTTFESFALSTWRNLSAHPVFKLLQPHIYGVLAI DTIGRKELIGSGG
IVDQSLSLGGGGHVTFMEKCFKEVNLQDYHLPNALKKRGVDDPSKLPGFY
YRDDGLALWEAIETFIGEIIAIFYKNDDDVKRDNEIQSWIYDVHKNGW RV
NPGHQDHGVPASFESREQLKEVLTSLVFTFSCQHAAVNF SOKDHYGFTPN
APAILRHPPP KKKGEATLQSILSTLPSK SQAAKAIATVYILTKFSEDERY
LGNYSATAWEDKDALDAINRFQDKLEDISKKIKQRNENLEVPYIYLLPER
IPNGTAI*
```

```
>P1;2FNQ_A
structureX:2FNQ_A:374      :A:1066      :::: 3.20:
```

```
-----AIYNVEVETGDREHAGTDATITIRITGAKGRTDY
LKLDKWFHNDFEAGSKEQYTVQGFDVGDIOQLIELHSDGGGYW--DPDFV
NRVIIISSTQDRVYSFPCFRWVIKDMVLF--GEATLPFNEVPAIVSEQR
QKELEQRKLTQWDYVSDMPGNIKAKTHDDLPRDVQFTDEKRSYQESR
KAALVNLGIGSLFTMFENWDSYDDYHILYRNWILGGTPNMADRWHEDRWF
GYQFLNGANPVILTRCDALPSNFPVTNEHVNASLDR--NLDEEIKDGHY
IVDFKVLVGAKSY-----ADIRYCAAPLALFYVNKLGHLM
PIAIQIN-QEPGPENPIWTPHEENEHDWMMAKFWLGVAESNFHQLNTHLL
RTHLTTFESFALSTWRNLSAHPVFKLLQPHIYGVLAI DTIGRKELIGSGG
IVDQSLSLGGGGHVTFMEKCFKEVNLQDYHLPNALKKRGVDDPSKLPGFY
YRDDGLALWEAIETFIGEIIAIFYKNDDDVKRDNEIQSWIYDVHKNGW RV
NPGHQDHGVPASFESREQLKEVLTSLVFTFSCQHAAVNF SOKDHYGFTPN
APAVLRHPPP KKKGEATLQSILSTLPSK SQAAKAIATVYILTKFSEDERY
LGNYSATAWEDKDALDAINRFQDKLEDISKKIKQRNENLEVPYIYLLPER
IPNGTAI*
```


Lampiran 8. Pengaturan model-multiple.py

```
# Homology modeling with multiple templates
from modeller import *          # Load standard Modeller classes
from modeller.automodel import * # Load the automodel class

log.verbose() # request verbose output
env = environ() # create a new MODELLER environment to build this model in

# directories for input atom files
env.io.atom_files_directory = ['.', '../atom_files']

a = automodel(env,
               alnfile = 'align-multiple.ali', # alignment filename
               knowns = ('2POM_A', '3DYS_A', '3FG4_A', '3FG3_A', '3FG1_A', '2FNQ_A',
                         '3D3L_A'), # codes of the templates
               sequence = 'target_3D3L1JNQ') # code of the target
a.starting_model= 1 # index of the first model
a.ending_model = 1 # index of the last model
# (determines how many models to calculate)
a.make() # do the actual homology modeling
```

Lampiran 9. Tampilan pengaturan model-loop-define.py

```
from modeller import *
from modeller.automodel import *

log.verbose()
env = environ()

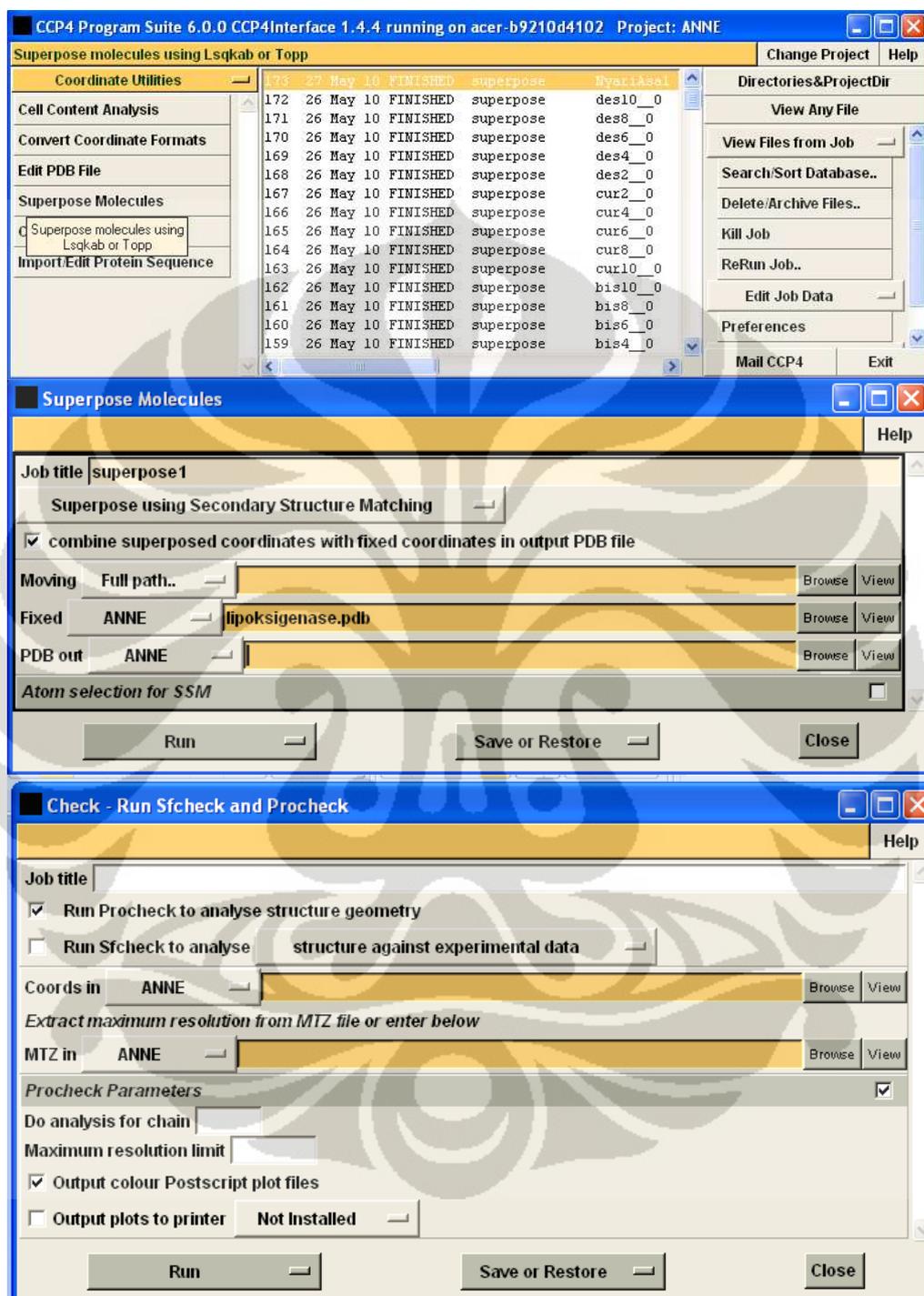
env.io.atom_files_directory = ['.', '../atom_files']

# Create a new class based on 'loopmodel' so that we can redefine
# select_loop_atoms
class MyLoop(loopmodel):
    # This routine picks the residues to be refined by loop modeling
    def select_loop_atoms(self):
        # Three residue ranges (both will be refined simultaneously)
        return selection(self.residue_range('111:', '117:'),
                        self.residue_range('220:', '248:'),
                        self.residue_range('423:', '428:'))

a = MyLoop(env,
            alnfile = 'align-multiple.ali', # alignment filename
            knowns = ('2POM_A', '3DYS_A', '3FG4_A', '3FG3_A', '3FG1_A',
                     '2FNQ_A', '3D3L_A'), # codes of the templates
            sequence = 'target_3D3L1JNQ', # code of the target
            loop_assess_methods=assess.DOPE) # assess each loop with DOPE
a.starting_model= 1 # index of the first model
a.ending_model = 1 # index of the last model

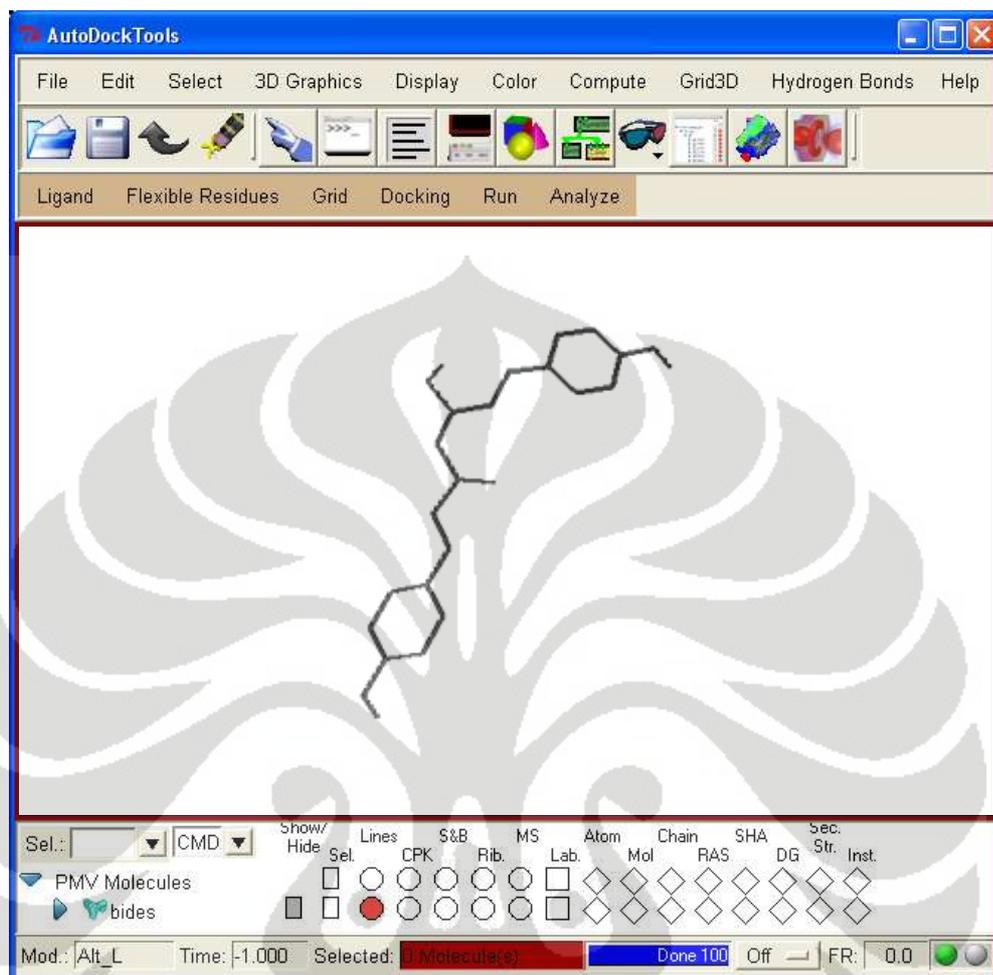
a.loop.starting_model = 1 # First loop model
a.loop.ending_model = 10 # Last loop model
a.loop.md_level= refine.slow # Loop model refinement level
a.make() # do modeling and loop refinement
```

Lampiran 10. Tampilan antarmuka *superpose* dan PROCHECK pada software CCP4 package

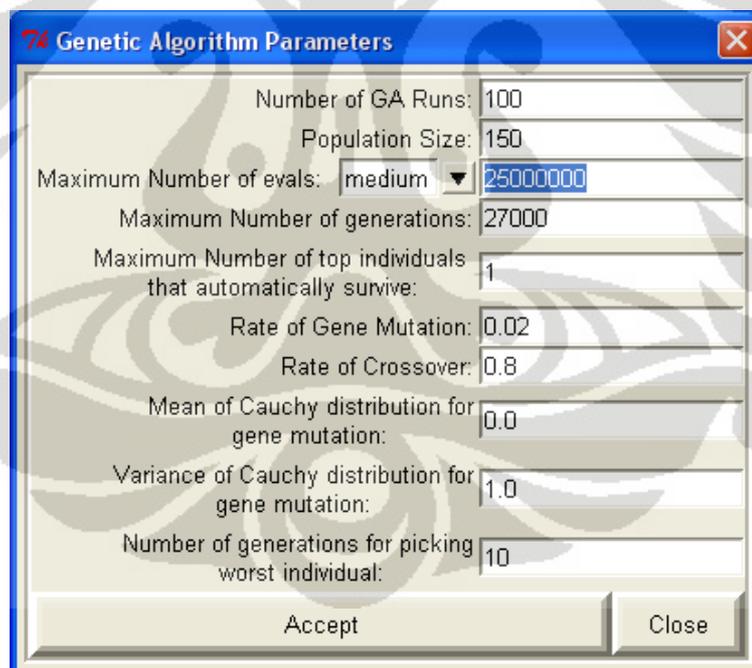
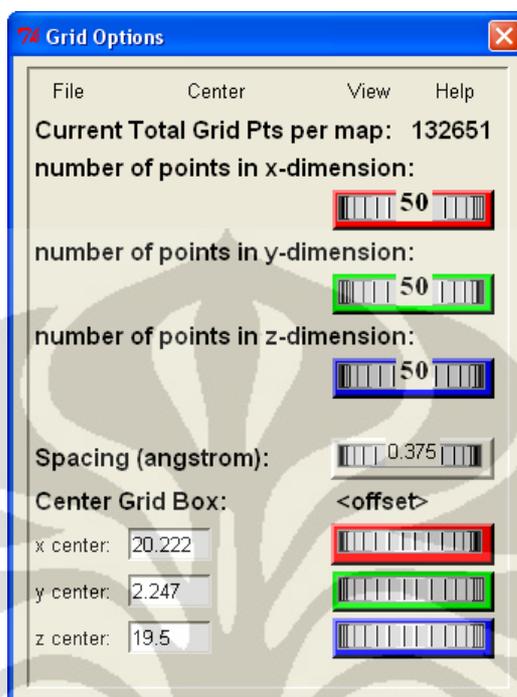


Keterangan: Untuk menjalankan PROCHECK, masuk ke tab Validation & Deposition

Lampiran 11. Tampilan antarmuka AutoDock



(Lanjutan)



(Lanjutan)

Set Docking Run Options

for random number generator: Use defaults Select library + set seeds

For RANDOM NUMBER GENERATOR LIBRARY:

Built-In Library Platform-Independent Library
(from UTexas Biomedical School):

SELECT ONE RANDOM NUMBER GENERATOR SEED:

time pid user defined

time pid user defined

for energy parameters: Use defaults Customize energy parameters

ENERGY PARAMETERS:

External Grid Energy:

Maximum allowable initial energy:

Maximum Number of Retries:

Calculate internal electrostatic energy: Yes No

for step size parameters: Use defaults Customize step size parameters

STEP SIZE PARAMETERS:

Translation (Angstrom/step):

Enter values for 1st , last cycles to have AutoDock calculate trmf

Quaternion (Degree/step):

Torsion (Degree/step):

for output format parameters: Use defaults Customize output format parameters

OUTPUT FORMAT PARAMETERS:

Level of Detail for output:
(use no output for GA and minimal for SA)

no output: minimal output:

full state output at end of each cycle: detailed output for each step:

RMS Cluster Tolerance (Angstrom):

Reference structure file for RMS calc:

for results of a docking:

perform a cluster analysis: do no analysis:

(for clustering multi-job output only:
Write all conformations in a cluster: do not write all conformations:

Accept Close

Lampiran 12. Tampilan antarmuka *software* PRODRG2

The Dundee PRODRG2 Server - Microsoft Internet Explorer

Address: <http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg/prodrg.html>

The Dundee PRODRG2 Server

Finally, a FAQ is available [here](#), READ it before using this server

Molecular topologies for ...
... X-ray refinement/MD ...
... drug design/docking

Funded by:
 The Wellcome Trust

Draw Molecule With JME

... or ...

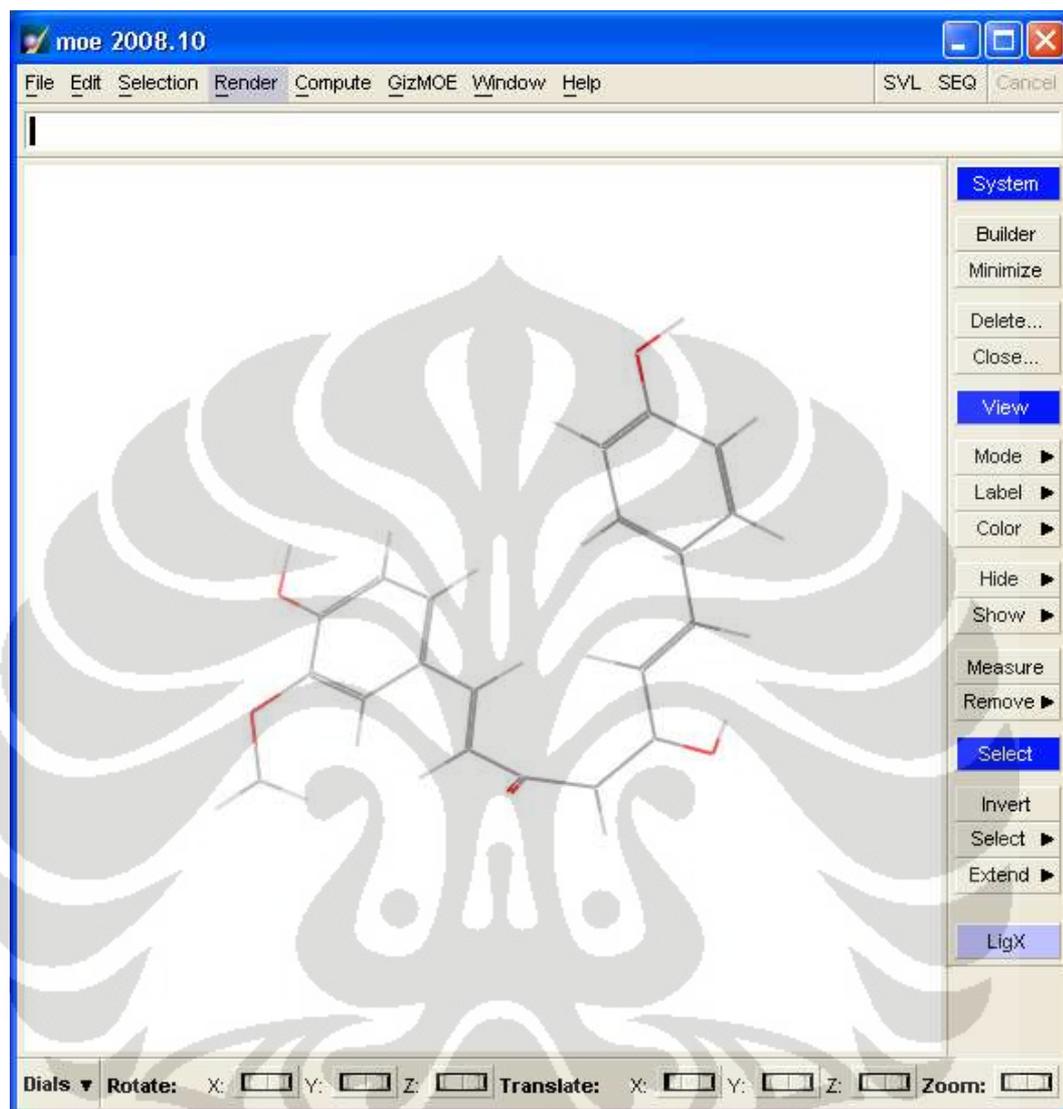
Paste your input here (PDB coordinates, MDL MOLfile, text drawing). See below for instructions.

Chirality Full Energy
chargesminimization

Yes No Yes Run PRODRG Clear

Internet

Lampiran 13. Tampilan antarmuka MOE



Lampiran 14. Berkas em.mdp sistem 12-LOX berligan

```
title                = LOX_bisdesmetoksicurcumin
cpp                  = /usr/bin/cpp
define               = -DFLEX_SPC
constraints          = none
integrator          = steep
dt                   = 0.002 ; ps !
nsteps              = 1800
nstlist             = 10
ns_type             = grid
rlist               = 1.0
coulombtype         = PME
rcoulomb            = 1.0
rvdw                = 1.4
fourierspacing      = 0.12
fourier_nx          = 0
fourier_ny          = 0
fourier_nz          = 0
pme_order           = 6
ewald_rtol          = 1e-5
optimize_fft        = yes
;
;      Energy minimizing stuff
;
emtol                = 1000.0
emstep              = 0.01
```

Keterangan: untuk sistem 12-LOX tanpa ligan, yang diberi warna abu-abu diganti menjadi:
vdwtype = cut-off, pme_order = 4

Lampiran 15. Berkas pr.mdp sistem 12-LOX berligan

```

title           = LOX_bidesmetoksicurcumin
cpp             = /usr/bin/cpp
define          = -DPOSRES
constraints     = all-bonds
integrator      = md
dt              = 0.002 ; ps !
nsteps         = 15000 ; total 30 ps.
nstcomm        = 1
nstxout        = 250 ; collect data every 0.5 ps
nstvout        = 1000
nstfout        = 0
nstlog         = 10
nstenergy      = 10
nstlist        = 10
ns_type        = grid
rlist          = 1.0
coulombtype    = PME
rcoulomb       = 1.0
vdwtype        = cut-off
rvdw           = 1.4
fourierspacing = 0.12
fourier_nx     = 0
fourier_ny     = 0
fourier_nz     = 0
pme_order      = 6
ewald_rtol     = 1e-5
optimize_fft   = yes
; Berendsen temperature coupling is on
Tcoupl         = berendsen
tau_t          = 0.1 0.1
tc-grps        = protein non-protein
ref_t          = 300 300
; Pressure coupling is on
Pcoupl         = berendsen
tau_p          = 0.5
Pcoupltype     = isotropic
compressibility = 4.5e-5
ref_p          = 1.0
; Generate velocities is on at 300 K.
gen_vel        = yes
gen_temp       = 300.0
gen_seed       = 173529

```

Keterangan: Untuk sistem 12-LOX tanpa ligan, yang ditandai warna abu-abu diganti menjadi:
nsteps = 10000, pme_order = 4, pcoupl = parrinello-rahman, pcoupltype = isotropic

Lampiran 16. Berkas md.mdp sistem 12-LOX berligan

```

title = LOX bisdemetoksicurcumin
cpp = /usr/bin/cpp
constraints = all-bonds
integrator = md
dt = 0.002 ; ps !
nsteps = 500000 ; total 1 ns.
nstcomm = 1
nstxout = 5000 ; collect data every 10 ps
nstvout = 0
nstfout = 0
nstlist = 10
ns_type = grid
rlist = 1.0
coulombtype = PME
rcoulomb = 1.0
vdwtype = cut-off
rvdw = 1.4
fourierspacing = 0.12
fourier_nx = 0
fourier_ny = 0
fourier_nz = 0
pme_order = 6
ewald_rtol = 1e-5
optimize_fft = yes
; Berendsen temperature coupling is on
Tcoupl = berendsen
tau_t = 0.1 0.1
tc-grps = protein non-protein
ref_t = 300 300
; Use Energy group monitoring
energygrps = protein sol UNK
; Pressure coupling is on
Pcoupl = berendsen
pcoupltype = isotropic
tau_p = 0.5
compressibility = 4.5e-5
ref_p = 1.0
; Generate velocities is on at 300 K
gen_vel = yes
gen_temp = 300.0
gen_seed = 173529

```

Keterangan: Untuk sistem 12-LOX tanpa ligan, yang diberi warna abu-abu diganti menjadi:
pme_order = 4, energygrps = -, pcoupl = parrinello-rahman, pcoupltype = -

Lampiran 17. Perintah LINUX* yang dipakai dalam penelitian ini

1. **cd ..**
= menaikkan direktori satu tingkat
2. **cd nama_folder**
= masuk atau pindah direktori pada satu tingkat
3. **mkdir**
= membuat direktori baru
4. **ls**
= melihat isi dari direktori
5. **exit**
= keluar dari emulasi LINUX

*dalam penulisan skripsi ini, semua perintah pemrograman dituliskan *bold*, sedangkan berkas *file* dituliskan dengan *font Courier New* untuk mempermudah pemahaman

Lampiran 18. Perintah AutoDock

1. **autogrid4 -p berkas_grid.gpf -l berkas_grid.glg&**
= menjalankan program autogrid4 untuk memroses berkas *grid*
Input : cur.gpf
Output : cur.glg
2. **autodock4 -p berkas_docking.dpf -l berkas_docking.dlg&**
= menjalankan program autodock4 untuk memroses berkas *docking*
Input : cur.dpf
Output : cur.dlg

Lampiran 19. Perintah GROMACS 4.0

1. **pdb2gmx -ignh -ff gmx -f lox.pdb -o lox2.pdb -p lox.top -water spce**

= membuat topologi awal, diikuti langkah memasukkan ligan

Input : lox.pdb

Output : lox2.pdb, lox.top

2. **editconf -bt cubic -f lox2.pdb -o lox2.pdb -d 0.9**

= memproses pembuatan *genbox*

Input : lox2.pdb

Output : lox2.pdb

3. **genbox -cd lox2.pdb -cd spc216.gro -o lox_b4ion.pdb -p lox.top**

= memproses pengisian *genbox* dengan air bertopologi spc216

Input : lox2.pdb, spc216.gro

Output : lox_b4ion.pdb, lox.top

4. **grompp -f em.mdp -c lox_b4ion.pdb -p lox.top -o lox_b4ion.tpr**

= proses penghitungan muatan sistem

Input : em.mdp, lox_b4ion.pdb

Output : lox_b4ion.tpr

5. **genion -s lox_b4ion.tpr -o lox_b4em.pdb -pname Na -np 5 -g lox_ion.log**

= proses penetralan sistem dengan ion yang tersedia

Input : lox_b4ion.tpr, Mg

Output : lox_b4em.pdb, lox_ion.log

6. **grompp -f em.mdp -c lox_b4em.pdb -p lox.top -o lox_em.tpr**

Input : em.mdp, lox_b4em.pdb

Output : lox.top, lox_em.tpr

7. **mdrun -v -deffnm lox_em**

= menjalankan proses minimisasi

Input : lox_em.tpr

Output : lox_em.trr, lox_em.edr, lox_em.gro

8. **grompp -f pr.mdp -c lox_em.gro -p lox.top -o lox_pr.tpr**

Input : pr.mdp

Output : lox.top, lox_pr.tpr

9. **mdrun -v -deffnm lox_pr**

= menjalankan proses penahanan posisi

Input : lox_pr.tpr

Output: lox_pr.trr, lox_pr.edr, lox_pr.gro

10. **grompp -f md.mdp -c lox_pr.gro -p lox.top -o topol.tpr**

Input : md.mdp, lox_pr.gro

Output: lox.top, topol.tpr

11. **mdrun -v -deffnm topol -g md.log**

= menjalankan proses simulasi dinamika molekuler

Input : topol.tpr

Output: topol.trr, topol.edr, topol.gro

12. **trjconv -f lox_md.trr -o lox_md.xtc**

= menjalankan proses kompresi data .trr

Input : lox_md.trr

Output: lox_md.xtc

13. **g_energy -f topol.edr -o pe.svg -skip 50**

= mendata energi potensial selama simulasi dinamika molekuler berlangsung

Input : lox_md.edr

Output: pe.svg

14. **g_rms -s topol.tpr -f topol.trr -o bkbone_rmsdlox.svg**

Input : topol.tpr, topol.trr

Output: bkbone_rmsdlox.svg

15. **g_rmsf -f lox_md.xtc -s topol.tpr -o traj_rmsf.svg -b 1000 -e 10000 -ox traj_avg.pdb**

Input : lox_md.xtc, topol.tpr

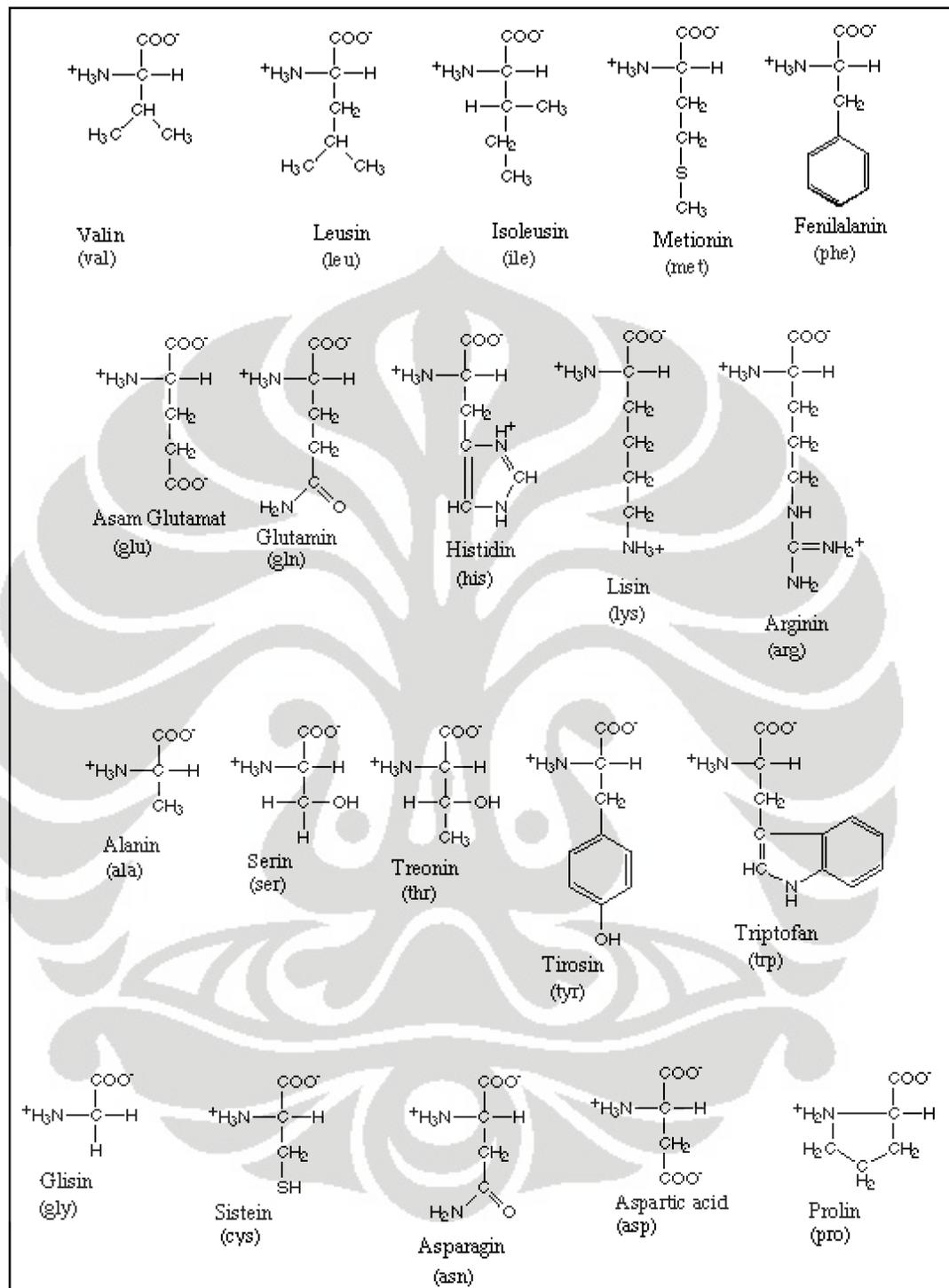
Output: traj_rmsf.svg, traj_avg.pdb

16. **g_hbond -f lox_md.xtc -s topol.tpr -o hbond.svg**

Input : lox_md.xtc, topol.trr

Output: hbond.svg

Lampiran 20. Jenis asam amino penyusun protein



[Sumber: Abedon, ST., Important Words and Concepts from Stryer Biochemistry]

Lampiran 21. Skema kerja penelitian

