



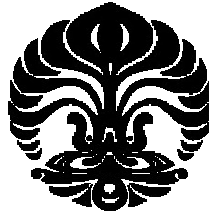
UNIVERSITAS INDONESIA

**PENAMBATAN MOLEKULER BEBERAPA SENYAWA
XANTON DARI TANAMAN *Garcinia mangostana* Linn. PADA
PROTEASE HIV-1**

SKRIPSI

**FARIDA NURFITRIYANA
0606070705**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2010**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENAMBATAN MOLEKULER BEBERAPA SENYAWA
XANTON DARI TANAMAN *Garcinia mangostana* Linn. PADA
PROTEASE HIV-1**

SKRIPSI

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

**FARIDA NURFITRIYANA
0606070705**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2010**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Farida Nurfitriyana

NPM : 0606070705

Tanda Tangan : 

Tanggal : 14 Juli 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Farida Nurfitriyana
NPM : 0606070705
Program Studi : S1 Farmasi
Judul Skripsi : Penambatan Molekuler Beberapa Senyawa Xanton dari Tanaman *Garcinia mangostana* Linn. pada Protease HIV-1

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Arry Yanuar, M.Si. (.....)
Pembimbing II : Dr. Berna Elya, Apt., M.Si (.....)
Penguji I : Dr. Harmita, Apt. (.....)
Penguji II : Prof. Dr. Heru Suhartanto, M.Sc. Ph.D. (.....)
Penguji III : Dr. Silvia Surini, M.Pharm.Sc. (.....)

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 4 Juli 2010

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur saya panjatkan ke hadirat Allah SWT yang maha pengasih dan penyayang serta senantiasa mencurahkan nikmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini.

Skripsi ini disusun untuk memenuhi syarat mengikuti ujian Sarjana Farmasi di Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS selaku ketua Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan kesempatan pada penulis untuk melaksanakan penelitian ini.
2. Bapak Dr. Arry Yanuar MS selaku pembimbing pertama skripsi yang telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk memberikan bimbingan, saran, dan nasehat dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini serta atas diperkenankannya penulis melakukan penelitian ini.
3. Ibu Dr. Berna Elya Apt, M.Si selaku pembimbing kedua skripsi sekaligus Koordinator Pendidikan Departemen Farmasi yang juga telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk memberikan bimbingan, saran, dan nasehat dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini serta atas diperkenankannya penulis melakukan penelitian ini.
4. Ibu Dr. Katrin MS selaku pembimbing akademik yang telah membimbing penulis dari awal perkuliahan hingga penelitian ini.
5. Seluruh staf pengajar dan karyawan di Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah membantu penulis selama menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI.
6. Seluruh keluarga Ibu, Ayah, Adik, Alrikko Putra yang selalu memberikan doa, kasih sayang, motivasi, nasehat, dan dukungan materi.
7. Sahabat-sahabatku yang selalu setia mendengarkan keluh kesahku dan selalu memberikan perhatian, semangat, dukungan, dan doa.

8. Seluruh teman-teman Farmasi UI yang telah membantu penulis dalam berbagai hal terutama selama masa penelitian dan penyusunan tugas akhir.
9. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah membantu dalam proses penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Akhir kata, penulis berharap Allah SWT akan membalas semua kebaikan segala pihak yang telah membantu. Penulis menyadari masih banyak kekurangan pada skripsi ini, namun penulis berharap semoga skripsi ini berguna bagi perkembangan 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 : Farida Nurfitriyana
NPM : 0606070705
Program Studi : Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
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 :

Penambatan Molekuler Beberapa Senyawa Xanton dari Tanaman *Garcinia mangostana* Linn. pada Protease HIV-1

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, 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 : 14 Juli 2010

Yang menyatakan



(Farida Nurfitriyana)



ABSTRAK

Nama : Farida Nurfitriyana
Program Studi : Farmasi
Judul : Penambatan Molekuler Beberapa Senyawa Xanton dari Tanaman *Garcinia mangostana* Linn. pada Protease HIV-1

Human Immunodeficiency Virus tipe 1 (HIV-1) merupakan retrovirus penyebab penyakit mematikan AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*). Virusnya yang cepat bermutasi menyebabkan belum adanya obat yang dapat menyembuhkan penyakit ini secara total. Salah satu target enzim yang dapat diinhibisi untuk menghambat replikasi virus ini adalah protease HIV-1. Inhibisi pada enzim ini menyebabkan hambatan pemotongan protein pada tahap pematangan virus. Beberapa senyawa xanton dari tanaman *Garcinia mangostana* Linn. yakni α -, β -, dan γ -mangostin menunjukkan aktivitas inhibisi pada enzim ini. Strukturnya yang berupa non-peptida memungkinkan adanya mekanisme berbeda dari inhibitor lain. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengamati model pengikatan dari analog mangostin tersebut. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah penambatan molekul secara *in silico*. Hasil menunjukkan bahwa terdapat dua model pengikatan dengan afinitas yang lebih tinggi pada sisi aktif kantung hidrofobik (ΔG AutoDock 4 = (-9,64)-(-9,89) kkal/mol; ΔG AutoDock Vina = (-8,7)-(-9,4) kkal/mol) dan pada sisi permukaan luar yang masih menunjukkan afinitas ikatan yang baik (ΔG AutoDock 4 = (-5,85)-(-6,06) kkal/mol; ΔG AutoDock Vina = (-5,3)-(-5,9) kkal/mol).

Kata kunci:

protease HIV-1, α -, β -, dan γ -mangostin, penambatan molekul, inhibitor non-peptida

xvi+125 halaman; 32 gambar; 15 tabel; 15 lampiran

Bibliografi : 71 (1987-2010)

ABSTRACT

Name : Farida Nurfitriyana
Major : Pharmacy
Title : Molecular Docking of Several Xanthones Compound from *Garcinia mangostana* Linn. to HIV-1 Protease

Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) is a retroviral virus that cause deadly disease, AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome). The virus that mutates so fast cause no drugs available to cure this disease totally yet. One of enzyme target that can be inhibited to block the replication of this virus is HIV-1 protease. Inhibition to this enzyme cause the blocking of protein cleavage in virus maturation process. Several xanthones compound from *Garcinia mangostana* Linn., α -, β -, dan γ -mangostin, has shown inhibition activity to this enzyme. The structure, which is non-peptide based, gives possibility to different mechanism than other inhibitor. This research's aim is to search the binding modes of mangostin analogues. The method used in this research is *in silico* molecular docking. The result shows that there are two binding modes with higher affinity in hydrophobic pocket active site (ΔG AutoDock 4 = (-9,64)-(-9,89) kcal/mol; ΔG AutoDock Vina = (-8,7)-(-9,4) kcal/mol) and molecular surface site which still shows good affinity (ΔG AutoDock 4 = (-5,85)-(-6,06) kcal/mol; ΔG AutoDock Vina = (-5,3)-(-5,9) kcal/mol).

Keywords:

HIV-1 protease, α -, β -, and γ -mangostin, molecular docking, non-peptide inhibitor
xvi+125pages ; 32 figures; 15 tables; 15 appendixes
Bibliography : 71 (1987-2010)

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 <i>Garcinia mangostana</i>	4
2.1.1 Klasifikasi.....	4
2.1.2 Xanton.....	5
2.1.3 Analog Xanton.....	5
2.1.4 Isolasi mangostin	7
2.2 Protein	7
2.2.1 Struktur Protein.....	8
2.2.1.1 Struktur Primer.....	8
2.2.1.2 Struktur Sekunder.....	8
2.2.1.3 Struktur Tersier	10
2.2.1.4 Struktur Kuartener.....	11
2.2.2 Interaksi Protein dengan Ligan.....	12
2.2.2.1 Interaksi Hidrogen.....	12
2.2.2.2 Interaksi van der Waals	13
2.2.2.3 Interaksi Hidrofobik	14
2.3 Enzim.....	15
2.4 Reseptor	16
2.5 <i>Human Immunodeficiency Virus</i> tipe 1 (HIV-1).....	18
2.6 Protease HIV-1.....	20
2.7 Inhibitor Protease HIV-1	23
2.8 Nelfinavir	27
2.9 Bioinformatika	28
2.10 Biokimia komputasi	28
2.11 Penambatan Molekuler	28
2.11.1 Minimisasi Energi	30

2.11.2 Metode Pencarian Konformasi	30
2.11.3 Fungsi Penilaian (<i>Scoring Function</i>)	32
2.12. Perangkat Lunak Penambatan Molekuler	33
2.12.1. AutoDock 4 dan AutoDock Tools	34
2.12.2. AutoDock Vina	34
2.12.3. GOLD.....	35
2.12.4. Kriteria dan Parameter Penambatan.....	36
2.13. Bank Data Protein (<i>Protein Data Bank</i>)	37
2.14. PyMOL	37
2.15. UCSF Chimera (<i>University of California at San Fransisco</i> Chimera)	38
2.16. VegaZZ	38
2.17. Cygwin	38
2.18. CCP4 (<i>The Collaborative Computational Project Number 4</i>)	39
2.19. MOE (<i>Molecular Operating Environment</i>)	39
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	40
3.1. Tempat dan Waktu	40
3.2. Alat	40
3.3.1. Perangkat Keras	40
3.3.2. Perangkat Lunak	40
3.3. Bahan.....	41
3.3.1. Struktur Tiga Dimensi Protease HIV-1 (makromolekul)	41
3.3.2. Struktur Tiga Dimensi Ligan.....	41
3.4. Cara Kerja	42
3.4.1. Pengunduhan Makromolekul Protease HIV-1	42
3.4.2. Pengunduhan dan Pembuatan Struktur Tiga Dimensi Ligan Analog Mangostin serta Kontrol Positif	43
3.4.3. Pemisahan Rantai Protease HIV-1 untuk Target Penambatan	43
3.4.4. Superposisi Rantai Protease HIV-1 Monomer dan Homodimer	43
3.4.5. Optimasi Makromolekul Protease HIV-1	43
3.4.6. Optimasi Struktur Tiga Dimensi Ligan	44
3.4.7. Penambatan Molekuler Protease HIV-1 dengan Ligan-Ligan	44
3.4.8. Analisis hasil Penambatan Molekuler Protease HIV-1 dengan Ligan-Ligan	47
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	48
4.1. Pengunduhan Makromolekul Protease HIV-1	48
4.2. Pengunduhan dan Pembuatan Struktur Tiga Dimensi Ligan Analog Mangostin serta Kontrol Positif	49
4.3. Pemisahan Rantai Protease HIV-1 untuk Target Penambatan	50
4.4. Superposisi Rantai Protease HIV-1 Monomer dan Homodimer	50
4.5. Optimasi Makromolekul Protease HIV-1	51
4.6. Optimasi Struktur Tiga Dimensi Ligan	55
4.7. Penambatan Molekuler Protease HIV-1 dengan Ligan-Ligan.....	57

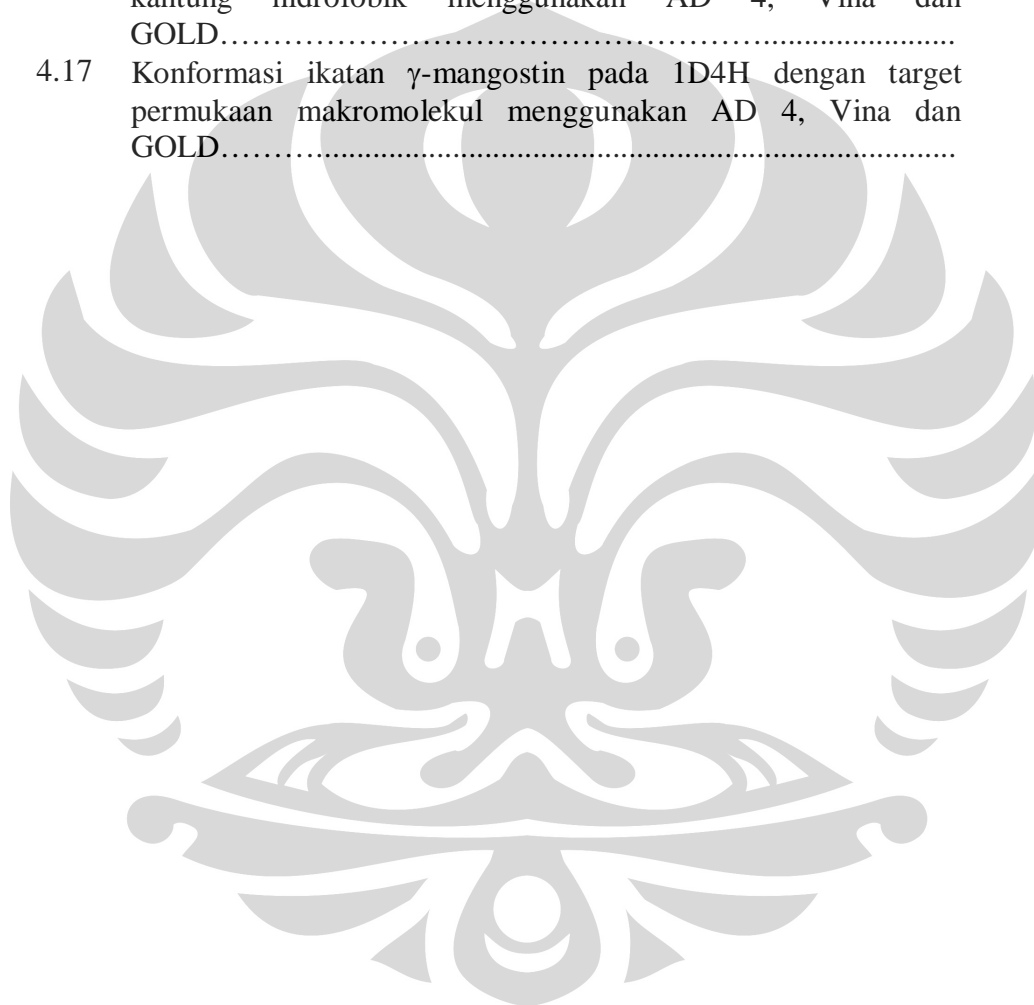
4.8. Analisis hasil Penambatan Molekuler Protease HIV-1 dengan Ligan-Ligan	61
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	72
5.1. Kesimpulan	72
5.2. Saran	72
DAFTAR ACUAN	73



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Analog senyawa mangostin dari <i>G. mangostana</i> Linn.....	6
2.2 Struktur primer dan sekunder protein.....	10
2.3 Struktur tersier dan kuartener protein.....	12
2.4 Virus HIV-1.....	19
2.5 Siklus hidup HIV-1 (<i>Human Immunodeficiency Virus</i> tipe 1).....	20
2.6 Target pemotongan <i>gag</i> dan <i>gag-pol</i> oleh protease HIV-1.....	21
2.7 Struktur makromolekul protease HIV-1	22
2.8 Mekanisme pemotongan substrat protease HIV-1.....	23
2.9 Mekanisme inhibitor protease HIV-1.....	24
2.10 Struktur makromolekul protease HIV-1 yang terikat dengan inhibitor peptida.....	25
2.11 Sisi-sisi nonkompetitif permukaan luar makromolekul protease HIV-1.....	26
2.12 Struktur nelfinavir.....	27
2.13 Dua puluh jenis asam amino penyusun protein.....	79
3.1 Struktur tiga dimensi makromolekul protease HIV-1.....	41
3.2 Struktur tiga dimensi ligan.....	42
4.1 Hasil superposisi subunit A 1D4H dengan 1ZP8.....	51
4.2 Struktur tiga dimensi makromolekul 1ZP8 dan 1D4H sebelum dan sesudah dioptimasi.....	53
4.3 Struktur tiga dimensi analog mangostin sebelum dan sesudah optimasi.....	56
4.4 Posisi ligan mangostin pada target penambatan seluruh makromolekul 1ZP8.....	62
4.5 Residu pada kantung hidrofobik yang berinteraksi pada penambatan ligan.....	65
4.6 Perbandingan hasil penambatan senyawa mangostin terhadap nelfinavir.....	66
4.7 Residu pada permukaan makromolekul yang berinteraksi pada penambatan ligan	68
4.8 Prediksi sisi penambatan analog-analog mangostin pada 1D4H..	69
4.9 Konformasi ikatan α -mangostin pada 1ZP8 dengan target kantung hidrofobik menggunakan AD 4, Vina dan GOLD.....	80
4.10 Konformasi ikatan α -mangostin pada 1D4H dengan target kantung hidrofobik menggunakan AD 4, Vina dan GOLD.....	81
4.11 Konformasi ikatan α -mangostin pada 1D4H dengan target permukaan makromolekul menggunakan dengan AD 4, Vina dan GOLD.....	82
4.12 Konformasi ikatan β -mangostin pada 1ZP8 dengan target kantung hidrofobik menggunakan AD 4, Vina dan GOLD.....	83

4.13	Konformasi ikatan β -mangostin pada 1D4H dengan target kantung hidrofobik menggunakan AD 4, Vina dan GOLD.....	84
4.14	Konformasi ikatan β -mangostin pada 1D4H dengan target permukaan makromolekul dengan AD 4, Vina dan GOLD.....	85
4.15	Konformasi ikatan γ -mangostin pada 1ZP8 dengan target kantung hidrofobik menggunakan AD 4, Vina dan GOLD.....	86
4.16	Konformasi ikatan γ -mangostin pada 1D4H dengan target kantung hidrofobik menggunakan AD 4, Vina dan GOLD.....	87
4.17	Konformasi ikatan γ -mangostin pada 1D4H dengan target permukaan makromolekul menggunakan AD 4, Vina dan GOLD.....	88



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Struktur protease HIV-1 yang diunduh dari <i>Protein Data Bank</i>	48
4.2 Perbandingan hasil penambatan 1D4H sesudah dan sebelum minimisasi.....	54
4.3 Hasil penambatan α -mangostin dengan target seluruh makromolekul 1ZP8 menggunakan AD 4.....	62
4.4 Hasil keseluruhan penambatan ligan mangostin pada target kantung hidrofobik.....	63
4.5 Hasil penambatan kontrol positif nelfinavir pada 1D4H menggunakan AD 4.....	66
4.6 Hasil keseluruhan penambatan ligan mangostin pada target sisi permukaan.....	67
4.7 Hasil penambatan ligan mangostin pada sisi kantung hidrofobik menggunakan AD 4.....	89
4.8 Hasil penambatan ligan mangostin pada sisi kantung hidrofobik menggunakan Vina.....	90
4.9 Hasil penambatan ligan mangostin pada sisi kantung hidrofobik menggunakan GOLD.....	91
4.10 Hasil penambatan ligan mangostin pada sisi permukaan makromolekul menggunakan AD 4.....	92
4.11 Hasil penambatan ligan mangostin pada sisi permukaan makromolekul menggunakan Vina.....	92
4.12 Hasil penambatan ligan mangostin pada sisi permukaan makromolekul menggunakan GOLD.....	93
4.13 Ikatan hidrogen yang terjadi pada target penambatan kantung hidrofobik 1ZP8.....	94
4.14 Ikatan hidrogen yang terjadi pada target penambatan kantung hidrofobik 1D4H.....	95
4.15 Ikatan hidrogen yang terjadi pada target penambatan sisi permukaan 1D4H.....	96

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1	Skema kerja.....	97
2	Tampilan situs <i>Protein Data Bank</i>	98
3	Tampilan perangkat lunak Vega ZZ.....	99
4	Tampilan perangkat lunak CCP4.....	100
5	Plot Ramachandran 1ZP8.....	101
6	Plot Ramachandran 1D4H setelah minimisasi.....	102
7	Plot Ramachandran 1D4H sebelum minimisasi.....	103
8	Manual penggunaan AutoDock 4.....	104
9	Manual penggunaan AutoDock Vina.....	110
10	Manual penggunaan GOLD.....	113
11	Tampilan perangkat lunak MOE.....	120
12	Tampilan perangkat lunak PyMOL.....	121
13	Tampilan .dlg, .txt, serta GoldScore <i>result</i>	122
14	Tampilan hasil superposisi makromolekul melalui CCP4.....	124
15	Tampilan perangkat lunak UCSF Chimera.....	125





BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) adalah penyakit epidemik yang disebabkan oleh patogen tak dikenal yang muncul pada abad 20-an. Setelah diteliti, penyakit ini disebabkan oleh *Human Immunodeficiency Virus* tipe 1 (HIV-1), yang merupakan anggota dari famili retrovirus. Pada awal kemunculan penyakit ini di awal tahun 1980-an, tidak ada obat yang tersedia yang berguna bagi pengobatan AIDS yang mengharuskan penciptaan obat baru. Enzim-enzim retrovirus seperti *reverse transcriptase*, integrase, dan protease adalah target nyata dalam pencarian obat anti-HIV-1 (Wlodawer & Vondrasek, 1998).

HIV-1 sendiri merupakan virus “peniru yang buruk” yang berarti virus ini membuat kesalahan setiap kali bereplikasi. Hal inilah yang menyebabkan virus ini diestimasi menghasilkan satu milyar mutan dalam setiap individu penderita per harinya sehingga dapat disimpulkan bahwa virus ini adalah target yang bergerak cepat. Hingga saat ini belum ditemukan obat yang dapat menyembuhkan penderitanya secara total. Oleh karena itu, berbagai penelitian mengenai inhibitor HIV-1 sangat penting bagi perkembangan pengobatan AIDS (Fight AIDS @ Home: The AIDS Crisis, 2005).

Obat AIDS pertama yang ditemukan adalah inhibitor *reverse transcriptase* (Wlodawer & Vondrasek, 1998). Kemudian pada tahun 1995 inhibitor protease HIV-1 diperkenalkan karena tingkat mutasi yang tinggi dari *reverse transcriptase*. Penggunaan inhibitor protease bersama dengan inhibitor *reverse transcriptase* menghasilkan kombinasi HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*) yang terbukti cukup efektif dalam menurunkan *viral load* secara drastis (Tjay & Rahardja, 2007).

Protease HIV-1 yang termasuk dalam protease aspartat, berperan dalam proses pemotongan protein pada saat pematangan virus. Enzim ini bekerja dengan memotong protein rantai panjang pada sisi *gag* dan *gag-pol* (Adamson, Salzwedel, & Freed, 2009). Inhibitor protease HIV-1 menghambat proses tersebut sehingga menyebabkan virion-virion baru tidak terbentuk (Wood, 1998). Hingga

saat ini terdapat sepuluh obat yang telah diakui oleh FDA sebagai inhibitor protease HIV-1 (Currently approved drugs for HIV: a comparative chart, 2008).

Inhibitor-inhibitor protease HIV-1 yang telah diakui, hampir seluruhnya berupa senyawa dengan struktur turunan peptida. Walaupun mempunyai tingkat inhibisi kuat, senyawa turunan ini mempunyai beberapa kelemahan yakni dari segi farmakokinetik, tingkat kerumitan dan biaya sintesis (Harvey, et al., 1997), serta adanya interaksi dengan obat lain (Judd, et al., 2001). Inhibitor lain dengan struktur non-peptida, sebagian besar memiliki sifat dan mekanisme yang berbeda dari inhibitor peptida. Dengan adanya kondisi-kondisi tersebut, diharapkan inhibitor berbasis struktur non-peptida akan mengatasi masalah-masalah pada inhibitor peptida dan menjadi obat AIDS yang menjanjikan. Hal inilah yang kemudian mendorong perkembangan obat baru yang berupa senyawa dengan struktur non-peptida. Penapisan bahan alam yang banyak mengandung senyawa dengan struktur tersebut juga mengiringi perkembangannya.

Salah satu tanaman yang diketahui mempunyai aktivitas terhadap protease HIV-1 adalah *Garcinia mangostana* Linn. atau yang lebih dikenal dengan manggis. Kandungan utama *G. mangostana* adalah senyawa xanton yang memiliki banyak aktivitas biologis seperti seperti antioksidan, antitumor, antialergi, antiinflamasi, antibakteri, dan antiretroviral (Chaverri, Rodriguez, Ibarra, & Rojas, 2008). Berdasarkan penelitian sebelumnya, diketahui bahwa terdapat beberapa senyawa analog xanton dalam *G. mangostana* yakni α -, dan γ -mangostin memiliki aktivitas terhadap protease HIV-1 (Chen, Wan, & Loh, 1996; Vlietinck, Apers, & Pieters, 1998).

Pada penelitian ini, dilakukan studi prediksi model ikatan senyawa analog mangostin yang diketahui aktif dalam menghambat protease HIV-1 melalui metode *in silico*. Metode ini dipilih karena mempunyai keuntungan tersendiri dibanding metode lain. Keuntungan tersebut antara lain waktu penelitian yang lebih sedikit yang dapat mempercepat proses penemuan obat dan biaya yang relatif lebih murah dari pendekatan lainnya (Huang & Zou, 2007). Teknik *in silico* yang dipakai dalam studi prediksi model ikatan ini adalah penambatan molekuler atau *molecular docking*.

Molecular docking atau penambatan molekuler adalah prosedur komputasional yang memprediksi ikatan nonkovalen dari makromolekul (protein target) dengan molekul kecil (ligan) secara efisien. Tujuan utama dari penambatan molekuler adalah memprediksi konformasi ikatan berupa posisi dan jenis ikatan serta afinitas ikatan berdasarkan energi ikatan. Prediksi ini dinilai penting bagi perkembangan dari senyawa-senyawa yang diduga memiliki aktivitas biologis untuk dijadikan senyawa penuntun bagi perkembangan obat selanjutnya (Trott & Olson, 2009).

Lebih dari enam puluh perangkat lunak penambatan molekuler telah tersedia namun hanya beberapa yang sering digunakan dalam penelitian (Moitessier, Englebienne, Lee, Lawandi, & Corbeil, 2008). Perangkat lunak-perangkat lunak tersebut diantaranya adalah AutoDock 4 dan GOLD dengan menempati urutan pertama dan kedua terbanyak dalam penggunaannya (Sousa, Fernandes, & Ramos, 2006). AutoDock telah meluncurkan perangkat lunak versi terbarunya yakni AutoDock Vina yang lebih cepat dan akurat berdasarkan perbandingannya dengan AutoDock 4 (Trott & Olson, 2009). Dalam penelitian kali ini, akan digunakan ketiga perangkat lunak tersebut dengan harapan diperoleh hasil penambatan yang diperkuat oleh masing-masing perangkat lunak.

Ligan-ligan berupa α - dan γ -mangostin, serta dengan tambahan analog lain yakni β -mangostin, masing-masing akan ditambatkan pada protease HIV-1 dengan beberapa sisi target menggunakan tiga perangkat lunak penambatan. Hasil penambatan kemudian akan dianalisis baik energi afinitas ikatan, tingkat inhibisi maupun orientasi posisi ikatannya. Hasil ini diharapkan akan memberikan prediksi model penghambatan dari analog mangostin. Untuk selanjutnya, analog mangostin diharapkan dapat dijadikan senyawa penuntun dalam pengembangan obat anti-HIV.

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh model pengikatan beberapa senyawa analog turunan xanton dari *Garcinia mangostana* Linn. terhadap protease HIV-1.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Garcinia mangostana*

Garcinia mangostana Linn. (*G. mangostana*) merupakan nama latin dari tumbuhan manggis atau yang dalam bahasa Inggris disebut *mangosteen*. Tanaman ini berasal dari negara yang mempunyai hutan tropis di Asia Tenggara seperti Indonesia, Malaysia, Filipina dan Thailand (Chaverri, Rodriguez, Ibarra, & Rojas, 2008). Diameter buahnya sekitar 2,5-7,5 cm, dengan tebal kulit berkisar antara 0,6-1,0 cm dengan kandungan pigmen ungu di dalamnya (Aka, Nakagawa, Linuma, & Nozawa, 2008). Pada daging buah di dalamnya, terdapat dalam delapan bagian berwarna putih. Kandungan kimia yang terdapat dalam buah manggis diantaranya adalah xanton, flavonoid, tanin, vitamin B1, B2, dan C (Pradipta, Nikodemus, & Susilawati, 2007).

Manggis adalah tanaman yang berasal dari Asia Tenggara yang dijuluki sebagai “*the queen of fruits*” atau “ratu buah-buahan” karena banyak orang setuju bahwa buah manggis merupakan salah satu buah paling enak di dunia (Chaverri, Rodriguez, Ibarra, & Rojas, 2008). Buah manggis merupakan buah yang eksotik karena memiliki warna yang menarik dan kandungan gizi yang tinggi, karena itu buah manggis memiliki prospek yang cukup baik untuk dikembangkan (Pradipta, Nikodemus, & Susilawati, 2007). Di daerah asalnya yakni Indonesia, Malaysia, Thailand dan Filipina, buah manggis telah digunakan sebagai obat tradisional untuk pengobatan nyeri perut, diare, disentri, ulser kronik, gonorrhoea, sebagai astringen, dan pengobatan infeksi luka (Chaverri, Rodriguez, Ibarra, & Rojas, 2008).

2.1.1 Klasifikasi (Osman & Milan, 2006)

Dunia	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Bangsa	: Malpighiales
Famili	: Clusiaceae

Genus : *Garcinia*
Spesies : *Garcinia mangostana*

2.1.2 Xanton

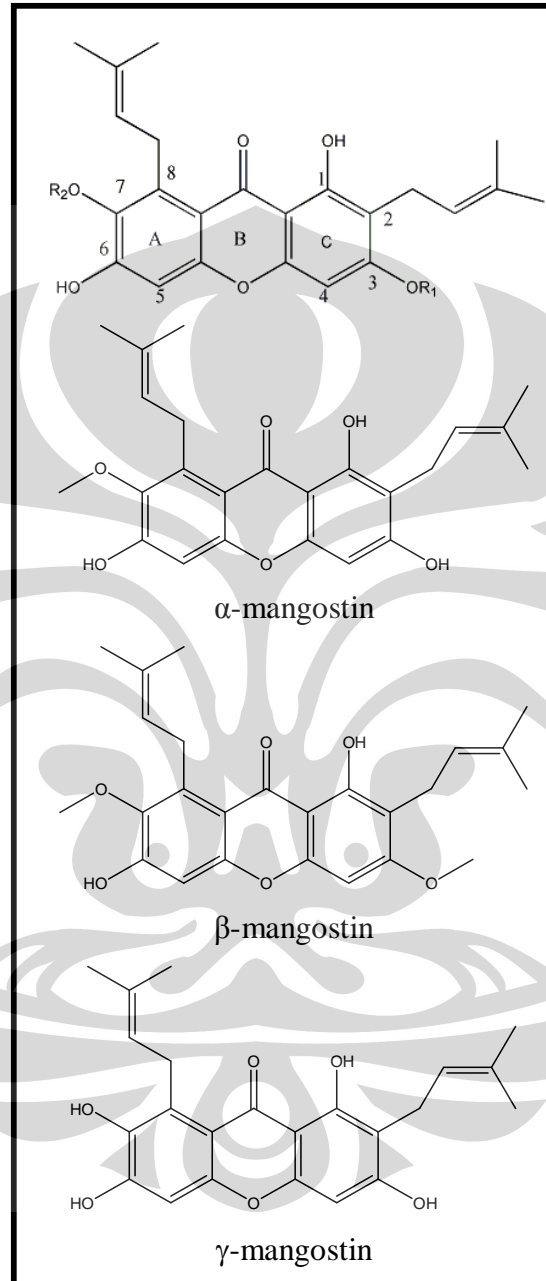
Kandungan utama pada *G. mangostana* adalah senyawa xanton. Lebih dari 200 xanton terdapat dalam tanaman tersebut di alam (Akao, Nakagawa, Linuma, & Nozawa, 2008). Senyawa xanton telah diisolasi dari kulit buah, seluruh buah, dan daun dari *G. mangostana*. Beberapa studi membuktikan bahwa kandungan xanton ini mempunyai aktivitas biologis yang tinggi (Chaverri, Rodriguez, Ibarra, & Rojas, 2008).

Xanton merupakan derivat dari difenil- γ -pyron, yang memiliki nama IUPAC 9H-xantin-9-on. Xanton terdistribusi luas pada tumbuhan tinggi, tumbuhan paku, jamur, dan tumbuhan lumut. Sebagian besar xanton ditemukan pada tumbuhan tinggi yang dapat diisolasi dari empat suku, yaitu *Guttiferae*, *Moraceae*, *Polygalaceae* dan *Gentianaceae*. Xanton dilaporkan memiliki aktivitas farmakologi sebagai antibakteri, antiretroviral, antifungi, antiinflamasi, antileukemia, antiagregasi platelet, selain itu xanton dapat menstimulasi sistem saraf pusat dan memiliki aktivitas antituberkulosis secara *in vitro* pada bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (Pradipta, Nikodemus, & Susilawati, 2007).

2.1.3 Analog Xanton

Beberapa senyawa analog xanton dari *G. mangostana* telah berhasil diidentifikasi dan dilakukan studi lebih lanjut. Senyawa-senyawa xanton tersebut di antaranya adalah α -, β -, dan γ - mangostin, garsinon E, 8-deoksigartanin, dan gartanin (Chaverri, Rodriguez, Ibarra, & Rojas, 2008). Penelitian yang dilakukan oleh Chen, Wan, dan Loh serta Vlietinck, Apers, dan Pieters secara *in vitro* pada tahun 1996 dan 1998, menunjukkan bahwa α - dan γ -mangostin mempunyai aktivitas sebagai inhibitor protease HIV-1. Uji *in vitro* dilakukan dengan menggunakan protease HIV-1 dengan heptapeptida sintesis (Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val) sebagai substrat dan pepstatin A sebagai kontrol positif. Hasil yang diperoleh berupa plot Lineweaver-Burk yang menunjukkan mekanisme nonkompetitif. Pada percobaan tersebut, didapatkan bahwa α -mangostin memiliki

K_i sebesar $10,7 \pm 0,95 \mu\text{M}$ sedangkan γ -mangostin memiliki K_i sebesar $7,8 \pm 0,40 \mu\text{M}$. Analog lain yakni β -mangostin diduga memiliki aktivitas yang sama karena struktur dari ketiga analog yang mirip.



[Sumber: Chaverri, Rodriguez, Ibarra, & Rojas, 2008]

Gambar 2.1. Analog senyawa mangostin dari *G. mangostana* Linn. “telah diolah kembali”

2.1.4 Isolasi Mangostin

Mangostin dapat diperoleh dari isolasi beberapa bagian tanaman manggis seperti kulit buah (perikarp), getah, dan kulit kayu (Chaverri, Rodriguez, Ibarra, & Rojas, 2008). Salah satu cara isolasi mangostin adalah seperti pada penelitian oleh Mahabusarakam, Wiriyachitra, dan Taylor (1987). Isolasi mangostin dimulai dari ekstraksi bagian kulit buah dari manggis. Serbuk kulit buah dilarutkan dalam benzen selama tiga hari. Ekstraksi diulang sebanyak tiga hari dan larutan-larutannya dikumpulkan. Presipitat berwarna kuning diambil dan dikumpulkan dari larutan tersebut. Presipitat tersebut dipisahkan dengan elusi kolom cepat menggunakan pelarut heksan, heksan/benzen, benzen, CH_2Cl_2 , EtOAc, Me_2CO , dan kemudian dengan MeOH. Eluen yang memiliki komponen mirip dikombinasikan ke dalam tujuh fraksi. Fraksi 1, 3, 5 yang mengandung komponen utama sementara komponen 2, 4, 6, 7 mengandung campuran beberapa senyawa. Fraksi 1 menghasilkan gartanin, fraksi 3 menghasilkan α -mangostin, dan fraksi 5 menghasilkan γ -mangostin.

Cairan utama dari fraksi 1 dan 3 dikombinasikan dengan fraksi 2 dan campuran tersebut dipisahkan dengan elusidasi kolom cepat. Dari hasil elusidasi didapatkan tiga fraksi utama: A, B, dan C. Fraksi B merupakan α -mangostin dan fraksi C menghasilkan β -mangostin. Fraksi A menghasilkan fraksi kristal γ -mangostin.

2.2 Protein

Protein adalah polimer linier yang terdiri dari unit-unit monomer asam amino yang terhubung melalui ikatan peptida. Unit-unit berulang ini disebut sebagai residu asam amino. Dalam sebuah protein, terdapat residu asam amino antara 40 hingga 4000 residu yang terdiri dari dua puluh jenis penyusunnya (Bruice, 2003). Protein merupakan makromolekul yang sangat berguna dalam sistem kehidupan dan memiliki fungsi penting dalam seluruh proses biologis. Berdasarkan fungsi biologis tersebut, protein dapat diklasifikasikan sebagai enzim (dehidrogenase, kinase), protein penyimpanan (ferritin, mioglobin), protein pengatur (protein pengikat DNA, hormon peptida), protein struktural (kolagen, proteoglikan), protein pelindung (faktor pembekuan darah, imunoglobulin), protein

pengangkut (hemoglobin, lipoprotein plasma), dan protein kontraktif/motil (aktin, tubulin) (Murray, Granner, Mayes, & Rodwell, 2003).

Protein juga dapat diklasifikasikan berdasarkan bentuk keseluruhan ke dalam dua kelas, yakni protein fibrosa dan globular. Protein fibrosa mengandung rantai panjang polipeptida dalam ikatan-ikatan (bundel) yang tidak larut dalam air. Protein yang masuk dalam kelas ini diantaranya adalah keratin dan kolagen. Protein globular berbentuk struktur padat berlipat menyerupai globus atau sferis, yang termasuk ke dalam kelas ini adalah enzim-enzim (Bruice, 2003).

2.2.1 Struktur Protein

2.2.1.1 Struktur Primer

Sekuens asam-asam amino dari sebuah protein disebut sebagai struktur primer protein. Dalam protein, asam amino tersusun secara kovalen oleh ikatan peptida yang berupa interaksi amida antara grup α -karboksil dari satu asam amino dan grup α -amino dari asam amino lainnya. Ikatan peptida ini tidak dapat diputus dengan cara denaturasi protein seperti pemanasan atau konsentrasi urea yang tinggi. Oleh asam atau basa kuat dalam jangka panjang dan suhu tinggi, dapat memutus ikatan ini secara non-enzim.

Urutan penamaan rantai peptida ditulis dengan letak asam amino dengan gugus amin bebas (*N-terminal*) di kiri sedangkan asam amino dengan gugus karboksil bebas (*C-terminal*) di kanan (Gambar 2.2a). Oleh karena itu, semua sekuens asam amino dibaca dari N- ke *C-terminal* (Pamela & Harvey, 1994). Sudut disekitar ikatan $C\alpha - N$ disebut sebagai sudut phi sedangkan sudut disekitar ikatan $C\alpha - CO$ adalah sudut psi. Kombinasi sudut phi-psi yang menghasilkan rintangan sterik antar atom tidak diperbolehkan (*disallowed*) (Murray, Granner, Mayes, & Rodwell, 2003).

2.2.1.2 Struktur Sekunder

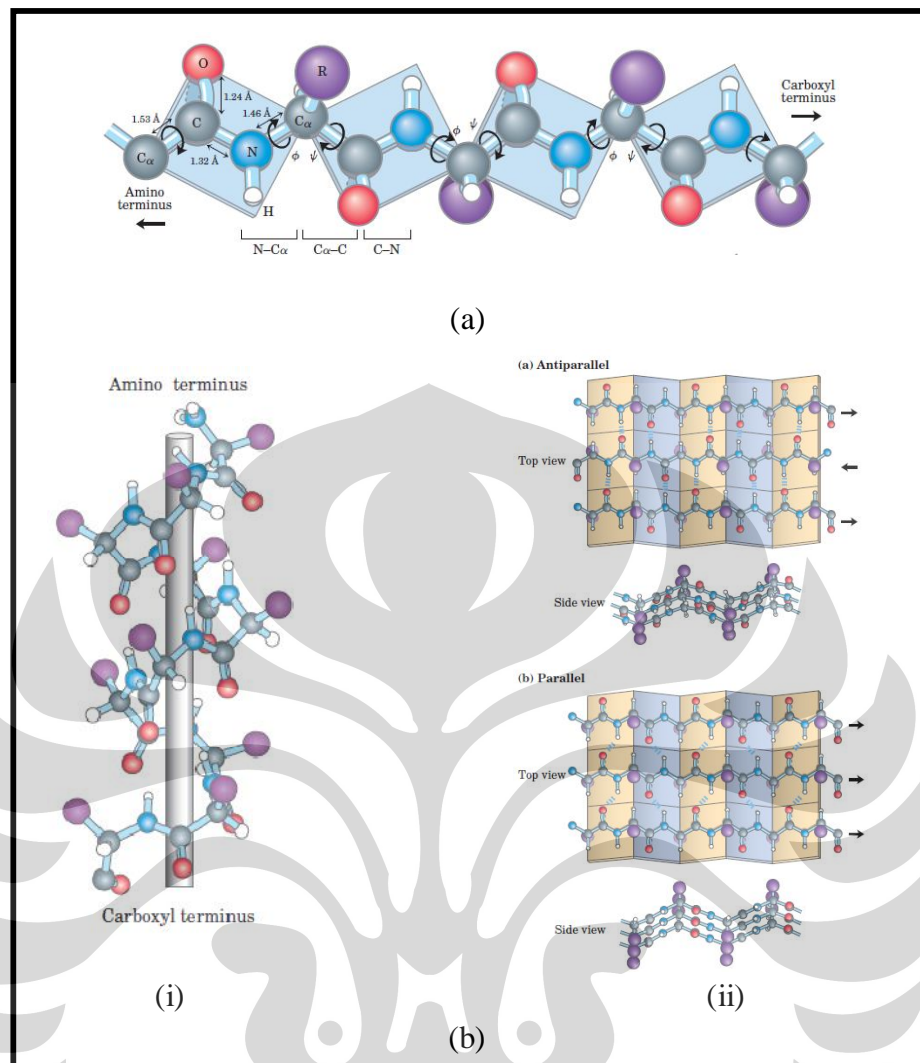
Dalam struktur sekunder protein, digambarkan konformasi dari segmen-segmen rantai kerangka sebuah protein seperti pada Gambar 2.2b. Untuk meminimisasi energi, sebuah rantai polipeptida cenderung melipat ke dalam struktur geometri berulang seperti heliks- α (*α -helix*) dan lembaran- β (*β -sheet*).

Terdapat tiga faktor yang mempengaruhi pemilihan bentuk sekunder suatu protein. Pertama adalah daerah planar setiap ikatan peptida yang membatasi konformasi yang mungkin dari rantai ikatan peptida. Kedua adalah adanya jumlah maksimum dari kelompok peptida yang tergabung oleh ikatan hidrogen. Ketiga adalah pemisahan ruang yang cukup di sekitar grup $-R$ untuk menghindari gangguan sterik serta tolak menolak muatan yang sama (Bruice, 2003).

Salah satu konformasi dari ikatan sekunder adalah heliks- α , dimana kerangka polipeptida membentuk kumparan sepanjang aksis dari molekul protein (Gambar 2.2b). Heliks ini distabilkan oleh ikatan hidrogen yang terjadi pada atom hidrogen yang terikat pada atom nitrogen amida dengan oksigen pada gugus karbonil. Substituen pada karbon- α dari asam amino menonjol keluar dari heliks, sehingga gangguan sterik diminimisasi. Karena struktur asam amino mempunyai konfigurasi L, maka heliks- α merupakan heliks yang dominan kanan. Hal ini menyebabkan heliks berputar searah jarum jam seiring perputarannya ke bawah (Bruice, 2003).

Konformasi kedua adalah lembaran- β (Gambar 2.2b). Lembaran- β seringkali disebut lembaran- β terlipat karena strukturnya jika diperpanjang menyerupai lembaran-lembaran yang berlipat. Ikatan hidrogen terjadi antara rantai peptida yang berdekatan. Dua rantai peptida yang terikat oleh ikatan hidrogen dapat terjadi dalam arah yang sama (paralel) maupun berkebalikan (antiparalel). Dalam lembaran- β paralel, rantai yang berdekatan terletak pada arah yang sama. Sedangkan dalam lembaran- β antiparalel, dua rantai yang berdekatan terletak pada arah yang terbalik (Bruice, 2003).

Sebagian besar struktur sekunder protein terdiri dari heliks- α dan lembaran- β . Selain dari bentuk konformasi tersebut, sisanya terdapat dalam konformasi kurang beraturan seperti konformasi gelungan (*loop*) dan tekukan- β . Gelungan *hairpin* atau gelungan berbentuk penjepit rambut menghubungkan lembaran- β antiparalel yang berdekatan (Murray, Granner, Mayes, & Rodwell, 2003).



[Sumber: Nelson & Cox, 2001]

Gambar 2.2 Struktur protein (a) primer dan (b) sekunder dengan (i) heliks- α (ii) lembaran- β

2.2.1.3 Struktur Tersier

Struktur tersier dari sebuah protein adalah gambaran tiga dimensi dari semua atom dalam protein (Gambar 2.3a). Protein melipat secara spontan dalam larutan (cairan tubuh) dengan tujuan memaksimalkan stabilitas protein. Setiap kali terjadi interaksi yang menstabilkan antara dua atom, energi bebas dilepaskan. Makin banyak energi yang dilepaskan (ΔG makin negatif), protein tersebut makin stabil. Oleh karena itu, pelipatan protein cenderung terjadi ke dalam sebuah bentuk yang memaksimalkan jumlah interaksi penstabilan (Bruice, 2003).

Bentuk interaksi penstabilan protein yakni ikatan kovalen, ikatan hidrogen, interaksi elektrostatik, interaksi hidrofobik, dan interaksi van der Waals. Ikatan kovalen yang terjadi hanya ikatan disulfida yang terbentuk ketika protein melipat. Ikatan lainnya jauh lebih lemah, tapi karena begitu banyak ikatan tersebut terjadi, ikatan-ikatan tersebut sangat penting dalam pelipatan protein (Bruice, 2003).

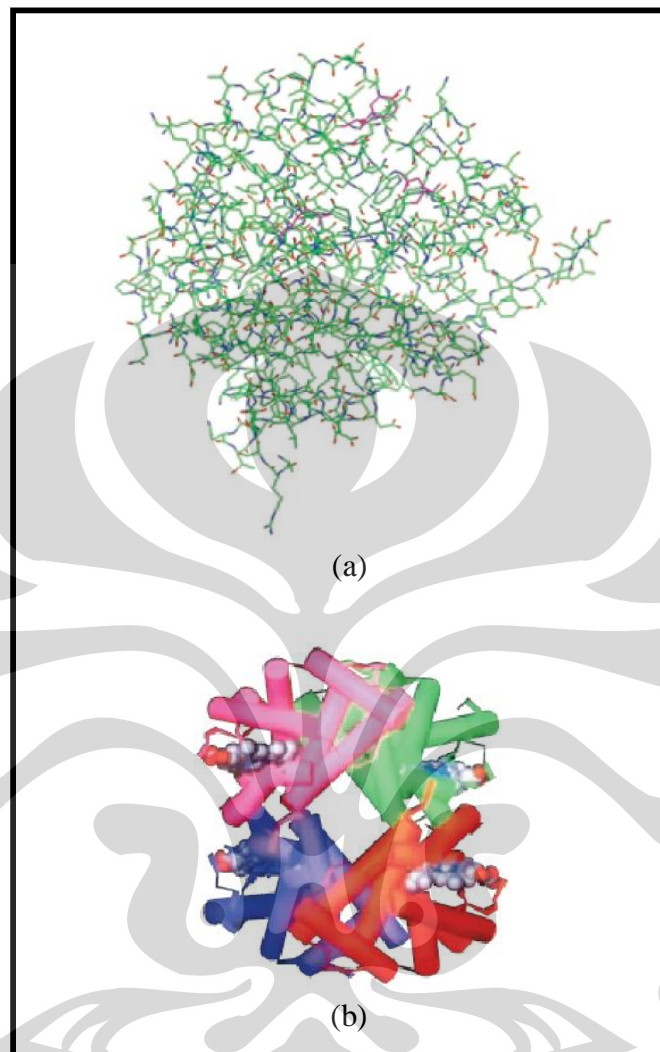
Protein biasanya terdapat dalam lingkungan larutan yang encer. Oleh karena itu, pelipatan protein cenderung terjadi dengan konformasi gugus polar yang berada di permukaan dan gugus nonpolar yang terletak di dalam jauh dari air. Interaksi yang terjadi antara grup nonpolar dikenal dengan interaksi hidrofobik. Interaksi ini meningkatkan stabilitas protein dengan meningkatkan entropi dari molekul air (Bruice, 2003). Ikatan hidrogen terjadi antara gugus polar pada permukaan protein dengan molekul air. Di bagian lainnya, terjadi ikatan hidrogen pada tulang punggung antara atom hidrogen yang terikat pada atom nitrogen amida dengan oksigen pada gugus karbonil (Murray, Granner, Mayes, & Rodwell, 2003).

Interaksi elektrostatik menghubungkan gugus $-R$ yang memiliki muatan berlawanan pada sejumlah residu dengan gugus α yang bermuatan pada residu terminal karboksil serta amino. Sedangkan interaksi van der Waals bersifat sangat lemah dan hanya bekerja pada jarak yang pendek. Namun jika terlalu dekat, akan terjadi gaya tolak menolak (Murray, Granner, Mayes, & Rodwell, 2003).

2.2.1.4 Struktur Kuartener

Struktur kuartener sebuah protein menggambarkan bagaimana subunit-subunit tersebut tersusun dalam sebuah ruang. Protein yang mempunyai lebih dari satu rantai peptida disebut sebagai oligomer (Gambar 2.3b). Rantai tunggalnya disebut sebagai subunit. Subunit-subunit pada struktur kuartener sebuah protein, dihubungkan dengan interaksi-interaksi yang sama seperti rantai tunggal protein dalam struktur tiga dimensinya yakni interaksi hidrofobik, ikatan hidrogen, dan interaksi elektrostatik. Sebuah protein dengan subunit tunggal disebut sebagai monomer, dua subunit sebagai dimer, tiga subunit sebagai trimer, dan empat subunit sebagai tetramer. Protein dengan subunit yang tidak sama disebut sebagai

heterooligomer. Subunit ini melaksanakan fungsi yang secara tipikal berbeda pula (Murray, Granner, Mayes, & Rodwell, 2003).



[Sumber: Bruice, 2003]

Gambar 2.3 Struktur protein (a) struktur tersier dan (b) struktur kuartener

2.2.2 Interaksi Protein dengan Ligan

2.2.2.1 Interaksi Hidrogen

Ikatan hidrogen adalah ikatan yang terjadi antara hidrogen dengan atom O, N, F (Bruice, 2003). Normalnya, atom hidrogen membentuk ikatan kovalen dengan atom lain, namun atom hidrogen yang terikat secara kovalen dengan atom donor tersebut juga dapat berinteraksi membentuk ikatan hidrogen dengan atom akseptor. Dalam pembentukan ikatan hidrogen, atom donor harus elektronegatif sehingga ikatan kovalen antara atom donor dengan H bersifat polar. Atom

akseptor juga harus elektronegatif dan harus mempunyai setidaknya sepasang elektron sunyi sehingga dapat menyerang δ^+ dari atom hidrogen (Lodish, Berk, Zipursky, Matsudaira, Baltimore, & Darnell, 2000). Ikatan hidrogen terjadi paling kuat ketika molekul berada dalam orientasi interaksi elektrostatik yang maksimum. Keadaan ini terjadi ketika atom hidrogen dan dua atom lain yang berikatan berada dalam satu garis, dimana atom akseptor berada segaris dengan ikatan kovalen antara atom donor dan atom H (Nelson & Cox, 2001).

Dalam sistem biologis, baik donor maupun akseptor biasanya merupakan atom nitrogen atau oksigen, khususnya atom dalam gugus amino ($-\text{NH}_2$) dan hidroksil ($-\text{OH}$). Karena ikatan antara N-H dan O-H bersifat polar, atom H-nya dapat berikatan hidrogen dengan atom akseptor. Contoh sederhana dari ikatan hidrogen adalah molekul air. Atom hidrogen dari satu molekul air tertarik pada sepasang elektron sunyi dari atom oksigen molekul yang berdekatan. Jarak ikatan hidrogen berkisar 0,23 – 0,37 nm, sekitar dua kali jarak ikatan kovalen dari atom yang sama (Lodish, Berk, Zipursky, Matsudaira, Baltimore, & Darnell, 2000).

2.2.2.2 Interaksi van der Waals

Ketika dua atom mendekat satu sama lain, kedua atom ini membentuk gaya tarik yang lemah dan nonspesifik yang menyebabkan interaksi van der Waals. Interaksi nonspesifik ini dihasilkan dari fluktuasi acak dalam distribusi elektron dari semua atom yang menyebabkan kenaikan distribusi elektron sementara yang tak seimbang yakni dipol elektrik sementara. Jika dua atom yang terikat secara kovalen berdekatan, dipol sementara pada satu atom akan mengganggu awan elektron atom lainnya. Gangguan ini menyebabkan dipol sementara dari atom kedua, dan kedua dipol tersebut akan tertarik satu sama lain secara lemah. Sama halnya dengan suatu ikatan kovalen yang polar dalam satu molekul akan menarik dipol yang berlawanan dari molekul lain (Lodish, Berk, Zipursky, Matsudaira, Baltimore, & Darnell, 2000).

Kekuatan interaksi van der Waals berkurang drastis ketika jarak molekul meningkat. Oleh karena itu, interaksi ini hanya terbentuk ketika atom-atom terletak sangat dekat. Akan tetapi jika atom terletak terlalu dekat, maka atom-atom tersebut saling tolak menolak karena adanya muatan negatif pada kulit

elektron terluar. Radius van der Waals dari atom H adalah 0,1 nm, dan radius dari atom O, N, C, S berkisar antara 0,14 – 0,18 nm. Jarak dari dua atom yang berikatan kovalen adalah jumlah radius dari keduanya. Contoh jarak interaksi yang terjadi yaitu jarak antara atom H dan C dalam interaksi van der Waals adalah 0,27 nm, dan jarak antar atom C adalah 0,34 nm (Lodish, Berk, Zipursky, Matsudaira, Baltimore, & Darnell, 2000).

Energi dari interaksi van der Waals adalah sekitar 1 kkal/mol, hanya sedikit lebih tinggi dari energi termal rata-rata dari molekul pada suhu 25° C. Oleh karena itu, interaksi van der Waals lebih lemah dibanding ikatan hidrogen yang biasanya memiliki energi antara 1-2 kkal/mol dalam larutan encer (Lodish, Berk, Zipursky, Matsudaira, Baltimore, & Darnell, 2000)

2.2.2.3 Interaksi Hidrofobik

Molekul nonpolar tidak mengandung ion, memiliki momen dipol atau terhidrasi. Karena molekul tersebut tak larut atau hampir tak larut dalam air, molekul itu disebut hidrofobik (Yunani, “takut-air”). Ikatan kovalen antara dua karbon dan antara karbon dan hidrogen adalah ikatan nonpolar yang paling umum dalam sistem biologis. Hidrokarbon, molekul yang terbentuk dari karbon dan hidrogen, bersifat tak larut dalam air. Gaya yang menyebabkan molekul-molekul hidrofobik dari bagian molekul nonpolar untuk lebih menyatu daripada terlarut dalam air disebut ikatan hidrofobik (Lodish, Berk, Zipursky, Matsudaira, Baltimore, & Darnell, 2000).

Gaya hidrofobik bukan merupakan gaya yang menyebabkan pemisahan melainkan gaya yang diperlukan untuk memasukkan molekul nonpolar ke dalam air. Molekul nonpolar tidak dapat membentuk ikatan hidrogen dengan molekul air, hal ini menyebabkan gangguan pada struktur air yang memaksa air membentuk kurungan kaku yang terikat oleh ikatan hidrogen di sekitarnya. Normalnya molekul air bergerak pada kecepatan konstan, namun formasi kurungan membatasi pergerakan air. Efek ini bertujuan untuk meningkatkan organisasi struktur air tersebut (Lodish, Berk, Zipursky, Matsudaira, Baltimore, & Darnell, 2000).

Molekul nonpolar juga dapat terikat bersamaan melalui interaksi van der Waals. Total hasil interaksi hidrofobik dan interaksi van der Waals menjadikan molekul hidrofobik sangat kuat berikatan bersama dan tidak dengan air. Secara sederhana, sesuai dengan teori *like dissolves like*, molekul polar larut dalam pelarut polar seperti air sedangkan molekul nonpolar larut dalam pelarut nonpolar seperti heksan (Lodish, Berk, Zipursky, Matsudaira, Baltimore, & Darnell, 2000).

2.3 Enzim

Enzim adalah polimer biologis yang mengkatalisis reaksi kimia dalam tubuh. Enzim mengkatalisis perubahan satu atau lebih senyawa (substrat) ke satu atau lebih senyawa berbeda (produk). Sebagai katalis dengan efisiensi tinggi, enzim merupakan pengkatalis yang sangat selektif. Enzim spesifik bagi tipe reaksi maupun substrat atau senyawa yang mirip substrat tersebut. Enzim memiliki berat molekul berkisar antara 12.000 hingga lebih dari satu juta (Nelson & Cox, 2001).

Kebanyakan enzim memiliki nama dengan akhiran “-ase” dari tambahan kata substratnya atau dari kata jenis aktivitasnya. Contoh penamaan enzim tersebut adalah urease yang mengkatalisis hidrolisis urea atau protease yang mengkatalisis pemotongan protein. Enzim lain dinamakan berdasarkan penemuan dalam fungsinya sebelum reaksi katalisis spesifiknya diketahui. Contoh penamaan enzim tersebut adalah enzim yang diketahui bekerja dalam pencernaan makanan yang dinamai pepsin, dari asal kata Yunani *pepsis* yang berarti pencernaan. Karena makin banyak enzim ditemukan, maka enzim dinamakan dan diklasifikasikan ke dalam enam kelas, masing-masing dengan subkelasnya, berdasarkan tipe reaksi yang dikatalisis. Kelas-kelas tersebut adalah oksidoreduktase, transferase, hidrolase, liase, isomerase, dan ligase (Nelson & Cox, 2001).

Reaksi katalisis enzim dikarakterisasi oleh formasi kompleks yang terjadi antara substrat dan enzim. Ikatan dengan substrat terjadi pada kantung dalam enzim yang dikenal sebagai sisi aktif. Energi yang digunakan untuk peningkatan aktivitas enzim berasal dari interaksi-interaksi lemah (ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan interaksi ionik) antara substrat dan enzim. Sisi aktif enzim dibangun agar interaksi lemah tersebut dapat terjadi pada reaksi transisi sehingga

dapat menstabilkan keadaan tersebut. Energi afinitas ikatan (ΔG), digunakan untuk menurunkan entropi substrat atau mengakibatkan perubahan konformasi enzim (*induced fit*). Energi afinitas ikatan juga merupakan nilai yang menggambarkan spesifitas enzim terhadap substrat (Nelson & Cox, 2001).

Suatu inhibitor dapat menghambat enzim dengan beberapa mekanisme diantaranya kompetitif, nonkompetitif, dan unkompetitif. Pada inhibisi kompetitif, inhibitor berikatan dengan situs pengikatan substrat pada sisi aktif dan memblok akses substrat tersebut. Struktur dari inhibitor kompetitif ini menyerupai struktur substrat alami sehingga dinamakan analog substrat. Efek yang terjadi pada mekanisme ini adalah inhibitor tersebut bekerja dengan menurunkan jumlah molekul enzim yang berikatan dengan substrat (Nelson & Cox, 2001). Pada mekanisme penghambatan nonkompetitif, pengikatan inhibitor tidak mempengaruhi pengikatan substrat. Inhibitor nonkompetitif berikatan dengan enzim pada sisi yang berbeda dengan sisi pengikatan substrat dan umumnya sedikit atau tidak mirip dengan substrat alami. Pengikatan terjadi ketika enzim berikatan maupun tidak berikatan dengan substrat. Inhibitor unkompetitif juga berikatan pada sisi yang berbeda namun terjadi ketika enzim dan substrat berikatan (Nelson & Cox, 2001).

Ketika afinitas ligan yang berikatan pada sisi aktif dipengaruhi oleh ligan lain yang terikat pada sisi lain, sisi aktif tersebut dikatakan bersifat kooperatif. Ligan lain yang berikatan tersebut mengakibatkan perubahan struktur yang berpengaruh terhadap sisi aktif. Keadaan ini disebut sebagai alosterik. Jika kedua ligan yang berikatan merupakan ligan yang sama, maka efeknya disebut sebagai kooperatif homotropik. Sedangkan untuk ligan yang berbeda, efeknya disebut sebagai kooperatif heterotropik. Dalam kooperatif heterotropik, ketika ligan yang berbeda tersebut meningkatkan afinitas ligan pada sisi aktif, maka ligan ini disebut sebagai efektor alosterik. Sedangkan ligan yang menurunkan afinitas disebut sebagai represor alosterik (Copeland, 2000).

2.4 Reseptor

Reseptor suatu obat merupakan makromolekul fungsional yang dapat dihambat fungsinya maupun kecepatan kerjanya oleh obat tersebut. Efek obat

pada umumnya timbul karena interaksi obat dengan reseptor pada suatu sel organisme. Interaksi tersebut mengakibatkan perubahan biokimiawi dan fisiologi yang merupakan respon khas untuk obat tersebut. Komponen yang paling penting dalam reseptor obat ialah protein. Ikatan obat-reseptor dapat berupa ikatan ion, hidrogen, hidrofobik, van der Waals, atau kovalen. Menurut teori pendudukan reseptor, intensitas efek obat berbanding lurus dengan fraksi reseptor yang diikatnya serta menjadi maksimal apabila seluruh reseptor diduduki obat.

Ketika terjadi interaksi obat dengan reseptor, suatu obat dapat menjadi agonis atau antagonis. Agonis ialah obat yang bila menduduki reseptor menimbulkan efek farmakologi secara intrinsik. Sedangkan antagonis ialah obat yang menduduki reseptor yang sama tetapi secara intrinsik tidak mampu menimbulkan efek farmakologi. Oleh karena itu, suatu antagonis dapat menghalangi ikatan agonis dengan reseptor sehingga kerja agonis terhambat.

Antagonis dapat bekerja secara kompetitif maupun nonkompetitif. Pada antagonisme nonkompetitif, antagonis berikatan dengan sisi aktif reseptor secara reversibel sehingga dapat digeser oleh agonis kadar tinggi. Dengan demikian, penghambatan efek agonis dapat diatasi dengan meningkatkan kadar agonis sampai akhirnya dicapai efek maksimal. Jadi, diperlukan kadar agonis yang lebih tinggi dari normal untuk memperoleh efek yang sama. Hal ini berarti bahwa afinitas agonis terhadap reseptornya menurun.

Pada antagonisme nonkompetitif, antagonis berikatan di tempat yang berbeda dengan agonis sehingga menyebabkan perubahan konformasi tertentu. Hal ini menyebabkan gangguan pada efek yang dihasilkan agonis. Penghambatan antagonis ini tidak dapat diatasi dengan meningkatkan kadar agonis. Akibatnya, efek maksimal yang dicapai berkurang namun afinitas agonis terhadap reseptor tidak berubah (Setiawati, SB, & Suyatna, 2005).

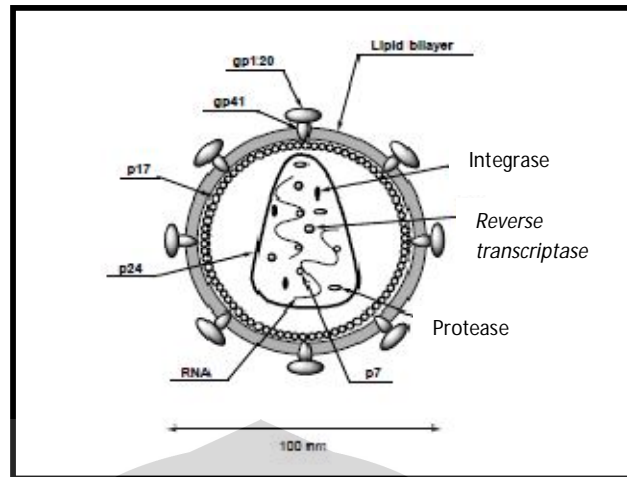
Reseptor membuat suatu sel dapat menangkap serta meneruskan suatu respon ke hormon atau isyarat-isyarat lainnya. Salah satu contoh reseptor dalam tubuh manusia adalah reseptor protein G. Reseptor ini terdapat pada *lipid bilayer* dan memiliki tujuh rentang daerah hidrofobik membran plasma yang diilustrasikan dengan tujuh buah silinder. Ketika berikatan dengan hormon,

kompleks protein ini menjadi aktif sehingga dapat meneruskan respon ke sasarannya (Murray, Granner, Mayes, & Rodwell, 2003).

2.5 *Human Immunodeficiency Virus Tipe 1 (HIV-1)*

Human Immunodeficiency Virus adalah virus yang relatif baru, ditransmisikan secara seksual, dan merupakan virus penginfeksi manusia. Sejarah penyebaran virus ini bermula dari daratan Afrika (Dimmock, Easton, & Leppard, 2007). Awalnya virus ini terdapat dalam primata, namun virus ini telah pindah ke manusia akibat kontak erat antara manusia dan binatang tersebut. Dari manusia ke manusia, virus ini dapat ditularkan melalui cairan tubuh seperti darah, mani, dan cairan vaginal (Tjay & Rahardja, 2007). Terdapat beberapa tipe dari virus ini, namun HIV tipe 1 adalah penginfeksi yang paling umum. HIV-1 telah tersebar secara global dan lebih dari 99% infeksi HIV disebarkan oleh virus ini (Dimmock, Easton, & Leppard, 2007).

HIV-1 adalah anggota dari genus *Lentivirus* dan dari famili retrovirus. HIV-1 adalah virus diploid dan di dalamnya terdapat dua molekul identik dari sense ssRNA yang positif. Virus ini memiliki diameter sebesar 100 nm (Gambar 2.4). Genomnya tersusun dari rantai gen standar oncovirus yakni 5'-*gag-pol-env*-3'. Selain itu, terdapat protein-protein yang dikodekan oleh virus ini (misalnya, *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu*, dan *nef*), totalnya sebanyak 16 protein. *Gag*, *pol*, dan *env* mengkode proteinnya masing-masing. *Gag* mengkode protein inti virion, *pol* mengkode enzim-enzim virion, dan *env* mengkode protein selubung virion. *Gag*, *pol*, dan *env* merupakan derivat dari prekursor poliprotein (Danielson & Hope, 2009).

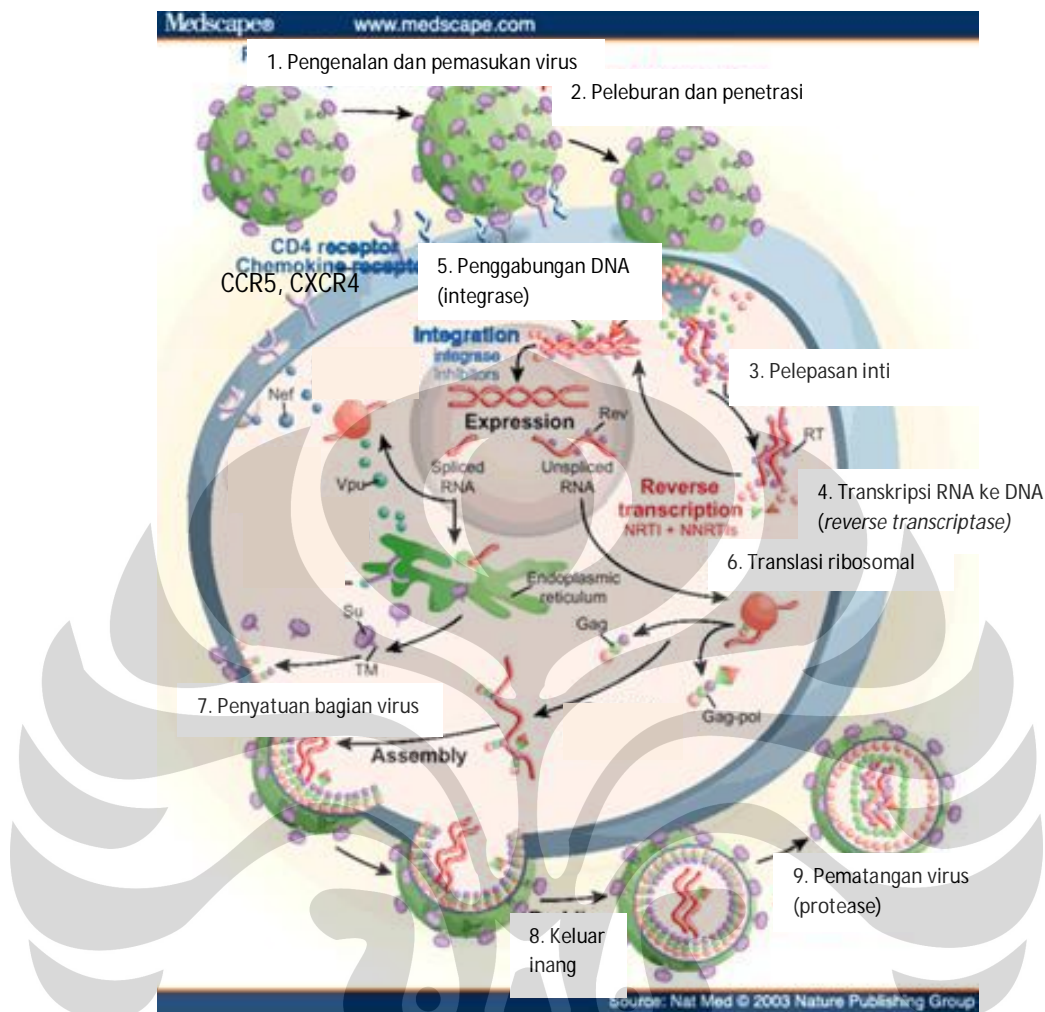


[Sumber: Alterman, 2001]

Gambar 2.4 Virus HIV-1

HIV-1 menginfeksi sel limfosit T, monosit, dan makrofag dari manusia (Tjay & Rahardja, 2007). Seperti pada Gambar 2.5, virus tersebut masuk ke sel inang melalui ikatan yang dibentuk oleh selubung glikoprotein gp 120 yang dimilikinya dengan reseptor CD4. Tahap ini kemudian memungkinkan interaksi gp 120 dengan koreseptor CCR5 atau CXCR4 dan mengubah konformasinya. Setelah perubahan konformasi ini, peleburan antara virus dan sel inang pun terjadi untuk kemudian virus melepas intinya ke dalam sel inang (Danielson & Hope, 2009).

Setelah inti dikeluarkan dari selubung, terjadi proses transkripsi dari RNA ke DNA oleh *reverse transcriptase*. Selanjutnya, DNA diinkorporasikan ke dalam DNA inang dengan bantuan integrase. Di dalam DNA inang, DNA virus ikut bereplikasi kemudian terjadi translasi dan terbentuk protein-protein panjang. Tahap berikutnya, protein menuju keluar sel inang untuk kemudian mendapatkan selubung. Kemudian terjadi proses pertunasan dimana terbentuk virion-virion baru. Protein panjang yang terdapat di dalam virion tersebut kemudian dipotong oleh bantuan enzim pemotong yakni protease. Setelah pemotongan tersebut, barulah virus menjadi matang untuk kemudian menginfeksi sel-sel lain (Tjay & Rahardja, 2007; Figure for: Twenty Years of Therapy for HIV-1 Infection, 2003).



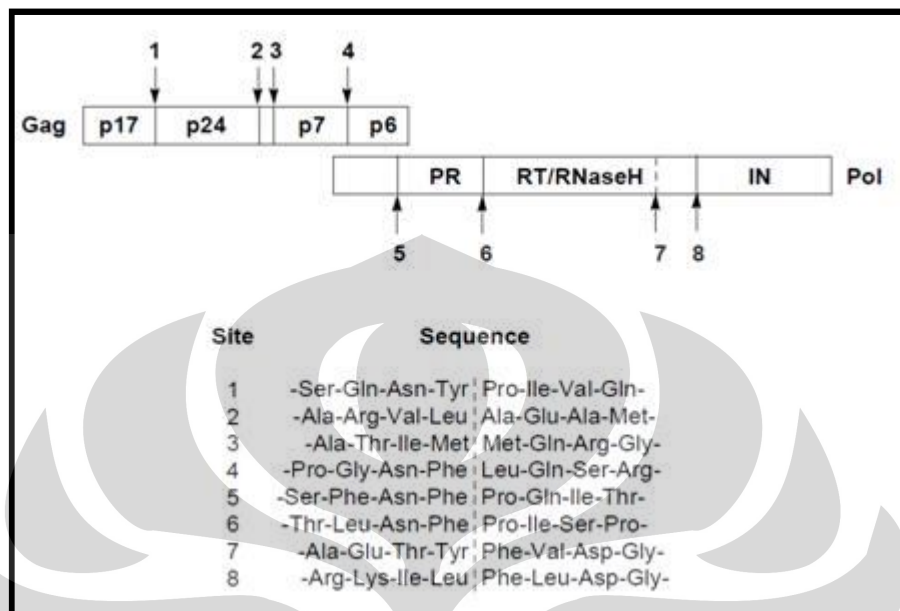
[Sumber: Figure for: Twenty Years of Therapy for HIV-1 Infection , 2003]

Gambar 2.5 Siklus hidup HIV-1 (*Human Immunodeficiency Virus* tipe 1)

2.6 Protease HIV-1

Protease HIV-1 adalah salah satu enzim yang terdapat dalam virus HIV-1 yang berfungsi untuk memotong protein rantai panjang pada proses pematangan virus. Enzim ini memotong rantai protein panjang pada sisi *gag* dan *gag-pol* yang harus dipotong agar virus menjadi matang (Gambar 2.6). Pemotongan dari poliprotein menghasilkan tiga protein besar (p24, p17, dan p7) yang berkontribusi dalam struktur virion dan pembungkusan RNA, sementara tiga protein yang lebih kecil (p6, p2, dan p1) fungsinya masih belum pasti (Gambar 2.4). Meskipun mamalia mempunyai protease aspartil, tidak ada yang dapat memotong poliprotein *gag*. Dua dari sisi pemotongan oleh protease HIV-1 adalah ikatan

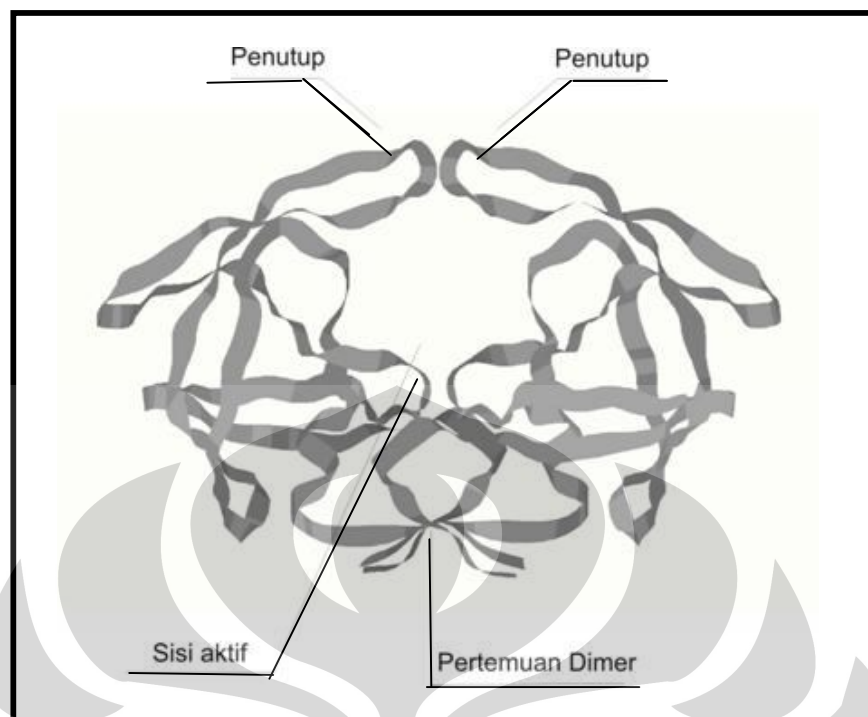
fenilalanin-prolin atau tirosin-prolin, yang merupakan sisi yang tidak terdapat pada target protease mamalia (Wood, 1998).



[Sumber: Alterman, 2001]

Gambar 2.6 Target pemotongan *gag* dan *gag-pol* oleh protease HIV-1

Protease HIV-1 sendiri adalah hasil pengkodean dari gen *pol*. Enzim ini adalah anggota dari famili protease asam aspartat seperti enzim pepsin. Seperti pada Gambar 2.7, protease HIV-1 merupakan homodimer, terdiri dari dua rantai poliprotein identik terhubung secara nonkovalen yang terdiri dari 99 asam amino (Patick & Potts, 1998; Tiana, *et al.*, 2005). Masing-masing monomer mengandung daerah lembaran β yang luas (belokan yang kaya glisin) dikenal dikenal sebagai *flap* (penutup) yang mempunyai bagian penting dalam pengikatan substrat dan sisi aktif Asp25-Thr26-Gly27 (Ashraf & Wong, 2003). Sisi aktif enzim ini mengandung sisi-sisi dimana inhibitor dapat terikat dengan erat (Patick & Potts, 1998). Sisi ini berada di bagian bawah ruang pengikatan sedangkan *flap* atau penutup berada di bagian atas. Segitiga sisi aktif ini terletak dalam suatu putaran yang strukturnya distabilkan dengan suatu jaringan ikatan hidrogen (Wlodawer & Vondrasek, 1998).



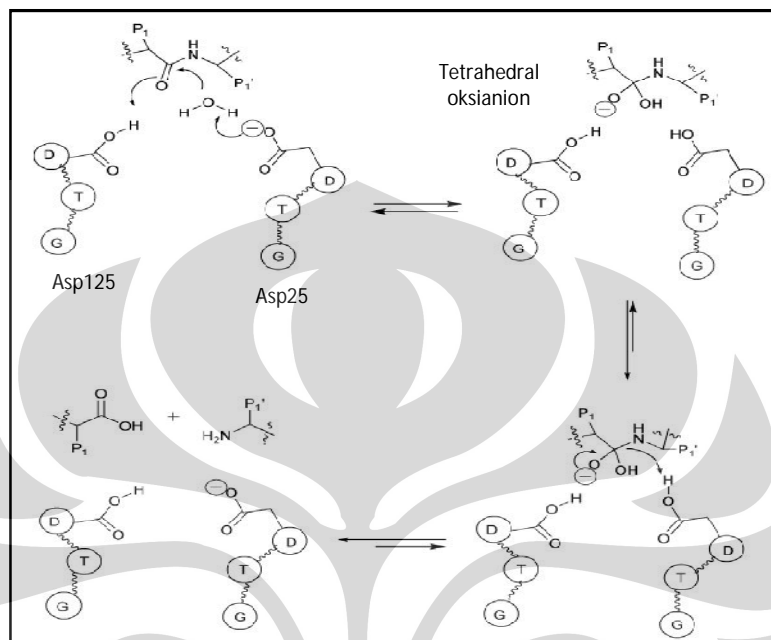
[Sumber: Alterman, 2001]

Gambar 2.7 Struktur makromolekul protease HIV-1

Pada sisi-sisi pengikatan dengan substrat, protease HIV-1 mempunyai kantung-kantung yang dinamai sebagai S1, S2, S3 serta S1', S2', dan S3' yang masing-masing pasang mempunyai residu sama. Pada sisi S1 mengandung residu Arg-108, Val182 dan Pro-181 berhadapan dengan S1, S1' mengandung residu Arg8, Val82, Pro81. S2 mengandung residu Ala28, Asp29, Asp30 Ile47, Val82 dan S2' mengandung Ala128, Asp129, Asp130, Ile147, dan Val182. Sedangkan S3 dan S3' masing-masing mengandung Trp6, Gln7, Arg8, Pro9 dan Trp106, Gln107, Arg108, Pro109. Sisi S1, S1' dan S2, S2' adalah sisi yang hidrofobik kecuali Asp29, Asp30, Asp129, dan Asp130 (Ashraf & Wong, 2003; Pechik, *et al.*, 1989).

Mekanisme pemotongan substrat pada protease HIV-1 merupakan mekanisme asam-basa pada umumnya. Seperti pada Gambar 2.8, kedua sisi aktif memiliki peran penting dalam mengaktivasi molekul air. Residu Asp terdekat memiliki muatan negatif menyebabkan molekul air teraktivasi. Aktivasi ini bertujuan untuk membuat molekul air bertindak sebagai nukleofilik sehingga menyerang karbon gugus karbonil pada ikatan yang akan dipotong. Penyerangan ini menghasilkan suatu senyawa intermediat tetrahedral oksianion. Selanjutnya

terjadi protonasi atom N amida yang mengakibatkan *rearrangement*. Proses ini kemudian menghasilkan produk yang telah mengalami hidrolisis dan substrat berhasil dipotong (Ashraf & Wong, 2003).



[Sumber: Ashraf & Wong, 2003]

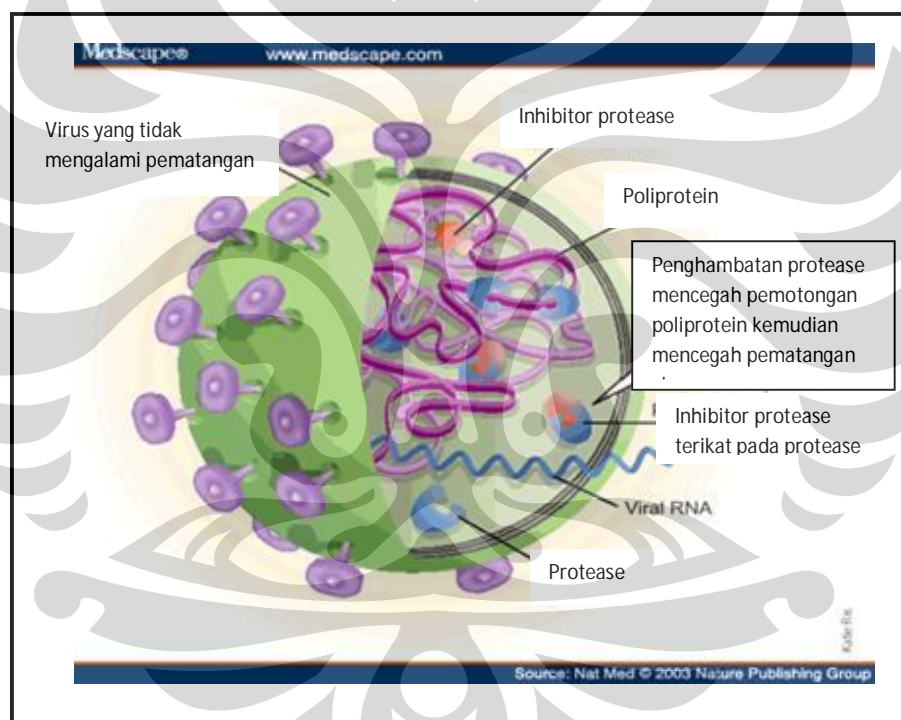
Gambar 2.8 Mekanisme pemotongan substrat protease HIV-1

Beberapa tahun terakhir ini, banyak dilakukan studi tentang kristalografi yang bertujuan untuk mengkarakterisasi struktur protease HIV-1 serta kompleks protease HIV/inhibitor dalam level atom. Terobosan baru pembuatan desain struktural protease HIV terjadi pada awal tahun 1989. Protease HIV-1 dimodelkan menggunakan cetakan protease aspartat pada eukariot yang sebelumnya telah diketahui. Model tersebut juga dibuat dalam versi struktur 3-dimensi (3D) (Wlodawer & Vondrasek, 1998). Lebih dari 140 struktur protease HIV-1, baik yang telah bermutasi maupun yang terikat dengan ligan telah dipublikasikan (Ashraf & Wong, 2003).

2.7 Inhibitor Protease HIV-1

Sejak penemuan anti-HIV pertama yakni inhibitor *reverse transcriptase*, pengembangan obat antiretroviral lain terus dikembangkan. Setelah peluncurannya, terdapat masalah yakni inhibitor *reverse transcriptase* telah

resisten terhadap HIV maka pada tahun 1995 inhibitor HIV protease pun diperkenalkan (Familia, *et al.*, n.d.). Setahun kemudian, diperkenalkan pengobatan baru dalam HIV yakni HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*). HAART merupakan kombinasi dari inhibitor *reverse transcriptase* dan inhibitor protease. Kombinasi yang digunakan biasanya merupakan *triple therapy* yang terdiri dari dua inhibitor *reverse transcriptase* dan satu inhibitor protease. Terapi ini ternyata sangat efektif terbukti dapat menurunkan *viral load* secara drastis (Tjay & Rahardja, 2007). Seperti pada Gambar 2.9 inhibitor protease HIV-1 bekerja dengan cara menghambat kerja protease HIV-1 melalui pencegahan enzim pada proses pemotongan prekursor poliprotein *gag* dan *gag-pol* (Wood, 1998).



[Sumber: Figure for: Twenty Years of Therapy for HIV-1 Infection , 2003]

Gambar 2.9 Mekanisme inhibitor protease HIV-1

Inhibitor protease HIV-1 memiliki beberapa mekanisme, diantaranya adalah sebagai analog senyawa transisi (*intermediate*), penghambat dimerisasi, serta penghambat penutup atau *flap*. Residu katalitik atau pemotongan pada protease HIV-1 terdapat pada tiga sisi aktif yakni Asp25, Thr26, dan Gly27. Pada proses pemotongan, substrat berikatan dengan sisi aktif dan penutup sebagai

penahan ikatan. Ikatan dengan penutup ini dibantu dengan adanya molekul air yang menyebabkan terjadinya ikatan hidrogen. Protease HIV-1 memiliki mekanisme pemotongan yang bertahap, salah satu tahapnya menghasilkan senyawa *intermediate* tetrahedral. Sebagai analog senyawa transisi, inhibitor protease HIV-1 menyerupai senyawa *intermediate* tersebut sehingga pemotongan tidak berlangsung sempurna (Wlodawer & Vondrasek, 1998). Posisi ikatan inhibitor dengan mekanisme ini ditunjukkan pada Gambar 2.10.



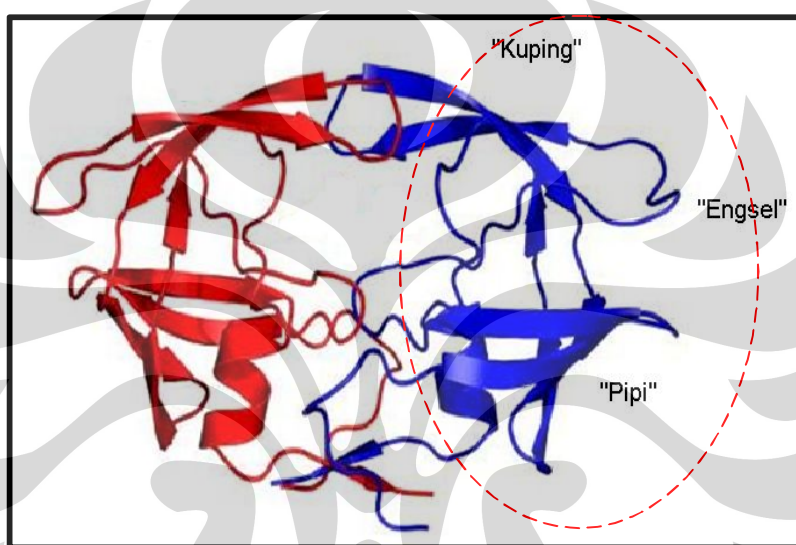
[Sumber: Wood, 1998]

Gambar 2.10 Struktur makromolekul protease HIV-1 yang terikat dengan inhibitor peptida (putih)

Sedangkan sebagai penghambat dimerisasi, inhibitor protease HIV-1 menghambat penggabungan monomer yang menyebabkan enzim menjadi tidak aktif (Alterman, 2001). Target penghambatan dimerisasi berada pada terminal-N dan C atau pertemuan dimer. Pada pertemuan dimer ini, terdapat residu-residu yang berperan besar dalam mengikat subunit lainnya. Residu tersebut diantaranya adalah residu 1-4 dan 96-99. Dalam proses dimerisasi, lebih dari 75% energi disumbangkan oleh area ini. Untuk menargetkan pengikatan inhibitor di daerah ini, biasanya digunakan struktur yang berbasis peptida (Breccia, *et al.*, 2003).

Penelitian oleh Chen, Wan, dan Loh (1996), Judd, *et al.* (2001), Kovalesky, *et al.* (2006), Perryman, Lin, dan McCammon (2006), serta Dash & Rao (2010), menunjukkan bahwa inhibitor protease HIV-1 yang berupa struktur

non-peptida dapat bekerja secara nonkompetitif. Sisi pengikatan yang terjadi berada di bagian luar dekat dengan penutup yang disebut “kuping”-“engsel”-“pipi” (Gambar 2.11). Residu-residu yang terdapat pada sisi tersebut diantaranya residu 11-58. Pengikatan pada daerah sekitar penutup menyebabkan fleksibilitas penutup terganggu sehingga penutup tidak dapat membuka atau menutup. Perubahan fleksibilitas ini menyebabkan penutup tidak dapat berikatan dengan substrat alami sehingga tidak terjadi pemotongan (Judd, *et al.*, 2001; Dash & Rao, 2010; Kovalesky, *et al.*, 2006; Perryman, Lin, & McCammon, 2006).



[Sumber: Perryman, Lin, & McCammon, 2006]

Gambar 2.11. Sisi-sisi nonkompetitif permukaan luar makromolekul protease HIV-1

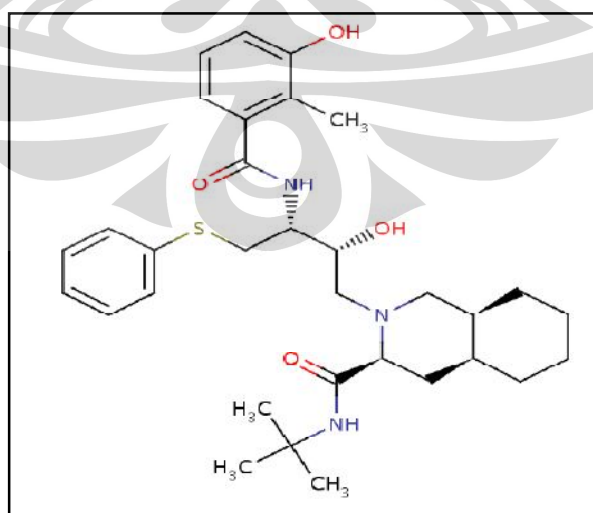
Protease yang terdapat pada HIV-1 dapat memotong sekuen Tyr-Pro atau Phe-Pro yang tidak dapat dilakukan oleh protease lain. Karena ikatan amida dari residu prolin ini tidak dapat dipotong oleh protease mamalia, maka desain dari inhibitor protease HIV-1 diharapkan mempunyai selektivitas tinggi terhadap enzim ini. Terdapat sepuluh inhibitor yang telah diakui oleh FDA, dan inhibitor protease HIV-1 yang pertama ditemukan adalah saquinavir. Inhibitor-inhibitor lain adalah ritonavir, lopinavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, atazanavir, fosamprenavir, tipranavir, dan darunavir (Currently approved drugs for HIV: a comparative chart, 2008).

Inhibitor dengan struktur dasar peptida mempunyai kekurangan-kekurangan diantaranya profil farmakokinetik yang kurang seperti

bioavailabilitas yang rendah dan ekskresi yang cepat. Selain itu, sintesis dari struktur-struktur ini rumit dan mahal (Harvey, *et al.*, 1997). Inhibitor peptida juga tidak dapat diberikan bersamaan dengan sebagian obat karena adanya interaksi obat (Judd, *et al.*, 2001). Penelitian sekarang ini pun terarah pada struktur inhibitor non-peptida yang diharapkan bisa meminimalisir kekurangan-kekurangan tersebut (Skulnick, *et al.*, 1997).

2.8 Nelfinavir

Nelfinavir merupakan inhibitor protease HIV-1 yang dikembangkan melalui kombinasi teknik desain obat berdasarkan struktur (*structure-based design*). Pada sediaan yang beredar di pasaran, obat ini berbentuk nelfinavir mesilat. Dengan pemberian secara oral dari nelfinavir mesilat, nelfinavir merupakan metabolit utama yang aktif (Zhang, *et al.*, 2001). Obat ini memiliki struktur berbasis non-peptida dengan sifat peptidomimetik (mirip peptida). Dari hasil kristalografi ditunjukkan bahwa nelfinavir menghambat secara kompetitif dengan berikatan pada sisi S1, S2, S1' dan S2'. Berdasarkan uji *in vitro*, diketahui bahwa obat ini cukup potensial dalam menghambat protease HIV-1 dengan K_i sebesar 2 nM. Sedangkan dalam uji *in vivo*, ditunjukkan bahwa obat ini cukup baik untuk diabsorpsi secara oral dan memiliki sifat farmakokinetik yang baik pada manusia. Peluncurannya dilakukan pada tahun 1997 oleh perusahaan Agouron dengan nama dagang Viracept® (Kaldor, *et al.*, 1997).



[Sumber: Kaldor, *et al.*, 1997]

Gambar 2.12. Struktur nelfinavir “telah diolah kembali”

2.9 Bioinformatika

Bioinformatika adalah suatu disiplin ilmu yang melibatkan ilmu biologi, ilmu komputer, statistika dan teknologi informasi di dalamnya (Dimmock, Easton, & Leppard, 2007). Contoh topik utama bidang ini meliputi basis data untuk mengelola informasi biologis, penyejajaran sekuen (*sequence alignment*), prediksi struktur untuk meramalkan bentuk struktur protein maupun struktur sekunder RNA, analisis filogenetik, dan analisis ekspresi gen (Wink, 2006). Ilmu bioinformatika ini didukung pula dengan perkembangan internet. Internet dibutuhkan untuk mempermudah akses basis data bioinformatika yang bermacam-macam (Tsai, 2002).

2.10 Biokimia Komputasi

Perkembangan dalam teknologi komputer dan ilmu komputer telah memberikan efek yang signifikan tentang ilmu-ilmu komputasi, termasuk biologi komputasi, kimia komputasi, dan biokimia komputasi. Biokimia komputasi digunakan ketika suatu model biokimia cukup berkembang sehingga dapat permasalahannya dapat dipecahkan menggunakan media komputer. Sekarang ini banyak perangkat lunak komputer serta sumber dari internet yang mendukung biokimia komputasi dalam penelitian serta kurikulum mengenai biokimia.

Untuk selanjutnya, sangat penting bagi peneliti untuk lebih mengembangkan *database* serta manajemennya seiring dengan penambahan informasi yang berhubungan dengan biokimia. Model visual dari struktur-struktur biokimia serta fenomenanya dapat memperdalam pemahaman serta evaluasinya. Simulasi dari sistem biokimia dapat memberikan kendali pada peneliti dari model tersebut. Sedangkan model dan penambatan molekuler dari interaksi biomolekul-biomolekul memungkinkan peneliti tidak hanya memprediksi dan menentukan struktur tiga dimensinya namun juga meneliti korelasi antara sifat-sifat dan fungsinya (Tsai, 2002).

2.11 Penambatan Molekuler

Penambatan molekuler telah memegang peranan penting dalam kesuksesan dalam desain obat secara struktural dan telah digunakan secara luas

dalam bidang industri dan akademis (Irwin, *et al.*, 2009). Pengembangan obat dengan komputasi penambatan molekuler diharapkan dapat menghemat biaya dan waktu pencarian obat (Huang & Zou, 2007).

Teknologi *molecular docking* atau penambatan molekuler diaplikasikan pada beberapa tingkat dari proses pengembangan obat untuk tiga tujuan utama, yaitu: memprediksi model ikatan dari ligan yang diketahui aktif; pencarian ligan baru menggunakan *virtual screening*; dan memprediksi afinitas ikatan dari beberapa seri senyawa aktif (Leach, Shoicet, & Peishoff, 2006).

Dengan adanya dua molekul, sebagai reseptor dan sebagai ligan, penambatan molekuler merupakan usaha untuk memprediksi model pengikatan dengan cara mengevaluasi nilai energi dari konformasi ikatan berbeda menggunakan fungsi nilai tertentu (Huang & Zou, 2007). Proses penambatan molekuler menyangkut prediksi konformasi ligan dan orientasi (penentuan posisi) dengan sisi penambatan yang ditargetkan. Aspek teoritis mengenai penambatan molekuler dengan memprediksikan posisi suatu ligan [I] pada suatu makromolekul protein [E] di bawah kondisi ekuilibrium (*conformational search*). Dari dua variable tersebut, akan dikalkulasikan (*scoring function*) nilai dari kompleks $[E+I] = [EI]$ yang dikenal sebagai energi bebas ikatan (ΔG). Energi bebas ikatan berkaitan dengan afinitas ligan terhadap protein (Kitchen, Decornez, Furr, & Bajorath, 2004). Perubahan energi ini dipengaruhi oleh perubahan entalpi (ΔH) dan perubahan entropi (ΔS). Energi bebas ikatan digambarkan melalui persamaan Gibbs:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

Dalam masa-masa awal penemuan, pada algoritma penambatan, baik ligan maupun protein bersifat *rigid*. Seiring peningkatan performa komputer dan perkembangan algoritma, sekarang ini kebanyakan penambatan dilakukan dengan ligan yang fleksibel dan makromolekul yang *rigid*. Sekarang telah ada kurang lebih dari tiga puluh perangkat lunak penambatan yang telah diluncurkan (Leach, Shoicet, & Peishoff, 2006). Dua komponen utama dari perangkat lunak *docking* adalah algoritma penambatan (pencarian konformasi) dan *scoring function* atau fungsi penilaian (Tiikkainen, 2010).

2.11.1 Minimisasi Energi

Struktur tiga dimensi yang diperoleh untuk penambatan molekuler tidak seluruhnya memiliki konformasi dengan energi terkecil. Oleh karena itu, struktur tersebut harus melalui tahap minimisasi energi. Salah satu teknik minimisasi yang umumnya digunakan adalah teknik turunan-pertama (*first-derivative*). Dalam teknik ini, terdapat beberapa prosedur seperti metode *steepest descent* dan *conjugate gradient*.

Pada fase pertama, metode *steepest descent* diaplikasikan ketika suatu struktur masih memiliki energi yang tinggi. Setiap atom digerakkan pada suatu arah dalam sebuah ruang dan perubahan energinya disimpan. Setelah semua atom mengalami pengulangan, konformasi diubah ke arah dimana terjadi pengurangan terbesar dalam energi total (posisi di bagian dasar permukaan energi). Proses ini terus berlanjut hingga didapatkan suatu angka atau energi yang cukup kecil. Metode ini merupakan metode yang cukup lambat untuk mencapai energi minimum. *Steepest descent* biasanya digunakan untuk konformasi yang jauh dari energi minimum sebagai tahap awal minimisasi secara kasar. Untuk penerapannya, *steepest descent* umumnya dilakukan pada 100-1000 tahap pengulangan dan dilanjutkan dengan tahap yang lebih tinggi yakni *conjugate gradient*.

Fase selanjutnya adalah penerapan metode *conjugate gradient* sebagai pelengkap metode *steepest descent*. Pada metode ini diakumulasikan informasi dari tiap fungsi pengulangan. Dengan proses ini, tindakan berbalik ke tahap sebelumnya dapat dicegah sehingga tidak terjadi pengulangan dari awal. Setiap proses minimisasi tiap gradient dikalkulasikan dan digunakan sebagai informasi tambahan dalam perhitungan minimisasi berikutnya. Jadi, setiap tahap yang sukses mendekatkan struktur untuk bergerak ke arah minimum. Proses ini lebih memakan waktu dan komputasi yang lebih besar dari metode *steepest descent* (Tiikkainen, 2010).

2.11.2 Metode Pencarian Konformasi

Tahap-tahap prediksi penentuan konformasi tergantung dari metode masing-masing perangkat lunak penambatan. Metode-metode tersebut diantaranya

adalah pencarian sistematis, pencarian acak, metode simulasi, dan fleksibilitas protein (Kitchen, Decornez, Furr, & Bajorath, 2004).

Metode pencarian sistematis merupakan algoritma yang menelusuri seluruh derajat kebebasan dalam suatu molekul, namun bermasalah dalam ledakan kombinasi. Oleh karena itu, ligan biasanya ditambahkan fragmen-fragmen lain saat berada pada sisi aktif. Pencarian ini disebut juga sebagai metode penambahan konstruksi (Kitchen, Decornez, Furr, & Bajorath, 2004). Pada algoritma penambahan konstruksi ini, ligan dipisahkan antara bagian yang *rigid* (kaku) dan bagian yang dapat berputar. Kemudian bagian yang kaku dijadikan bagian dasar yang akan ditempatkan pada ruang pengikatan untuk bergerak ke beberapa jenis interaksi. Bagian yang tersisa kemudian ditambahkan satu persatu ke bagian dasar. Hasilnya akan dinilai untuk kemudian diurutkan untuk analisis selanjutnya. Salah satu perangkat lunak yang menggunakan algoritma ini adalah FlexX (Tiikkainen, 2010).

Metode pencarian berikutnya adalah pencarian acak. Algoritma ini (sering disebut juga sebagai metode stokastik) berjalan dengan perubahan acak baik pada ligan tunggal maupun populasinya. Ligan baru yang dihasilkan dievaluasi berdasarkan fungsi probabilitas. Dua pendekatan populer adalah Monte Carlo dan algoritma genetika (Kitchen, Decornez, Furr, & Bajorath, 2004). Algoritma genetika ini digunakan pada kebanyakan perangkat lunak seperti GOLD dan AutoDock (*Lamarckian genetic algorithm*) (Tiikkainen, 2010).

Pada pencarian acak, setiap posisi ikatan termasuk konformasinya digambarkan sebagai sederetan nilai (rangkaiannya kromosom). Pada awalnya, satu set populasi kromosom (“pulau”) dibuat secara acak. Setiap kromosom diberikan nilai oleh fungsi penilaian yang menunjukkan bagaimana ligan tersebut terikat pada ruang penambatan. Setelah semua populasi dalam pulau diberi nilai, penghubung evolusi diaplikasikan untuk membuat generasi baru dari kromosom-kromosom tersebut. Dengan menyilangkan dua *parent* dari kromosom dalam pulau, terjadi pertukaran dalam bagian kromosom dan menghasilkan anak kromosom. Dengan mutasi beberapa sifat, *parent* tunggal diubah untuk membuat generasi anak kromosom baru. Secara migrasi, sebuah kromosom digandakan ke pulau yang lain. Untuk penyilangan dan mutasi, *parent* dipilih secara acak dengan

prediksi menuju kromosom dengan nilai yang tinggi. Anak-anak yang dihasilkan menggantikan anggota urutan paling akhir dari populasi. Tahapan-tahapan ini terus berputar sesuai dengan pengaturan. Pada akhirnya, hasil dengan nilai yang paling tinggi yang akan tersisa untuk diidentifikasi ketepatan pengikatannya (Tiikkainen, 2010).

Metode lainnya adalah metode penguatan simulasi (*simulated annealing*). Pendekatan yang paling populer dari metode ini adalah dinamika molekuler. Namun, simulasi dinamika molekuler sering tidak mampu memindahkan batas energi dengan waktu simulasi yang efisien. Oleh karena itu, pendekatan ini hanya menyediakan ligan dengan energi yang kecil. Pendekatan ini pun sering digunakan untuk simulasi interaksi protein-ligan pada suhu dan parameter berbeda. Berbeda dari dinamika molekuler, metode minimisasi energi jarang digunakan. DOCK, salah satu perangkat lunak dengan metode ini, melakukan tahap minimisasi pada tiap penambahan fragmen yang diikuti dengan minimisasi final sebelum dilakukan penilaian (Kitchen, Decornez, Furr, & Bajorath, 2004).

Metode terakhir adalah fleksibilitas protein. Metode ini memang belum berkembang dibanding pendekatan fleksibilitas ligan (metode pada umumnya), namun telah diupayakan beberapa pendekatan. Pada intinya pendekatan ini lebih memperlakukan protein secara fleksibel. Untuk membatasi banyaknya kemungkinan konformasi, metode ini menggunakan algoritma dengan eliminasi *dead-end* (Kitchen, Decornez, Furr, & Bajorath, 2004).

2.11.3 Fungsi Penilaian (*Scoring Function*)

Komponen kritis lain yang terdapat pada semua perangkat lunak penambatan adalah fungsi penilaian atau *scoring function*. Objek dari fungsi penilaian ini adalah untuk memperkirakan energi bebas dari ligan dalam model ikatannya. Seperti yang telah disebutkan sebelumnya, energi bebas dapat digambarkan melalui persamaan Gibbs. Fungsi penilaian dikelompokkan menjadi beberapa bagian yaitu empiris, berdasarkan *force field*, dan berdasarkan pengetahuan (*knowledge-based*) (Tiikkainen, 2010).

Penilaian berdasarkan empiris memiliki syarat-syarat bagi tiap tipe interaksi. Parameter syarat-syarat ini ditentukan oleh tingkat kualitas struktur tiga

dimensi ligan dan target. Dengan fungsi penilaian empiris, penilaian dilakukan berdasarkan seberapa banyak perubahan geometri dari nilai-nilai optimum seperti jarak atom berat antara ligan dan protein serta sudut dari ikatan hidrogen. Penilaian empiris merupakan penilaian yang cukup cepat membuatnya cocok untuk skrining molekul dalam jumlah besar. Penilaian empiris ini masih bersifat eksplisit sehingga penggunaannya harus didahului dengan beberapa set percobaan. Oleh karena itu, prediksi energi interaksi dari data yang belum dicoba, dapat menjadi tidak akurat (Tiikkainen, 2010).

Seperti namanya, fungsi penilaian *force field* menggunakan medan gaya untuk menghitung afinitas ligan terhadap target (Tiikkainen, 2010). Pada pendekatan *force field*, biasanya dihitung jumlah energi dari interaksi reseptor-ligan dan energi internal ligan. Kebanyakan fungsi *force field* hanya mempertimbangkan satu konformasi protein sehingga memungkinkan fungsi penilaian ini mengabaikan energi internal protein sehingga menyederhanakan penilaiannya (Kitchen, Decornez, Furr, & Bajorath, 2004).

Kelas besar yang ketiga adalah fungsi penilaian berdasarkan pengetahuan (*knowledge-based*). Hampir mirip dengan fungsi penilaian empiris, fungsi penilaian ini berdasarkan data percobaan eksperimental dari ligan yang dikristalkan dengan protein yang biasanya diambil dari *Protein Data Bank*. Jika fungsi empiris menggunakan banyak parameter dari sebuah percobaan, maka fungsi ini dilakukan berdasarkan banyaknya frekuensi tipe interaksi ligan-protein yang muncul dari tipe-tipe yang ada (Tiikkainen, 2010).

2.12 Perangkat Lunak Penambatan Molekuler

Lebih dari enam puluh perangkat lunak penambatan molekuler dengan tiga puluh jenis fungsi penilaian berbeda telah tersedia, namun hanya beberapa yang sering digunakan dalam penelitian (Moitessier, Englebienne, Lee, Lawandi, & Corbeil, 2008). Perangkat lunak-perangkat lunak tersebut diantaranya adalah AutoDock 4 dan GOLD dengan menempati urutan pertama dan kedua terbanyak dalam penggunaannya (Sousa, Fernandes, & Ramos, 2006).

2.12.1 AutoDock 4 dan AutoDock Tools

Sejak peluncurannya pada tahun 1990, AutoDock telah terbukti sebagai aplikasi penambatan molekuler yang efektif yang secara cepat dan akurat dapat memprediksi konformasi dan energi dari suatu ikatan antara ligan dan target makromolekul. AutoDock mengkombinasikan *force field* energi bebas empiris dengan *Lamarckian genetic algorithm* sehingga menghasilkan prediksi cepat dari konformasi ikatan dengan asosiasi prediksi energi bebas. Untuk memungkinkan pencarian konformasi, AutoDock membutuhkan ruang pencarian dalam sistem koordinat di mana posisi ligan dianggap akan terikat.

Metode utama AutoDock 4 dalam pencarian konformasi adalah *Lamarckian genetic algorithm* di mana terbentuk populasi dari beberapa konformasi untuk kemudian terdapat generasi-generasi yang sukses bermutasi, mengubah parameter-parameter konformasi, dan berkompetisi dalam sifat yang hampir sama kemudian berevolusi secara biologis dengan tujuan akhir mencari konformasi dengan energi pengikatan paling rendah. Sedangkan untuk *force field* pada AutoDock4 didasarkan atas model termodinamika umum yang memungkinkan penggabungan energi intramolekul ke dalam prediksi energi bebas dari pengikatan. Dasar ini dijalankan dengan mengevaluasi energi ligan baik dalam bentuk terikat maupun tidak. Dalam batas penggunaan ligan, AutoDock 4 memperlihatkan hasil yang maksimal dalam penambatan ligan dengan torsi yang berjumlah 10 atau kurang.

Untuk menyederhanakan persiapan penambatan, pengguna dapat memvisualisasikan sisi aktif dan volume ruang pencarian melalui aplikasi AutoDock Tools. AutoDock Tools juga menyediakan beberapa metode baru dalam menampilkan kluster, bentuk, serta analisis hasil penambatan.

AutoDock 4 dan AutoDock Tools dapat diperoleh secara mudah dan bebas biaya di bawah lisensi dari GPL. Berkas yang dapat diunduh terdiri dari satu paket MGLTools (Morris, *et al.*, 2009).

2.12.2 AutoDock Vina

AutoDock Vina adalah perangkat lunak terbaru untuk penemuan obat, penambatan molekuler, dan skrining virtual. AutoDock Vina didisain dan

diimplementasikan oleh Dr. Oleg Trott dari Molecular Graphics Lab di The Scripps Research Institute. AutoDock Vina merupakan versi terbaru dari perangkat lunak AutoDock yang menggunakan *interface* yang sama seperti AutoDock Tools. Perangkat lunak ini menawarkan kapabilitas dan kinerja tinggi, akurasi yang lebih tinggi, serta kemudahan dalam penggunaannya.

Dalam Vina, optimisasi algoritma ditingkatkan dengan pengkombinasian optimisasi stokastik global termasuk *genetic algorithm*, *particle swarm*, *simulated annealing*, dll, yang kemudian dikombinasikan dengan beberapa prosedur optimisasi lokal dan "trik" spesial untuk mempercepat optimisasi. Dalam perangkat lunak ini pengguna lebih dimudahkan dalam pengaturan parameter. Pengguna hanya tinggal memasukan parameter penting yang telah dilihat pengaturannya pada *interface* AutoDock Tools, dalam satu berkas kode. Perangkat lunak ini juga dapat mendeteksi jumlah prosesor sekaligus sehingga waktu penambatan lebih cepat dari AutoDock 4 (Trott & Olson, 2009).

2.12.3 GOLD

GOLD (*Genetic Optimization for Ligand Docking*) adalah perangkat lunak untuk menghitung model penambatan dari molekul-molekul kecil pada sisi pengikatan aktif. GOLD menggunakan metode pencarian GA (*genetic algorithm*). Algoritma genetika ini telah dioptimasi untuk aplikasi *virtual screening*. GOLD tersedia dalam GOLD *suite*, sebuah paket perangkat lunak untuk visualisasi dan manipulasi struktur untuk menambatkan ligan-protein, untuk proses sesudahnya, serta visualisasi hasil penambatan (GOLD-Protein Ligand Docking, 2010).

GOLD menawarkan beberapa pilihan dalam penilaiannya yakni GoldScore, ChemScore, dan penilaian kombinasi pemilihan pengguna. GoldScore dan ChemScore keduanya sama-sama dapat dipercaya, namun dapat memberikan hasil yang berbeda tergantung dari penggunaannya. GoldScore adalah fungsi penilaian original yang ditawarkan oleh GOLD yang telah dioptimasi untuk memprediksi posisi ligan. Sedangkan ChemScore adalah fungsi penilaian lain yang tersedia dari GOLD. ChemScore mempunyai kekurangan yakni kurang akurat dalam memprediksi afinitas ikatan (GOLD Support-Scientific FAQs, 2010).

Produk ini adalah hasil kolaborasi dari University of Sheffield, GlaxoSmithKline plc., dan CCDC (*Cambridge Crystallographic Data Centre*). GOLD sangat dianjurkan oleh komunitas *molecular modeling* karena keakuratan dan kepercayaan hasilnya (GOLD-Protein Ligand Docking, 2010).

2.12.4 Kriteria dan Parameter Penambatan

Hasil yang ditunjukkan oleh AutoDock 4 berupa energi afinitas ikatan (ΔG) serta konstanta inhibisi (K_i). Energi afinitas ikatan (kkal/mol) menunjukkan seberapa kuat ikatan yang terjadi antara makromolekul dengan ligan. Sedangkan konstanta inhibisi (Molar) menunjukkan konsentrasi yang diperlukan ligan dalam menghambat makromolekul (enzim). Afinitas ikatan yang baik berupa nilai ΔG yang makin kecil (makin negatif). Sedangkan konstanta inhibisi yang baik juga berupa nilai K_i yang makin kecil. Hasil ini disusun atas peringkat energi afinitas ikatan serta kluster pada masing-masing tingkatan energi. Peringkat pertama disebut sebagai *best energy* sedangkan kluster terbanyak disebut sebagai *best cluster*. Konformasi yang dinilai paling sesuai berada dalam energi dengan kluster terbanyak. Hasil penambatan yang baik ditunjukkan melalui terjadinya kondisi konvergen dengan adanya *best energy* dalam *best cluster*. Sedangkan kondisi dimana *best energy* tidak berada dalam *best cluster* disebut dengan kondisi divergen.

Hasil yang ditunjukkan oleh AutoDock Vina berupa ΔG dan hanya tersusun berdasarkan peringkat energi afinitas ikatan dari ligan. Energi afinitas ikatan (kkal/mol) yang baik berupa energi yang makin kecil (makin negatif). Konformasi yang terbaik berada dalam peringkat energi afinitas pertama.

Hasil yang ditunjukkan oleh GOLD berupa GoldScore yang tersusun dari nilai tertinggi hingga terendah. GoldScore lebih menunjukkan konformasi ligan terbaik dibanding afinitas ikatan. GoldScore berbanding terbalik dengan energi afinitas yang berarti makin negatif ΔG , makin tinggi nilai GoldScore. Konformasi terbaik ditunjukkan dengan nilai GoldScore yang paling tinggi (Huey & Morris, 2007; Trott, 2009; Nervall, *et al.*, 2007).

2.13 Bank Data Protein (*Protein Data Bank*)

Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB) menawarkan data struktur makromolekul biologis, yang sekarang berjumlah lebih dari 32.500. Terdapat tiga komponen dalam situs ini: *Structural Genomics Initiatives* yang berisi informasi serta penghubung pada masing-masing situs struktur genom, termasuk laporan proses, daftar target, status target, target-target dalam PDB, serta redundansi sekuens; *Targets* menyediakan informasi kombinasi target, protokol dan data lain yang menyangkut determinasi struktur protein; dan *Structures* yang menyediakan penilaian proses struktur genom berdasarkan cakupan fungsi genom manusia oleh struktur-struktur dalam PDB, target struktur genom, dan model homologi. RCSB PDB dioperasikan oleh Rutgers, The State University of New Jersey, dan San Diego Supercomputer Center di University of California (Kouranov, *et al.*, 2006).

2.14 PyMOL

PyMOL merupakan salah satu perangkat lunak visualisasi yang digunakan untuk memahami suatu struktur dan dapat menghasilkan gambar tiga dimensi yang berkualitas dari suatu molekul kecil maupun makromolekul seperti protein. Visualisasi sangatlah penting untuk lebih memahami dan mendalami struktur suatu molekul dan PyMOL merupakan salah satu perangkat lunak visualisasi yang mampu menyajikan tampilan struktur dalam beberapa warna.

Beberapa tahun terakhir ini, sistem grafik molekuler PyMOL telah berkembang menjadi penampil molekuler yang kuat dengan adanya kekurangan dari tampilan 3D sehingga dapat digunakan untuk beberapa perangkat lunak dan aplikasi. Melalui pengaturan tampilan yang bermacam-macam serta penggunaan bahasa *Python* dalam level yang kuat untuk objek, menjadikan perangkat lunak ini menjadi mudah untuk dipergunakan secara luas tanpa mengubah kode-kode utama. Perangkat lunak ini dikomersilkan oleh DeLano Scientific LLC (Delano, 2004).

2.15 UCSF Chimera (*University of California at San Francisco Chimera*)

UCSF (*University of California at San Francisco*) Chimera adalah suatu perangkat lunak yang dikembangkan secara luas untuk visualisasi interaktif dan analisis struktur molekuler dan data terkait, termasuk pemetaan densitas, pengaturan supramolekuler, penataan sekuens, trajektori, dan penggabungan konformasi. Gambar dan animasi dengan kualitas tinggi dapat dihasilkan oleh perangkat lunak ini.

Chimera termasuk dokumentasi yang lengkap dan beberapa tutorial, dapat diunduh bebas biaya untuk kepentingan akademis, pemerintahan, nirlaba, ataupun penggunaan pribadi. Chimera dikembangkan oleh *Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics* (Pettersen, *et al.*, 2004).

2.16 Vega ZZ

Vega ZZ adalah suatu proyek kimia komputasi yang dikembangkan untuk menciptakan suatu software untuk *molecular modeling* dengan antarmuka grafik 3 dimensi. Vega ZZ pertama kali digunakan untuk menghubungkan perangkat lunak sejenis dan mempermudah proses pembelajaran dari penambatan molekuler (Pedretti, Mazzolari, & Vistoli, 2004).

Vega ZZ dilengkapi dengan fitur-fitur seperti tampilan grafis untuk pengguna, perangkat lunak untuk mengedit, dan perangkat lunak untuk melakukan kalkulasi terhadap molekul. Saat ini, Vega ZZ dapat digunakan untuk menyelesaikan permasalahan kimia komputasi baik untuk desain obat, optimasi ligan, *homology modelling* dari suatu protein, serta kalkulasi penggambaran QSAR (*Quantitative Structural Analysis Relationship*) molekuler.

2.17 Cygwin

Cygwin adalah perangkat lunak yang menyediakan lingkungan pemrograman seperti Linux untuk Windows. Cygwin mencakup DLL (*Data Link Layer*) yang bertindak seperti lapisan pengemulasi sebagai POSIX (*Portable Operating System Interface*), fungsi pemanggilan sistem dan peralatan seperti pada Linux.

Cygwin dapat bekerja dengan semua versi Windows, mulai dari Windows 95. Perbedaan antara Cygwin dengan Linux adalah penggunaan *newlib* bukan *glibc* serta *defaultnya*. Pada Cygwin digunakan *ash* sedangkan pada kebanyakan Linux menggunakan default *bash* (Cygwin User's Guide, 1998).

2.18 CCP4 (*The Collaborative Computational Project Number 4*)

CCP4 atau *The Collaborative Computational Project Number 4* adalah suatu kumpulan perangkat lunak khusus yang mencakup sistem komputasi yang dibutuhkan pada kristalografi makromolekuler. Perangkat lunak ini dikembangkan oleh *Biotechnology and Biological Sciences Research Council* (BBSRC). CCP4 mempunyai perangkat lunak-perangkat lunak terpisah namun dioperasikan menggunakan berkas-berkas standar yang sama. CCP4 mempunyai fitur-fitur bagi analisis molekuler seperti penyejajaran sekuens dan plot Ramachandran (Colaborative Computational Project, 1994).

2.19 MOE (*Molecular Operating Environment*)

MOE (*Molecular Operating Environment*) adalah suatu perangkat lunak penambatan molekuler yang secara spesifik didesain untuk menangani molekul-molekul biologis besar. MOE dapat digunakan untuk memvisualisasikan ikatan-ikatan yang terjadi dari hasil penambatan. MOE didesain oleh *Chemical Computing Group* untuk mendukung kimia informatika, *molecular modeling*, bioinformatika, skrining virtual, desain berdasarkan struktur dan dapat digunakan untuk membuat aplikasi baru berdasarkan SVL (*Scientific Vector Language*) (Review: MOE (*Molecular Operating Environment*), 2006).



BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Komputer Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia selama bulan Februari hingga Mei 2010.

3.2 Alat

3.2.1 Perangkat Keras

Perangkat keras berupa komputer dengan spesifikasi RAM (*Random Access Memory*) minimal satu *gigabyte*, *Quad Core processor* (Intel® Core™, Amerika), *Graphic Card* NVIDIA Ge Force GTS 250 (Amerika), dan sistem operasi Microsoft Windows XP2 (Microsoft, Amerika). Kelengkapan komputer yakni monitor (AOC, China), CPU (*Central Processing Unit*) Asus (Amerika), *mouse* (Simbadda, Indonesia; Logitech, China) dan *keyboard* (Simbadda, Indonesia; Microsoft, Amerika). Komputer terhubung dengan koneksi internet dan UPS (*Uninterrupted Power Supply*).

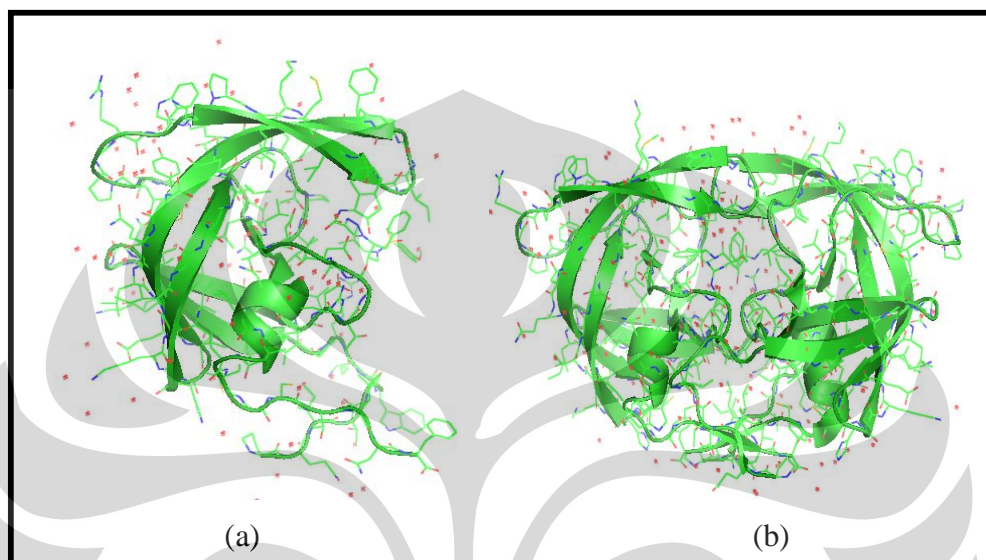
3.2.2 Perangkat Lunak

Perangkat lunak berupa PyMOL (DeLano Scientific LLC, Italia), CCP4 (The Collaborative Computing Project Number 4, Inggris), UCSF Chimera (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatic, University of California San Fransisco, Amerika), AutoDock Tools (The Scripps Research Institute, Amerika), AutoDock 4 (The Scripps Research Institute, Amerika), AutoDock Vina (The Scripps Research Institute, Amerika), GOLD (The Cambridge Crystallographic Data Centre, Inggris), Vega ZZ (The Drug Design Laboratory, University of Milan, Italia), MOE (Chemical Computing Group, Kanada), dan Cygwin (Red Hat Inc., Amerika).

3.3 Bahan

3.3.1 Struktur Tiga Dimensi Protease HIV-1 (Makromolekul)

Struktur tiga dimensi protease HIV-1 yang diunduh dari Bank Data Protein (Berman, et al., 2000) dengan identitas 1ZP8 yang berupa monomer protease HIV-1 dan 1D4H yang berupa homodimer protease HIV-1.

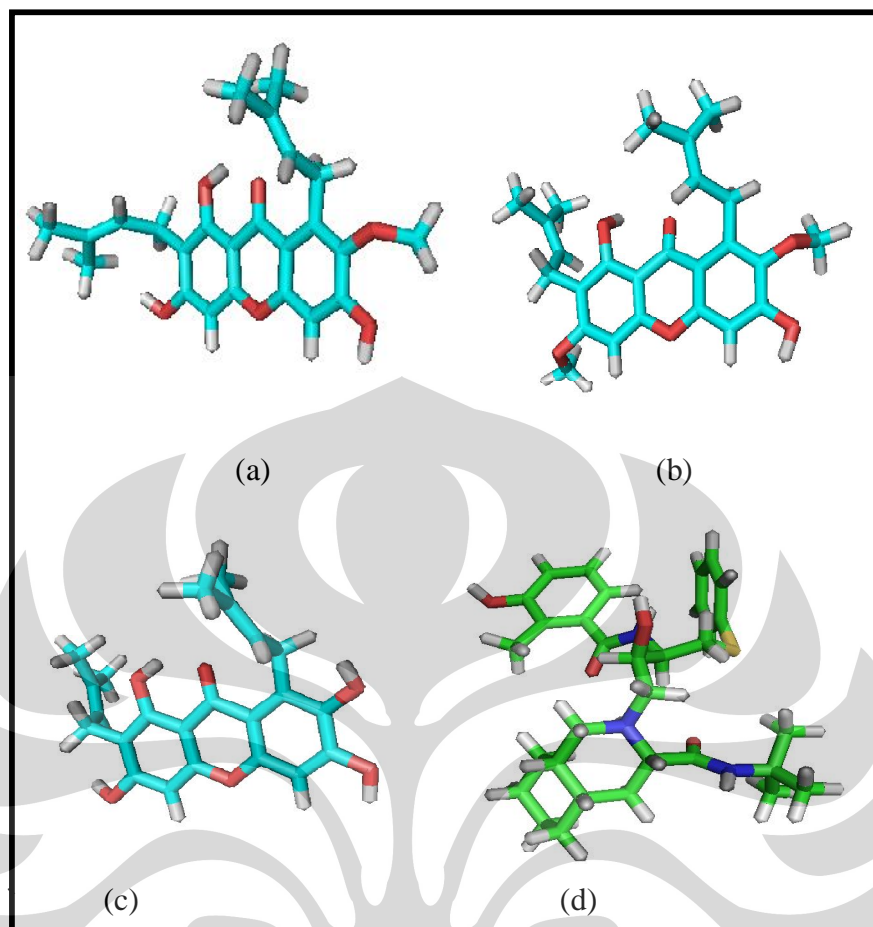


[Sumber: Berman, *et al.*, 2000 (PDB ID: 1ZP8, 1D4H)]

Gambar 3.1 Struktur tiga dimensi makromolekul protease HIV-1 (a) 1ZP8 (b) 1D4H

3.3.2 Struktur Tiga Dimensi Ligan

Struktur tiga dimensi ligan dari analog mangostin yang diunduh dari *PubChem Compound* (PubChem Compound), yaitu: α -mangostin, β -mangostin, dan γ -mangostin. Selanjutnya adalah struktur nelfinavir (kontrol positif) yang diunduh dari PDB dan kemudian dipisahkan dari makromolekulnya.



[Sumber: PubChem Compound (PCC ID: CID5281650, CID5464078); Berman, *et al.*, 2000 (PDB ID: 10HR; olahan penulis dengan Vega ZZ)]

Gambar 3.2 Struktur tiga dimensi ligan (a) α -mangostin, (b) β -mangostin, (c) γ -mangostin, dan (d) nelfinavir

3.4 Cara Kerja (Lampiran 1)

3.4.1 Pengunduhan Makromolekul Protease HIV-1

Makromolekul diunduh dari Bank Data Protein (Berman, *et al.*, 2000). Identitas makromolekul yang diinginkan yakni 1ZP8 yang terikat dengan inhibitor AB-2 dan 1D4H yang terikat dengan inhibitor BEH dimasukkan untuk diunduh. Data makromolekul disimpan sebagai bentuk .pdb.

3.4.2 Pengunduhan dan Pembuatan Struktur Tiga Dimensi Ligan Analog Mangostin serta Kontrol Positif

Struktur ligan analog mangostin untuk penambatan merupakan bentuk struktur tiga dimensinya yang dapat diunduh dari *PubChem Compound* (PubChem Compound). Bagi struktur tiga dimensi yang tidak terdapat dalam situs tersebut, dapat dibuat menggunakan perangkat lunak Vega ZZ (Lampiran 3). Cetakan ini berdasarkan data dua dimensi dari sumber lain. Setelah diunduh atau dibuat, struktur tersebut diubah atau disimpan kembali dalam format .pdb.

Struktur tiga dimensi kontrol positif diunduh dari struktur kristal yang masih terikat dengan makromolekul protease HIV-1. Struktur tersebut diunduh dari Bank Data Protein. Nelfinavir diunduh dari struktur dengan identitas 1OHR. Setelah diunduh dalam bentuk .pdb, masing-masing kontrol positif dipisahkan dengan perangkat lunak UCSF Chimera. Berkas disimpan dalam bentuk .pdb.

3.4.3 Pemisahan Rantai Makromolekul Protease HIV-1 untuk Target Penambatan

Makromolekul dipisahkan dari pelarut dan ligan atau residu non-standar. Pemisahan makromolekul dari molekul yang tidak diperlukan, dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak UCSF Chimera (Lampiran 15). Hasil pemisahan tersebut akan digunakan dalam pengujian superposisi dan penambatan. Hasil pemisahan disimpan dalam bentuk .pdb.

3.4.4 Superposisi Rantai Protease HIV-1 Monomer dan Homodimer

Superposisi (penyejajaran) rantai dilakukan menggunakan *software* CCP4 (Lampiran 4) (Overview and Manual, 2002). Rantai monomer protease HIV-1 (1ZP8) disejajarkan dengan homodimer protease HIV-1 (1D4H). Rantai-rantai tersebut dibandingkan kemiripan strukturnya. Hasil superposisi disimpan dalam bentuk .pdb.

3.4.5 Optimasi Makromolekul Protease HIV-1

Setelah dilakukan superposisi, makromolekul kemudian dioptimasi untuk selanjutnya dilakukan penambatan. Optimasi struktur tiga dimensi makromolekul

dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak Vega ZZ. Optimasi tersebut meliputi: penghapusan molekul air, penambahan atom hidrogen, perbaikan muatan dengan menambahkan muatan parsial *Gasteiger charge*, pemberian *force field* AutoDock, dan penerapan minimisasi. Minimisasi makromolekul dilakukan dengan dua cara, yaitu dengan metode *steepest descent* sebanyak 100 kali dan dengan metode *conjugate gradients* sebanyak 1000 kali (Setiawan, 2009). Hasil optimasi ini kemudian diperiksa dengan perangkat lunak Ramachandran (Lampiran 5, Lampiran 6, dan Lampiran 7) (Overview and Manual, 2002). Untuk perangkat lunak AutoDock 4 dan AutoDock vina, hasil optimasi disimpan dalam bentuk *.pdb* yang kemudian diubah menjadi *.pdbqt* sedangkan untuk perangkat lunak GOLD cukup dibutuhkan berkas dalam format *.pdb*.

3.4.6 Optimasi Struktur Tiga Dimensi Ligan

Setelah pengunduhan dan pembuatan, ligan kemudian dioptimasi untuk persiapan penambatan. Optimasi struktur tiga dimensi ligan dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak Vega ZZ. Optimasi tersebut meliputi: penambahan atom hidrogen, penghapusan molekul air, perbaikan muatan dengan menambahkan muatan parsial *Gasteiger charge*, pemberian *force field SP4* untuk ligan, dan penerapan minimisasi serta pencarian konformasi. Minimisasi dilakukan dengan metode *trust* sebanyak 1000 kali. Selanjutnya dilakukan pencarian konformasi terbaik untuk ligan yang dijalankan berdasarkan torsi fleksibelnya (Setiawan, 2009).

3.4.7 Penambatan Molekuler Protease HIV-1 dengan Ligan-Ligan

Penambatan molekul dilakukan menggunakan perangkat lunak AutoDock 4 (AD 4), AutoDock Vina (Vina), dan GOLD (Huey & Morris, 2007; Trott, 2009; Marcou & Kellenberger, 2009). Struktur makromolekul dan ligan yang akan ditambatkan dan telah dioptimasi secara terpisah disimpan dalam satu folder yang sama. Penambatan molekul dilakukan sebanyak tiga tahap yakni pemilihan sisi penambatan antara sisi hidrofobik (sisi aktif protease HIV-1) sisi pertemuan dimer, dan permukaan dengan salah satu analog (α -mangostin), penambatan pada sisi aktif, serta penambatan pada permukaan.

Untuk penambatan molekuler dengan perangkat lunak AutoDock 4 dilakukan melalui *interface* pada AutoDock Tools (ADT) dengan tahapan sebagai berikut (Lampiran 8):

- a. Berkas *.pdbqt* makromolekul dibuat dari berkas *.pdb* melalui ADT.
- b. Berkas *.pdbqt* ligan dibuat dari berkas *.pdb* melalui ADT.
- c. Berkas *.pdbqt* dari makromolekul dan ligan ditampilkan ke dalam *interface* ADT.
- d. *Grid Parameter File* dipersiapkan yakni meliputi tahap penentuan *map type* dengan memilih ligan dan penentuan *grid box* yakni batasan ruang penambatan pada makromolekul. Pada pemilihan sisi penambatan antara kantung hidrofobik, pertemuan dimer, dan permukaan digunakan kotak batas dengan koordinat (X,Y,Z) -6,103; 23,62; 36,227 dengan volume kotak 114 x 100 x 106 Å dengan makromolekul monomer (1ZP8). Pada sisi penambatan kantung hidrofobik untuk makromolekul monomer (1ZP8) pengaturan *grid box*nya adalah koordinat (X,Y,Z) -8,705; 14,18; 30,509 dengan volume kotak 60 x 60 x 60 Å dengan tiap irisan 0,375 Å. Untuk makromolekul homodimer (1D4H) pengaturan *grid box*nya adalah koordinat (X,Y,Z) 8,77; 25,56; 6,018 dengan volume kotak 50 x 50 x 50 Å dengan tiap irisan 0,375 Å. Sedangkan untuk target penambatan dengan permukaan, pengaturannya yakni dengan koordinat (X,Y,Z) 3,876; 31,167; 18,822 dengan volume kotak 60 x 44 x 52 Å dengan tiap irisan 0,375 Å untuk target penambatan 1D4H. Tahap ini kemudian disimpan dalam bentuk berkas *.gpf* (*grid parameter file*).
- e. Proses kalkulasi *autogrid* dijalankan menggunakan perangkat lunak Cygwin dengan perintah: `autogrid4 -p .gpf -l .glg &`. Hasil kalkulasi ini akan disimpan dalam berkas *.glg*.
- f. *Dock Parameter File* dipersiapkan yakni meliputi tahap penentuan molekul rigid (makromolekul), pemilihan ligan, penentuan parameter pencarian, dan parameter penambatan. Hasilnya disimpan dalam bentuk Lamarckian GA (*Genetic Algorithm*) dengan berkas *.dpf*.

- g. Proses kalkulasi *autodock* atau penambatan dilakukan kembali menggunakan Cygwin dengan perintah: `AutoDock 4 -p .dpf -l .dlg &`. Hasil penambatan ini akan disimpan dalam berkas `.dlg`.

Untuk penambatan molekuler dengan perangkat lunak Autodock Vina dilakukan dengan tahapan sebagai berikut (Lampiran 9):

- a. Pembuatan *folder* berisi berkas yang diperlukan bagi perangkat lunak Vina yaitu: berkas `.pdbqt` dari makromolekul, berkas `.pdbqt` dari ligan, berkas `.exe` aplikasi perangkat lunak vina, dan berkas `.txt` berisi *input* parameter-parameter penambatan. Parameter-parameter tersebut terdiri dari: nama berkas ligan dan makromolekul, koordinat ruang penambatan dan ukurannya, serta jumlah GA (*genetic algorithm*). Untuk penambatan kantung hidrofobik makromolekul monomer (1ZP8) pengaturan *grid box*nya adalah koordinat (X,Y,Z) -8,705; 14,18; 30,509 dengan volume kotak 22,5 x 22,5 x 22,5 Å dengan tiap irisan 1 Å. Untuk makromolekul homodimer (1D4H) pengaturan *grid box*nya adalah koordinat (X,Y,Z) 8,77; 25,56; 6,018 dengan volume kotak 18,75 x 18,75 x 18,75 Å dengan tiap irisan 1 Å. Kemudian untuk sisi penambatan permukaan pada 1D4H adalah 22,5 x 16,5 x 19,5 Å dengan tiap irisan 1 Å.
- b. Proses kalkulasi vina atau penambatan dilakukan dengan menjalankan perintah melalui *command prompt*. Hasil penambatan dengan perangkat lunak ini akan disimpan dalam berkas `.txt` untuk peringkat energinya serta `.pdbqt` untuk bentuk konformasi.

Untuk penambatan molekuler dengan perangkat lunak GOLD dilakukan dengan tahapan sebagai berikut (Lampiran 10):

- a. Berkas `.pdb` dari makromolekul dibuat dari berkas `.pdbqt` melalui Vega ZZ
- b. Berkas `.mol` dari ligan dibuat dari berkas `.pdb` melalui PyMOL
- c. Penjalanan perangkat lunak GOLD dengan model *wizard*. Dalam model tersebut secara berurut akan dilakukan penambahan hidrogen kembali dari makromolekul, penentuan *template* yakni GoldScore, penentuan koordinat ruang penambatan, pemilihan ligan, penentuan GA (*genetic algorithm*), serta penentuan model penambatan. Ruang penambatan yang digunakan

memakai koordinat yang sama seperti pada AD 4 dan Vina. Yang berbeda adalah radius sisi penambatan yakni 15 Å untuk sisi penambatan kantung hidrofobik dan 10 Å untuk sisi penambatan permukaan.

- d. Pilihan penyimpanan hasil penambatan akan muncul saat tampilan akhir *wizard* yang akan dibuat dalam satu *folder*. Hasil penambatan berupa berkas *.conf* atau *configuration gold file* dan bentuk konformasi pengikatan ligan berupa *.mol*.

3.4.8 Analisis Hasil Penambatan Molekuler Protease HIV-1 dengan Ligan-Ligan

Hasil penambatan divisualisasi menggunakan *software* PyMOL, AutoDock Tools (ADT), *Molecular Operating Environment* (MOE), dan GOLD (Huey & Morris, 2007; Trott, 2009; Marcou & Kellenberger, 2009). Hasil penambatan AutoDock disimpan dalam bentuk *.dlg* yang dapat dibuka menggunakan Wordpad dan ADT (Lampiran 13). Dalam Wordpad, dilihat adanya kluster-kluster serta nilai energi afinitas ikatan (ΔG) dan konstanta inhibisi (K_i) untuk selanjutnya ditentukan kluster dan penambatan yang terbaik. Sedangkan dalam ADT dilihat bentuk konformasi-konformasi ligan. Hasil penambatan Vina disimpan dalam bentuk *.txt* dan *.pdbqt*, dalam yang masing-masing dapat dilihat dengan Notepad dan PyMOL (Lampiran 12). Dalam Notepad, dilihat urutan nilai ΔG terbaik sedangkan dalam PyMOL dilihat bentuk konformasi ligan. Untuk interaksi dapat divisualisasi dengan perangkat lunak MOE (Lampiran 11). Hasil penambatan GOLD disimpan dalam bentuk *.conf* dan *.mol* yang dapat dibuka menggunakan GOLD dan PyMOL. Dalam GOLD dilihat nilai GoldScore (menggambarkan konformasi terbaik) (Lampiran 13) sedangkan dalam PyMOL diolah untuk divisualisasi.



BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengunduhan Makromolekul Protease HIV-1

Tahap awal dalam penelitian ini adalah pengunduhan makromolekul protease HIV-1 sebagai target penambatan. Dari pencarian melalui Bank Data Protein dihasilkan dua makromolekul protease HIV-1 yang diunduh strukturnya dengan format .pdb. Struktur pertama adalah struktur dengan identitas 1ZP8 yang memiliki satu subunit protease HIV-1 (monomer) dengan ligan bernama AB-2. Kedua adalah struktur dengan identitas 1D4H yang memiliki dua subunit protease HIV-1 (homodimer) dengan ligan bernama BEH. Kondisi dan kualitas dari struktur protease HIV-1 yang diunduh tercantum pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Struktur protease HIV-1 yang diunduh dari *Protein Data Bank*

No	Identitas	Jumlah Subunit	Ligan yang Terikat	Jenis Enzim	Resolusi (Å)
1	1ZP8	1	Inhibitor AB-2	Hidrolase	2,02
2	1D4H	2	Inhibitor BEA435	Hidrolase	1,81

Struktur protease HIV-1 yang tersedia dalam Bank Data Protein berupa struktur makromolekul yang terikat dengan ligan. Struktur-struktur tersebut terdiri dari berbagai kondisi berupa struktur asli, hasil mutasi maupun modifikasi. Dalam penelitian ini, struktur protease HIV-1 yang digunakan adalah struktur monomer dan homodimer asli. Hal ini untuk melihat variasi pengikatan serta prediksi mekanisme dari penambatan ligan. Pemilihan struktur dengan identitas 1ZP8 dan 1D4H didasarkan atas strukturnya yang utuh belum mengalami mutasi dan modifikasi.

4.2 Pengunduhan dan Pembuatan Struktur Tiga Dimensi Ligan Analog Mangostin serta Kontrol Positif

Dari pencarian melalui *PubChem Compound* diperoleh dua struktur tiga dimensi analog mangostin yang tersedia yakni α -mangostin dan γ -mangostin. Masing-masing identitas dari kedua struktur ini adalah CID5281650 dan CID5464078. Struktur yang diunduh berupa struktur dengan format *.sdf*. Untuk β -mangostin yang struktur tiga dimensinya tidak tersedia dalam situs tersebut, dibuat melalui perangkat lunak Vega ZZ. Dari pembuatan struktur ini dihasilkan struktur dengan format *.mol*.

PubChem merupakan situs yang berisi database mengenai senyawa-senyawa aktif termasuk senyawa dari tanaman yang telah diisolasi. Pada pencarian dengan kata kunci mangostin, hasil yang ada hanya struktur α -mangostin dan γ -mangostin. Struktur yang didapat berupa berkas dengan format *.sdf* atau *Structure Data File*. Sedangkan β -mangostin dibuat dari cetakan dua dimensinya ke tiga dimensi melalui perangkat lunak Vega ZZ yang menyimpan bentuk struktur dalam format *.mol*. Pada format ini disimpan informasi mengenai atom-atom, ikatan, serta koordinat dari struktur.

Dari pencarian melalui *Protein Data Bank* dihasilkan satu kontrol positif inhibitor non-peptida yakni nelfinavir dengan identitas 1OHR. Pengunduhan ini menghasilkan struktur dengan format *.pdb* dengan struktur nelfinavir yang terikat dengan protease HIV-1. Kemudian pada pemotongan dengan perangkat lunak UCSF Chimera dihasilkan ligan atau struktur kontrol positif yang terpisah dari protease HIV-1 yang disimpan dalam format *.pdb*.

Pada penentuan kontrol positif, pemilihan nelfinavir didasarkan atas fungsinya sebagai obat anti-HIV berdasarkan struktur non-peptida yang berikatan di sisi kompetitif. Sedangkan untuk kontrol positif senyawa yang dapat berikatan dengan sisi nonkompetitif yakni darunavir tidak digunakan karena mempunyai torsi lebih dari sepuluh. Penambatan molekul dengan torsi lebih dari sepuluh akan memberikan hasil penambatan yang kurang akurat.

4.3 Pemisahan Rantai Makromolekul Protease HIV-1 untuk Target Penambatan

Dari pengunduhan makromolekul protease HIV-1 dari Bank Data Protein didapatkan struktur makromolekul yang terikat dengan ligan, pelarut, serta residu non-standar lain. Struktur ini kemudian dipisahkan dari residu-residu non-standar tersebut. Pemisahan makromolekul dengan perangkat lunak UCSF Chimera menghasilkan struktur protease HIV-1 yang utuh dan siap melalui tahap selanjutnya. Struktur ini disimpan dalam bentuk .pdb.

Pada pengunduhan melalui situs Bank Data Protein, makromolekul berada dalam bentuk terikat dengan ligan dan banyak terdapat molekul pelarut air atau residu non-standard lain. Bentuk ini merupakan sisa hasil pengkristalan sebelumnya. Residu-residu non-standard ini harus dihilangkan agar tidak mengganggu proses penambatan. Ligan yang terikat pada sisi aktif dapat menghalangi ligan lain untuk berikatan. Sedangkan adanya molekul H₂O yang tersebar pada sekeliling makromolekul dapat mengganggu ikatan proses penambatan berupa kemungkinan terikatnya ligan dengan molekul air melalui ikatan hidrogen.

Perangkat lunak UCSF Chimera berfungsi memotong residu non-standard dengan tidak mengubah susunan atom-atom lain. Pada kedua makromolekul yang diunduh, hanya terdapat residu non-standard berupa ligan dan molekul air. Makromolekul yang mengalami pemotongan adalah 1ZP8 dengan hasil murni subunit A, 1D4H dengan hasil murni subunit A dan B. 1D4H juga dipisahkan untuk diambil subunit A saja agar dapat dilakukan perbandingan dengan 1ZP8.

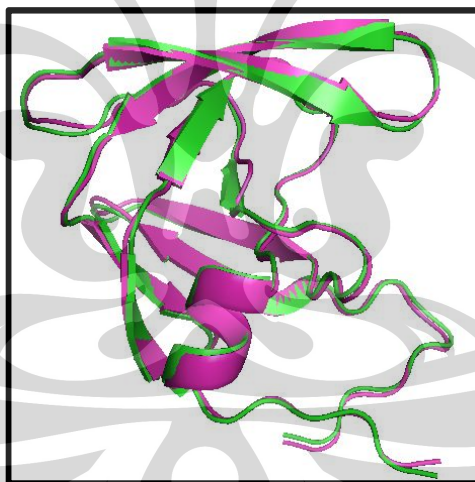
4.4 Superposisi Rantai Protease HIV-1 Monomer dan Homodimer

Setelah dalam bentuk terpisahnya, makromolekul dapat digunakan untuk proses selanjutnya yakni superposisi atau penyejajaran. Superposisi makromolekul dilakukan menggunakan perangkat lunak CCP4 (*The Collaborative Computational Project Number 4*). Makromolekul yang disejajarkan adalah 1ZP8 dengan subunit A serta subunit A 1D4H yang telah dipisahkan. Hasil superposisi sekuens-sekuens diperoleh *match rate* sebesar 100%

dengan RMSD (*Root Mean Square Deviation*) sebesar 0,526 (Lampiran 14 dan Gambar 4.1).

Superposisi adalah penyejajaran sekuens-sekuens dari satu makromolekul dengan makromolekul lain. Dalam penelitian ini digunakan makromolekul dengan satu subunit dan dua subunit. Untuk melihat kesamaan sekuens dari makromolekul tersebut maka dilakukan superposisi. Hasil yang diharapkan adalah sekuens-sekuens yang sama pada kedua makromolekul. Hal ini untuk menjaga agar keadaan target penambatan pada sisi pengikatan serupa.

Dari hasil superposisi didapat tingkat kesamaan (*match rate*) sebesar 100% dan RMSD superposisi yang kurang dari 2. Dari hasil-hasil tersebut disimpulkan bahwa struktur makromolekul 1ZP8 yang terdiri dari satu subunit A dengan subunit A dari 1D4H adalah sama. Atas dasar kesamaan dalam superposisi, maka kedua makromolekul tersebut dapat digunakan dalam penambatan molekuler.



[Sumber: Olahan penulis dengan PyMOL]

Keterangan :

Magenta: Subunit A 1D4H

Hijau : 1ZP8

Gambar 4.1 Hasil superposisi subunit A 1D4H dengan 1ZP8

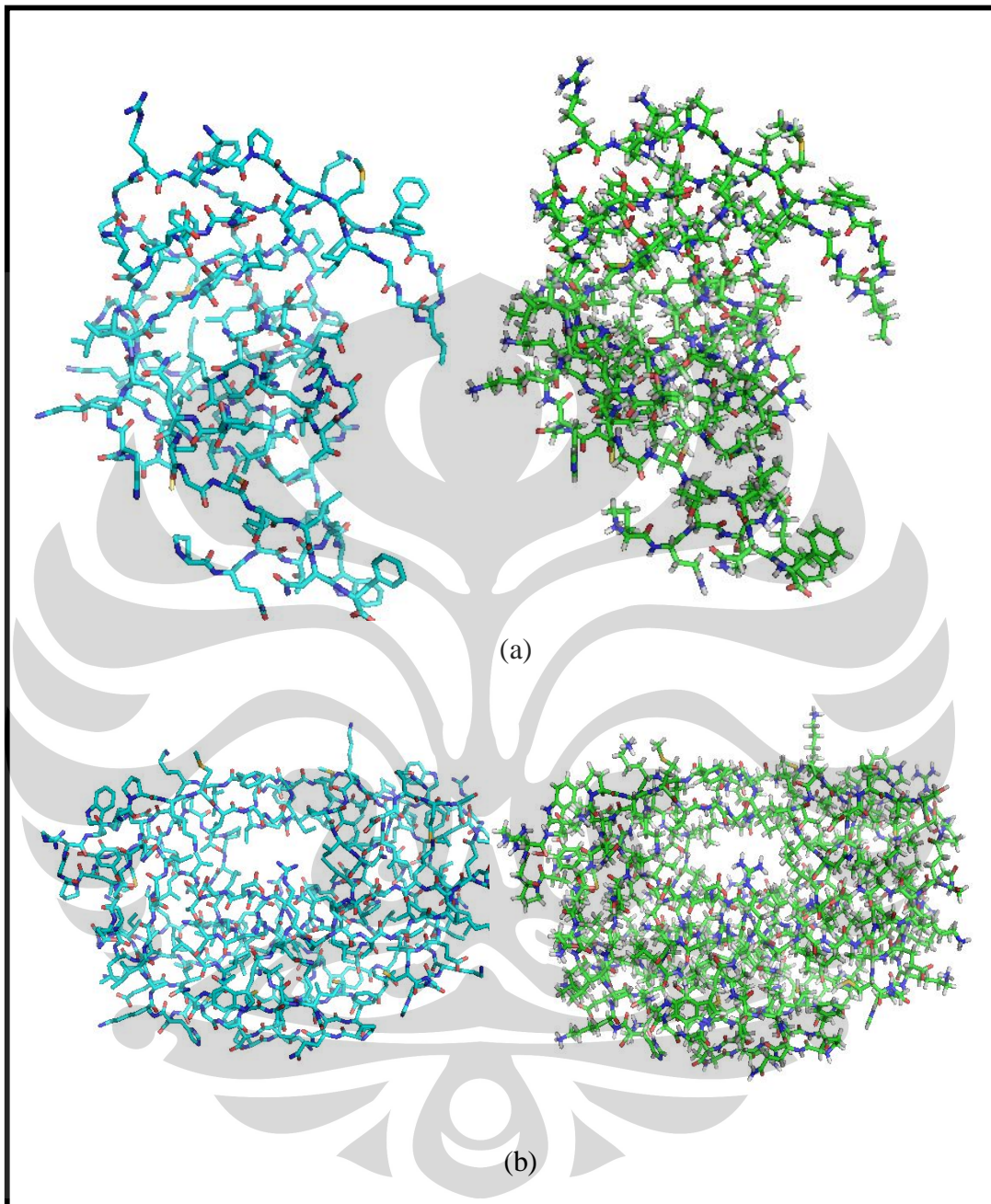
4.5 Optimasi Makromolekul Protease HIV-1

Pada tahap optimasi struktur, dilakukan kembali penghilangan molekul air dan penambahan hidrogen pada masing-masing residu. Struktur dengan hidrogen yang hilang menjadi terikat kembali. Pada tahap perbaikan muatan, ditambahkan

force field AutoDock dan muatan *Gasteiger*. Selanjutnya dilakukan proses optimasi minimisasi. Minimisasi yang dilakukan adalah dengan metode *steepest descent* sebanyak 100 kali dan *conjugate gradients* sebanyak 1000 kali. Dari hasil minimisasi, terlihat adanya pergeseran-pergeseran posisi struktur. Hasil minimisasi oleh Vega ZZ disimpan dalam bentuk *.pdb* sebagai format yang diperlukan oleh AutoDock4 dan AutoDock Vina yang kemudian diubah menjadi *.pdbqt*. sedangkan untuk perangkat lunak GOLD tetap dalam format *.pdb*.

Optimasi makromolekul hasil kristalisasi dari PDB perlu dilakukan untuk persiapan penambatan agar sesuai dengan kondisi yang diperlukan oleh perangkat lunak penambatan. Pada optimasi struktur, penghilangan molekul air yang terdeteksi saat pengkristalan diperlukan agar tidak mempengaruhi interaksi penambatan. Sedangkan penambahan atom hidrogen yang hilang saat kristalisasi perlu dilakukan karena keberadaan atom hidrogen dapat mempengaruhi interaksi penambatan misalnya melalui terbentuknya ikatan hidrogen. Pada optimasi perbaikan muatan, proses yang dilakukan adalah penambahan *force field* AutoDock serta muatan *Gasteiger*. Penambahan *force field* serta muatan perlu dilakukan sebagai kebutuhan perangkat lunak penambatan dalam penilaian hasil akhir. Hal ini didasarkan atas perhitungan skor AutoDock dan GOLD yang berdasarkan *force field*. Sedangkan muatan *Gasteiger* dipilih berdasarkan rekomendasi AutoDock.

Tahap optimasi selanjutnya adalah minimisasi energi yang bertujuan untuk mencari energi optimum terkecil di mana struktur berada dalam konformasi yang paling stabil untuk digunakan dalam penambatan. Minimisasi protein yang sering digunakan adalah dengan metode *steepest descent* dilanjutkan dengan *conjugate gradients*. Optimasi ini dilakukan berdasarkan minimisasi makromolekul pada umumnya (Tiikkainen, 2010). Setelah mengalami minimisasi, struktur makromolekul mengalami pergeseran konformasi dari konformasi sebelumnya (Gambar 4.2).



[Sumber: Olahan penulis dengan Vega ZZ dan PyMOL]

Gambar 4.2 Struktur tiga dimensi makromolekul (a) 1ZP8 dan (b) 1D4H sebelum dioptimasi (biru) dan setelah dioptimasi (hijau).

Setelah melalui proses optimasi, makromolekul diperiksa keteraturan strukturnya melalui sudut-sudut ikatannya. Pemeriksaan ini dilakukan dengan perangkat lunak CCP4 melalui fitur Ramachandran Plot. Hasil yang diperoleh

adalah pada makromolekul 1ZP8 yang telah dioptimasi menghasilkan daerah favorit (*most favoured region*) sebesar 94,9% dan daerah yang tidak diperbolehkan (*dissalowed region*) sebesar 0% (Lampiran 5). Untuk 1D4H yang diminimisasi, hasil pemeriksaannya adalah terdapat daerah favorit sebesar 88,6% dan daerah yang tidak diperbolehkan sebesar 0% (Lampiran 6). Karena hasil belum sesuai ekspektasi, maka makromolekul 1D4H yang belum diminimisasi juga diperiksa. Hasilnya adalah terdapat daerah favorit sebesar 98,7% dan daerah yang tidak diperbolehkan sebesar 0% (Lampiran 7). Hasil ini menunjukkan bahwa 1D4H yang belum mengalami minimisasi memiliki kualitas makromolekul yang lebih baik. Dari hasil-hasil tersebut, dilakukan penambatan dengan membandingkan 1D4H yang belum diminimisasi dan 1D4H yang telah diminimisasi dengan hasil yang ditunjukkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Perbandingan hasil penambatan antara 1DH4 setelah diminimisasi (1D4H) dan sebelum diminimisasi (1D4H')

Perangkat lunak	Analog	1D4H	1D4H'
ΔG AutoDock 4 (Kkal/mol)	α -mangostin	-8,46	-8,77
	β -mangostin	-9,58	-9,41
	γ -mangostin	-9,75	-9,88
ΔG Vina (Kkal/mol)	α -mangostin	-9,2	-9,7
	β -mangostin	-8,7	-8,8
	γ -mangostin	-9,07	-9,3
GoldScore GOLD	α -mangostin	52,7197	51,7839
	β -mangostin	33,4042	35,7106
	γ -mangostin	42,4614	39,155

Pada fitur Ramachandran digunakan plot sudut phi (ϕ) dan psi (Ψ). Kombinasi sudut phi-psi yang menghasilkan rintangan sterik antar atom tidak diperbolehkan (*disallowed*) (Murray, Granner, Mayes, & Rodwell, 2003). Berdasarkan plot phi dan psi tersebut, dinilai seberapa baik kualitas suatu konformasi struktur protein. Struktur protein dengan kualitas baik ditunjukkan

dengan daerah favorit (*most favoured region*) sebesar lebih dari 90 % dan daerah yang tidak diperbolehkan (*disallowed region*) sebesar 0 %.

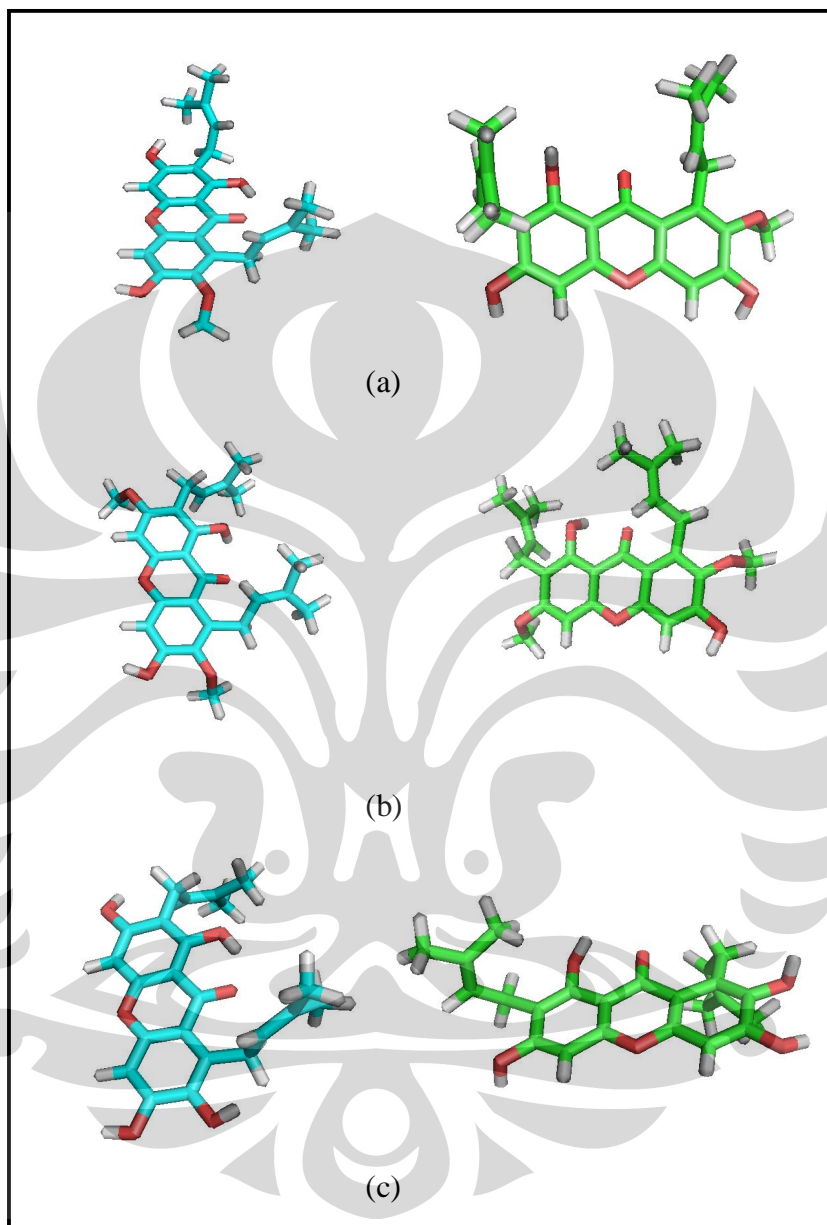
Hasil yang ditunjukkan dari tahap pemeriksaan 1ZP8 memberikan struktur makromolekul hasil optimasi dengan kualitas baik. Sedangkan 1D4H yang mengalami optimasi pada tahap minimisasi kualitasnya belum memenuhi persyaratan. Hasil makromolekul dengan kualitas baik ditunjukkan pada 1D4H yang tidak mengalami optimasi pada minimisasi energi. Setelah dilakukan penambatan pada kedua makromolekul tersebut, hasil yang didapat menunjukkan bahwa 1D4H yang tidak diminimisasi secara keseluruhan hampir semua memberikan nilai yang lebih baik. Nilai tersebut berupa ΔG dari AutoDock 4 dan Vina yang lebih rendah serta skor GOLD yang tinggi. Dari hasil ini, diputuskan bahwa makromolekul dua subunit dari protease HIV-1 yang dijadikan target penambatan adalah 1D4H yang tidak diminimisasi.

4.6 Optimasi Struktur Tiga Dimensi Ligan

Sama seperti optimasi makromolekul, optimasi ligan juga perlu dilakukan untuk mempersiapkan ligan dalam proses penambatan. Optimasi ini juga dilakukan dengan perangkat lunak Vega ZZ oleh fitur-fitur optimasinya. Pada tahap optimasi struktur, dilakukan kembali penghilangan molekul air dan penambahan hidrogen. Pada tahap perbaikan muatan, ditambahkan *force field* SP4 dan muatan *Gasteiger*. Selanjutnya dilakukan proses optimasi minimisasi yang dilakukan adalah dengan metode *trust* sebanyak 1000 kali. Setelah minimisasi, dilanjutkan dengan pencarian konformasi. Hasil optimasi oleh Vega ZZ disimpan dalam bentuk *.pdb* sebagai format yang diperlukan oleh AutoDock4 dan AutoDock Vina yang kemudian diubah menjadi *.pdbqt*. sedangkan untuk perangkat lunak GOLD, disimpan dalam bentuk *.mol*.

Pada optimasi ligan baik analog mangostin serta kontrol positif, perlakuannya hampir sama dengan makromolekul. Pada struktur, dihilangkan molekul air jika terdeteksi seperti pada ligan yang diambil dari ikatannya dengan makromolekul. Kemudian penambahan hidrogen juga dilakukan agar tidak mempengaruhi ikatan yang terjadi. Penambahan *force field* SP4 sesuai dengan rekomendasi Vega ZZ untuk ligan. Sedangkan muatan *Gasteiger* dipilih sesuai

dengan rekomendasi dari AutoDock. Pada tahap minimisasi metode yang digunakan adalah metode *trust* sebanyak 1000 kali. Metode ini dipilih sesuai dengan *default* dari Vega ZZ.



[Sumber: Olahan penulis dengan Vega ZZ dan PyMOL]

Gambar 4.3 Struktur tiga dimensi (a) α -mangostin, (b) β -mangostin, dan (c) γ -mangostin, sebelum (biru) dan sesudah (hijau) dioptimasi.

Untuk mencari struktur yang lebih konvergen, maka perlu dilakukan pencarian konformasi. Pencarian ini berdasarkan jumlah torsi fleksibel yang terdapat dalam ligan. Torsi pada α -mangostin, β -mangostin, dan, γ -mangostin

masing-masing sebanyak 5, 6, dan 4. Torsi ini masih termasuk dalam batas persyaratan karena makin banyak torsi yang dimiliki oleh suatu ligan, makin lama pencarian konformasinya dan hasil penambatan molekuler yang baik makin sulit diperoleh. Hal ini dikarenakan banyak kemungkinan posisi yang terjadi sehingga hasil yang konsisten sulit didapat. Dari Gambar 4.3 terlihat bahwa analog-analog mangostin sebelum dioptimasi dan setelah dioptimasi memiliki konformasi yang berbeda. Pada struktur β -mangostin yang struktur tiga dimensinya diupayakan untuk dibuat sendiri terlihat memiliki perbedaan paling sedikit. Hal ini dikarenakan pembuatan struktur dua dimensi menjadi tiga dimensi melalui perangkat lunak Vega ZZ secara otomatis mengalami minimisasi.

4.7 Penambatan Molekuler Protease HIV-1 dengan Ligan-Ligan

Secara keseluruhan, penambatan dilakukan kedalam tiga tahap sisi penambatan. Pertama adalah *screening* sisi pengikatan ligan dengan menambatkan ligan ke semua sisi protease HIV-1. Penambatan ini dilakukan pada makromolekul satu subunit (1ZP8) dan hanya digunakan satu analog perwakilan (α -mangostin). Hasil yang diperoleh dari penambatan ini adalah adanya dua kemungkinan posisi dimana ligan paling sering terikat. Kemungkinan ini adalah pada sisi kantung hidrofobik (sisi aktif) dan sisi 'engsel' antara 'kuping dan 'pipi' (permukaan). Tahap kedua yang dilakukan adalah penambatan terhadap sisi kantung hidrofobik. Penambatan ini dilakukan pada makromolekul satu subunit (1ZP8) dan dua subunit (1D4H). Tahap ketiga adalah penambatan pada sisi engsel yang terletak dari sisi permukaan protease HIV-1. Penambatan ini dilakukan pada makromolekul 1D4H. Semua penambatan dilakukan triplo dan menggunakan tiga perangkat lunak penambatan.

Pada penelitian kali ini, perangkat lunak yang digunakan sebanyak tiga perangkat lunak yakni AutoDock 4 (AD 4), AutoDock Vina (Vina), dan GOLD. Pemilihan perangkat lunak ini adalah berdasarkan jumlah perangkat lunak yang paling banyak digunakan yakni AD 4 dan GOLD serta adanya varian baru dari AutoDock yakni AutoDock Vina. AD 4 merupakan perangkat lunak penambatan yang paling banyak digunakan dan GOLD berada setelahnya. Sedangkan Vina adalah perangkat lunak baru yang menurut pembuatnya dari hasil percobaan lebih

akurat dan cepat dari AD 4. Baik AutoDock maupun GOLD menggunakan sistem pencarian konformasi *random* (stokastik). AD 4 menggunakan pendekatan *Lamarckian genetic algorithm* sedangkan GOLD menggunakan pendekatan *genetic algorithm*. Berbeda dengan *genetic algorithm* yang hanya fokus dengan pencarian global, *Lamarckian genetic algorithm* merupakan variasi pencarian global serta pencarian lokal.

Vina menggunakan beberapa variasi dari pendekatan stokastik termasuk *genetic algorithm*, *particle swarm*, *simulated annealing*, dan lain-lain yang dikombinasikan dengan optimisasi lokal dan trik spesial. Sedangkan dalam fungsi skor (*scoring function*) baik AutoDock maupun GOLD menggunakan penilaian dengan pendekatan berdasarkan *force field*. Vina yang merupakan variasi AutoDock, menggunakan fungsi penilaian dengan tambahan dari AD 4 yakni *united atom*. Penilaian ini hampir serupa dengan AD 4 namun derajat kebebasan yang mempengaruhi pergerakan atom hidrogen, misalnya gugus hidroksil, dikurangi (Trott, 2009).

Perangkat lunak yang pertama dijalankan adalah AutoDock4 (AD 4). Pada awal percobaan, dilakukan optimasi terhadap sisi pengikatan ligan dengan menambatkan ligan ke semua sisi protease HIV-1. Tahap ini dilakukan untuk menentukan pada sisi mana kemungkinan ligan terikat. Optimasi ini dilakukan dengan menambatkan ligan dengan target seluruh makromolekul 1ZP8. Penambatan pada makromolekul satu subunit ini dilakukan agar semua kemungkinan sisi pengikatan terbuka, termasuk sisi pertemuan dimer yang tertutup pada protease HIV-1 dua subunit (Gambar 2.6). Optimasi penentuan kotak batas (*grid box*) dilakukan pada perangkat lunak AutoDock Tools karena tampilan yang memudahkan pengguna untuk mengatur target penambatan. Pada penambatan dengan *grid box* keseluruhan makromolekul 1ZP8 digunakan koordinat (X,Y,Z) -6,103; 23,62; 36,227 dengan volume kotak 114 x 100 x 106 Å. Dari hasil penambatan terhadap seluruh bagian makromolekul, akan ditentukan penambatan selanjutnya berdasarkan sisi dimana ligan banyak terikat. Pada penambatan ini didapatkan hasil pengikatan ligan pada sisi kantung hidrofobik dan sisi permukaan protease HIV-1. Dari optimasi tersebut, dibuat kotak batas baru untuk sisi pengikatan kantung hidrofobik dengan memperluas batas kotak

hingga kantung hidrofobik terpenuhi. Koordinat serta luas kotak batas bagi masing-masing makromolekul yakni koordinat (X,Y,Z) -8,705; 14,18; 30,509 dengan volume kotak 60 x 60 x 60 Å untuk 1ZP8 dan koordinat (X,Y,Z) 8,77; 25,56; 6,018 dengan volume kotak 50 x 50 x 50 Å untuk 1D4H. Makromolekul 1ZP8 dipilih karena akan dilihat konformasi dari ligan terhadap satu subunit yang merupakan bentuk belum aktif. Sedangkan 1D4H dipilih karena sesuai dengan bentuk aktif. Pertimbangan selanjutnya adalah dilihat dari posisi pada sisi kantung hidrofobik yang dipengaruhi oleh perbedaan antara satu dan dua subunit makromolekul.

Untuk target penambatan selanjutnya, penentuan batas kotak didasarkan atas adanya sisi pengikatan lain dari optimasi yakni pada sisi permukaan protease HIV-1. Sisi pengikatan tersebut berada di luar sisi aktif protease HIV-1 yakni meliputi sisi permukaan pada protease HIV-1. Atas dasar tersebut, maka batas kotak untuk sisi penambatannya adalah koordinat (X,Y,Z) 3,876; 31,167; 18,822 dengan volume kotak 60 x 44 x 52 Å untuk target penambatan 1D4H. Makromolekul dengan dua subunit dipilih karena pertimbangan protease HIV-1 berada dalam keadaan aktif dan sisi ini tidak dipengaruhi oleh perbedaan satu atau dua subunit.

Tahap selanjutnya setelah penentuan batas kotak adalah penentuan parameter penambatan yakni jumlah GA (*Genetic Algorithm*) dan jumlah evaluasi penilaian. Setelah optimasi kedua parameter tersebut, didapatkan jumlah optimum GA sebesar 100 untuk semua penambatan serta evaluasi sebanyak 250.000 kali untuk penambatan pada semua sisi 1ZP8, evaluasi sebanyak 2.500.000 kali untuk 1ZP8 dan 25.000.000 kali untuk 1D4H pada penambatan di sisi kantung hidrofobik, dan 2.500.000 kali untuk penambatan pada sisi permukaan. Evaluasi berbeda didasarkan pada tingkat seberapa konvergen hasil yang didapatkan dari optimasi. Hal ini dikarenakan AD 4 menggunakan pencarian secara acak dan evaluasi penilaian secara individual sehingga hasil yang didapat beragam dan hasil beragam dapat meningkat seiring bertambahnya evaluasi.

Proses penambatan dengan perangkat lunak ini berlangsung selama 1-3 hari. Nilai yang didapat dari penambatan dengan AD 4 berupa energi (ΔG) dan K_i

(Konstanta Inhibisi). Bentuk penilaian disusun atas ranking energi serta kluster-kluster. Energi yang paling baik adalah energi yang paling rendah.

Perangkat lunak kedua adalah AutoDock Vina (Vina). Pada proses penambatan menggunakan Vina yang perangkat lunaknya tidak menggunakan *interface* (tampilan), proses dijalankan melalui *command prompt*. Perintah dijalankan berdasarkan parameter yang terdiri dari koordinat yang sama seperti AD 4 namun dengan ukuran kotak yang dikonversi dengan dikali 0,375 Å serta jumlah GA. Hasil penambatan dengan perangkat lunak ini akan disimpan dalam berkas *.txt* untuk peringkat energinya serta *.pdbqt* untuk bentuk konformasi. Proses penambatan berlangsung dengan waktu sekitar 2-10 menit. Hasil penambatan melalui perangkat lunak Vina hanya menunjukkan peringkat besarnya energi (ΔG) serta konformasi ikatan saja.

Perangkat lunak terakhir adalah GOLD. Penambatan yang dihasilkan berupa berkas *.conf* atau *configuration gold file* dan bentuk konformasi pengikatan ligan berupa *.mol*. Proses penambatan berlangsung dengan waktu sekitar 10 menit – 1 jam. GOLD hanya menunjukkan hasil peringkat penambatan berdasarkan skor (GoldScore) serta konformasi-konformasi ikatan. Pemilihan GoldScore dilakukan berdasarkan penilaiannya yang lebih banyak digunakan dibanding ChemScore. Pada GOLD digunakan koordinat yang sama namun dengan radius berbeda masing-masing untuk target kantung hidrofobik dan permukaan dengan radius 15 dan 10 Å sebagai luas daerah. Penggunaan radius dikarenakan model batas pada GOLD berupa sferik atau bola. Radius yang berbeda dikarenakan sisi penambatan pada permukaan lebih kecil dibanding sisi pada kantung hidrofobik.

Hasil penambatan masing-masing perangkat lunak menampilkan variabel penilaian yang berbeda. Penilaian tersebut yakni AD 4 dengan ΔG dan K_i , Vina dengan ΔG , dan GOLD dengan GoldScore. ΔG adalah energi bebas ikatan yang menunjukkan afinitas ikatan suatu ligan terhadap targetnya. K_i adalah konstanta inhibisi yang menunjukkan konsentrasi ligan yang dapat menginhibisi suatu enzim. Sedangkan GoldScore adalah fungsi nilai dari perangkat lunak GOLD dalam menentukan peringkat posisi terbaik. GoldScore sendiri bukan merupakan

fungsi nilai yang baik untuk menunjukkan afinitas ikatan ligan dengan target namun lebih menunjukkan posisi ikatan yang dinilai paling baik.

4.8 Analisis Hasil Penambatan Molekuler Protease HIV-1 dengan Ligan-Ligan

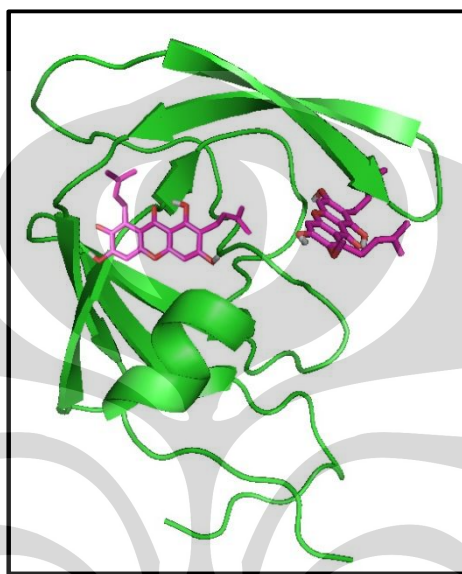
Hasil penambatan dari masing-masing perangkat lunak dianalisis menggunakan perangkat lunak yang berbeda menurut kompatibilitas masing-masing. Hasil penambatan AD 4 berupa berkas dalam bentuk .dlg yang dapat dibuka dan dianalisis dengan aplikasi wordpad dan AutoDock Tools (Lampiran 13). Hasil penambatan Vina dibuka dan dianalisis dengan aplikasi notepad serta MOE. Sedangkan GOLD dibuka dan dianalisis melalui perangkat lunak GOLD itu sendiri.

Pada AD 4, setiap hasil penambatan molekuler yang berjumlah seratus konformasi, dikelompokkan atas kluster-kluster dan energi berdasarkan kemiripan posisi dengan toleransi RMSD maksimum = 2 Å. Dari hasil penambatan dengan AD 4 dapat diperoleh hasil yang konvergen dan divergen. Hasil yang konvergen adalah hasil penambatan dengan energi terendah terdapat pada konformasi kluster terbanyak. Sedangkan hasil divergen didapatkan ketika energi terendah tidak terdapat pada kluster terbanyak. Hal ini dikarenakan AD 4 menggunakan pencarian secara acak dan evaluasi penilaian secara individual sehingga hasil yang didapat beragam dan hasil beragam dapat meningkat seiring bertambahnya evaluasi. Dan hasil konvergen atau divergen ini biasanya dipengaruhi oleh tingkat kekuatan dari perangkat keras (komputer).

Pada Vina, hasil yang ditunjukkan hanya berupa peringkat berdasarkan energi (ΔG), tidak dengan kluster. Sedangkan pada GOLD, hasil berupa peringkat GoldScore yang lebih menunjukkan posisi terbaik daripada energi afinitas. Hasil penilaian GoldScore merupakan hasil negatif dari jumlah semua energi, sehingga makin besar hasil skor, makin baik ikatannya (Nervall, *et al.*, 2007).

Pada penelitian kali ini, dilakukan penambatan molekuler dari analog mangostin ke target protease HIV-1 untuk memprediksi sisi ikatannya. Tahapan-tahapan penambatan dilakukan secara berurut dari tiga target. Target pertama adalah optimasi terhadap sisi pengikatan ligan dengan menambatkan ligan ke

semua sisi protease HIV-1. Penambatan dilakukan pada satu subunit makromolekul agar sisi pertemuan dimer tidak tertutup oleh subunit lainnya. Dengan penambatan pada sisi tersebut, didapatkan bahwa adanya dua kemungkinan posisi dimana ligan paling sering terikat yakni pada sisi kantung hidrofobik (sisi aktif) dan sisi permukaan (Gambar 4.4 dan Tabel 4.3).



[Sumber: Olahan penulis dengan AutoDock 4 & PyMOL]

Keterangan:

Magenta: Ligan mangostin

Hijau: Monomer protease HIV-1

Gambar 4.4 Posisi ligan mangostin pada target penambatan seluruh makromolekul 1ZP8.

Tabel 4.3 Hasil penambatan α -mangostin dengan target seluruh makromolekul 1ZP8 menggunakan AD 4

Posisi	Energi ΔG (kkal/mol)	Kluster (%)
Kantung hidrofobik	-6,32	67
Permukaan	-4,40	33

Ligan mangostin tidak tertarik ke sisi pertemuan dimer dari protease HIV-1. Sisi ini merupakan sisi yang sangat terlindungi dan bertanggung jawab terhadap proses dimerisasi dimana protease HIV-1 akan dijadikan bentuk aktifnya. Pada situs ini, terdapat terminal N dan C dari protease HIV-1. Oleh karena itu, untuk dilakukan penghambatan secara nonkompetitif pada sisi ini, diperlukan inhibitor

yang dapat dikenali oleh terminal N dan C seperti struktur berbasis peptida dan bersifat lipofilik untuk meningkatkan selektifitasnya (Breccia, *et al.*, 2003). Analog mangostin bukan merupakan tipe keduanya, oleh karena itu, ligan ini tidak tertarik ke sisi tersebut.

Setelah didapatkan hasil pemilihan sisi penambatan, target baru pada kantung hidrofobik dibuat. Pada penambatan ini digunakan makromolekul satu subunit dan dua subunit yang hasilnya akan dibandingkan. Hasil penambatan ditunjukkan pada Tabel 4.4. Hasil yang diperoleh cukup bervariasi dari ketiga perangkat lunak yang digunakan juga dari dua makromolekul yang ditargetkan. Dari tabel di atas ditunjukkan bahwa ΔG AD 4 memberikan hasil yang lebih tinggi dari Vina namun perbedaannya tidak jauh berbeda. Dari penambatan dengan dua makromolekul, diperoleh hasil energi yang lebih baik pada 1D4H (homodimer) dari 1ZP8 (monomer). Hasil ini ditunjukkan oleh semua perangkat lunak penambatan. Urutan tingkat inhibisi analog yang ditunjukkan oleh ΔG pada AD 4 dan Vina dari yang terkuat hingga terkecil adalah γ -mangostin, α -mangostin, dan β -mangostin. Sedangkan pada GOLD urutan konformasi dari yang terkuat hingga terkecil ditunjukkan oleh α -, γ -, dan β -mangostin.

Tabel 4.4 Hasil keseluruhan penambatan ligan mangostin pada target kantung hidrofobik

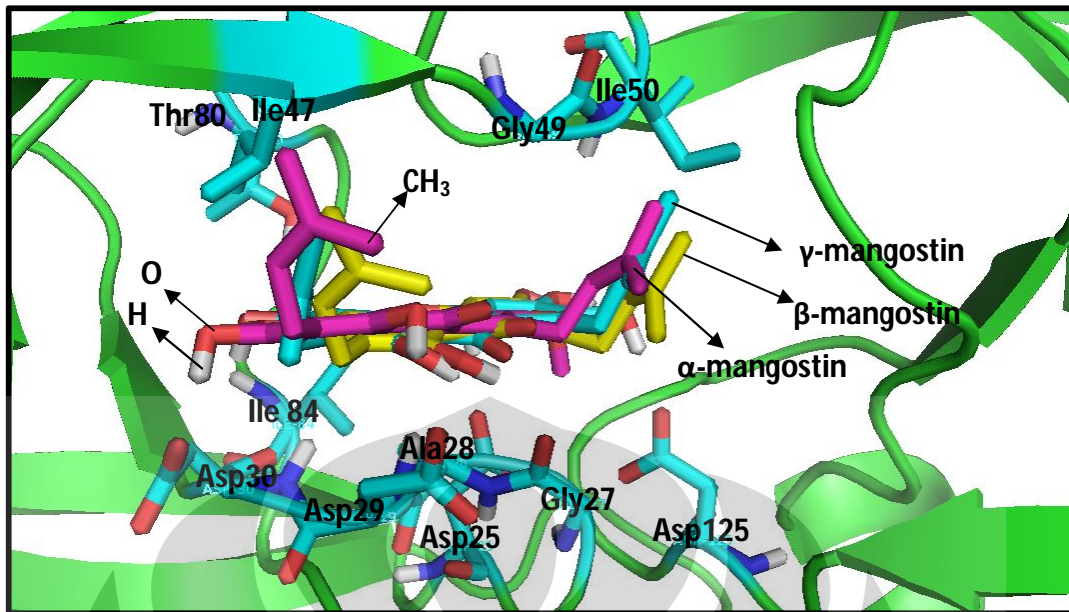
Makromolekul	Analog	AD4 ΔG (kkal/mol)/ K_i (μM)	Vina ΔG (kkal/mol)	GOLD GoldScore
1ZP8 (sisi hidrofobik)	α -mangostin	-8,09/1,18	-6,5	43,8434
	β -mangostin	-7,38/3,87	-6,6	18,7394
	γ -mangostin	-8,43/0,76	-8,49	33,8932
1D4H (sisi hidrofobik)	α -mangostin	-9,64/0,09	-8,7	59,891
	β -mangostin	-9,66/0,08	-8,8	38,1276
	γ -mangostin	-9,89/0,06	-9,4	39,4545

Hasil penambatan yang diperoleh dari masing-masing perangkat lunak cukup bervariasi. Hal ini dikarenakan tiap-tiap perangkat lunak menggunakan

model pencarian acak yang berbeda-beda. Masing-masing perangkat lunak juga memiliki fungsi nilai sendiri serta memiliki kespesifikan sendiri dalam penentuan konformasi. Dari ketiga perangkat lunak, hasil yang paling variatif ditunjukkan oleh hasil penambatan melalui perangkat lunak GOLD. AD 4 dan Vina berasal dari varian yang sama yakni AutoDock. Kedua perangkat lunak tersebut memiliki pendekatan metode pencarian, pendekatan fungsi skor, serta variabel penilaian yang hampir sama. Sedangkan GOLD merupakan perangkat lunak dengan varian berbeda sehingga pendekatan metode pencarian, fungsi skor, dan variabel penilaian cukup berbeda.

Hasil yang lebih baik ditunjukkan pada penambatan dengan makromolekul dua subunit (aktif) dibanding satu subunit (belum aktif). Hal ini menunjukkan adanya dugaan mekanisme yang terjadi pada penghambatan sisi hidrofobik dimana terjadi ketika protease HIV-1 dalam bentuk aktifnya, berbeda dengan penghambatan pada proses dimerisasi.

Hasil konformasi interaksi-interaksi yang terjadi pada masing-masing program dan makromolekul juga terdapat variasi. Secara umum, analog mangostin terikat pada subsisi S1 dari kantung tersebut. Residu yang paling sering berinteraksi dengan ligan ditunjukkan pada Gambar 4.5. Ikatan-ikatan hidrogen terjadi pada cabang-cabang dengan gugus elektronegatif seperti $-OH$ dan $-OCH_3$ nomor 1, 3, 6, dan 7 dan pada atom O dari gugus keton. Gugus-gugus tersebut berikatan dengan residu-residu polar seperti Asp29, Asp30, Asp125, dan Thr80. Interaksi juga terjadi pada sisi penutup yang terletak cukup dekat yakni dengan residu Gly48, Gly49, dan Ile50. Ikatan hidrogen ini terjadi pada jarak antara 2,4–3,7 Å. Interaksi lain seperti hidrofobik dengan cincin aromatis A dan C pada residu-residu nonpolar seperti Ala28, Ile47, Gly49, Ile84 dan van der Waals ditunjukkan rantai karbon cabang nomor 2 dan 8. Pada penambatan dengan dua subunit interaksi ikatan ligan dan makromolekul ini banyak memberikan *posing* yang berbeda dengan dua orientasi utama yakni orientasi dengan cincin A atau cincin C yang terletak lebih dekat ke residu polar Asp29 dan Asp30.



[Sumber: Olahan penulis dengan AutoDock 4, AutoDock Vina, GOLD, & PyMOL]

Gambar 4.5 Residu pada kantung hidrofobik yang berinteraksi pada penambatan ligan.

Interaksi-interaksi yang banyak terjadi pada situs ini disebabkan oleh gugus polar maupun nonpolar. Interaksi hidrogen dapat terjadi pada gugus -OH...O, gugus -NH...O, gugus -NH...N, dan gugus -OH...N. Interaksi hidrofobik terjadi pada cincin aromatis dengan gugus -CH pada residu nonpolar. Sedangkan interaksi van der Waals terjadi pada gugus -CH...HC- (Kovalesky, *et al.*, 2006). *Posing* yang berbeda pada beberapa konformasi disebabkan karena kantung hidrofobik yang cukup luas memiliki residu yang sama pada kedua dimer. Hal itu juga terjadi karena faktor analog mangostin yang berupa molekul kecil serta dua sisinya yang hampir mirip menyebabkan molekul tersebut memiliki variasi orientasi.

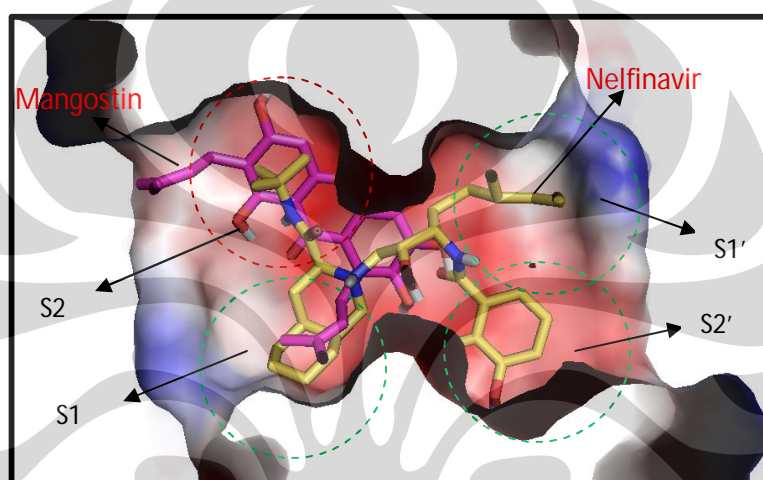
Interaksi-interaksi yang ditunjukkan jika dibandingkan dengan nelfinavir (Tabel 4.5 dan Gambar 4.6), dinilai dapat mengambat atau mengganggu substrat yang masuk ke dalam situs pemotongan tersebut. Dari penghambatan melalui sisi hidrofobik, mekanisme yang terjadi adalah kompetitif karena substrat juga terikat pada sisi tersebut. Jika substrat tidak dapat berikatan dengan sisi tersebut, maka pemotongan tidak dapat terjadi (Wlodawer & Vondrasek, 1998).

Tabel 4.5 Hasil penambatan kontrol positif nelfinavir pada 1D4H menggunakan AD 4

Analog	Percobaan	ΔG (kcal/mol)	K_i (μM)
Nelfinavir	1	-10,33	0,02
	2	-11,28	0,005
	3	-11,4	0,005

Keterangan :

Arsiran biru adalah konformasi yang dipilih



[Sumber: Olahan penulis dengan AutoDock 4, & PyMOL]

Gambar 4.6 Perbandingan hasil penambatan senyawa mangostin terhadap nelfinavir

Setelah penambatan dengan sisi kantung hidrofobik, penambatan dilanjutkan dengan target diluar sisi aktif. Hasil dan *posing* yang dihasilkan pada penambatan ini juga bervariasi. Hasil energi afinitas yang diperoleh lebih kecil daripada penambatan pada kantung hidrofobik. Namun dari hasil ini tingkat inhibisi (K_i) yang dihasilkan, ligan masih dapat memberikan aktivitas. Dari Tabel 4.6, hasil energi afinitas yang diperoleh dari AD 4 dan Vina cukup berbeda. Pada AD 4 menurut pemilihan kluster terbanyak, afinitas tertinggi hingga terendah diberikan oleh α -mangostin dengan β - dan γ -mangostin yang hampir sama. Namun jika dilihat dari pemilihan energi terbaik, afinitas tertinggi diberikan pada γ -mangostin, selanjutnya α - dan β -mangostin. Sedangkan pada Vina, hasil terbaik diberikan oleh γ -mangostin dengan α - dan β - mangostin yang berimbang. Pada

Tabel 4.6 dari hasil penambatan GOLD, urutan yang diperoleh sama seperti AD 4 namun dengan adanya skor negatif pada β -mangostin. Perbedaan energi ini juga dipengaruhi oleh variasi perangkat lunak-perangkat lunak penambatan. Sulit untuk menentukan perangkat lunak yang paling benar, namun dari percobaan *in vitro* diperlihatkan bahwa γ -mangostin memiliki aktivitas yang lebih tinggi dari α -mangostin.

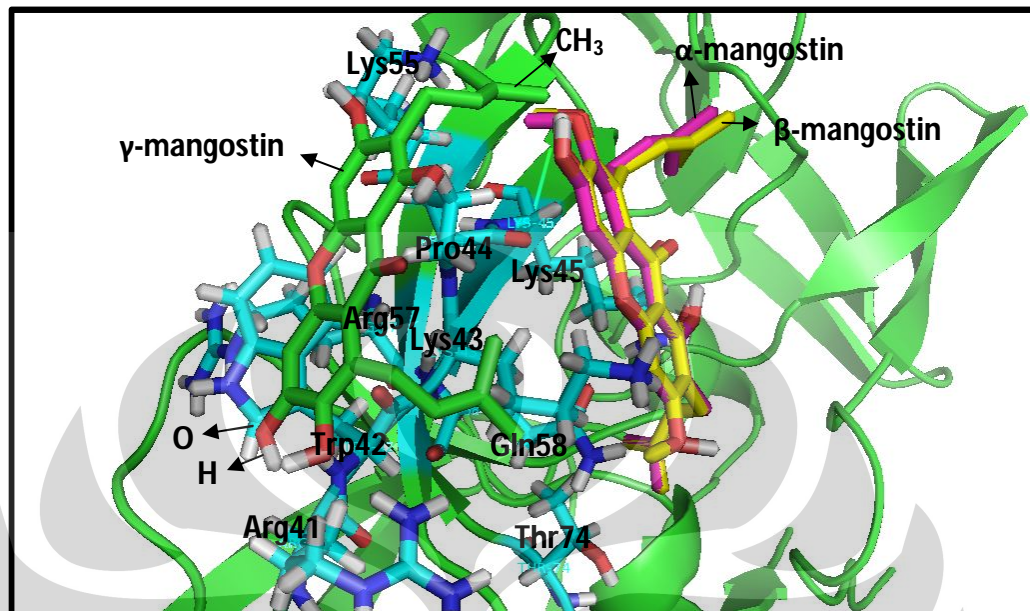
Tabel 4.6 Hasil keseluruhan penambatan ligan mangostin pada target sisi permukaan

Makromolekul	Analog	AD4	Vina	GOLD
		ΔG (kcal/mol)/ K_i (μM)	ΔG (kcal/mol)	GoldScore
1D4H (sisi permukaan)	α -mangostin	-6,06/35,99	-5,3	17,7444
	β -mangostin	-5,89/48,04	-5,3	-3,0857
	γ -mangostin	-5,85/51,88	-5,9	3,8957

Hasil energi serta tingkat inhibisi yang diperoleh lebih kecil namun masih dapat memberikan aktivitas inhibisi. Menurut penelitian Judd, *et al.*, senyawa inhibitor nonkompetitif pada sisi ini masih dapat memberikan aktivitas hingga $K_i=100 \mu M$. Dari hasil penambatan oleh GOLD diperoleh hasil negatif, hal ini dapat disebabkan oleh kegagalan aplikasi dalam mengkalkulasi energi yang dipengaruhi oleh permukaan makromolekul (Cheng, Li, Li, Liu, & Wang, 2009).

Dari hasil interaksi yang diperoleh, kembali terjadi variasi konformasi. Banyaknya variasi dari hasil penambatan dipengaruhi oleh letak sisi penambatan yang tidak terlokalisasi seperti pada kantung hidrofobik. Namun dari variasi konformasi ini, analog masih berinteraksi dengan daerah di sekitar penutup. Dari Gambar 4.7 ditunjukkan residu yang sering berinteraksi di sisi ini. Interaksi hidrogen terjadi pada gugus-gugus dari analog yang masih sama seperti pada penambatan sebelumnya, namun dengan residu berbeda. Residu yang paling sering berinteraksi adalah Lys45. Residu-residu lain masih terdapat adanya interaksi disekitar penutup yakni Lys55, Lys43, Pro44, Trp42, Thr74, Arg41, Arg57, dan Gln58. Sementara interaksi hidrofobik dengan cincin A dan C pada analog dengan residu-residu nonpolar seperti Pro44 dan Pro79. Interaksi van der Waals (-CH...HC) juga masih diperlihatkan oleh rantai karbon 2 dan 8. Hasil

perbedaan konformasi juga dipengaruhi oleh faktor yang sama seperti hasil perbedaan energi.



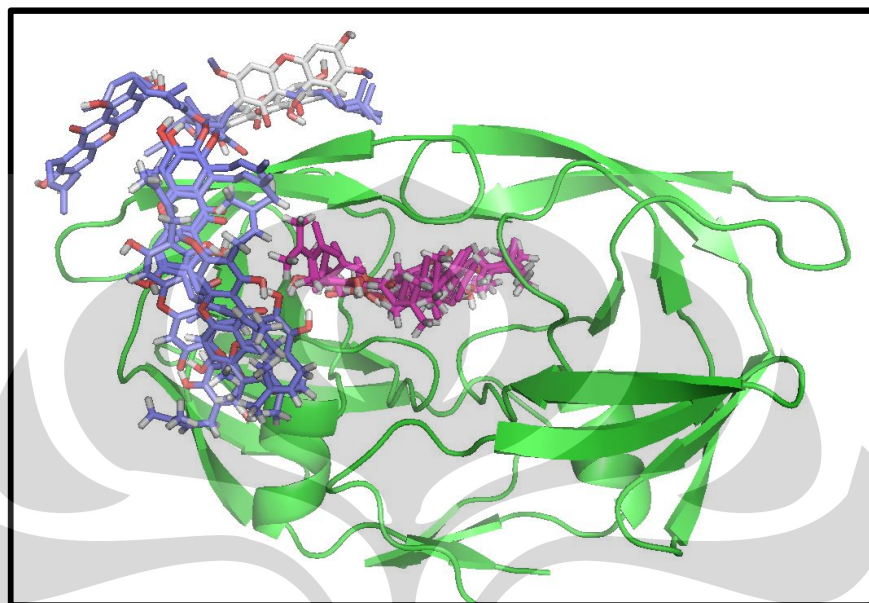
[Sumber: Olahan penulis dengan AutoDock 4, AutoDock Vina, GOLD, & PyMOL]

Gambar 4.7 Residu pada permukaan makromolekul yang berinteraksi pada penambatan ligan.

Pada penelitian-penelitian sebelumnya (Judd, *et al.*, 2001; Dash & Rao, 2010; Kovalesky, *et al.*, 2006; Perryman, Lin, & McCammon, 2006), ditunjukkan bahwa pengikatan pada daerah penutup (residu 43-58) dan daerah “engsel” dari “kuping” ke “pipi” (residu 11-42) dapat menghambat penutup. Saat penutup membuka, jarak antara ‘kuping’ ke ‘pipi’ pada protease HIV-1 mengecil sedangkan pada penutup menutup, jarak tersebut membesar. Mekanisme penghambatan pada sisi ini menyebabkan pergerakan penutup dihentikan. Hal ini menjadikan penutup tidak dapat membuka atau menutup sehingga substrat tidak dapat masuk atau terikat dan pada akhirnya tidak terjadi pemotongan substrat. Dari adanya hasil ini, kemungkinan mekanisme nonkompetitif di daerah ini dapat terjadi.

Dari hasil ketiga penambatan, diperoleh adanya dua dugaan pengikatan analog mangostin terhadap protease HIV-1 yakni pada sisi kantung hidrofobik (kompetitif) dan sisi permukaan luar (nonkompetitif) (Gambar 4.8). Menurut hasil *in vitro* dari penelitian sebelumnya oleh Chen, Wan dan Loh (1996),

menunjukkan bahwa α - dan γ -mangostin menghambat secara nonkompetitif. Jika dibandingkan dengan hasil penambatan dengan tingginya afinitas pada sisi kompetitif (sisi kantung hidrofobik), terdapat masih adanya perbedaan prediksi.



[Sumber: Olahan penulis dengan AutoDock 4, AutoDock Vina, GOLD, & PyMOL]

Keterangan:

Magenta: Penambatan analog mangostin pada sisi kantung hidrofobik

Biru : Penambatan analog mangostin pada sisi permukaan

Gambar 4.8 Prediksi sisi penambatan analog-analog mangostin pada 1D4H

Hasil afinitas pengikatan ligan yang lebih tinggi diberikan oleh penambatan pada sisi kantung hidrofobik. Dari hasil konformasi ligan pada sisi tersebut seperti pada Gambar 4.6, walaupun tidak mengisi semua ruang hidrofobik seperti inhibitor kompetitif lain, namun analog masih dapat masuk dan berinteraksi cukup kuat. Hal ini menimbulkan dugaan lain bahwa substrat lain masih dapat masuk dan ikut mengisi ruang tersebut karena molekul analog mangostin yang cukup kecil dan hanya mengisi satu sisi. Dugaan tersebut ditunjukkan oleh hasil penelitian oleh Hoog, *et al* (1996). Hasil kristalisasi dari dua ligan terhadap protease HIV-1 menunjukkan kedua molekul tersebut masuk ke sisi hidrofobik. Menurut kemungkinan adanya keadaan tersebut, timbul dugaan bahwa pada saat percobaan *in vitro*, masih terdapat kontrol substrat yang dapat berikatan dan dipotong. Prediksi lain adalah pada saat percobaan *in vitro*, terdapat pengaruh konsentrasi ligan yang dapat mengubah mekanisme nonkompetitif

menjadi kompetitif atau sebaliknya. Perbedaan mekanisme ini dihasilkan dari penelitian mengenai perancangan inhibitor baru protease HIV-1 oleh Rezacova, *et al* (2009). Dalam penelitian tersebut, didapatkan hasil bahwa dengan konsentrasi tinggi mekanisme yang terjadi adalah kompetitif, sedangkan dengan konsentrasi rendah yang terjadi adalah mekanisme nonkompetitif. Hal ini belum dipastikan secara pasti penyebabnya, namun diduga karena adanya agregasi dari inhibitor di permukaan enzim yang terletak di luar sisi aktif.

Pengikatan pada sisi nonkompetitif dinilai lebih sesuai dengan percobaan *in vitro*. Namun dari hasil penambatan, energi yang diperoleh lebih rendah dari sisi aktif protease HIV-1. Selain dari dugaan-dugaan yang telah dikemukakan sebelumnya, pengikatan ini masih mungkin terjadi karena pertimbangan lain. Pada penelitian inhibitor dengan mekanisme yang sama, juga menunjukkan kemungkinan interaksi ligan terhadap sisi aktif dan sisi permukaan (Judd, *et al.*, 2001; Kovalesky, *et al.*, 2006). Fenomena ini kemudian dijelaskan oleh Ma, Shatsky, Wolfson, dan Nussinov (2002) dalam penelitiannya mengenai kecenderungan banyaknya ligan ke dalam suatu sisi. Kecenderungan pengikatan banyaknya ligan ke sisi aktif suatu protein target misalnya protease disebabkan oleh topologi kantung aktif makromolekul itu sendiri. Pada keadaan protease HIV-1 yang tertutup, terbentuk area kantung yang lebih terlokalisasi akibat adanya dua penutup yang berdekatan. Hal ini yang mempengaruhi kecenderungan ligan menyesuaikan diri di daerah tersebut. Dalam penambatan molekuler, terbentuk populasi ligan yang cenderung membentuk konformasi ke sisi aktif yang lebih sesuai. Dari sebagian besar populasi yang dibentuk pada daerah itu, penyesuaian ligan lebih fokus ke populasi tersebut dibanding mempertimbangkan ke daerah lain.

Baru-baru ini, dipublikasikan penemuan baru mengenai penghambatan nonkompetitif di sisi antara “kuning”-“pipi” protease HIV-1 oleh Perryman dan anggota lain dalam Scripps Research (Fikes, 2010). Publikasi tersebut berisi bahwa molekul kecil dapat menghambat pada sisi nonkompetitif protease HIV-1 ini. Dari penelitian dinamika molekuler tersebut, ditunjukkan bahwa penutup pada protease HIV-1 yang mengalami mutasi dapat terbuka terlalu luas dan lebih fleksibel. Ketika inhibitor berada dalam kantung hidrofobik, energi lebih

dibutuhkan untuk menarik penutup ketimbang bertahan dalam sisi tersebut. Sebagai akibatnya, obat tersebut tidak dapat bertahan dan sisi aktif kembali tersedia untuk pengikatan substrat. Dari pengikatan molekul kecil pada sisi permukaan ditunjukkan bahwa pembukaan penutup yang terlalu lebar serta fleksibilitas penutup dapat ditahan. Pada penelitian inhibitor nonkompetitif lain (terikat di sisi engsel) oleh Judd *et al.* (2001), struktur protease HIV-1 yang digunakan adalah dengan konformasi penutup yang membuka. Dari penelitian-penelitian yang telah dilakukan terhadap inhibitor nonkompetitif, digunakan struktur protease HIV-1 yang terbuka. Hal ini diduga berdasarkan mekanisme penghambatan nonkompetitif yang bertujuan untuk menahan fleksibilitas penutup pada konformasi terbuka. Dari seluruh struktur kristal protease HIV-1 yang tersedia saat ini, tidak terdapat struktur dengan konformasi terbuka (Kumar & Hosur, 2003). Hal ini yang juga menjadi batasan dalam mengamati inhibitor yang mempengaruhi pergerakan penutup.

Perbedaan prediksi penambatan analog mangostin terhadap protease HIV-1 terjadi karena adanya faktor-faktor yang dijelaskan di atas. Beberapa perbedaan prediksi hasil penambatan molekuler (*in silico*) dengan hasil penelitian *in vitro* dapat disebabkan oleh keterbatasan yang ada pada penelitian *in vitro*, atau *in silico* itu sendiri. Pada penelitian metode *docking*, faktor keterbatasan dapat disebabkan keterbatasan alat (perangkat keras), perangkat lunak (perangkat lunak), metode, dan teknik yang digunakan. Perbedaan prediksi posisi melalui perbandingan dengan struktur metabolit dapat dikarenakan teknik penambatan molekuler hanya mampu memprediksi interaksi ligan dengan makromolekul di dalam kotak simulasi yang ditentukan (*grid box*) tetapi tidak mampu memprediksi proses yang mengawali terjadinya pengikatan ligan (Setiawan, 2009). Meskipun demikian, penambatan molekuler masih dapat memberikan prediksi pengikatan ligan. Dengan pertimbangan penghambatan pada sisi nonkompetitif yang mempengaruhi aspek fleksibilitas dari protease HIV-1, maka untuk lebih memastikan model pengikatan analog mangostin, dapat digunakan teknik selanjutnya yakni dinamika molekuler di mana pergerakan ligan maupun makromolekul dapat fleksibel.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari penambatan molekuler beberapa senyawa xanton yakni α -, β -, dan γ -mangostin terhadap protease HIV-1 diperoleh dua model pengikatan. Model pengikatan tersebut yakni dengan energi afinitas ikatan yang lebih tinggi pada sisi aktif kantung hidrofobik (ΔG AutoDock 4 = (-9,64)-(-9.89) kkal/mol; ΔG AutoDock Vina = (-8,7)-(-9,4) kkal/mol) dan pada sisi permukaan luar yang masih menunjukkan energi afinitas ikatan yang baik (ΔG AutoDock 4 = (-5,85)-(-6,06) kkal/mol; ΔG AutoDock Vina = (-5,3)-(-5,9) kkal/mol).

5.2 Saran

1. Untuk selanjutnya, penelitian ini dapat dilanjutkan dengan menggunakan metode dinamika molekuler untuk memastikan model penambatan mengingat pengaruh fleksibilitas penutup.
2. Perlu dilakukan penentuan protokol terhadap pengamatan model pengikatan protease HIV-1 dengan inhibitor nonkompetitif sejenis agar hasil yang ditunjukkan lebih akurat.
3. Perlu dilakukan penentuan model ikatan senyawa-senyawa inhibitor protease HIV-1 sejenis agar klasifikasi mekanisme penambatan lebih terarah dan dapat dikembangkan lebih jauh.



DAFTAR ACUAN

- Adamson, C., Salzwedel, K., & Freed, E. (2009). Virus maturation as a novel HIV-1 therapeutic target. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 895-908.
- Akao, Y., Nakagawa, Y., Linuma, M., & Nozawa, Y. (2008). Anti-cancer effects of xanthenes from pericarps of mangosteen. *International Journal of Molecular Sciences*, 9, 355-370.
- Alterman, M. (2001). Design and synthesis of HIV-1 protease inhibitor. *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertation from The Faculty of Pharmacy*.
- Ashraf, B., & Wong, H. (2003). HIV-1 protease: mechanism and drug discovery. *Organization of Biomolecular Chemistry*, 1, 5-14.
- Berman, H., et al. (2000). The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, 28, 235-242. www.pdb.org.
- Breccia, P., et al. (2003). Dimerization inhibitors of HIV-1 protease based on a bicyclic guanidium subunit. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 5196-5207.
- Bruice, P. (2003). *Organic Chemistry* (4th ed, hal. 959-994.). New Jersey: Prentice Hall.
- Chaverri, J., Rodriguez, N., Ibarra, M., & Rojas, J. (2008). Medical properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3227-3239.
- Chen, S., Wan, M., & Loh, B. (1996). Active constituent againsts HIV-1 protease from *Garcinia mangostana*. *Planta Medica*, 62 (2), 381-382.
- Cheng, T., Li, X., Li, Y., Liu, Z., & Wang, R. (2009). Comparative assessment of scoring functions on diverse test set. *Journal of Chemical Information Model*, 49, 1079-1093.
- Colaborative Computational Project, N. 4. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallography*, D50, 760-763.
- Copeland, R. (2000). *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis* (Ed. Ke-2, hal. 14-19). New York: Wiley-VCH, Inc.
- Currently approved drugs for HIV: a comparative chart*. (22 Oktober 2008). Diakses 7 Juli 2010, dari AIDS MEDS: www.aidsmeds.com

- Cygwin user's guide*. (1998). Diakses 10 Januari 2010, dari Cygwin: <http://www.cygwin.com/cygwin-ug-net/>
- Danielson, C., & Hope, T. (2009). Imaging of HIV/host protein interaction. Dalam P. Spearman, & E. Freed, *Current Topics in Microbiology and Immunology: HIV Interactions with Host Cell Protein* (Vol. 339, hal. 103-124). Verlag: Springer.
- Dash, C., & Rao, M. (2001). Interactions of a novel inhibitor from an *Extremophilic Bacillus sp.* with HIV-1 protease. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (4), 2487-2493.
- Delano, W. (2004). *Pymol user's guide*. Diakses 10 Januari, 2010, dari Delano Scientific LLC.: <http://pymol.sourceforge.net/newman/userman>
- Dimmock, N., Easton, A., & Leppard, K. (2007). *Introduction to Modern Virology* (Ed. ke-6, hal. 310-339). Oxford: Blackwell Publishing.
- Familia, C., *et al.* (n.d.). *Automated docking analysis provides new insight on protease inhibitor selection for antiretroviral therapy in HIV-1 infection*. Diakses 28 Desember 2009, dari Aids Congress: <http://www.aidscongress.net/pdf/342>
- Fight AIDS @ Home: The AIDS crisis*. (2005, 15 November). Diakses 27 Mei, 2010, dari Fight AIDS @ Home: <http://fightaidsathomw.scripps.edu/crisis.html>
- Figure for: twenty years of therapy for HIV-1 infection*. (2003). Diakses 21 Januari 2010, dari Medscape: <http://www.medscape.com/content>
- Fikes, B. (2010, Februari 3). *New class of HIV drugs from Scripps Research?* Diakses 5 Juni 2010, dari NCTimes: <http://www.nctimes.com/app/blog/wp>
- GOLD support-scientific FAQs*. (2010). Diakses 10 Januari 2010, dari The Cambridge Crystallographic Data Centre: http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/faqs
- GOLD-protein ligand docking*. (2010). Diakses 10 Januari, 2010, dari The Cambridge Crystallographic Data Centre: http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/GOLD
- Harvey, I., Johnson, P., aristoff, P., Morris, J., Lovasz, K., Howe, W., *et al.* (1997). Structure-based design of non-peptidic HIV protease inhibitor: the

- sulfonamide-substitued cyclooctylpyranones. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1149-1164.
- Hoog, S., *et al.* (1996). Humman immunodeficiency virus protease ligand specificity conferred by residues outside of the active site cavity. *Biochemistry*, 35, 10279-10286.
- Huang, S., & Zou, X. (2007). Efficient molecular docking of NMR structures: application to HIV-1 protease. *Protein Science*, 16, 43-51.
- Huey, R., & Morris, G. (2007, Mei 22). Using AutoDock 4 with ADT: a tutorial. La Jolla, California, USA: The Scripps Research Institute.
- Irwin, J., *et al.* (2009). Automated docking screens: a feasibility study. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52, 5712-5720.
- Judd, D., *et al.* (2001). Polyoximetallate HIV-1 protease inhibitors: a new mode of protease inhibition. *Journal of American Chemical Society*, 123, 886-897.
- Kaldor, S., *et al.* (1997). Viracept (nelfinavir mesylate, AG1343): A potent, orally bioavailable inhibitor. *Journal of medicinal Chemistry*, 40, 3979-3985.
- Kitchen, D., Decornez, H., Furr, J., & Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and application. *Nature Reviews*, 4, 935-949.
- Kouranov, A., *et al.* (2006). The RCSB PDB information portal for structural genomics. *Nucleid Acid Research*, 34, D303-D305.
- Kovalesky, A., *et al.* (2006). Ultra-high resolution crystal structure of HIV-1 protease mutant reveals two binding sites for clinical inhibitor TMC114. *Journal of Molecular Biology*, 363 (1), 161-173.
- Kumar, M., & Hosur, M. (2003). Adaptability and flexibility of HIV-1 protease. *European Jurnal of Biochemistry*, 270, 1231-1239.
- Leach, A., Shoicet, B., & Peishoff, C. (2006). Docking and scoring. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49 (20), 5851-5855.
- Lodish, Berk, Zipursky, Matsudaira, Baltimore, & Darnell. (2000). *NCBI bookshelf: molecular cell biology*. Diakses 10 Mei 2010, dari NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf>

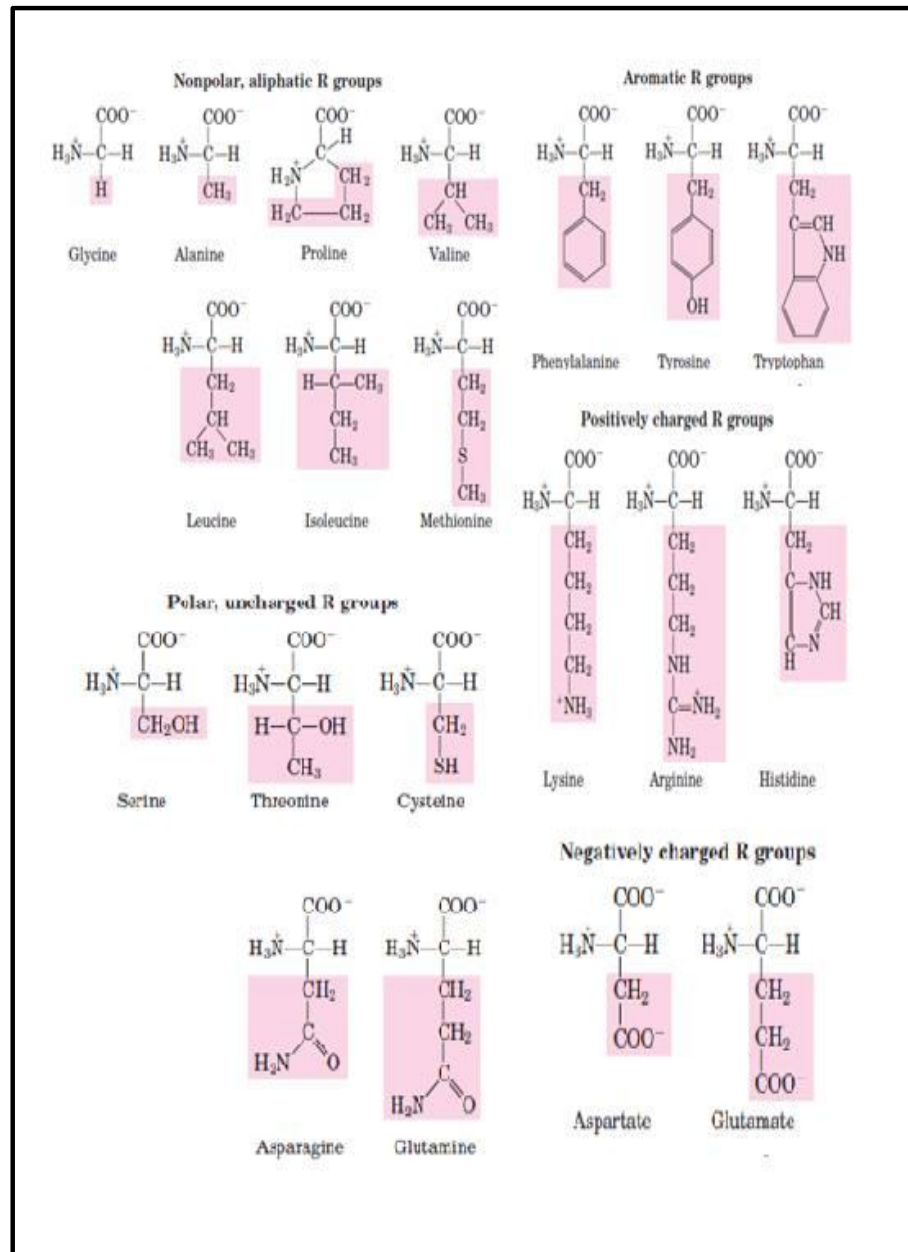
- Ma, B., Shatsky, M., Wolfson, H., & Nussinov, R. (2002). Multiple diverse ligands binding at a single protein site: a matter of pre-existing populations. *Protein Science*, *11*, 184-197.
- Mahabusarakam, W., Wiriyachitra, P., & Taylor, W. (1987). Chemical constituent of *Garcinia mangostana*. *Journal of Natural Products*, *50* (3), 474-478.
- Marcou, G., & Kellenberger, E. (2009, November). Docking with GOLD. Strasbourg, Prancis: Universite de Strasbourg.
- Moitessier, N., Englebienne, P., Lee, D., Lawandi, J., & Corbeil, C. (2008). Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. *British Journal of Pharmacology*, *153*, S7-S26.
- Morris, G., *et al.* (2009). AutoDock 4 and AutoDock Tools 4: automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 1-7.
- Murray, R., *et al.* (2003). *Biokimia Harper* (Ed. ke-25, hal. 45-58). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Nelson, D., & Cox, M. (2001). *Lehninger Principles of Biochemistry* (Ed ke-4, hal. 50-212). Wisconsin: W.H. Freeman Company.
- Nervall, M., *et al.* (2007). Predicting binding modes from free energi calculations. *Journal of Medicinal Chemistry*, *51*, 2657-2667.
- Osman, M., & Milan, A. (2006). Mangosteen-*Garcinia mangostana*. *Southampton for Underutilised Crops*, 1-3.
- Overview and Manual. (2002, Maret). *The CCP4 suite-computer programs for protein crystallography*. Warrington, United Kingdom: CCLRC Daresbury Laboratory.
- Pamela, C., & Harvey, R. (1994). *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry* (Ed ke-3, hal. 14-23). New York: Lippincott Wiliams & Wilkins.
- Patick, A., & Potts, K. (1998). Protease inhibitor as antiviral agents. *Clinical Microbiology Reviews*, *11* (4), 614-627.
- Pechik, I., *et al.* (1989). Possible role of some groups in the structure and function of HIV-1 protease as revealed by molecular modeling studies. *FEBS Letter*, *247* (1), 118-122.

- Pedretti, A., Mazzolari, A., & Vistoli, G. (2004). Vega ZZ: a versatile toolkit for drug design and protein modeling. *Journal of Computer Aided Molecular Design*, 18, 167-173.
- Pettersen, E., *et al.* (2004). UCSF-Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25 (13), 1605-1612.
- Pradipta, I., Nikodemus, T., & Susilawati, Y. (2007). Isolasi dan identifikasi senyawa golongan xanton dari kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.). *Laporan Akhir Penelitian Muda (LITMUD) UNPAD*.
- PubChem Compound*. (n.d.). Diakses 2 Mei 2010, dari NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound
- Rezacova, P., *et al.* (2009). Design of HIV protease inhibitors based on inorganic polyhedral metallocarboranes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52, 7132-7141.
- Review: MOE (Molecular Operating Environment)*. (2006). Diakses 7 Januari 2010, dari [Macresearch](http://www.macresearch.org): http://www.macresearch.org/review_moe_molecular_operating_environment
- Setiawati, A., SB, Z., & Suyatna, F. (2005). Pengantar Farmakologi. Dalam S. Ganiswarna, R. Setiabudi, F. Suyatna, Purwastyastuti, & Nafrialdi (Eds.), *Farmakologi dan Terapi* (Ed. ke-4, hal. 14-19). Jakarta: Bagian Farmakologi FKUI.
- Setiawan, A. (2009). Analisis *in silico* inhibisi enzim sitokrom P450 3A4 oleh senyawa golongan inhibitor HIV protease dengan teknik *molecular docking*. 1-136.
- Skulnick, H., *et al.* (1997). Structure-based design of non-peptidic HIV protease inhibitors: the sulfonamide-substituted cyclooctylpiranones. *Journal of Medicinal Chemistry*, 40, 1149-1164.
- Sousa, S., Fernandes, P., & Ramos, M. (2006). Protein-ligand docking current status and future challenges. *Proteins*, 65, 15-26.
- Tiana, G., *et al.* (2005). Design of a folding inhibitor of the HIV-1 protease. *Molecular Simulation*, 31 (11), 765-771.

- Tiikkainen, P. (2010). Study of ligand-based virtual screening tools in computer-aided drug design. *Medica-Odontologica*, 1-98.
- Tjay, T. H., & Rahardja, K. (2007). *Obat-obat penting: Khasiat, Penggunaan, dan Efek-Efek Sampingnya* (Ed. Ke-6, hal. 116-118). Jakarta: Elex Media Komputindo.
- Trott, O. (2009). *AutoDock Vina 1.0 manual*. Diakses 17 Februari 2010, dari AutoDock Vina - Molecular Docking and Virtual Screening Program: <http://vina.scripps.edu/manual.html>
- Trott, O., & Olson, A. (2009). Software news and update autodock vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 0, 1-7.
- Tsai, C. S. (2002). *An Introduction to Computational Biochemistry* (hal. 1-45). New York: Wilwy-Liss Inc.
- Vlietinck, A., Apers, S., & Pieters, L. (1998). Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Planta Medica*, 64 (2), 97-109.
- Wink, M. (2006). *An Introduction to Molecular Biotechnology* (hal. 387-390). Weinheim: WILY-VCH Verlag GmbH & Co.
- Wlodawer, A., & Vondrasek, J. (1998). Inhibitors of HIV-1 protease: a major success of structure-assisted drug design. *Annual Revision of Biophysic and Biomolecular Structure*, 27, 249-284.
- Wood, J. (1998). HIV protease inhibitor. *The New England Journal of Medicine*, 1281-1292.
- Zhang, K., *et al.* (2001). Circulating metabolites of the human immunodeficiency virus protease inhibitor in humans: structural identification, levels in plasma, and antiviral activity. *Antimicrobial Agents and Activity*, 45 (4), 1086-1093.

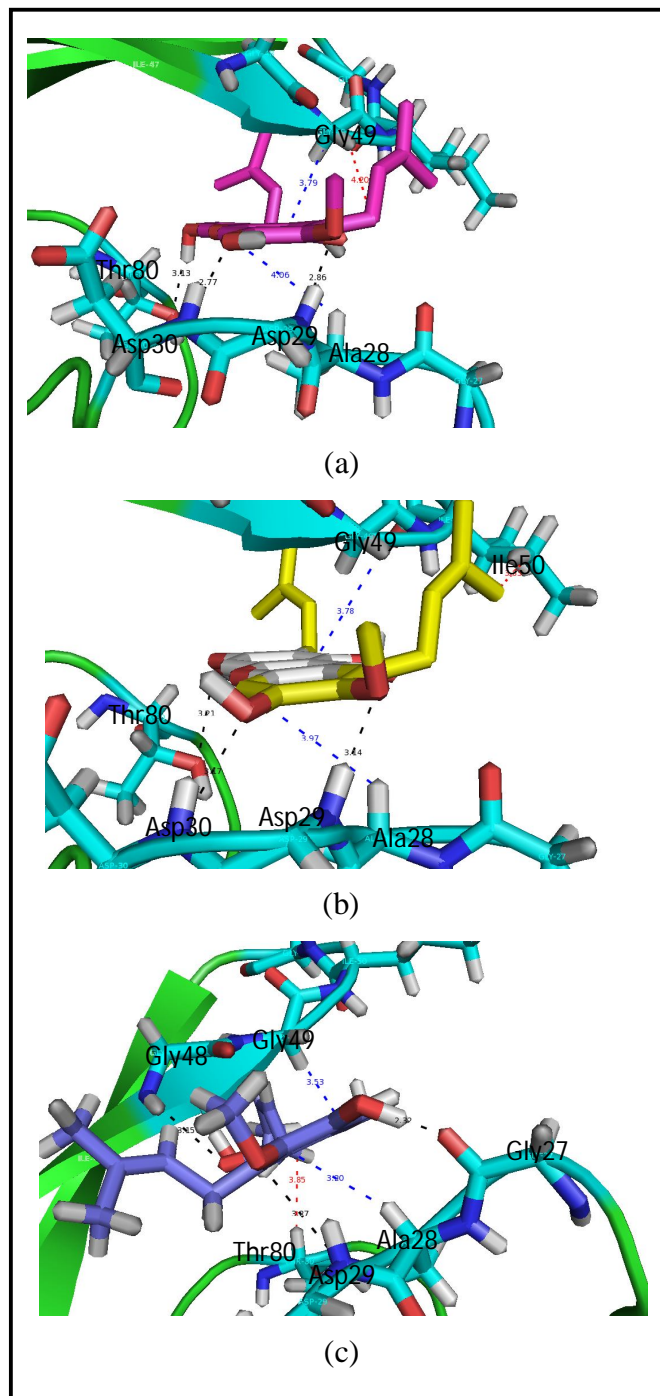


GAMBAR



[Sumber: Nelson & Cox, 2001]

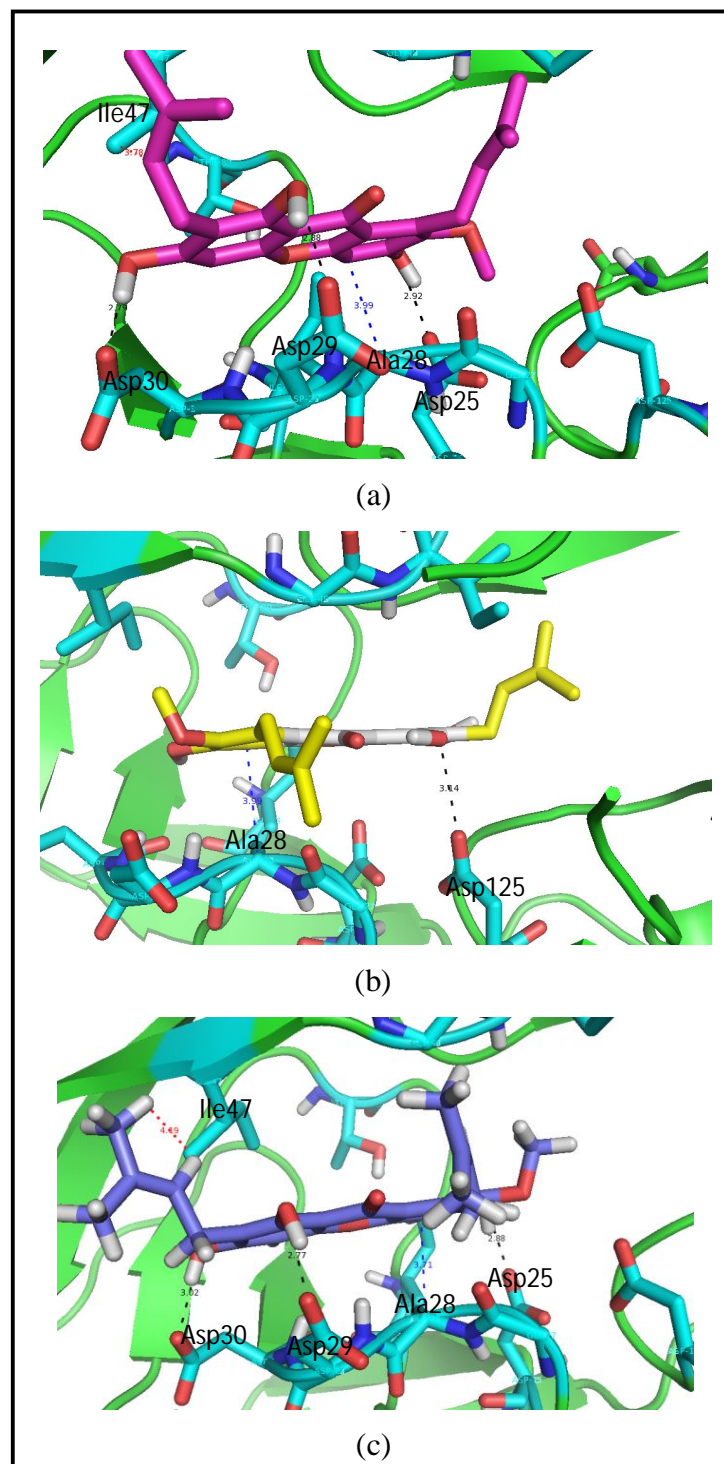
Gambar 2.13 Dua puluh jenis asam amino penyusun protein



[Sumber: Olahan penulis dengan AutoDock 4, AutoDock Vina, GOLD, & PyMOL]

Keterangan: - - - - Jarak ikatan hidrogen
 - - - - Jarak interaksi hidrofobik
 - - - - Jarak interaksi van der Waals

Gambar 4.9 Konformasi ikatan α -mangostin pada 1ZP8 dengan target sisi kantung hidrofobik menggunakan (a) AD4, (b) Vina dan (c) GOLD



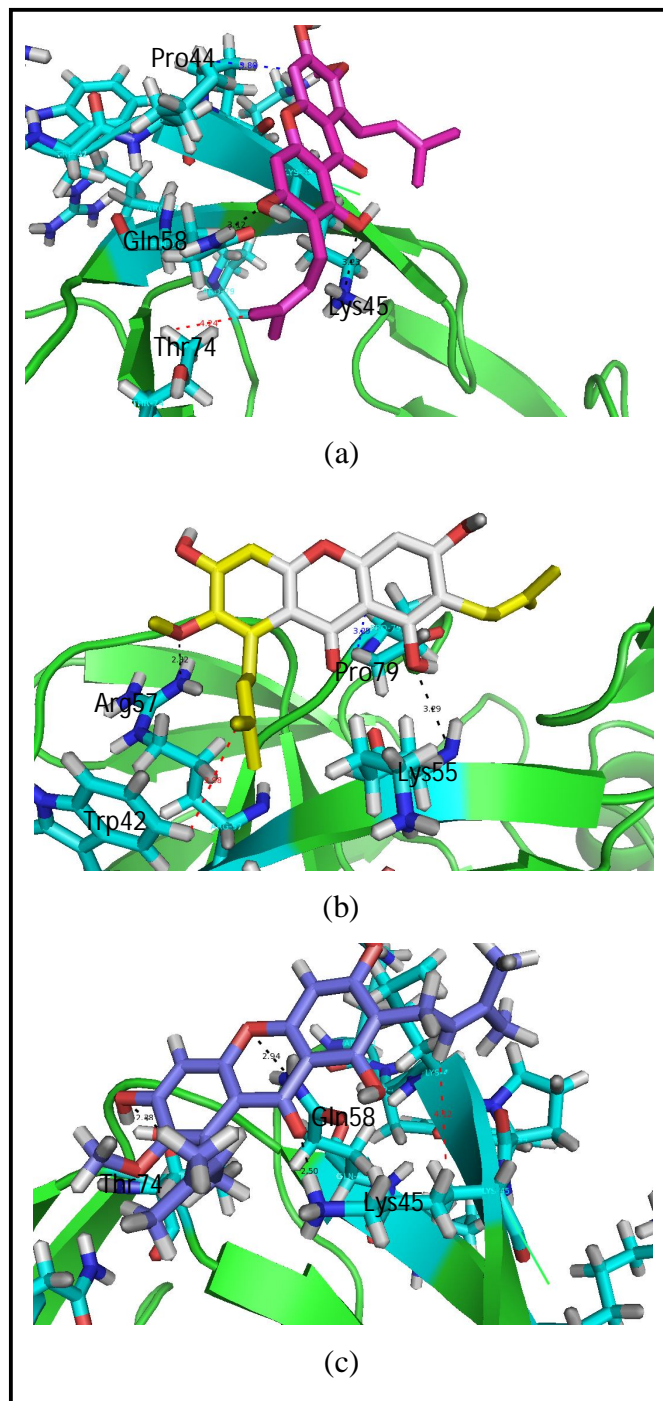
[Sumber: Olahan penulis dengan AutoDock 4, AutoDock Vina, GOLD, & PyMOL]

Keterangan: - - - - Jarak ikatan hidrogen

- - - - Jarak interaksi hidrofobik

- - - - Jarak interaksi van der Waals

Gambar 4.10 Konformasi ikatan α -mangostin pada 1D4H dengan target kantung hidrofobik menggunakan (a) AD4, (b) Vina dan (c) GOLD



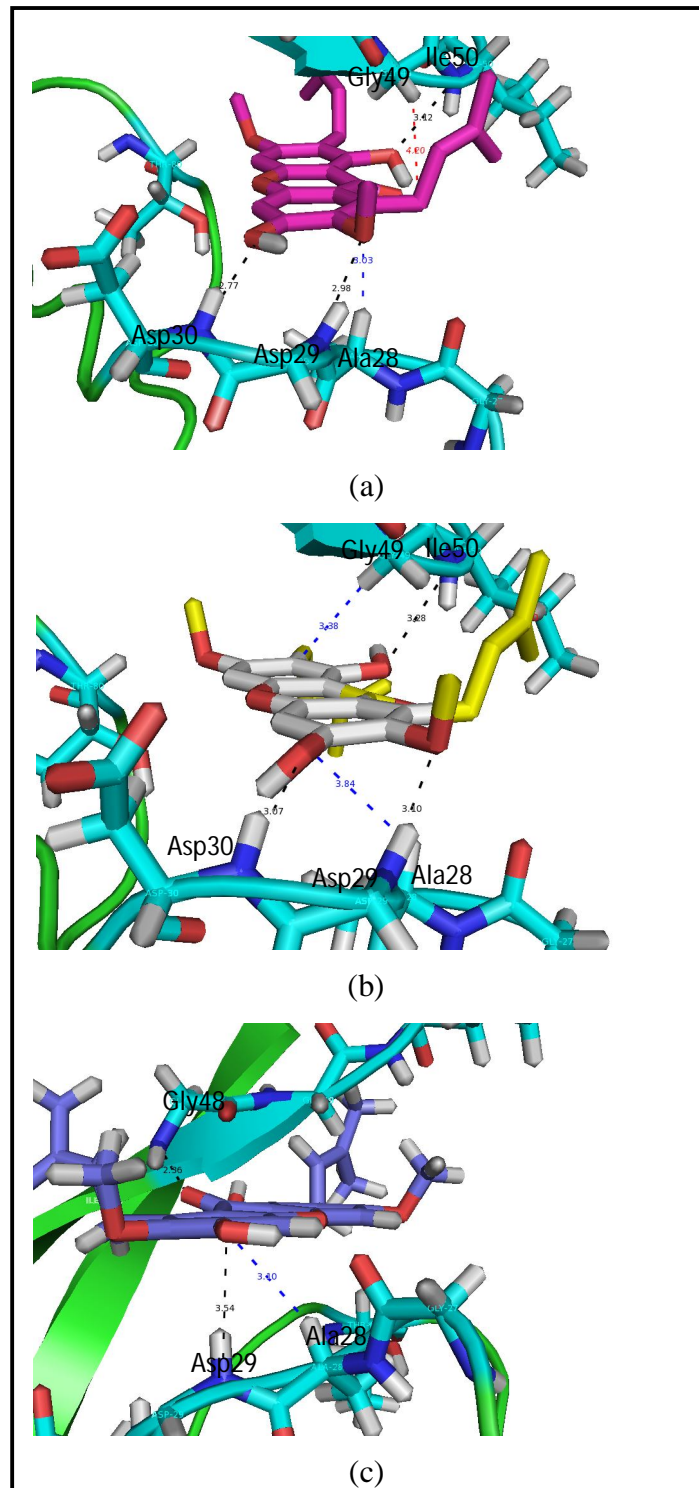
[Sumber: Olahan penulis dengan AutoDock 4, AutoDock Vina, GOLD, & PyMOL]

Keterangan: - - - - Jarak ikatan hidrogen

- - - - Jarak interaksi hidrofobik

- - - - Jarak interaksi van der Waals

Gambar 4.11 Konformasi ikatan α -mangostin pada 1D4H dengan target permukaan makromolekul menggunakan (a) AD4, (b) Vina dan (c) GOLD



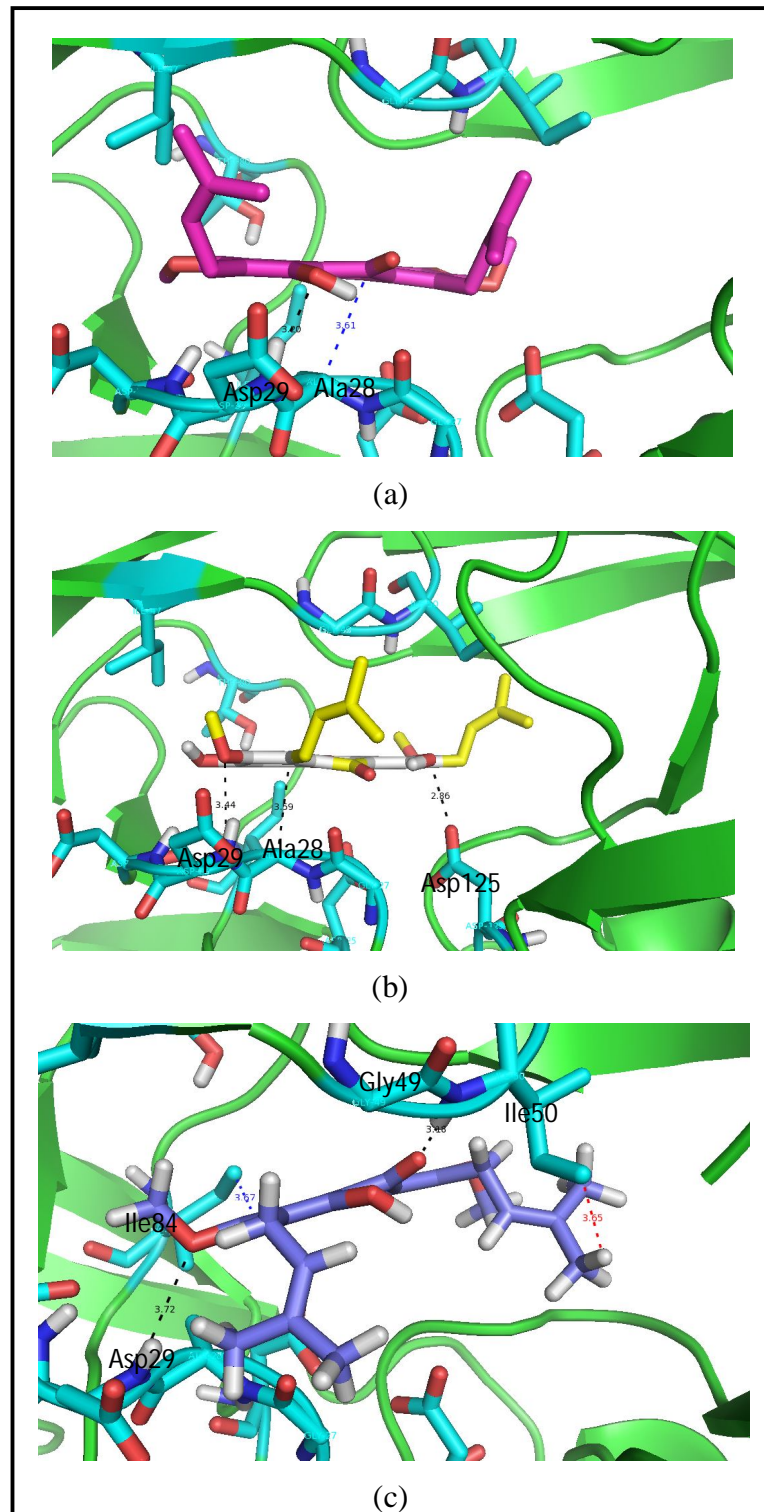
[Sumber: Olahan penulis dengan AutoDock 4, AutoDock Vina, GOLD, & PyMOL]

Keterangan: - - - - Jarak ikatan hidrogen

- - - - Jarak interaksi hidrofobik

- - - - Jarak interaksi van der Waals

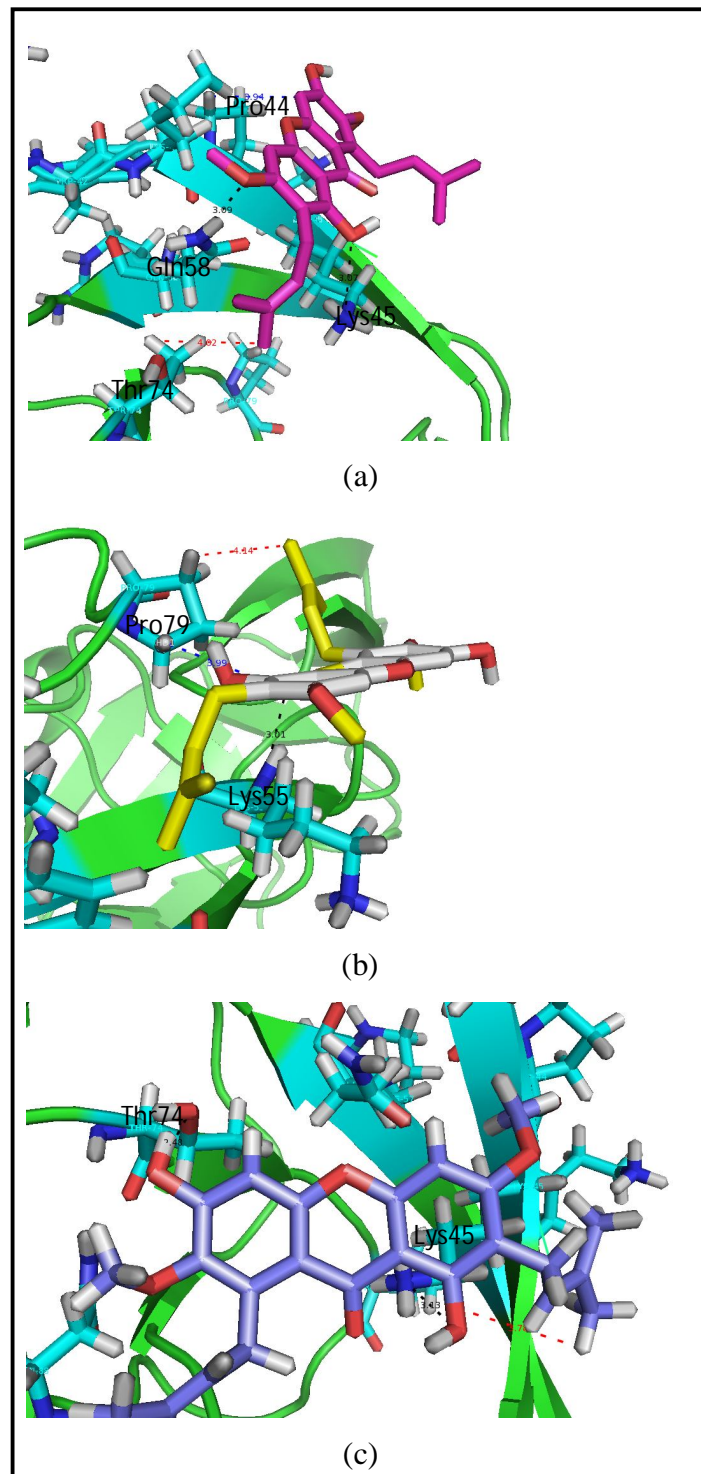
Gambar 4.12 Konformasi ikatan β -mangostin pada 1ZP8 dengan target sisi kantung hidrofobik menggunakan (a) AD4, (b) Vina dan (c) GOLD



[Sumber: Olahan penulis dengan AutoDock 4, AutoDock Vina, GOLD, & PyMOL]

Keterangan: - - - - Jarak ikatan hidrogen
 - - - - Jarak interaksi hidrofobik
 - - - - Jarak interaksi van der Waals

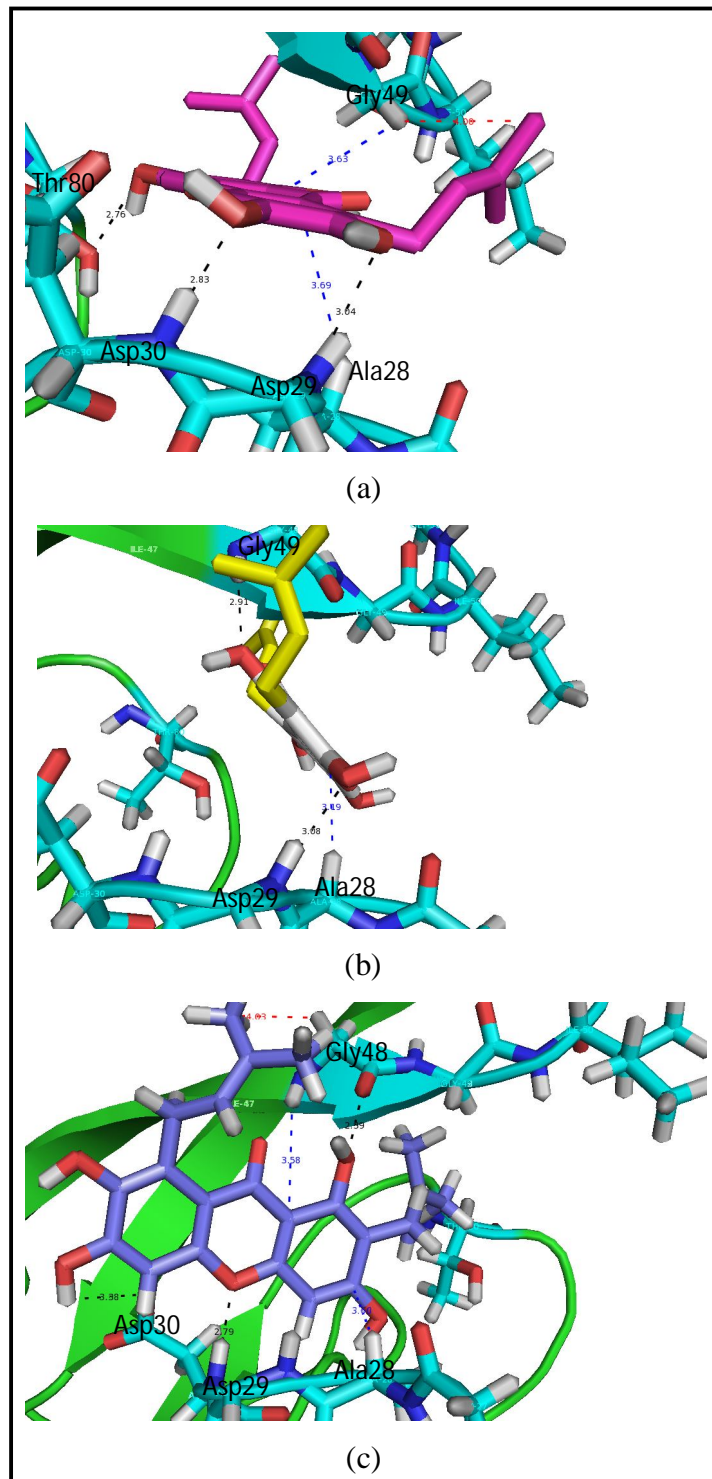
Gambar 4.13 Konformasi ikatan β -mangostin pada 1D4H dengan target kantung hidrofobik menggunakan (a) AD4, (b) Vina dan (c) GOLD



[Sumber: Olahan penulis dengan AutoDock 4, AutoDock Vina, GOLD, & PyMOL]

Keterangan: - - - - Jarak ikatan hidrogen
 - - - - Jarak interaksi hidrofobik
 - - - - Jarak interaksi van der Waals

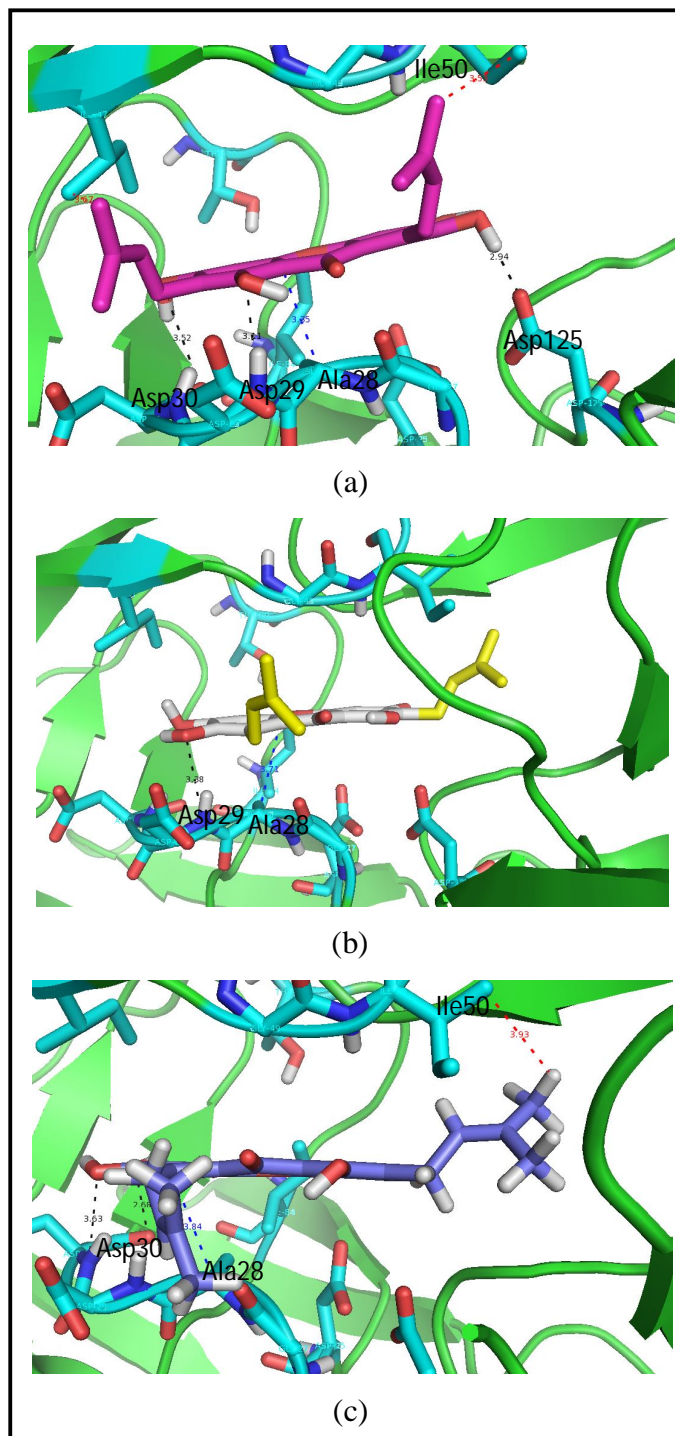
Gambar 4.14 Konformasi ikatan β -mangostin pada 1D4H dengan target permukaan makromolekul menggunakan (a) AD4, (b) Vina dan (c) GOLD



[Sumber: Olahan penulis dengan AutoDock 4, AutoDock Vina, GOLD, & PyMOL]

Keterangan: - - - - Jarak ikatan hidrogen
 - - - - Jarak interaksi hidrofobik
 - - - - Jarak interaksi van der Waals

Gambar 4.15 Konformasi ikatan γ -mangostin pada 1ZP8 dengan target sisi kantung hidrofobik menggunakan (a) AD4, (b) Vina dan (c) GOLD



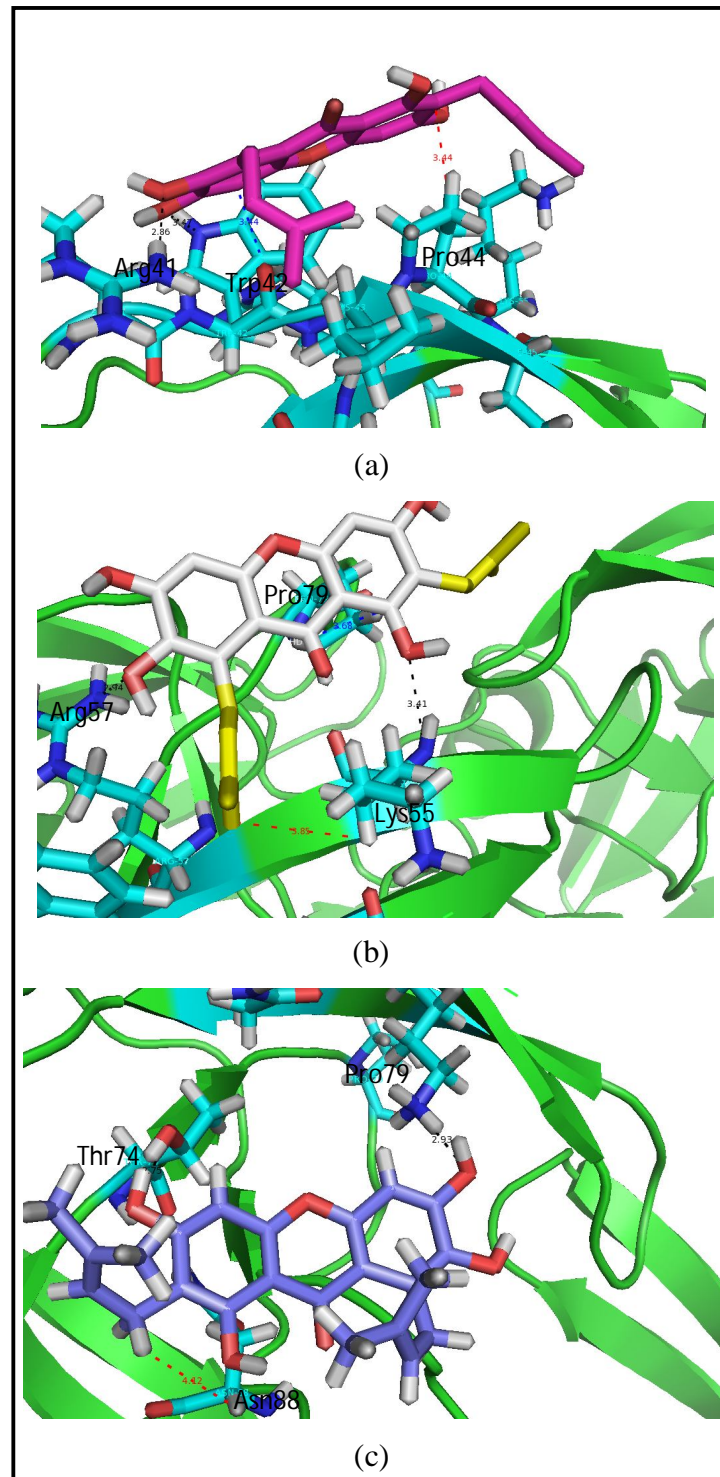
[Sumber: Olahan penulis dengan AutoDock 4, AutoDock Vina, GOLD, & PyMOL]

Keterangan: - - - - Jarak ikatan hidrogen

- - - - Jarak interaksi hidrofobik

- - - - Jarak interaksi van der Waals

Gambar 4.16 Konformasi ikatan γ -mangostin pada 1D4H dengan target kantong hidrofobik menggunakan (a) AD4, (b) Vina dan (c) GOLD



[Sumber: Olahan penulis dengan AutoDock 4, AutoDock Vina, GOLD, & PyMOL]

Keterangan: - - - - Jarak ikatan hidrogen

- - - - Jarak interaksi hidrofobik

- - - - Jarak interaksi van der Waals

Gambar 4.17 Konformasi ikatan γ -mangostin pada 1D4H dengan target permukaan makromolekul menggunakan (a) AD4, (b) Vina dan (c) GOLD

TABEL

Tabel 4.7 Hasil penambatan ligan mangostin pada sisi kantung hidrofobik menggunakan AD 4

Makromolekul	Analog	Percobaan	<i>Best Cluster</i>		<i>Best Energy</i>	
			ΔG (kkal/mol)	K_i (μM)	ΔG (kkal/mol)	K_i (μM)
1ZP8	α - mangostin	1*	-7,5	3,2	-8,12	1,1
		2*	-7,45	3,48	-8,11	1,13
		3	-8,09	1,18	-8,09	1,18
	β - mangostin	1*	-7,35	4,08	-7,38	3,9
		2*	-7,66	2,41	-7,79	1,95
		3*	-7,38	3,87	-7,61	2,65
	γ - mangostin	1	-8,43	0,76	-8,43	0,66
		2	-8,38	0,71	-8,49	0,6
		3	-8,35	0,75	-8,4	0,7
1D4H	α - mangostin	1*	-9,64	0,09	-9,84	0,06
		2*	-9,64	0,09	-9,84	0,06
		3*	-9,64	0,09	-9,83	0,06
	β - mangostin	1*	-9,42	0,12	-9,64	0,09
		2*	-9,4	0,13	-9,66	0,08
		3*	-9,42	0,12	-9,62	0,09
	γ - mangostin	1	-9,89	0,06	-9,89	0,06
		2	-9,88	0,06	-9,88	0,06
		3	-9,88	0,06	-9,88	0,06

Keterangan :

Arsiran biru adalah konformasi yang dipilih

*) Hasil divergen

Tabel 4.8 Hasil penambatan ligan mangostin pada sisi kantung hidrofobik menggunakan Vina

Makromolekul	Analog	Percobaan	ΔG (kkal/mol)
1ZP8	α -mangostin	1	-6,5
		2	-6,5
		3	-6,5
	β -mangostin	1	-6,6
		2	-6,6
		3	-6,6
	γ -mangostin	1	-8,43
		2	-8,49
		3	-8,4
1D4H	α -mangostin	1	-8,7
		2	-8,6
		3	-8,7
	β -mangostin	1	-8,8
		2	-8,8
		3	-8,8
	γ -mangostin	1	-9,3
		2	-9,3
		3	-9,4

Keterangan :

Arsiran biru adalah konformasi yang dipilih

Tabel 4.9 Hasil penambatan ligan mangostin pada sisi kantung hidrofobik menggunakan GOLD

Makromolekul	Analog	Percobaan	GoldScore
1ZP8	α -mangostin	1	43,8434
		2	40,7624
		3	40,4835
	β -mangostin	1	21,7019
		2	13,7447
		3	18,7394
	γ -mangostin	1	32,5137
		2	31,9954
		3	33,8932
1D4H	α -mangostin	1	58,7335
		2	59,891
		3	58,798
	β -mangostin	1	37,2481
		2	31,756
		3	38,1276
	γ -mangostin	1	39,4545
		2	38,952
		3	39,0585

Keterangan :

Arsiran biru adalah konformasi yang dipilih

Tabel 4.10 Hasil penambatan ligan mangostin pada sisi permukaan dengan menggunakan AD4

Makromolekul	Analog	Percobaan	<i>Best Cluster</i>		<i>Best Energy</i>	
			ΔG (kcal/mol)	K_i (μM)	ΔG (kcal/mol)	K_i (μM)
1D4H	α -mangostin	1	-6,06	35,99	-6,06	35,99
		2*	-6,05	36,53	-6,15	30,8
		3	-6,06	36,17	-6,06	36,17
	β -mangostin	1	-5,8	56,35	-5,8	56,35
		2	-5,89	48,04	-5,89	48,04
		3*	-5,51	91,62	-5,76	59,74
	γ -mangostin	1*	-5,81	55,24	-6,39	20,84
		2*	-5,85	51,88	-6,34	22,54
		3*	-5,81	55,07	-6,37	21,43

Keterangan :

Arsiran biru adalah konformasi yang dipilih

*) Hasil divergen

Tabel 4.11 Hasil penambatan ligan mangostin pada sisi permukaan dengan menggunakan Vina

Makromolekul	Analog	Percobaan	ΔG (kcal/mol)
1D4H	α -mangostin	1	-5,3
		2	-5,3
		3	-5,3
	β -mangostin	1	-5,3
		2	-5,3
		3	-5,3
	γ -mangostin	1	-5,9
		2	-5,9
		3	-5,9

Keterangan :

Arsiran biru adalah konformasi yang dipilih

Tabel 4.12 Hasil penambatan ligan mangostin pada sisi permukaan dengan menggunakan GOLD

Makromolekul	Analog	Percobaan	GoldScore
1D4H	α -mangostin	1	17,7444
		2	17,6488
		3	16,9577
	β -mangostin	1	-4,1102
		2	-4,9478
		3	-3,0857
	γ -mangostin	1	3,8957
		2	-2,399
		3	-3,4558

Keterangan :

Arsiran biru adalah konformasi yang dipilih

Tabel 4.13 Ikatan hidrogen yang terjadi pada target penambatan kantung hidrofobik 1ZP8

Analog	Perangkat Lunak	Gugus (Nomor)	(Gugus) Residu	Jarak (Å)
α -mangostin	AD4	-OH (3)	(-HO) Thr80	3,13
		-OH (6)	(-HN) Asp30	2,77
		O (7)	(-HN) Asp29	2,86
	Vina	-OH (3)	(-HO) Thr80	3,21
		-OH (6)	(-HN) Asp30	3,14
		O (7)	(-HN) Asp29	3,21
	GOLD	-HO (6)	(-OC) Gly27	2,32
		O (7)	(-HN) Asp29	3,27
		O Keton	(-HN) Gly48	3,15
β -mangostin	AD4	-OH (1)	(-HN) Ile50	3,12
		-OH (6)	(-HN) Asp30	2,84
		O (7)	(-HN) Asp29	2,98
	Vina	-OH (1)	(-HN) Ile50	3,28
		-OH (6)	(-HN) Asp30	3,07
		O (7)	(-HN) Asp29	3,10
	GOLD	-OH (1)	(-HN) Gly48	2,9
		O (7)	(-HN) Asp29	3,54
	γ -mangostin	AD4	-OH (3)	(-HO) Thr80
-OH (6)			(-HN) Asp30	2,83
-OH (7)			(-HN) Asp29	3,04
Vina		-OH (1)	(-HN) Gly49	2,91
		-OH (3)	(-HN) Asp29	3,08
GOLD		-OH (1)	(-HN) Gly48	2,90
		-HO (6)	(-OC) Asp30	3,38
		O Eter	(-HN) Asp29	2,79

Tabel 4.14 Ikatan hidrogen yang terjadi pada target penambatan kantung hidrofobik 1D4H

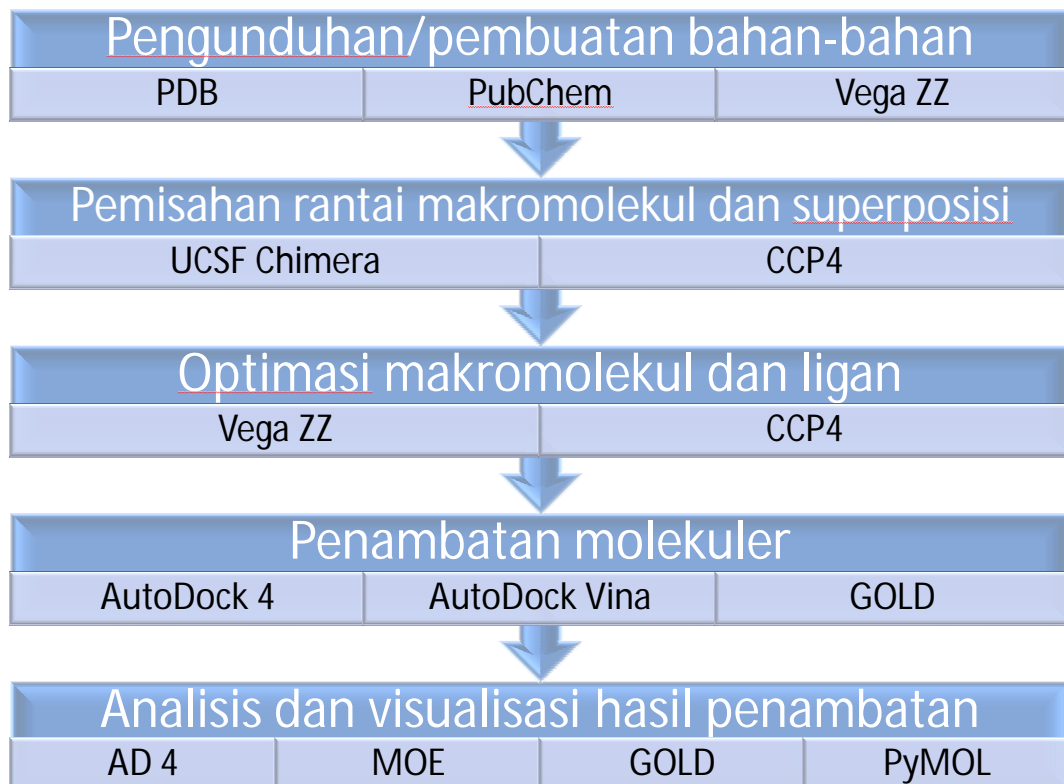
Analog	Perangkat Lunak	Gugus (Nomor)	(Gugus) Residu	Jarak (Å)	
α -mangostin	AD4	-HO (1)	(-OC) Asp29	2,88	
		-HO (3)	(-OC) Asp30	2,79	
		-OH (6)	(-HN) Asp25	2,92	
	Vina	-OH (1)	(-HC) Asp125	3,14	
		GOLD	-HO (1)	(-OC) Asp29	2,77
			-HO (3)	(-OC) Asp30	3,02
-HO (6)	(-OC) Asp25		2,88		
β -mangostin	AD4	-OH (1)	(-HN) Asp29	3,20	
		-HO (1)	(-OC) Asp125	2,86	
	Vina	-O (7)	(-HN) Asp29	3,44	
		GOLD	O Keton	(-HN) Ile50	3,18
			O (3)	(-HN) Asp29	3,72
	γ -mangostin	AD4	-OH (1)	(-HN) Asp29	3,11
-HO (3)			(-OC) Asp30	3,52	
-HO (7)			(-OC) Asp125	2,94	
Vina		-OH (7)	(-HN) Asp29	3,38	
		GOLD	-HO (6)	(-OC) Asp30	2,68
			-OH (7)	(-HN) Asp30	3,63

Tabel 4.15 Ikatan hidrogen yang terjadi pada target penambatan sisi permukaan
1D4H

Analog	Perangkat Lunak	Gugus (Nomor)	(Gugus) Residu	Jarak (Å)
α -mangostin	AD4	-OH (1)	(-HN) Lys45	3,23
		-OH (3)	(-HN) Gln58	3,12
	Vina	-OH (1)	(-HN) Lys55	3,29
		-HO (6)	(-OC) Thr74	
		O (7)	(-HN) Arg-57	2,82
	GOLD	O Keton	(-HN) Lys45	2,50
O Eter		(-HN) Gln58	2,85	
β -mangostin	AD4	-OH (1)	(-HN) Lys45	3,07
		-O (3)	(-HN) Gln58	3,09
	Vina	O keton	(-HN) Lys55	3,01
	GOLD	-OH (1)	(-HN) Lys45	3,13
		-OH (6)	(-OH) Thr74	2,48
γ -mangostin	AD4	-OH (6)	(-HN) Trp42	3,47
		-OH (7)	(-HN) Arg41	2,86
	Vina	-OH (1)	(-HN) Arg57	2,94
		-OH (3)	(-HN) Lys55	3,41
	GOLD	-OH (3)	(-HO) Thr74	2,75
		-OH (6)	(-HN) Pro79	2,93

LAMPIRAN

Lampiran 1 Skema kerja



Lampiran 2 Tampilan situs *Protein Data Bank*

The screenshot displays the Protein Data Bank (PDB) website interface. The browser title is "RCSB PDB : Structure Summary for 1OHR - VIRACEPT (R) (NELFINAVIR MESYLATE, AG1343): A POTENT ORALLY BIOAVAILABLE INHIBITOR OF HIV-1 PROTEASE - Mozilla Firefox". The address bar shows the URL: "file:///C:/skripsi/240510/1OHR/RCSB PDB _ Structure Summary for 1OHR - VIRACEPT (R) (NELFINAVIR MESYLATE, AG1343)_ A POTENT ORALLY".

The PDB logo is prominently displayed at the top left, with the tagline "An Information Portal to Biological Macromolecular Structures". Below the logo, it states "As of Tuesday May 18, 2010 at 5 PM PDT there are 65378 Structures" and provides a link to "PDB Statistics".

The main content area is titled "1OHR" and "VIRACEPT (R) (NELFINAVIR MESYLATE, AG1343): A POTENT ORALLY BIOAVAILABLE INHIBITOR OF HIV-1 PROTEASE". The DOI is listed as "10.2210/pdb1ohr/pdb".

Navigation tabs include: Summary (selected), Derived Data, Sequence, Seq. Similarity, 3D Similarity, Literature, Biol. & Chem., Methods, Geometry, and Links.

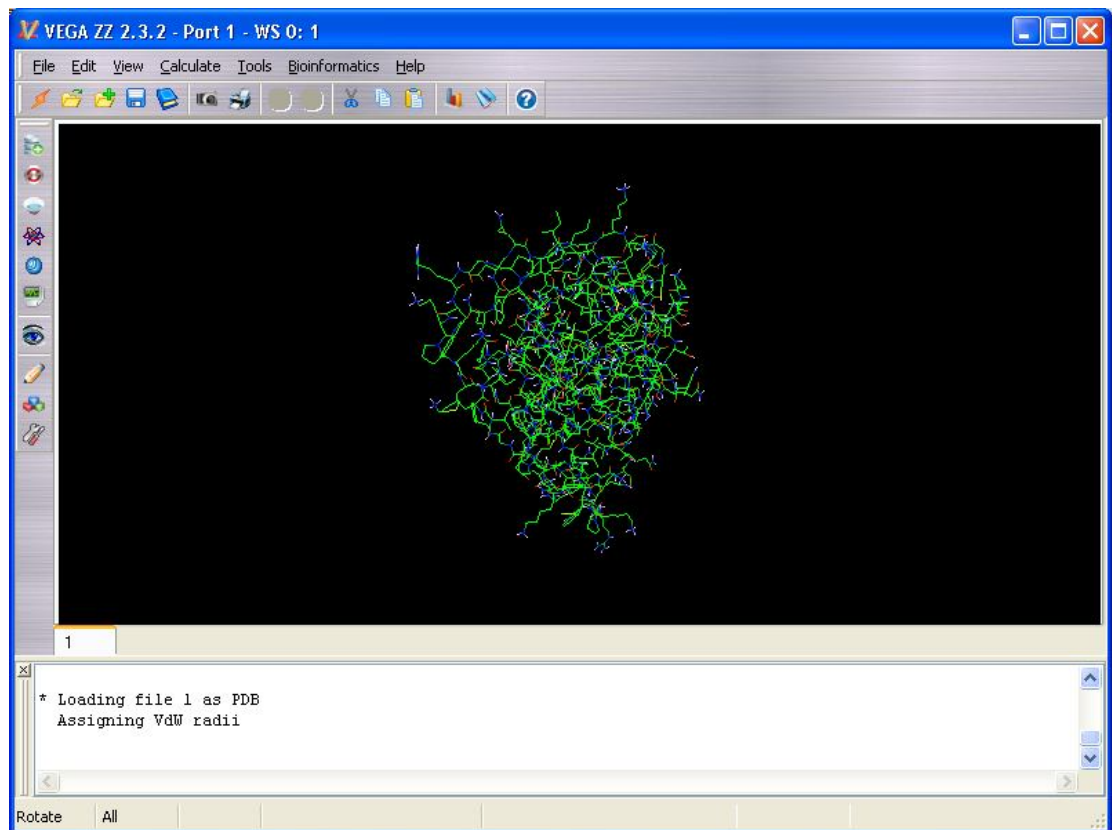
Key information displayed includes:

- Primary Citation:** A search bar with a magnifying glass icon.
- Related Citations in PDB Entry (REMARK 1):** A section with a "Hide" button.
- Molecular Description:**
 - Classification:** Aspartyl Protease
 - Structure Weight:** 22175.38
 - Molecule:** ASPARTYLPROTEASE
 - Polymer:** 1, Type: polypeptide(L)
 - Chains:** A, B
 - Length:** 99

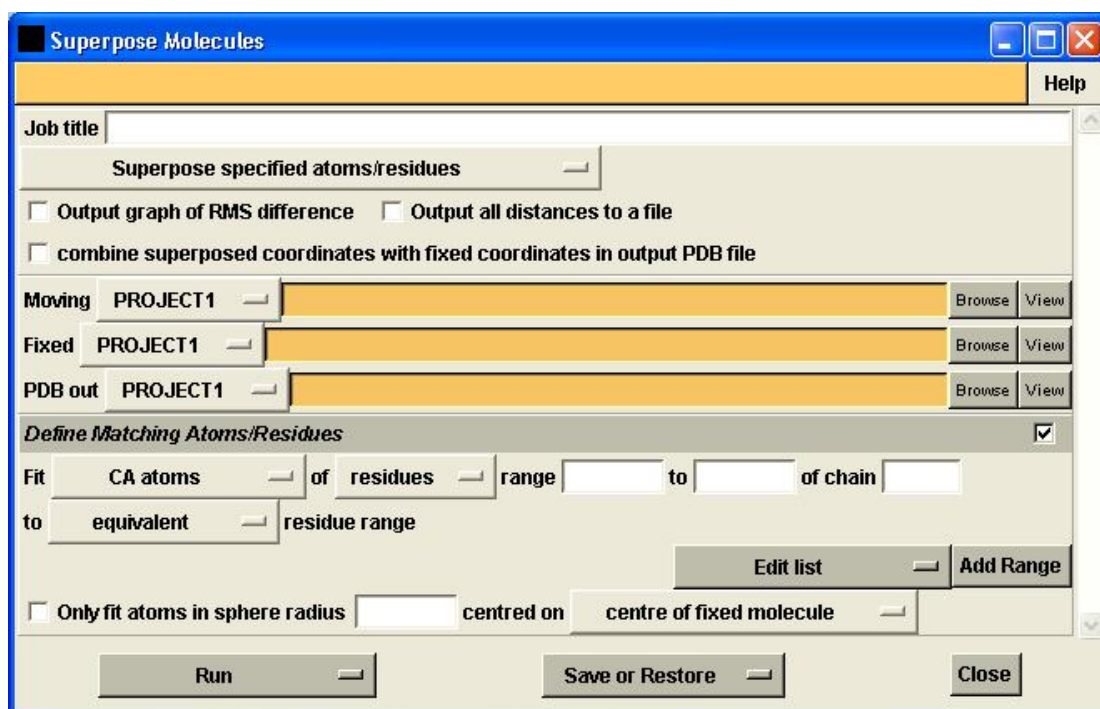
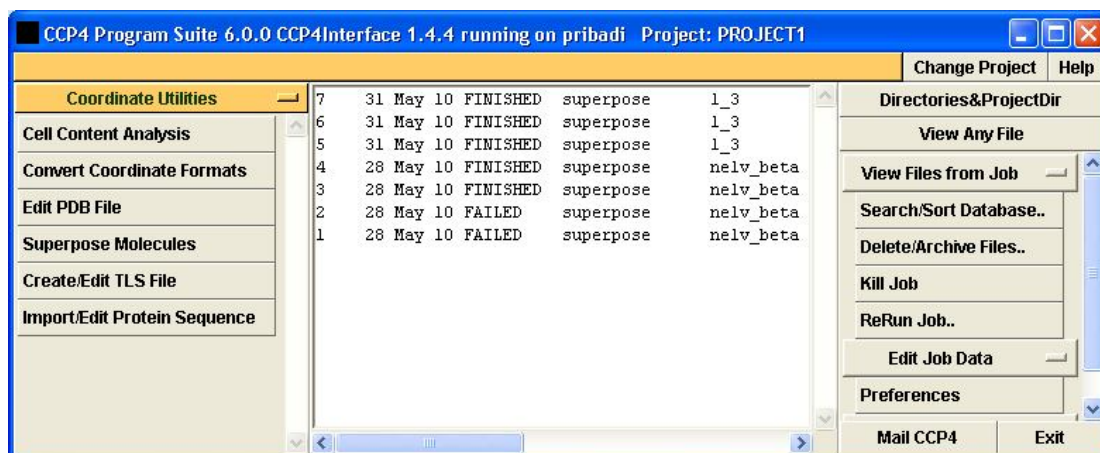
On the right side, there are options to "Display Files", "Download Files", "Print this Page", and "Share this Page".

The left sidebar contains navigation links for Home, Deposition, and Search, each with a "Hide" button. The "Home" section includes links for News & Publications, Usage/Reference Policies, Deposition Policies, Website FAQ, Deposition FAQ, Contact Us, About Us, Careers, and New Website Features. The "Deposition" section includes links for All Deposit Services, Electron Microscopy, X-ray | NMR, Validation Server, BioSync Beamline, and Related Tools. The "Search" section includes links for Advanced Search, Latest Release, and Latest Publications.

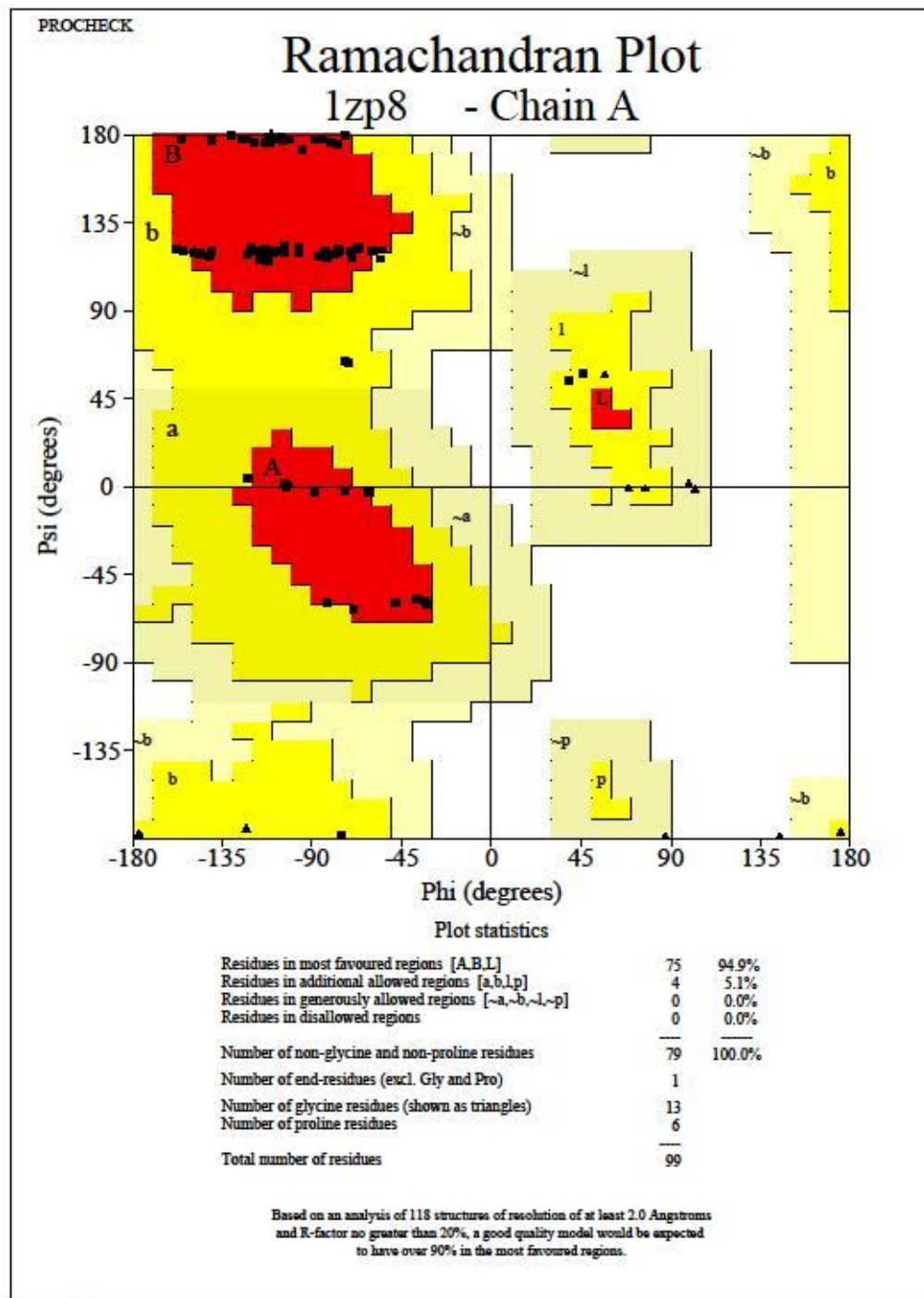
Lampiran 3 Tampilan perangkat lunak Vega ZZ



Lampiran 4 Tampilan perangkat lunak CCP4

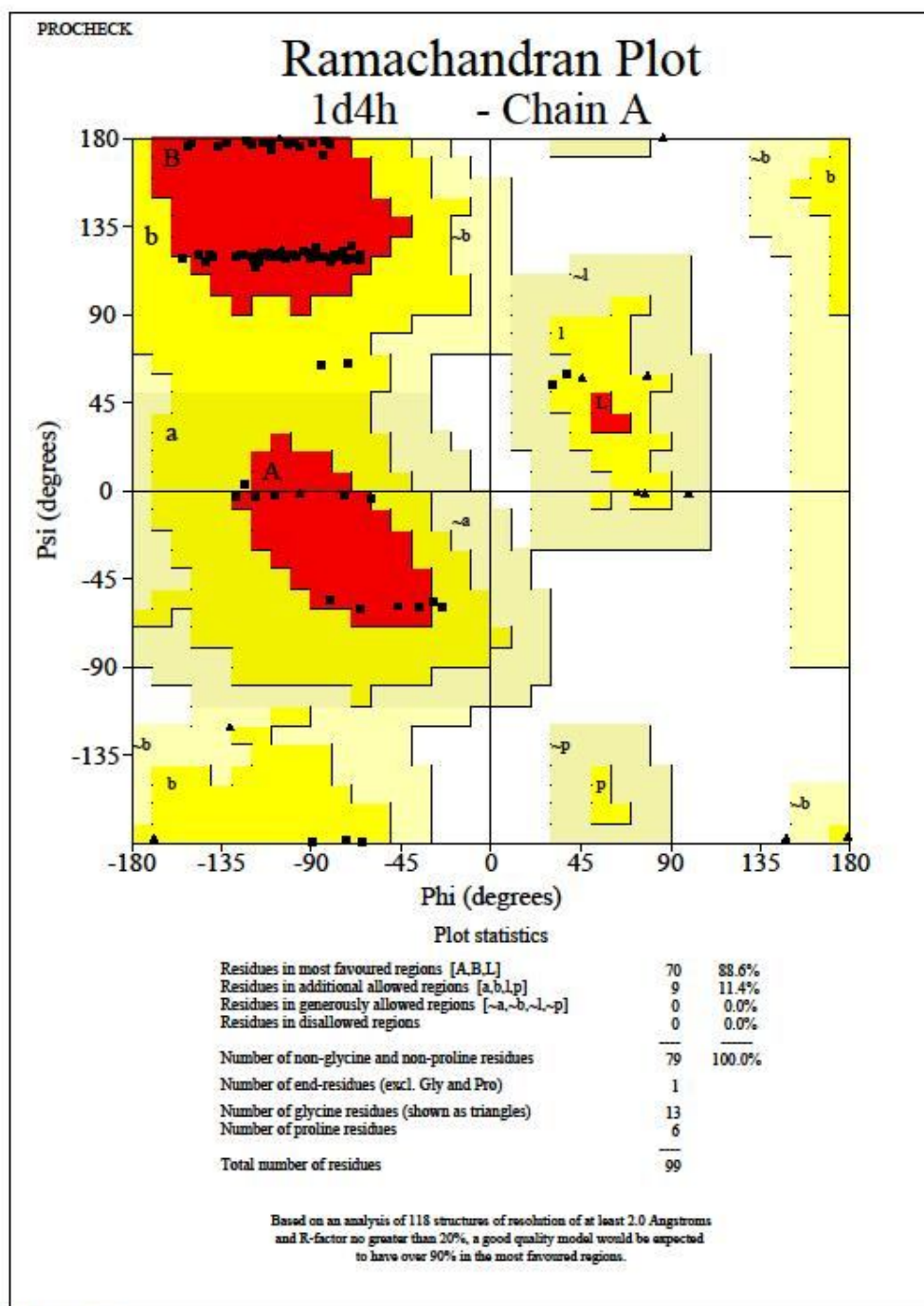


Lampiran 5 Plot Ramachandran 1ZP8



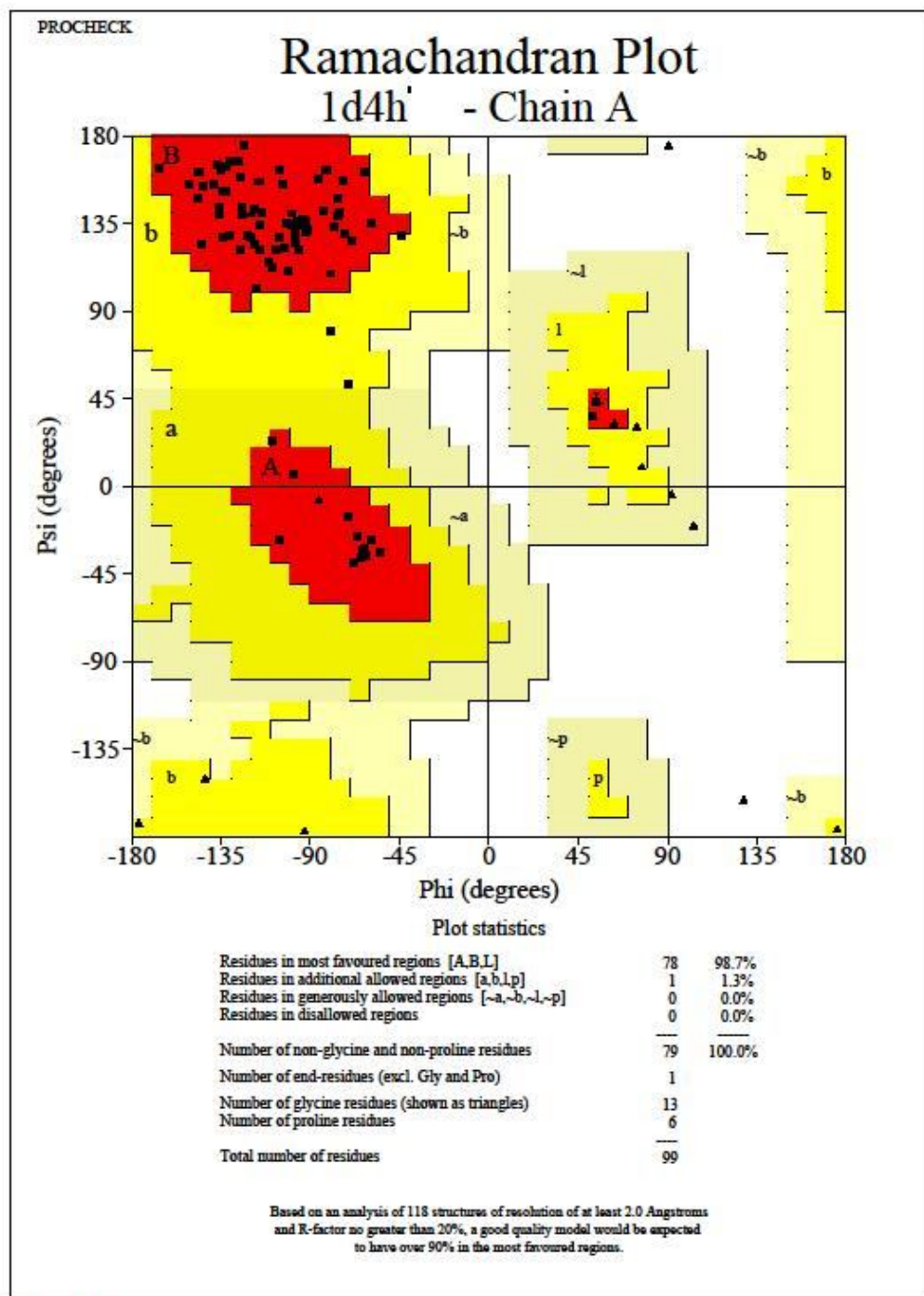
1zp8 _01.ps

Lampiran 6 Plot Ramachandran 1D4H setelah minimisasi



1d4h _01.ps

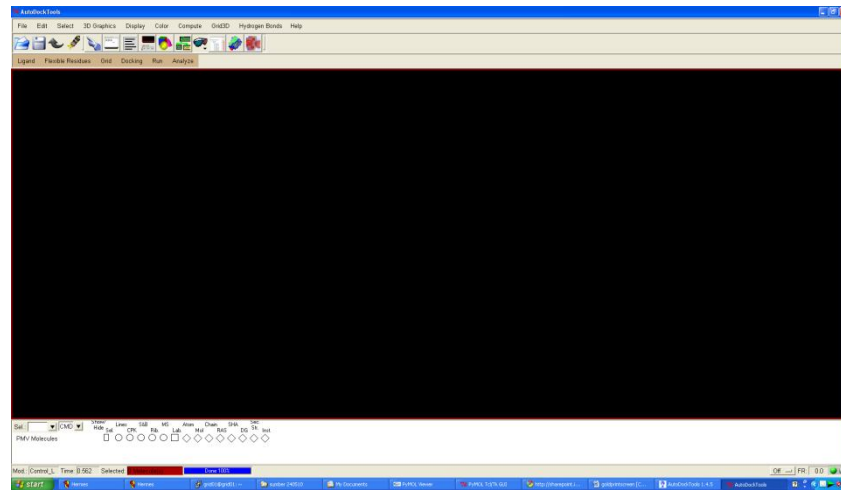
Lampiran 7 Plot Ramachandran 1D4H sebelum minimisasi



1d4h' _01.ps

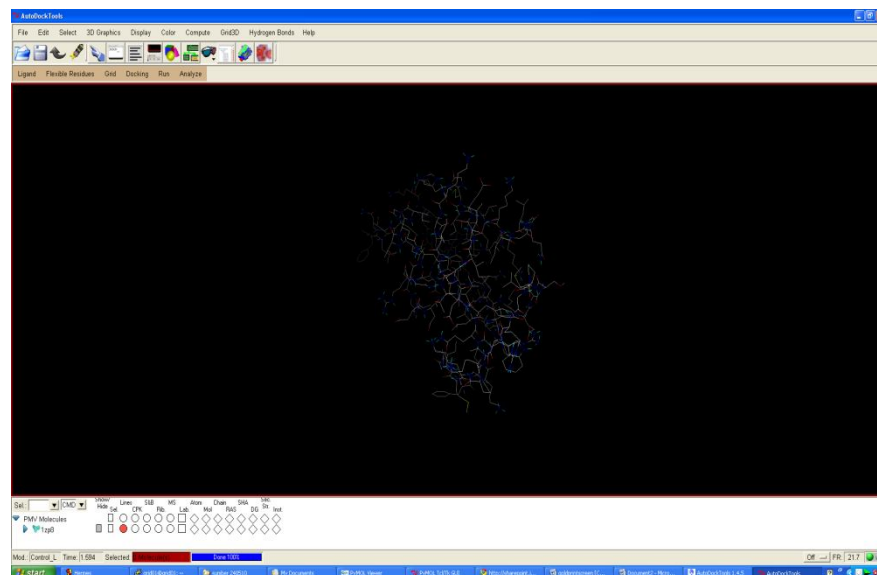
Lampiran 8 Manual penggunaan AutoDock4

1. Buka aplikasi AutoDock Tools 1.4.5



2. Pilih opsi Grid > Macromolecule > Open

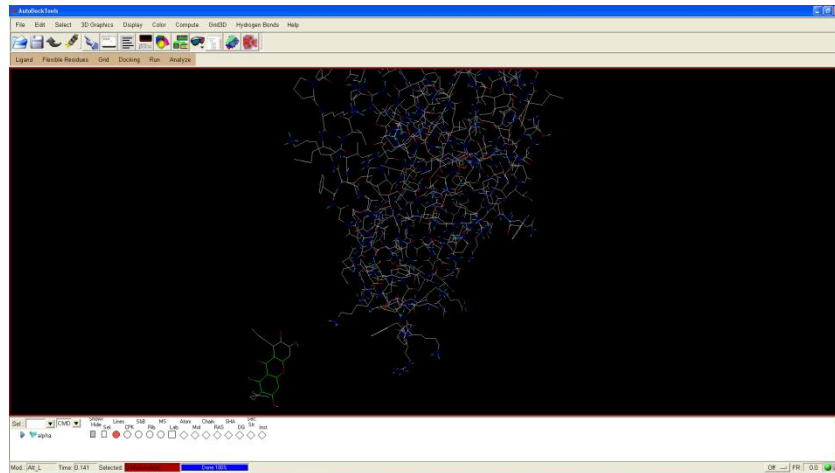
Akan terbuka pilihan untuk menyimpan berkas dalam format .pdbqt >
save



3. Setelah berkas makromolekul dibuka, pilih opsi Ligand > Input > Open

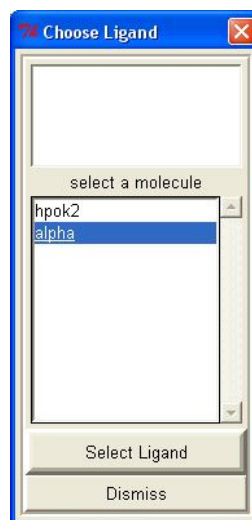
(Lanjutan)

Kemudian simpan berkas ligan dalam format .pdbqt dengan memilih opsi Ligand > Output > Save as pdbqt > Save



4. Pengaturan berkas GPF

a. Pilih opsi Grid > Set Map Type > Choose Ligand > Select Ligand

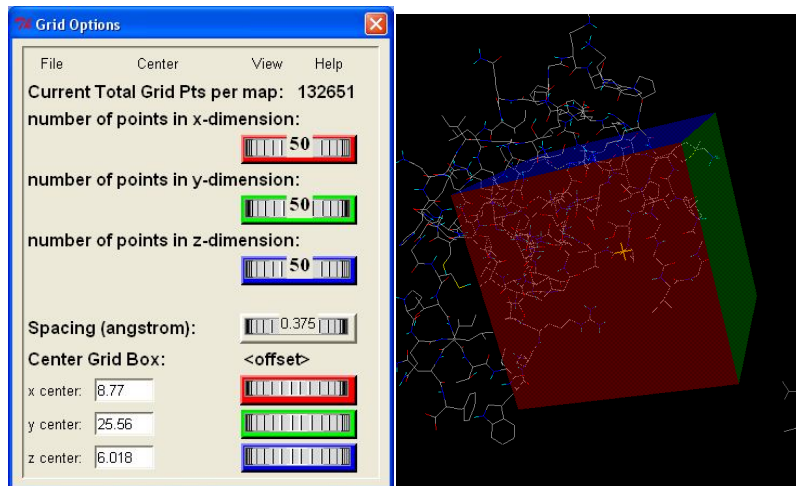


b. Pilih opsi Grid > Grid Box..

(Lanjutan)

Tentukan parameter-parameter batas kotak kemudian klik File > Close

Saving Current



c. Pilih opsi Grid > Output > Save GPF...

d. Buka aplikasi cygwin kemudian cari direktori di mana berkas gpf tersimpan dengan mengetik perintah:

`cd <direktori yang dituju>`

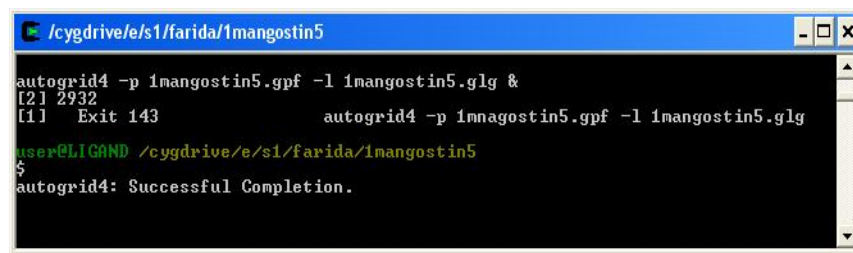


e. Ketik perintah kalkulasi autogrid dengan mengetik:

`autogrid4 -p <file>.gpf -l <file>.glg &`

Tunggu hingga kalkulasi selesai dijalankan

(Lanjutan)



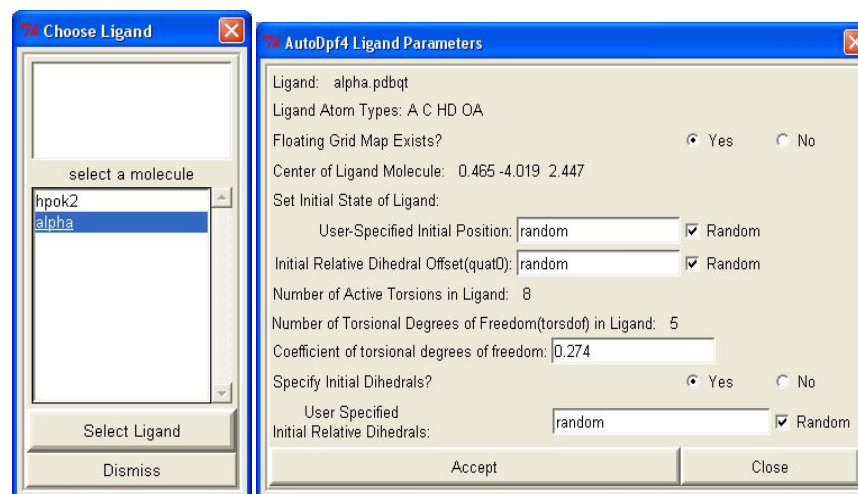
```

/cygdrive/e/s1/farida/1mangostin5
autogrid4 -p 1mangostin5.gpf -l 1mangostin5.glg &
[2] 2932
[1] Exit 143          autogrid4 -p 1mangostin5.gpf -l 1mangostin5.glg
user@LIGAND /cygdrive/e/s1/farida/1mangostin5
$
autogrid4: Successful Completion.

```

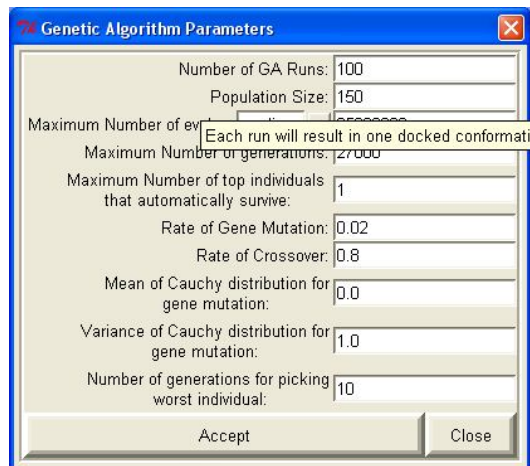
5. Pengaturan berkas DPF

- a. Buka kembali tampilan AutoDock Tools. Pilih opsi Docking > Macromolecule > Set Rigid File name > pilih Makromolekul > Open
- b. Pilih opsi Docking > Ligand > Choose > Select ligand > atur Ligand Parameter > Accept

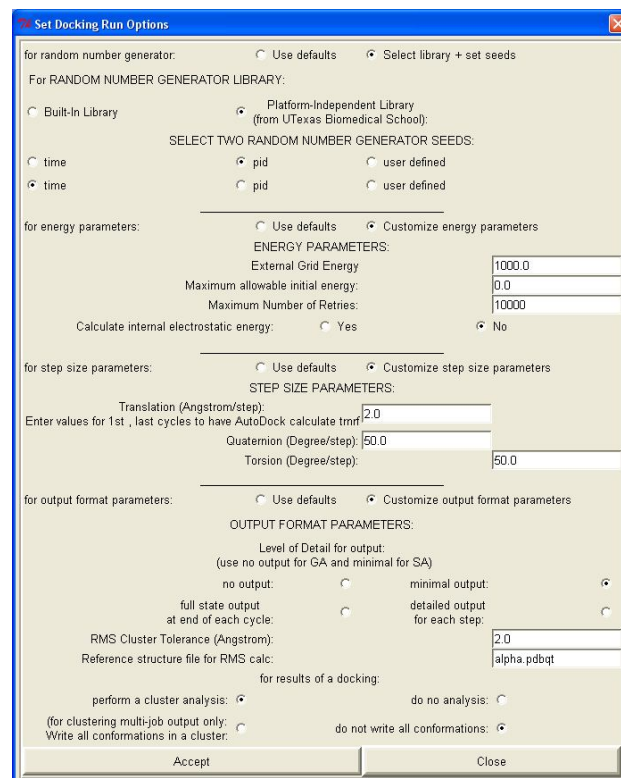


- c. Pilih opsi Docking > Search Parameter > Genetic Algorithm > Atur Parameter > Accept

(Lanjutan)



d. Pilih opsi Docking > Docking Parameter > atur parameter > Accept



e. Buka kembali tampilan Cygwin. Ketik perintah :
`autogrid4 -p <file>.dpf -l <file>.dlg &`

(Lanjutan)

Tunggu hingga perintah selesai dijalankan.

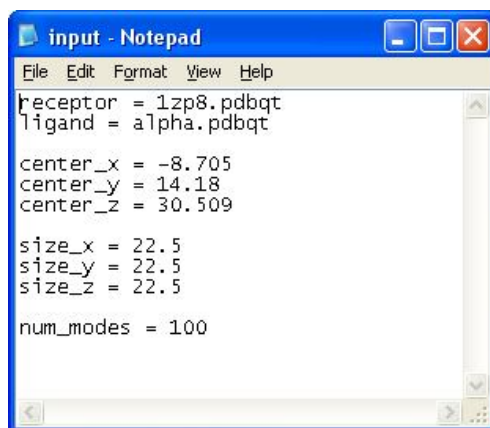


```
/cygdrive/e/s1/farida/1mangostin5
$ autodock4 -p 1mangostin5_dock.dpf -l 1mangostin5_dock.dlg &
[1] 3364
user@LIGAND /cygdrive/e/s1/farida/1mangostin5
$
autodock4: Successful Completion on "LIGAND"
```

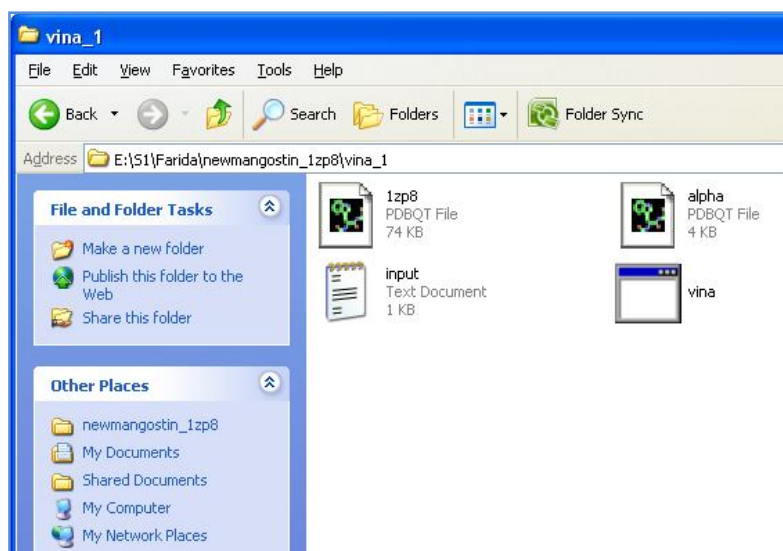
Lampiran 9 Manual penggunaan AutoDock Vina

1. Pembuatan *folder* berisi berkas yang diperlukan dalam penambatan.

- a. Pada aplikasi notepad, ketik pengaturan parameter. File > Save



- b. Kumpulkan berkas-berkas dalam satu *folder*: makromolekul.pdbqt, ligan.pdbqt, input pengaturan parameter, dan aplikasi vina.

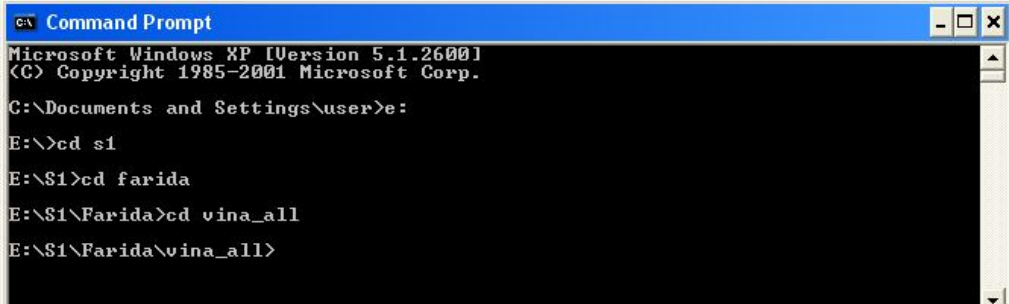


2. Proses kalkulasi penambatan

(Lanjutan)

- a. Buka aplikasi command prompt kemudian cari direktori di mana *folder* tersimpan dengan mengetik perintah:

`cd <direktori>`

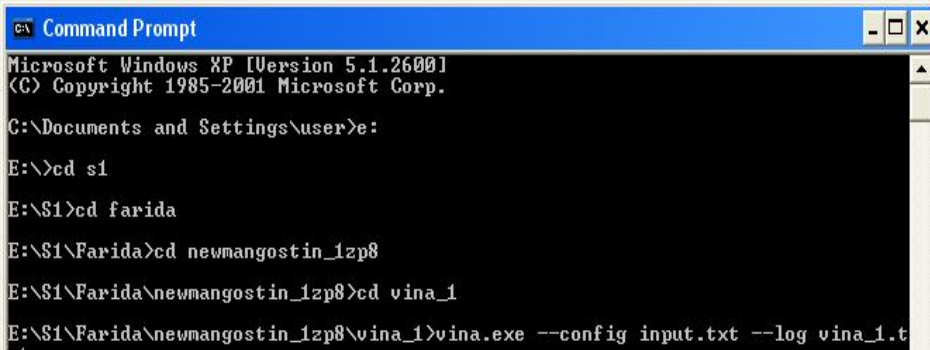


```
Command Prompt
Microsoft Windows XP [Version 5.1.2600]
(C) Copyright 1985-2001 Microsoft Corp.

C:\Documents and Settings\user>e:
E:\>cd s1
E:\S1>cd farida
E:\S1\Farida>cd vina_all
E:\S1\Farida\vina_all>
```

- b. Ketik perintah kalkulasi penambatan:

`vina.exe -config <input parameter>.txt -log <berkas
keluaran>.txt`



```
Command Prompt
Microsoft Windows XP [Version 5.1.2600]
(C) Copyright 1985-2001 Microsoft Corp.

C:\Documents and Settings\user>e:
E:\>cd s1
E:\S1>cd farida
E:\S1\Farida>cd newmangostin_1zp8
E:\S1\Farida\newmangostin_1zp8>cd vina_1
E:\S1\Farida\newmangostin_1zp8\vina_1>vina.exe --config input.txt --log vina_1.t
xt
```

- c. Proses kalkulasi akan berjalan.

(Lanjutan)

```

c:\ Command Prompt - vina.exe --config input.txt --log vina_1.txt
E:\S1\Farida\newmangostin_1zp8\vina_1>vina.exe --config input.txt --log vina_1.t
xt
#####
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite: #
# #
# O. Trott, A. J. Olson, #
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking #
# with a new scoring function, efficient optimization and #
# multithreading, Journal of Computational Chemistry (2009) #
# #
# DOI 10.1002/jcc.21334 #
# #
# Please see http://vina.scripps.edu for more information. #
#####

Output will be alpha_out.pdbqt
Detected 4 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: 1969265220
Performing search ...
0% 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100%
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|*****|

```

- d. Tunggu hingga kalkulasi selesai, akan muncul seluruh data hasil penambatan.

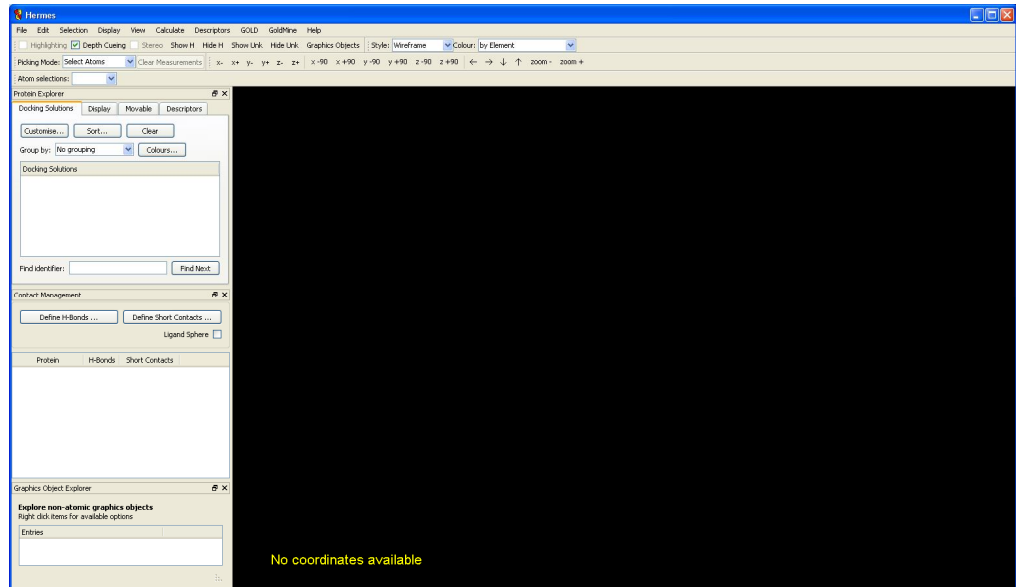
```

c:\ Command Prompt
74 -4.8 4.341 9.011
75 -4.7 2.961 7.818
76 -4.7 3.415 5.126
77 -4.7 3.678 7.787
78 -4.7 2.551 8.146
79 -4.7 4.159 6.535
80 -4.7 2.995 8.657
81 -4.6 4.396 9.804
82 -4.6 8.417 9.784
83 -4.6 3.269 5.586
84 -4.6 3.203 5.926
85 -4.6 4.652 7.350
86 -4.6 2.964 9.484
87 -4.6 3.104 6.323
88 -4.5 3.210 3.986
89 -4.5 5.024 8.104
90 -4.5 6.422 8.000
91 -4.4 3.103 5.851
92 -4.4 3.720 7.414
93 -4.4 6.076 8.440
94 -4.4 3.772 8.203
95 -4.4 6.813 8.621
96 -4.4 3.908 7.691
97 -4.4 4.673 8.164
98 -4.3 6.768 9.915
99 -4.3 3.909 8.588
100 -4.3 3.794 5.447
Writing output ... done.
E:\S1\Farida\newmangostin_1zp8\vina_1>

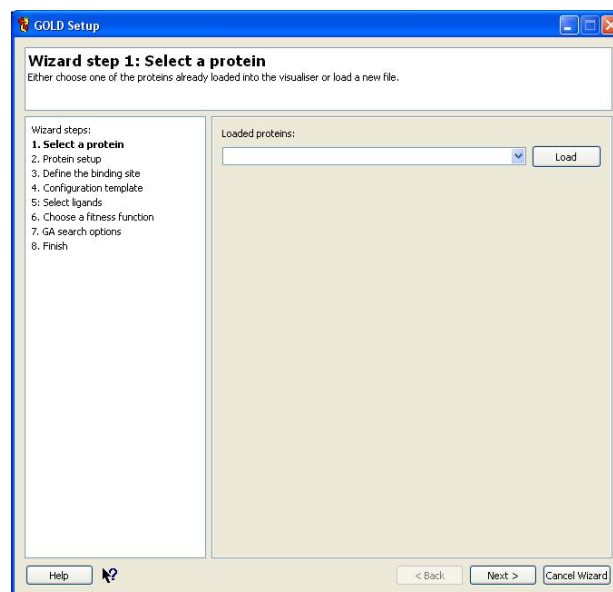
```

Lampiran 10 Manual penggunaan perangkat lunak GOLD

1. Buka aplikasi GOLD



2. Pilih opsi GOLD > Wizard. Akan muncul tampilan *wizard* dari GOLD.

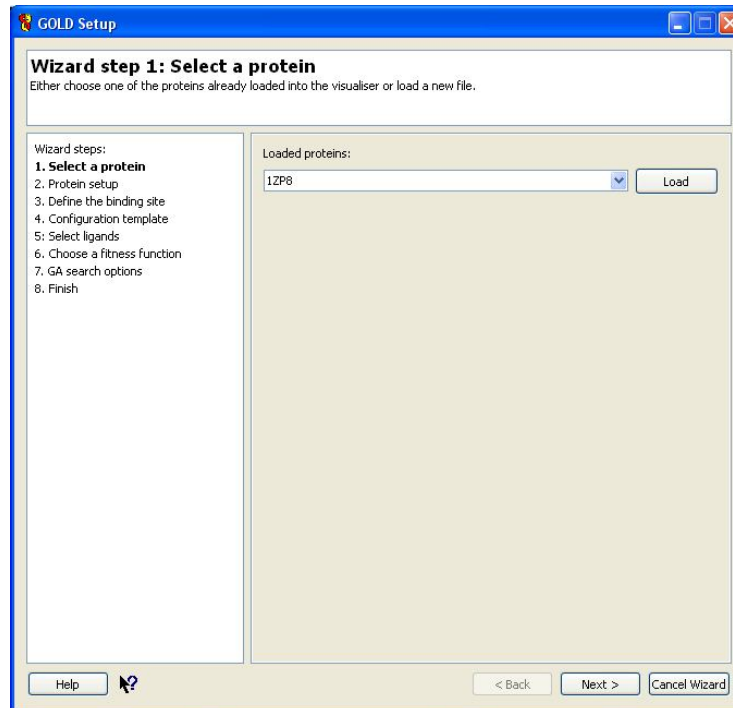


(Lanjutan)

3. Proses persiapan penambatan

a. Muncul tampilan langkah 1: Pemilihan protein

Klik Load > Pilih makromolekul > Open > Next



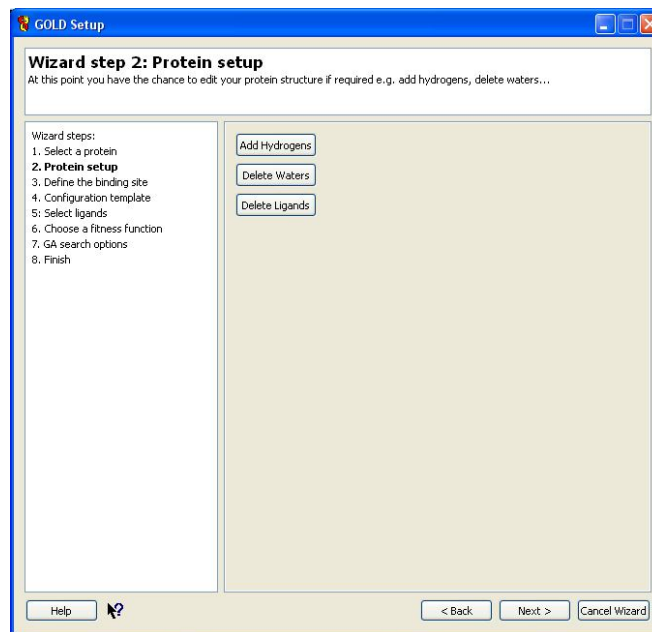
b. Muncul tampilan langkah 2: Pengaturan protein

Atur pengaturan protein dengan memilih:

- Add Hydrogens untuk penambahan atom hydrogen
- Delete Waters untuk menghulangkan molekul air
- Delete Ligands untuk menghilangkan ligan-ligan atau residu nonstandard lain

Klik Next

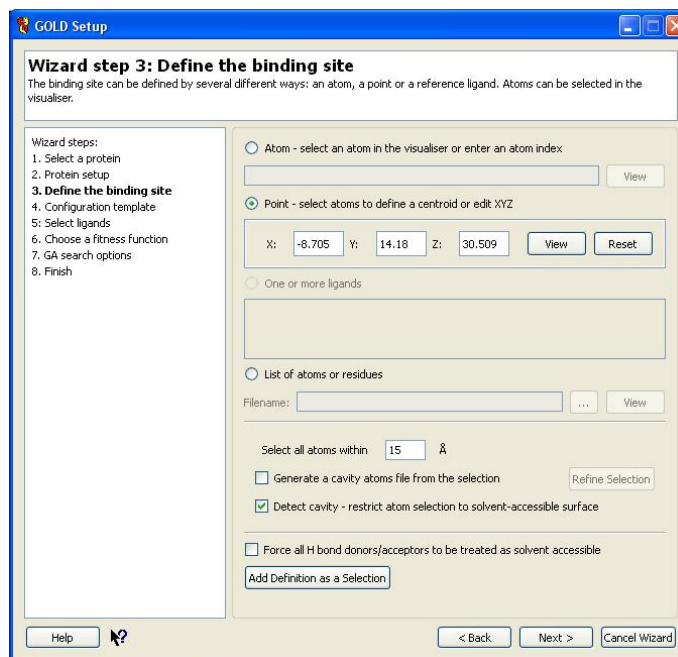
(Lanjutan)



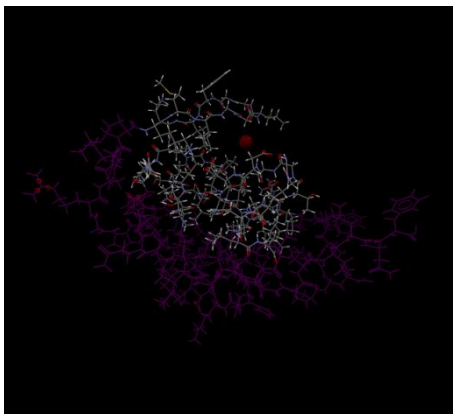
c. Muncul tampilan langkah 3: Penentuan sisi aktif

Pilih opsi Point > tentukan koordinat > atur radius speriks pada opsi

Select all atoms within > View > Next

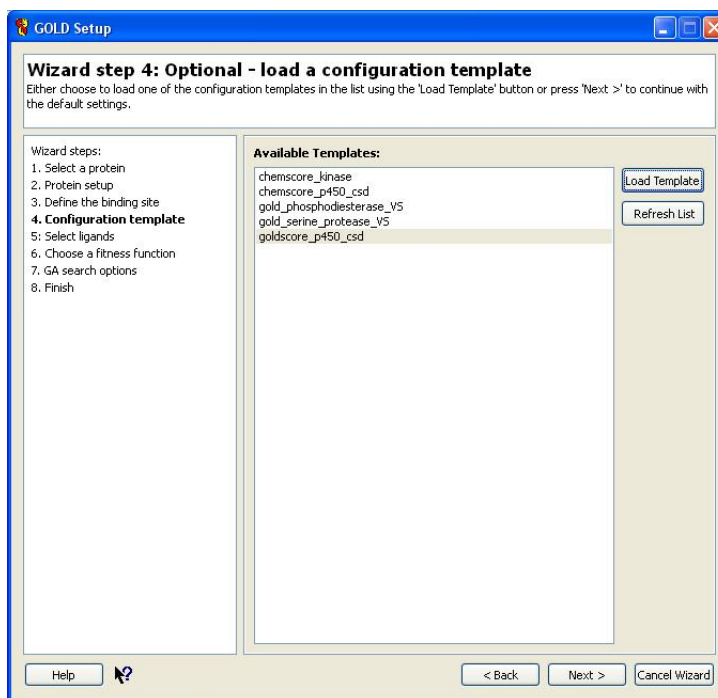


(Lanjutan)



d. Muncul tampilan langkah 4: Pemilihan cetakan (*template*)

Pilih opsi goldscore_p450_csd > Load Template > Next



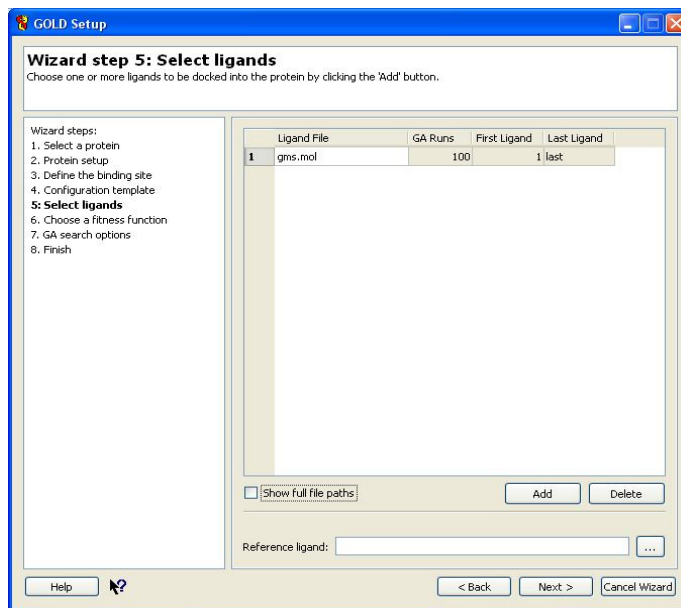
e. Muncul tampilan langkah 5: Pemilihan ligan

Klik Add > pilih ligan > Open

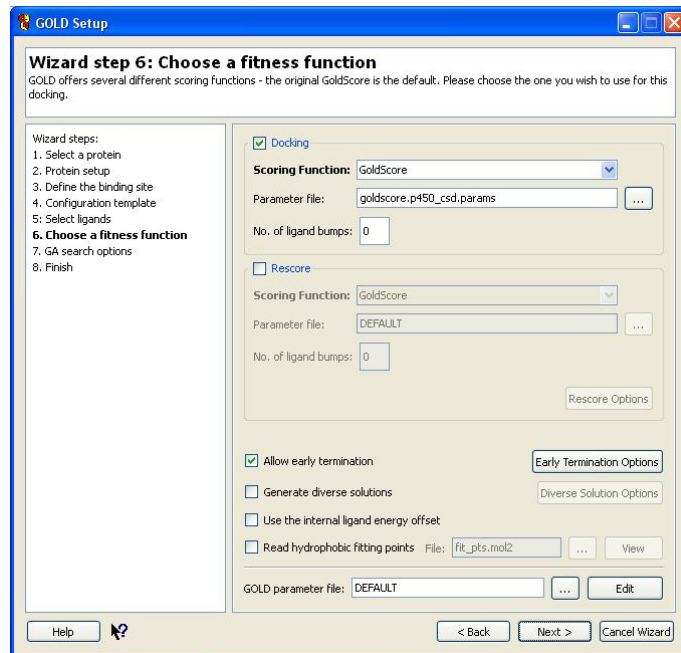
Atur jumlah GA = 100

Klik Next

(Lanjutan)

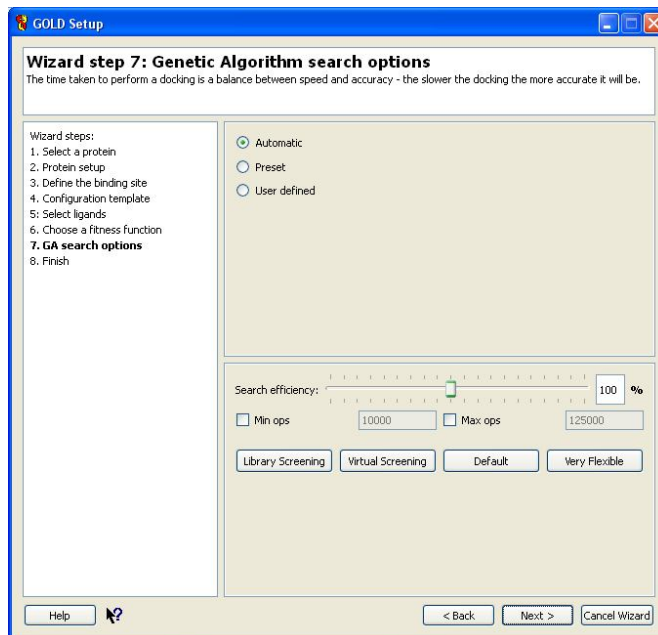


- f. Muncul tampilan langkah 6: Pemilihan fungsi skor
Pilih GoldScore (sesuai *default*) > Next

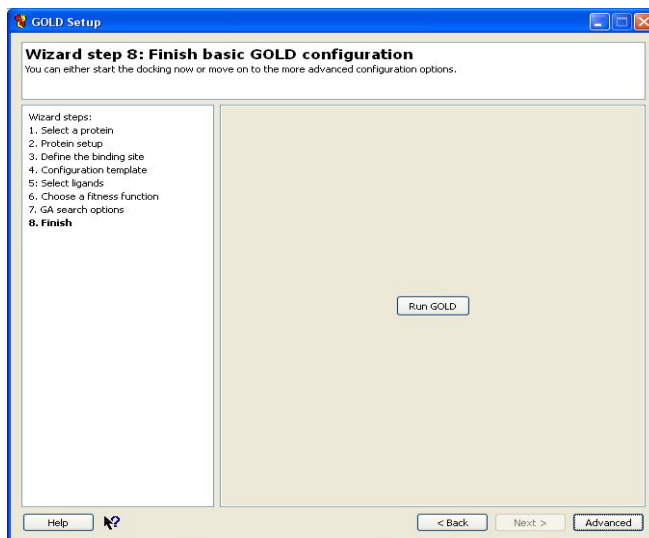


(Lanjutan)

- g. Muncul tampilan langkah 7: Pengaturan *Genetic Algorithm*
Pilih Automatic (sesuai *default*) > Next



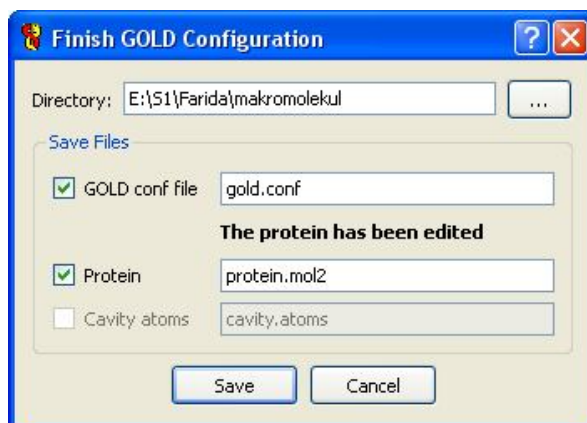
- h. Muncul tampilan langkah 8: Konfigurasi final
Klik Run GOLD



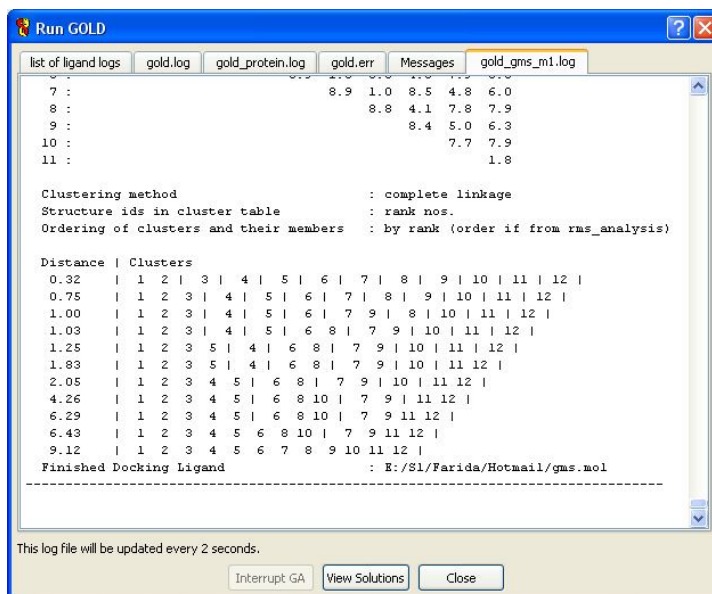
(Lanjutan)

4. Proses penambatan

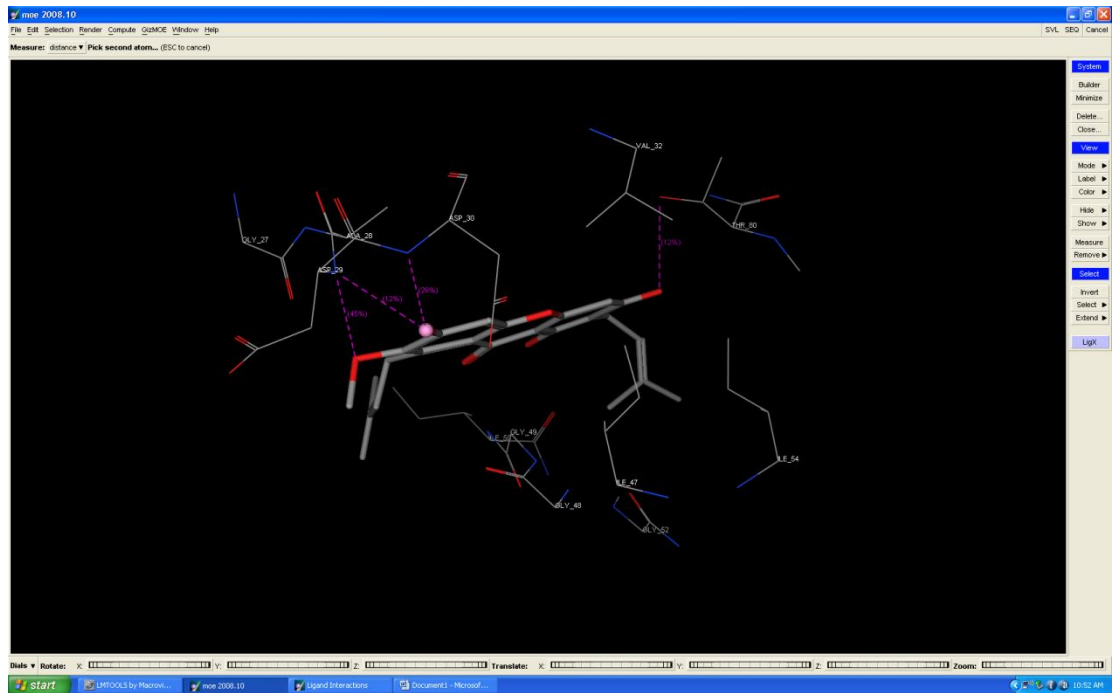
Setelah pemilihan opsi Run GOLD akan muncul opsi pemilihan direktori penyimpanan > Save



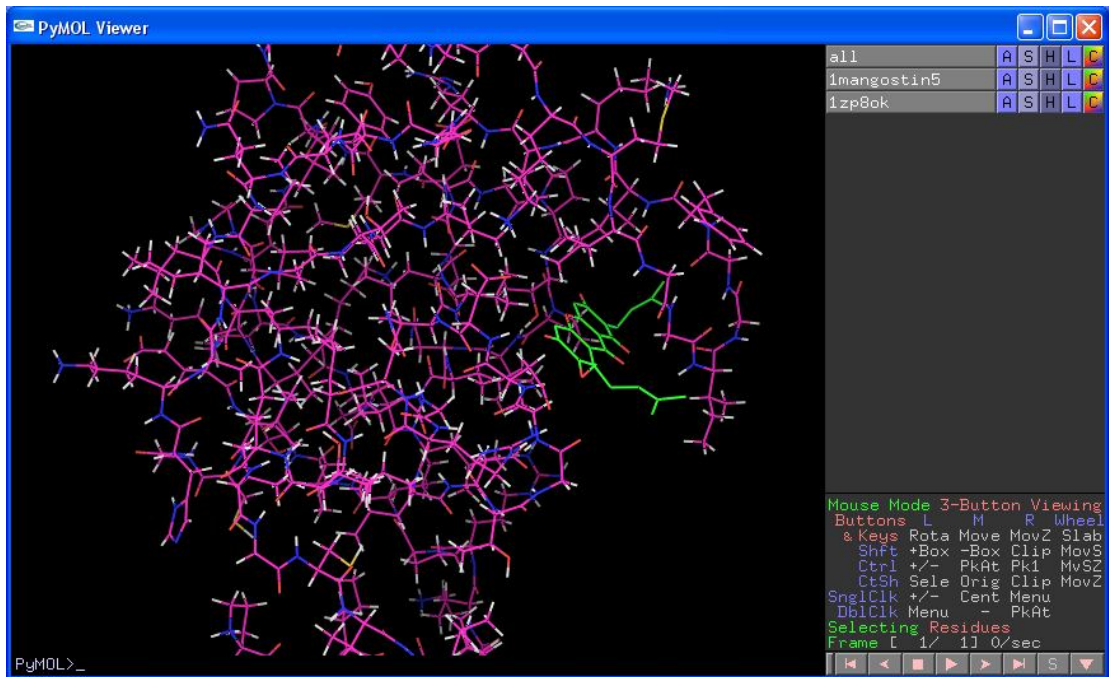
Tunggu hingga proses penambatan selesai



Lampiran 11 Tampilan perangkat lunak MOE



Lampiran 12 Tampilan perangkat lunak PyMOL



Lampiran 13 Tampilan .dlg dalam Wordpad dan .txt dalam Notepad serta GoldScore
result

2.dlg - WordPad

File Edit View Insert Format Help

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus	Lowest	Run	Mean	Num	Histogram
-ter	Binding		Binding	in	
Rank	Energy		Energy	Clus	5 10 15 20 25 30 35
1	-6.32	44	-5.44	37	#####
2	-6.11	50	-5.43	16	#####
3	-5.35	6	-5.35	1	###
4	-5.27	59	-4.89	6	#####
5	-5.22	29	-5.01	13	#####
6	-5.21	10	-5.10	3	###
7	-5.07	1	-5.03	2	##
8	-5.00	76	-5.00	1	#
9	-4.95	22	-4.95	1	#
10	-4.93	20	-4.81	5	#####
11	-4.82	2	-4.71	4	#####
12	-4.68	60	-4.55	3	###
13	-4.44	54	-4.44	1	#
14	-4.34	19	-4.34	1	#
15	-4.20	47	-3.75	3	###
16	-4.08	78	-4.01	2	##
17	+3.59e+06	45	+3.59e+06	1	#

Number of multi-member conformational clusters found = 11, out of 100 runs.

RMSD TABLE

Rank	Sub-Rank	Run	Binding Energy	Cluster RMSD	Reference RMSD	Grep Pattern
1	1	44	-6.32	0.00	35.25	RANKING

For Help, press F1

1bemas1.txt - Notepad

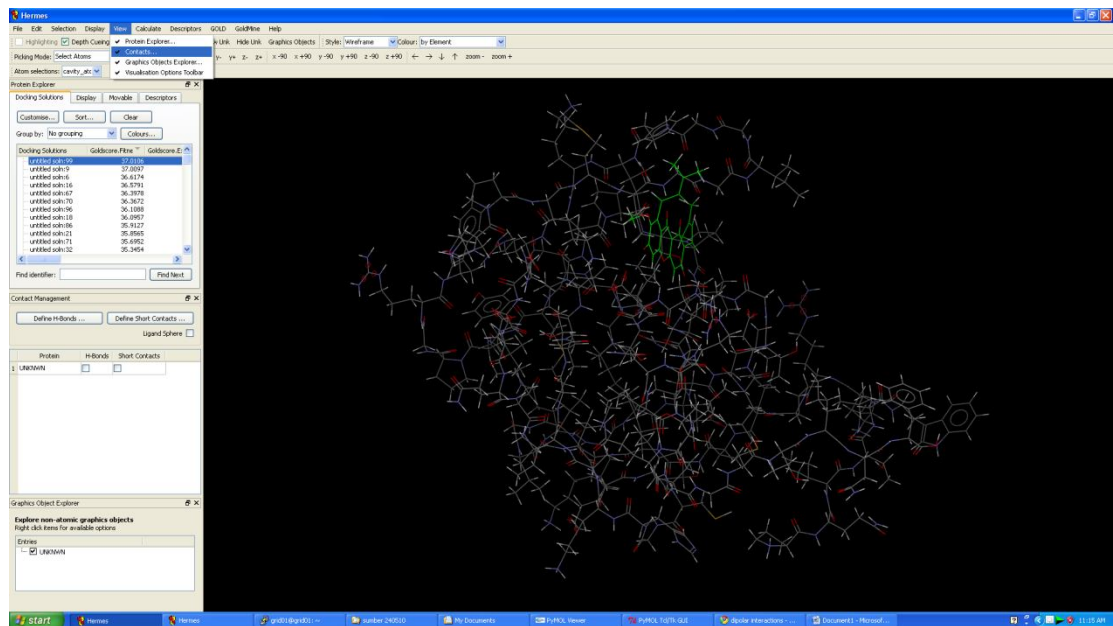
File Edit Format View Help

Output will be bemas_out.pdbqt
Detected 4 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: -2118722124
Performing search ... done.
Refining results ... done.

mode | affinity | dist from best mode
|(kcal/mol) | rmsd lb | rmsd ub

	affinity	dist from best mode	rmsd lb	rmsd ub
1	-6.6	0.000	0.000	
2	-6.5	2.602	9.042	
3	-6.4	1.957	8.148	
4	-6.3	1.973	8.519	
5	-6.3	1.108	1.141	
6	-6.1	1.997	7.742	
7	-6.1	2.709	9.160	
8	-6.0	2.554	8.544	
9	-6.0	2.128	2.657	
10	-6.0	1.913	8.427	
11	-6.0	1.691	8.166	
12	-6.0	2.250	8.317	
13	-6.0	3.300	6.781	
14	-6.0	3.424	6.505	
15	-6.0	2.324	3.534	
16	-5.9	3.438	7.214	
17	-5.9	3.604	8.064	
18	-5.8	4.487	8.542	
19	-5.7	1.823	2.323	
20	-5.7	2.322	7.784	
21	-5.7	2.791	5.819	
22	-5.6	3.100	8.719	
--	--	--	--	--

(Lanjutan)



Lampiran 14 Hasil superposisi makromolekul melalui CCP4

```

3_superpose.log - Notepad
File Edit Format View Help
0.8897967 0.0656906 0.4516045
TRANSLATION
-3.2548046 -3.1916580 16.1093445
O_Matrix name: LSQ_RT_CHAINAS4
-----
begin end Sequence Matching
-----
A1 A99 PQITLWKRPLVTKIGGQLKEALLDTGADDTVLEEMSLPGRWPKMIGGI
#####
A1 A99 PQITLWQRPLVTKIGGQLKEALLDTGADDTVLEEMSLPGRWPKMIGGI

GGFIKVRQYDQILIEICGHKAIGTVLVGPTPVNIIGRNLLTQIGCTLNF
#####
GGFIKVRQYDQILIEICGHKAIGTVLVGPTPVNIIGRNLLTQIGCTLNF
-----
Matching residues 99 Identical residues 98 Identity 99.0%
Match Rate(1) 100.0% r.m.s. of atoms 0.55 Mean distance 0.48
structure diversity 0.55 with 99 residues in match 4 of chains
Superimposed coordinates of this match: chainasaja_1zp8ok.pdb_4

```

```

Transformed coordinates will be written to file D:/Skripsi/Farida/sup/1.pdb

Query D:/Skripsi/Farida/1zp8.pdb
and Target D:/Skripsi/Farida/1d4h.pdb
have been superposed. Transformation matrix (to be applied
to D:/Skripsi/Farida/1zp8.pdb) is

  Rx  Ry  Rz  T
  0.2196  0.8042 -0.5523  17.1964
 -0.3955  0.5909  0.7032 -9.7287
  0.8918  0.0640  0.4478  0.8057

at RMSD = 0.526 and alignment length 99

-----
| Query | Dist.(Å) | Target |
|-----+-----+-----|
|+ A.PRO 1|< **0.39**>|+ A.PRO 1|
|+ A.GLN 2|< **0.37**>|+ A.GLN 2|
|- A.ILE 3|< **0.49**>|- A.ILE 3|
| .A.THR 4|< **0.34**>|.A.THR 4|
|- A.LEU 5|< **0.42**>|- A.LEU 5|
|.A.TRP 6|< **0.39**>|.A.TRP 6|
|+ A.LYS 7|< -0.63->|+ A.GLN 7|
|+ A.ARG 8|< **0.62**>|+ A.ARG 8|
|+ A.PRO 9|< **0.34**>|+ A.PRO 9|
|S- A.LEU 10|< **0.42**>|S- A.LEU 10|
|S- A.VAL 11|< **0.41**>|S- A.VAL 11|
|S- A.THR 12|< **0.26**>|S- A.THR 12|
|S- A.ILE 13|< **0.27**>|S- A.ILE 13|
|S+ A.LYS 14|< **0.33**>|S+ A.LYS 14|
|S- A.ILE 15|< **0.38**>|S- A.ILE 15|

```

Lampiran 15 Tampilan perangkat lunak UCSF Chimera

