



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENAPISAN *IN SILICO* ANTIMALARIA TERHADAP TARGET
Plasmodium falciparum ENOYL ACYL CARRIER PROTEIN
REDUCTASE (*Pf*ENR)**

SKRIPSI

**BERWI FAZRI PAMUDI
0706264513**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JUNI 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENAPISAN *IN SILICO* ANTIMALARIA TERHADAP TARGET
Plasmodium falciparum ENOYL ACYL CARRIER PROTEIN
REDUCTASE (*Pf*ENR)**

SKRIPSI

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

**BERWI FAZRI PAMUDI
0706264513**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JUNI 2011**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,

dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk

telah saya nyatakan dengan benar.

Nama

: Berwi Fazri Pamudi

NPM

: 0706264513

Tanda Tangan

: 

Tanggal

: 27 Juni 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Berwi Fazri Pamudi
NPM : 0706264513
Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Penapisan *In Silico* Antimalaria terhadap Target *Plasmodium falciparum Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (PfENR)*

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan 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	: Dra. Azizahwati, MS., Apt	()
Penguji I	: Dr. Amarila Malik, M.Si	()
Penguji II	: Dra. Juheini Amin, M.Si	()
Penguji III	: Dr. Herman Suryadi, M.S	() .

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 27 Juni 2011

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

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

Nama : Berwi Fazri Pamudi
NPM : 0706264513
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:

Penapisan *In Silico* Antimalaria terhadap Target *Plasmodium falciparum Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (PfENR)*

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 27 Juni 2011

Yang menyatakan



(Berwi Fazri Pamudi)

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur saya panjatkan ke hadirat Allah SWT yang Maha Pengasih dan Penyayang serta senantiasa mencerahkan nikmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini.

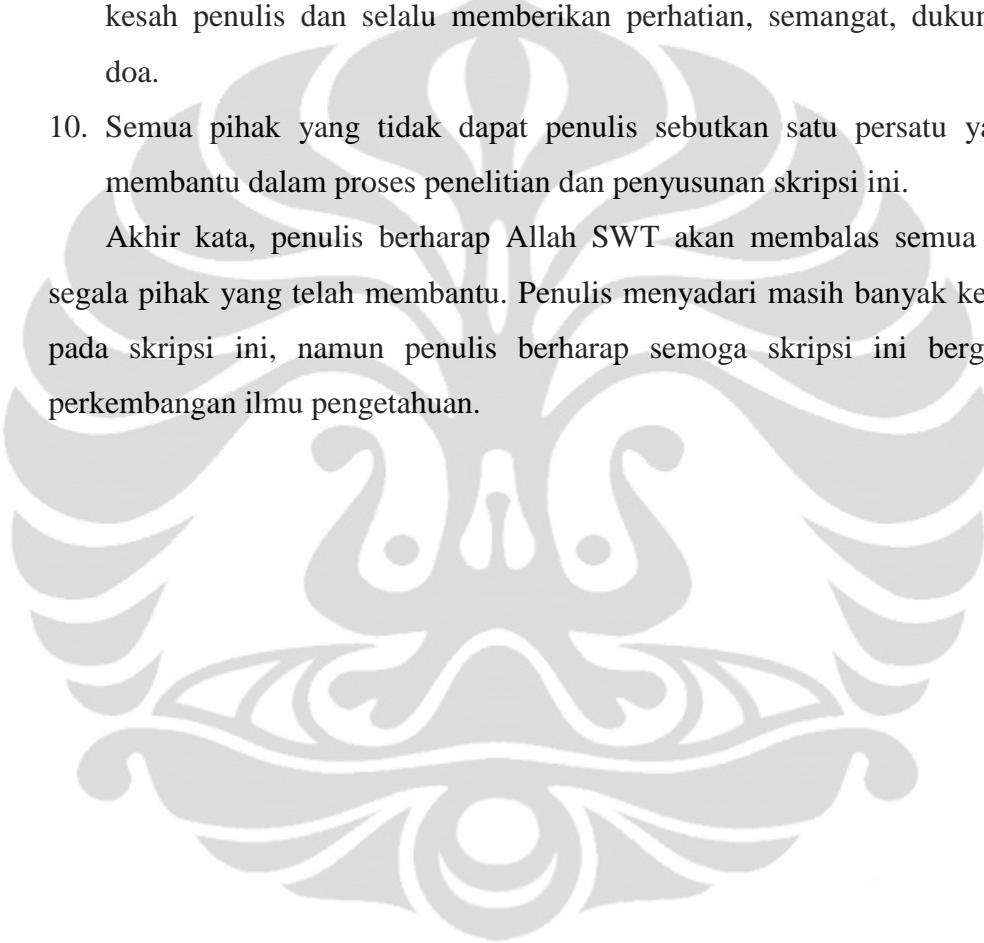
Skripsi ini disusun untuk memenuhi syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi di Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terimakasih kepada :

1. Ibu Prof. 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, M.Si selaku pembimbing pertama skripsi yang telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk memberikan bimbingan, saran, dan nasihat dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini serta atas diperkenankannya penulis melakukan penelitian ini.
3. Ibu Dra. Azizahwati, MS., Apt selaku pembimbing kedua skripsi yang telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk memberikan bimbingan, saran, dan nasihat dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini serta atas diperkenankannya penulis melakukan penelitian ini.
4. Ibu Pharm. Dr. Joshita Djajadisastra M.S.,Ph.D 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, Bapak, Mas Gurif, Om dan Tante serta keluarga di Solo dan Boyolali yang selalu memberikan doa, kasih sayang, motivasi, nasihat, dan dukungan materi.

7. Fika, Desy, Tyas, Citra, Khai, dan Marista atas persahabatan kita, dorongan semangat dan do'a dari kalian selama menuntut ilmu di Farmasi.
8. Seluruh teman-teman Farmasi UI 2007 yang telah membantu penulis dalam berbagai hal terutama selama masa penelitian dan penyusunan skripsi.
9. Sahabat-sahabat selama penelitian yang selalu setia mendengarkan keluh kesah penulis dan selalu memberikan perhatian, semangat, dukungan, dan doa.
10. 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

2011

ABSTRAK

Nama : Berwi Fazri Pamudi

Program Studi : Farmasi

Judul : Penapisan *In Silico* Antimalaria terhadap Target *Plasmodium falciparum Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (PfENR)*

Malaria merupakan salah satu infeksi parasit yang menjadi permasalahan di dunia. Tidak adanya vaksin yang efektif dan strain Plasmodium yang resisten terhadap obat antimalaria menunjukkan pentingnya untuk adanya pengembangan agen kemoterapi baru. Metode yang saat ini sedang banyak dikembangkan adalah pencarian obat antimalaria dengan menggunakan penapisan *in silico* atau dikenal pula dengan nama *virtual screening*. Salah satu enzim yang berperan dalam perkembangan parasit malaria adalah *Plasmodium falciparum Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (PfENR)*. Inhibisi pada enzim tersebut akan menyebabkan biosintesis lemak tipe II pada parasit akan terhenti. Pada penelitian kali ini dilakukan penapisan *in silico* menggunakan perangkat lunak GOLD untuk mencari kandidat inhibitor PfENR dengan menggunakan ligan yang terdapat pada *database* Tanaman Obat di Indonesia. Pada perangkat lunak GOLD dilakukan penambatan molekuler antara ligan dengan makromolekul target yaitu PfENR. Target ini telah dioptimasi dengan penghilangan residu dan penambahan muatan. Ligan diharapkan dapat menjadi inhibitor PfENR. Berdasarkan hasil dari penapisan *in silico* ini terdapat 5 kandidat senyawa inhibitor yang diharapkan dapat dikembangkan sebagai obat antimalaria. Senyawa tersebut yaitu *Kaempferol 3-rhamnosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-glucoside*, *Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside)*, *8-Hydroxyapigenin 8-(2'',4''-disulfatoglucuronide)*, *Epigallocatechin 3,5,-di-O-gallate*, dan *Quercetin 3,4'-dimethyl ether 7-alpha-L-Arabinofuranosyl-(1-6)-glucoside* dengan kisaran GoldScore dari 80,6236 sampai 100,4109.

Kata kunci : antimalaria, GOLD, malaria, penapisan *in silico*, *Plasmodium falciparum Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (PfENR)*

xiv+ 79 halaman; 25 gambar; 10 tabel; 10 lampiran

Bibliografi : 44 (1996-2011)

ABSTRACT

Name : Berwi Fazri Pamudi
Major : Pharmacy
Title : Antimalaria In Silico Screening against the Target of *Plasmodium falciparum* Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (*PfENR*)

Malaria is one of problematic infectious diseases worldwide. The absence of an effective vaccine and the spread of drug resistant strains of Plasmodium clearly indicate the necessity for the deveploment of new chemotherapeutic agents. Recent method being developed is searching a new drug of antimalarial using in silico screening, or also known as virtual screening. One of enzyme target that important for growth of the malaria parasite is *Plasmodium falciparum* Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (*PfENR*). Inhibition of this enzyme cause the fatty acid biosynthesis type II will be terminated. In this research, in silico screening was performed using GOLD software to find inhibitor candidates of *PfENR* by using ligands from the database of Medicinal Plants in Indonesia. On the GOLD software moleculer docking experiments were performed between ligands and macromolecule target *PfENR*. This target that has been optimized with residue removal and charges addition. Ligand is expected to be the *PfENR* inhibitors. Based on the results obtained from the in silico screening there were 5 inhibitor candidates which expected to be developed as an antimalarials. These compounds were Kaempferol 3-rhamnosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-glucoside, Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglicoside), 8-Hydroxyapigenin 8-(2",4"-disulfatoglucuronide), Epigallocatechin 3,5,-di-O-gallate, and Quercetin 3,4'-dimethyl ether 7-alpha-L-Arabinofuranosyl-(1-6)-glucoside with the GoldScore ranged from 80.6236 to 100.4109.

Keywords : antimalarial, GOLD, in silico screening, malaria, *Plasmodium falciparum* Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (*PfENR*)
xiv+ 79pages ; 25 figures; 10 tables; 10 appendixes
Bibliography : 44 (1996-2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PENYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
 BAB 1 PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	 4
2.1 Asam Amino dan Protein	4
2.1.1 Struktur Protein	4
2.1.2 Interaksi Protein dengan Ligand.....	7
2.2 Enzim	9
2.3 Malaria	11
2.4 <i>Plasmodium falciparum Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (PfENR)</i>	13
2.5 Inhibitor PfENR.....	15
2.6 Bioinformatika	17
2.7 Penambatan Molekuler.....	18
2.8 <i>Virtual Screening</i> (Penapisan <i>In Silico</i>)	19
2.9 <i>Protein Data Bank</i> (Bank Data Protein)	20
2.10 <i>Database Tanaman Obat di Indonesia</i>	20
2.11 GOLD.....	21
2.12 Kriteria dan Parameter Penambatan	21
2.13 PyMOL.....	22
2.14 Open Babel.....	22
2.15 UCSF Chimera	22
2.16 Vega ZZ.....	23
 BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN	 24
3.1. Tempat dan Waktu	24
3.2. Alat.....	24
3.2.1. Perangkat Keras.....	24
3.2.2. Perangkat Lunak	24

3.3. Bahan.....	24
3.3.1. Struktur Tiga Dimensi <i>Plasmodium falciparum Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (PfENR)</i>	24
3.3.2. Struktur Tiga Dimensi Ligand.....	25
3.3.3. Kontrol Positif dan Negatif dari Inhibitor <i>PfENR</i>	25
3.4. Cara Kerja	25
3.4.1. Penyiapan Struktur Protein.....	25
3.4.2. Pemisahan Residu dari Makromolekul <i>PfENR</i>	26
3.4.3. Optimasi Makromolekul <i>PfENR</i>	26
3.4.4. Validasi Metode Penapisan <i>In Silico</i>	26
3.4.5. Penyiapan Struktur Ligand.....	26
3.4.6. Penambatan Molekuler.....	27
3.4.7. Kandidat Senyawa Inhibitor <i>PfENR</i>	27
3.4.8. Analisis dan Visualisasi Interaksi Protein-Ligan	27
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	28
4.1 Penyiapan Struktur Protein.....	28
4.1.1 Pengunduhan Makromolekul <i>Plasmodium falciparum Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (PfENR)</i>	28
4.1.2 Pemisahan Residu pada Rantai Makromolekul <i>PfENR</i> untuk Target Penambatan	29
4.1.3 Optimasi Makromolekul <i>PfENR</i>	29
4.2 Validasi Metode <i>Virtual screening</i> (Penapisan	31
4.2.1 Pengunduhan Kontrol Positif dari Inhibitor <i>PfENR</i>	31
4.2.2 Pengunduhan Kontrol Negatif dari Inhibitor <i>PfENR</i>	32
4.2.3 Konversi File Kontrol Positif dan Negatif Inhibitor <i>PfENR</i> ..	32
4.2.4 Penambatan Molekuler Menggunakan GOLD	32
4.3 Penyiapan Struktur Ligand.....	38
4.4 Penambatan Molekuler <i>Database Tanaman Obat di Indonesia</i> pada <i>PfENR</i>	37
4.5 Kandidat Senyawa Inhibitor.....	38
4.6 Analisis dan Visualisasi Interaksi Protein-Ligan	40
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	43
5.1. Kesimpulan.....	43
5.2. Saran.....	43
DAFTAR ACUAN.....	44

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Dua Puluh Jenis Asam Amino Penyusun Protein	48
2.2. Struktur Primer dan Sekunder Protein	49
2.3. Struktur Tersier dan Kuartener Protein	50
2.4. Siklus Hidup Plasmodium	11
2.5. Lokasi Metabolisme pada <i>Plasmodium falciparum</i>	14
2.6. Reduksi Crotonoyl-CoA Menjadi Butyryl-CoA	14
2.7. Sekuens <i>PfENR</i>	15
2.8. Struktur Triklosan	15
2.9. Triklosan dan NAD ⁺ Terikat pada Situs Aktif <i>PfENR</i>	16
2.10. Interaksi Ikatan Triklosan dan NAD ⁺ pada Sisi Aktif <i>PfENR</i>	17
3.1. Struktur Tiga Dimensi Makromolekul <i>PfENR</i>	25
4.1. Struktur Tiga Dimensi Makromolekul <i>PfENR</i> (a) Sebelum Optimasi dan (b) Setelah Optimasi.....	31
4.2. Struktur Tiga Dimensi Kontrol Positif Inhibitor <i>PfENR</i>	31
4.3. Struktur Tiga Dimensi Kontrol Negatif Inhibitor <i>PfENR</i>	32
4.4. Situs Aktif <i>PfENR</i> Berikatan dengan Kontrol Positif	34
4.5. Konformasi Ikatan Kontrol Positif dengan <i>PfENR</i>	35
4.6. Konformasi Kontrol Positif Diazaborin terhadap <i>PfENR</i>	52
4.7. Konformasi Kontrol Positif Triklosan terhadap <i>PfENR</i>	52
4.8. Konformasi Ikatan Kontrol Negatif dengan <i>PfENR</i>	36
4.9. Rumus Struktur dari Kandidat Inhibitor Hasil Penapisan <i>In Silico</i>	53
4.10. Rumus Struktur dari Kandidat Inhibitor Hasil Penapisan <i>In Silico</i>	54
4.11. Interaksi <i>Kaempferol 3-rhamnosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-glucoside</i> dengan Beberapa Residu Asam Amino pada <i>PfENR</i>	40
4.12. Perbandingan Hasil Penambatan <i>Kaempferol 3-rhamnosyl-(1-3)-</i> <i>rhamnosyl-(1-6)-glucoside</i> dengan Triklosan	41
4.13. Interaksi <i>Epigallocatechin3,5,-di-O-gallate</i> dengan Beberapa Residu Asam Amino pada <i>PfENR</i>	42

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1. Enam Kelas Utama Enzim berdasarkan Reaksi yang Dikatalisis oleh Enzim	9
2.2. Target Antimalaria.....	13
4.1. Struktur <i>PfENR</i> yang Diunduh dari Bank Data Protein.....	28
4.2 . Hasil Penambatan Molekuler Pada Kontrol Positif Inhibitor <i>PfENR</i>	33
4.3. Hasil Penambatan Molekuler Pada Kontrol Negatif Inhibitor <i>PfENR</i>	36
4.4. Hasil Penapisan <i>In Silico</i> dengan Menggunakan <i>Database</i> Tanaman Obat di Indonesia	55
4.5. Hasil Penapisan <i>In Silico</i> terhadap Target <i>PfENR</i>	38
4.6. Kandidat Inhibitor Berdasarkan Hasil Penapisan <i>In Silico</i>	56
4.7. Kandidat Inhibitor Hasil Penapisan <i>In Silico</i> beserta Famili dan Spesies Tanaman Asal.....	57
4.8. Ikatan Hidrogen yang Terjadi pada Target Penambatan <i>PfENR</i>	58



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja.....	59
2. Skema Kerja Validasi <i>Virtual Screening</i> (Penapisan <i>In Silico</i>).....	60
3. Skema Kerja Perjalanan Perangkat Lunak GOLD	61
4. Analisis Hasil Penambatan dengan Perangkat Lunak GOLD	71
5. Tampilan Perangkat Lunak PyMOL.....	74
6. Tampilan Situs <i>Protein Data Bank</i> (Bank Data Protein).....	75
7. Tampilan Perangkat Lunak UCSF Chimera	76
8. Tampilan Perangkat Lunak Vega ZZ	77
9. Tampilan Situs <i>PubChemCompound</i>	78
10. Tampilan Perangkat Lunak Open Babel.....	79



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Malaria merupakan infeksi parasitik yang paling penting di dunia. Ada lebih dari 500 juta kasus malaria per tahun dengan sekitar 3 juta kematian. Sebanyak 40% populasi dunia tinggal di daerah endemik malaria dan di Indonesia 35% penduduknya tinggal di daerah yang berisiko terinfeksi malaria (Harijanto, Nugroho, & Gunawan, 2009).

Malaria adalah penyebab anemia hemolitik yang disebabkan oleh infeksi sel-sel darah merah oleh protozoa dari genus *Plasmodium* yang ditularkan kepada manusia melalui air liur nyamuk *Anopheles* betina (WHO,2010). Penyakit ini disebabkan oleh *Plasmodium* yang terdiri dari empat jenis yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, dan *Plasmodium vivax*. Dari empat jenis *Plasmodium* yang menyebabkan malaria pada manusia, *Plasmodium falciparum* adalah yang paling parah dan fatal, penyakitnya biasa disebut malaria tropika/ malaria serebral (Katzung, 2006).

Obat antimalaria yang efektif, aman, praktis dalam pemakaian, dan terjangkau secara ekonomis sangat diperlukan untuk mengurangi kematian akibat malaria. Untuk saat ini, obat antimalaria yang banyak dikembangkan bekerja dengan cara menghambat atau mematikan bentuk aseksual parasit malaria yang berada di dalam eritrosit manusia (skizontosida darah). Obat-obat yang efektif dan bekerja cepat diantaranya adalah kina, klorokuin, kinidin, meflokuin, dan derivat artemisinin. Obat lainnya seperti proguanil, pirimetamin, sulfonamid, sulfon, dan antibiotik yang berkhasiat sebagai antimalaria bekerja lambat. Masalah utama yang dihadapi saat ini yaitu kegagalan terapi karena resistensi parasit terhadap obat antimalaria (Harijanto, Nugroho, & Gunawan, 2009).

Ada beberapa kemungkinan penyebab parasit malaria menjadi resisten terhadap antimalaria contohnya klorokuin, diantaranya yaitu parasit tidak mempunyai sisi aktif untuk berikatan dengan klorokuin sehingga obat ini tidak dapat terkonsentrasi di dalam sel darah merah, *Plasmodium* yang resisten mempunyai jalur biokimia lain untuk mengadakan sintesis asam amino sehingga

dapat menghindarkan pengaruh klorokuin, dan mutasi spontan di bawah tekanan obat (Pribadi & Muljono, 2004).

Pengembangan obat antimalaria merupakan hal yang sangat penting dalam pengendalian malaria. Untuk melaksanakan tujuan ini, diperlukan identifikasi mengenai target penghambatan serta senyawa untuk pengobatan malaria (Mittamura & Palacpac, 2003). Dalam satu dekade terakhir ini, telah ditemukan target yang cukup potensial untuk antimalaria. Target ini adalah jalur biosintesis asam lemak tipe II yang berlangsung pada *Plasmodium falciparum*, dengan target spesifik yaitu *Plasmodium falciparum Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (PfENR)*. Target ini dipilih karena mempunyai peran penting dalam proses sintesis asam lemak dalam tubuh *Plasmodium falciparum* (Tasdemir, 2006).

PfENR adalah enzim yang berperan penting dalam biosintesis asam lemak tipe II *Plasmodium falciparum*. *PfENR* mengkatalisis langkah akhir dari siklus elongasi pada biosintesis asam lemak, bekerja dengan cara mengurangi ikatan rangkap karbon pada enoil yang terikat secara kovalen pada pembawa protein asil (Kapoor, Gopalakrishnapai, Surolia, & Surolia, 2004).

Proyek pencarian obat baru membutuhkan waktu yang cukup lama dan biaya yang cukup besar. Berdasarkan sejarah, penemuan obat baru diperoleh melalui sistem *screening* secara farmakologi menggunakan hewan coba, namun dengan banyaknya senyawa yang ada, hal ini sangat tidak efisien untuk tetap dilakukan (Wolff, 1996).

Kemajuan teknologi informasi pada saat ini dapat dijadikan alternatif untuk pencarian obat baru. Oleh sebab itu, dikembangkanlah metode *screening* sebagai tahap awal dalam rangkaian pencarian kandidat calon obat dengan menggunakan teknologi komputer. Dengan adanya teknologi informasi ini, proses *screening* dilakukan dengan metode *in silico* atau *virtual screening* (simulasi komputer).

Penapisan *in silico* adalah sistem komputasi atau analog *in silico* pada skrining biologi. Tujuan dari penapisan *in silico* adalah untuk mencari nilai, peringkat atau menyaring suatu set struktur data menggunakan satu atau lebih prosedur komputasi. Penapisan *in silico* digunakan untuk membantu menentukan

senyawa yang akan ditapis ataupun membantu untuk proses sintesis (Leach, Shoichet, & Peishoff, 2006).

Pada penelitian ini akan dilakukan penapisan *in silico* dengan menggunakan *database* Tanaman Obat di Indonesia untuk mendapatkan kandidat senyawa inhibitor *Plasmodium falciparum Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase* (*PfENR*) sebagai rangkaian dari pencarian kandidat obat antimalaria. Metode *in silico* dipilih karena waktu penelitian yang lebih cepat dan biaya yang relatif murah. Penapisan *in silico* atau *virtual screening* yang dilakukan pada penelitian ini adalah *structured based virtual screening* karena struktur tiga dimensi dari protein target yaitu *PfENR* tersedia pada bank data protein.

Pencarian inhibitor pada proses sintesis asam lemak tipe II pada *Plasmodium falciparum* dipilih untuk mempersingkat daur hidupnya. Pemutusan rantai pada saat sintesis menjadikan *Plasmodium* kekurangan energi untuk melakukan metabolisme sehingga lama kelamaan akan mati. Penelitian ini diharapkan dapat memperoleh kandidat senyawa inhibitor *PfENR* dari *database* Tanaman Obat di Indonesia yang nantinya dikembangkan secara lebih lanjut dalam rangkaian proses pencarian obat antimalaria yang baru.

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh kandidat senyawa inhibitor *Plasmodium falciparum Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase* (*PfENR*) dengan cara penambatan molekuler menggunakan ligan dari *database* Tanaman Obat di Indonesia sebagai tahap awal dari rangkaian proses pencarian obat antimalaria.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Asam Amino dan Protein

Asam amino merupakan unit dasar struktur protein. Suatu asam amino terdiri dari gugus amin, gugus karboksil, atom hidrogen dan gugus R tertentu yang terikat pada sebuah atom karbon pusat, yang disebut α -karbon. Atom karbon disebut α karena bersebelahan dengan gugus karboksil (asam) dan gugus R menyatakan rantai samping. Susunan tetrahedral dari empat gugus berbeda yang berikatan pada atom α -karbon menjadikan asam amino mempunyai aktivitas optik. Dua bentuk bayangan cermin yang disebut isomer L dan D, protein hanya terdiri dari asam amino L yang terdiri dari dua puluh jenis penyusunnya (Gambar 2.1) (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2002).

Susunan residu asam amino berbeda yang secara berulang dihubungkan melalui ikatan peptida membentuk suatu polimer linear disebut polipeptida atau protein. Rantai polipeptida ini mempunyai panjang antara 40 sampai 33.000 residu asam amino (sangat sedikit yang lebih dari 1500 residu asam amino). Protein memiliki berat molekul lebih dari 5.000 (g/mol).

Protein sangat berguna dalam kehidupan serta memiliki fungsi penting dalam seluruh proses biologis. Berdasarkan fungsi biologis tersebut, protein dapat diklasifikasikan sebagai enzim (dehidrogenase, kinase), protein penyimpanan (feritin, mioglobin), protein pengatur (protein pengikat DNA, hormon polipeptida), protein struktural (kolagen, proteoglikan), protein pelindung (faktor pembekuan darah, imunoglobulin), protein pengangkut (hemoglobin, lipoprotein plasma), dan protein kontraktil/ motil (aktin, tubulin) (Murray, Granner , Mayes, & Rodwell, 2003).

2.1.1 Struktur Protein

2.1.1.1 Struktur Primer

Sekuens asam-asam amino pada sebuah protein disebut 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. Urutan penamaan rantai peptida ditulis

dengan letak asam amino dengan gugus amin bebas (terminal-N) di kiri sedangkan asam amino dengan gugus karboksil bebas (terminal-C) di kanan (Gambar 2.2a). Oleh karena itu, semua sekuens asam amino dibaca dari terminal N ke C (Pamela & Harvey, 1994).

2.1.1.2 Struktur Sekunder

Dalam struktur sekunder protein, digambarkan konformasi dari segmen-semen 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).

Heliks- α merupakan elemen umum pada struktur sekunder dalam sebuah rantai polipeptida terlipat. Konformasi dari ikatan ini berupa tulang punggung (*backbone*) polipeptida yang membentuk kumparan sepanjang sumbu molekul protein. Heliks ini distabilkan oleh ikatan hidrogen yang terjadi pada atom hidrogen yang terikat pada atom nitrogen amida dengan oksigen pada gugus karbonil. Subsitusi pada karbon- α dari asam amino menonjol keluar dari heliks, sehingga gangguan sterik diminimisasi. Karena struktur asam amino pada protein 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).

Lembaran- β disebut dengan lembaran beta terlipat karena strukturnya bila diperpanjang menyerupai lembaran-lembaran yang berlipat. Ikatan hidrogen terjadi antara rantai peptida yang berdekatan. Dua rantai peptida terikat oleh ikatan hidrogen dapat terjadi dalam arah yang sama (paralel) maupun berkebalikan (antiparalel) (Gambar 2.2c). 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 (Petsko & Ringe, 2003).

2.1.1.3 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 (*backbone*) 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 karbon 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, pada ikatan ini akan terjadi gaya tolak menolak (Murray, Granner, Mayes, & Rodwell, 2003).

2.1.1.4 Struktur Kuartener

Struktur kuartener sebuah protein menggambarkan bagaimana subunit-subunit tersebut tersusun dalam sebuah ruang (Gambar 2.3b). Protein yang mempunyai lebih dari satu rantai peptida disebut sebagai oligomer. Rantai tunggalnya disebut sebagai subunit yang berada 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 (Gambar 2.3c). Protein dengan subunit yang tidak sama disebut sebagai heterooligomer. Subunit ini melaksanakan fungsi yang secara tipikal berbeda pula (Petsko & Ringe, 2003).

2.1.2 Interaksi Protein dengan Ligan

2.1.2.1 Interaksi Hidrogen

Ikatan hidrogen adalah ikatan yang terjadi antara hidrogen dengan atom F,O,N (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 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 (-NH₂) dan hidroksil (-OH). Karena ikatan antara N-H dan O-H bersifat polar, atom H-nya dapat berikatan hidrogen dengan atom akseptor (Lodish, Berk, Zipursky, Matsudaira, Baltimore, & Darnell, 2000).

2.1.2.2 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 berkang drastis ketika jarak molekul meningkat sehingga interaksi ini hanya terbentuk ketika atom-atom terletak 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).

2.1.2.3 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. Ikatan kovalen antara dua karbon dan antara karbon dan hidrogen adalah ikatan nonpolar yang paling umum dalam sistem biologis. Hidrokarbon merupakan molekul yang terbentuk dari karbon dan hidrogen dan bersifat tak larut dalam air. Ikatan atau gaya hidrofobik menyebabkan molekul-molekul hidrofobik dari bagian molekul nonpolar lebih

menyatu daripada terlarut dalam air (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).

2.2 Enzim

Polimer biologis yang mengkatalisis reaksi biokimia dalam tubuh, mengkatalisis perubahan satu atau lebih mol (substrat) membentuk satu atau lebih produk disebut dengan enzim. Sebagai katalis dengan efisiensi tinggi, enzim merupakan pengkatalis yang sangat selektif, terdapat dalam konsentrasi yang sangat rendah di dalam sel, dimana meningkatkan laju reaksi tanpa mengubah kesetimbangan. Enzim spesifik bagi tipe reaksi maupun substrat atau senyawa yang mirip substrat serta memiliki berat molekul berkisar antara 12.000 hingga lebih dari satu juta (Nelson & Cox, 2001).

Enzim diberi nama menurut sistem yang dirancang oleh Komisi Enzim (*Enzyme Commission*, EC) dari *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), dan berdasarkan pada tipe reaksi yang dikatalisis. Setiap tipe enzim mempunyai nomor EC yang spesifik, serta nama yang kompleks namun jelas. Dalam praktiknya, lebih dikenal dengan nama reaktan utamanya yang spesifik, dengan ditambahkan akhiran -ase (Ngili, 2010).

Tabel 2.1 Enam kelas utama enzim berdasarkan reaksi yang dikatalisis oleh enzim

Kelas Enzim	Tipe Reaksi yang Dikatalisis
Oksidoreduktase	Oksidasi-reduksi. Pendonor hidrogen atau elektron adalah salah satu substratnya.
Transferase	Transfer gugus kimia dari bentuk umum $A-X + B \rightarrow A+B-X$

(lanjutan)

Hidrolase	Pemotongan hidrolitik pada C—C, C—N, C—O, dan ikatan lainnya.
Liase	Pemotongan (bukan hidrolitik) pada C—C, C—N, C—O, dan ikatan lainnya, meninggalkan ikatan rangkap; atau alternatifnya yakni penambahan gugus pada suatu ikatan rangkap.
Isomerase	Perubahan penataan geometris (spasial) suatu molekul
Ligase	Ligasi (menghubungkan) dua molekul dengan mengikutsertakan hidrolisis senyawa yang memiliki ΔG besar untuk hidrolisis.

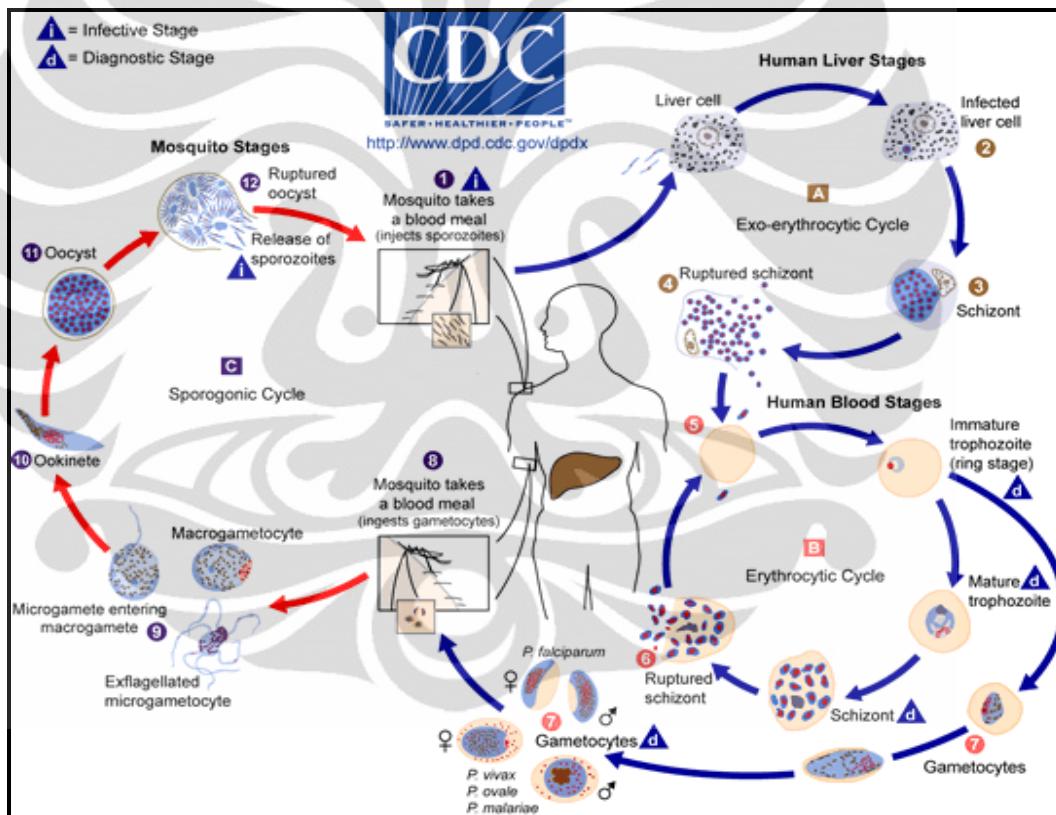
Reaksi katalisis enzim dikarakterisasi oleh formasi kompleks yang terjadi antara substrat dan enzim. Ikatan dengan substrat terjadi pada sisi aktif enzim. Energi yang digunakan untuk peningkatan aktivitas enzim berasal dari interaksi-interaksi lemah (ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan interaksi 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 dan nonkompetitif. 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 menghambat terjadinya pengikatan enzim 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 yang disebut dengan gugus allosterik (Nelson & Cox, 2001).

2.1 Malaria

Salah satu penyakit yang cukup menjadi perhatian penting di dunia adalah malaria. Penyakit ini tidak hanya menyerang manusia tetapi juga primata seperti monyet, kera, reptil dan burung. Malaria terjadi karena infeksi dari protozoa genus *Plasmodium* yang menyerang sel darah merah hospes. Secara klinis dikenal ada 3 macam penyakit malaria, yakni malaria tropika yang disebabkan oleh *Plasmodium falciparum*, malaria tersiana yang disebabkan oleh *Plasmodium vivax* dan *Plasmodium ovale* (jarang terdapat di luar Afrika), dan malaria kuartana yang disebabkan oleh *Plasmodium malariae* (Syarif & Zunilda, 2007).



[Sumber: diunduh dari <http://www.dpd.cdc.gov>]

Gambar 2.4. Siklus Hidup Plasmodium

Penyakit malaria ditransmisikan melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina. Siklus hidup Plasmodium terjadi dalam dua fase yaitu fase seksual di dalam tubuh Plasmodium dan fase aseksual di dalam tubuh manusia setelah Plasmodium menginfeksi melalui vektor nyamuk. Melalui gigitan nyamuk, sporozoit

Plasmodium masuk ke dalam hepatosit di hati dan memulai fase aseksual dengan berkembang menjadi skizon (tahap eksoeritrositik atau skizogoni). Setelah 5-15 hari, skizon akan melepaskan sel anak (merozoit) ke dalam darah yang akan menginvasi eritrosit. Di dalam eritrosit, merozoit mengalami perubahan menjadi bentuk cincin kemudian tropozoit, skizon dan merozoit yang kemudian akan menginvasi eritrosit baru. Fase aseksual terjadi selama 48 jam untuk *P.falciparum*, *P.vivax* dan *P.ovale* serta 72 jam untuk *P.malariae*. Setelah itu, merozoit akan berkembang menjadi gametosit. Gametosit, jantan (mikrogametosit) dan betina (makrogametosit), dapat terhisap ke dalam tubuh nyamuk pada saat menghisap darah manusia. Gametosit tersebut akan mengalami fase seksual (sporogoni) di dalam tubuh nyamuk. Di dalam perut nyamuk, mikrogamet akan memasuki makrogamet menghasilkan zigot. Zigot berubah menjadi motil dan memanjang (ookinet) yang akan berkembang menjadi ookist dan terakhir berubah menjadi sporozoit di dalam kelenjar saliva. Sporozoit ini akan kembali menginfeksi manusia melalui gigitan nyamuk. Tidak seperti *P.falciparum* dan *P.malariae* yang hanya tinggal di hati selama 3 minggu sebelum menginvasi eritrosit, *P.ovale* dan *P.vivax* dapat tinggal di hati dalam jangka waktu yang lama dalam bentuk laten (hipnozoit) sehingga dapat menyebabkan infeksi berulang setelah berminggu-minggu atau berbulan-bulan kemudian (Malaria, 2011).

Malaria yang disebabkan oleh *Plasmodium falciparum* tercatat sebagai penyakit yang paling mematikan, malaria ini biasa disebut dengan malaria tropika/ *serebral*. Gejala klinis malaria karena *P.falciparum* umumnya lebih berat dan lebih akut dibandingkan jenis lain ditandai dengan panas yang tidak teratur, anemia, splenomegali, dan sering terjadi komplikasi (Harijanto, Nugroho, & Gunawan, 2009). Malaria ini menyerang semua jenis sel darah merah, yang menyebabkan sel menjadi sangat rapuh. Banyaknya sel darah merah yang rusak akibat infeksi par寄生虫 menjadikan transportasi ke organ vital tubuh menjadi terganggu dan dapat mengakibatkan kematian secara cepat (Dziedzic, 2009).

Penanganan terhadap penyakit malaria yang disebabkan oleh *Plasmodium falciparum* telah banyak dilakukan. Banyak peneliti berusaha untuk menemukan dan mengembangkan obat antimalaria baru karena banyaknya resistensi pada obat

malaria saat ini. Selain itu, diperlukan juga target baru untuk terapi malaria. Tujuannya untuk menghasilkan obat yang aman dan mampu melawan parasit malaria yang telah resisten terhadap antimalaria sebelumnya. Salah satu target protein yang dapat digunakan untuk penambatan yaitu *Plasmodium falciparum Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (PfENR)*.

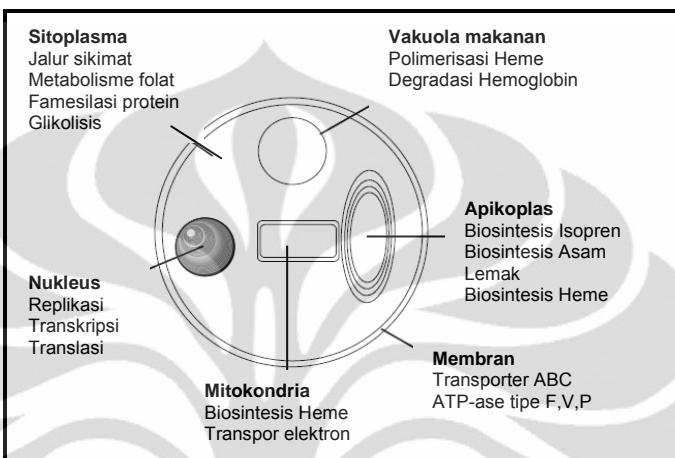
Tabel 2.2. Target antimalaria

Lokasi	Mekanisme	Molekul Target	Terapi sebelumnya	Senyawa baru
Sitosol	Metabolisme Folat Glikolisis	Dihidrofolat reduktase Timidilat sintase	Pirimetamin	Klorproguanil 5-fluoroorotat
Vakuola makanan	Hidrolisis Hemoglobin	Plasmepsin		Protease inhibitor
Apikoplas	Biosintesis asam lemak PfENR tipe II	FabH		Tiolaktomisin Triklosan
Membran Parasit	Sintesis fosfolipid	Pembawa kolin	G25	
Ekstraseluler	Invasi eritrosit	Subtilisin serin protease		Protease inhibitor

2.2 *Plasmodium falciparum Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (PfENR)*

Plasmodium falciparum Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (PfENR) terletak di dalam apikoplas, dimana organel tersebut merupakan tempat terjadinya beberapa metabolisme dalam *Plasmodium falciparum*. Salah satu proses yang terjadi di dalam apikoplas (Gambar 2.5) yaitu biosintesis asam lemak yang cukup penting untuk kehidupan organisme. Asam lemak merupakan komponen utama membran sel sehingga sangat dibutuhkan kehadirannya untuk mempertahankan

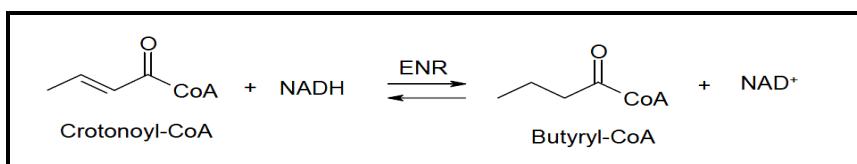
keutuhan sel. Pada *Plasmodium falciparum*, biosintesis asam lemak juga dibutuhkan untuk pertumbuhan sel, pembelahan sel dan homeostatis. Biosintesis asam lemak meningkat selama fase eritrosit, dimana parasit tumbuh dan membelah dengan sangat cepat (Tasdemir, 2006).



[Sumber: Tasdemir,2010] "telah diolah kembali"

Gambar 2.5. Lokasi metabolisme pada *Plasmodium falciparum*

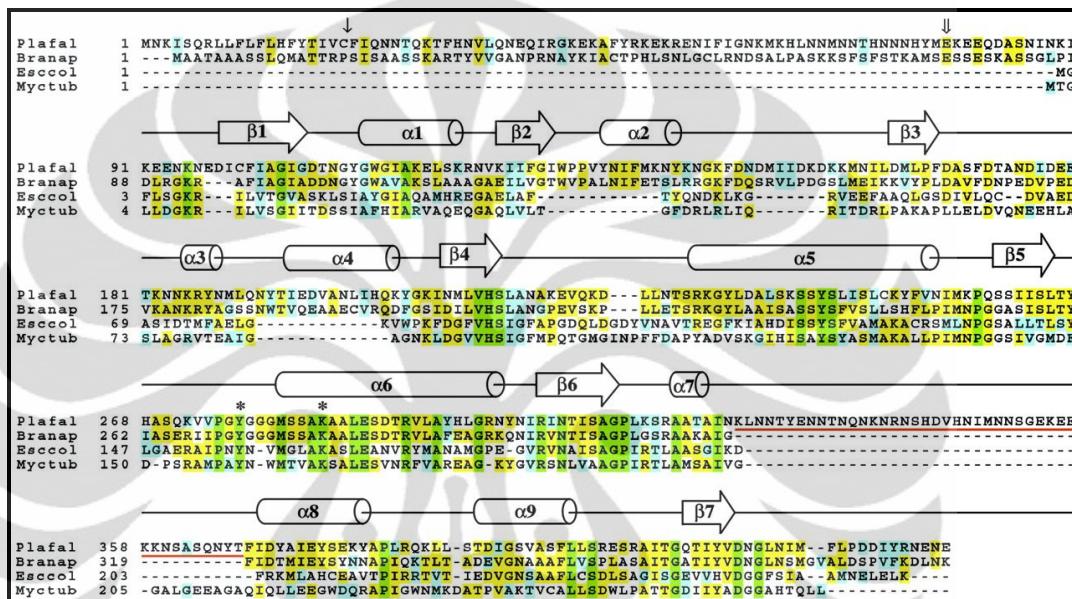
Biosintesis asam lemak yang terjadi pada *Plasmodium falciparum* yaitu biosintesis asam lemak tipe II. Salah satu enzim yang berperan dalam proses tersebut yaitu *PfENR* yang merupakan enzim kunci dalam jalur biosintesis asam lemak tipe II. Enzim ini terlibat dalam langkah reduksi perpanjangan akhir biosintesis asam lemak (Morde, Shaikh, Pissurlenkar, & Coutinho, 2009). *PfENR* mengkatalisis langkah akhir dari perpanjangan rantai lemak dengan cara mengkonversi trans-2-asil-ACP menjadi asil-ACP dan mengurangi ikatan rangkap karbon pada enoil yang terikat secara kovalen pada pembawa protein asil (Jeff Zhiqiang Lu, Lee, Waters, & Prigge, 2005). *PfENR* menggunakan NADH sebagai koenzim dalam reaksi katalisis dimana *Crotonoyl-CoA* diubah menjadi *Butyryl-CoA* seperti gambar di bawah ini.



[Sumber: Tasdemir,2010]

Gambar 2.6. Reduksi *Crotonoyl-CoA* menjadi *Butyryl-CoA*

PfENR mempunyai sekuen yang spesifik yaitu adanya penyisipan 43 residu asam amino pada salah satu untai yang tidak dimiliki pada ENR spesies lain. Enzim ini juga mempunyai daerah kompleks yang rendah pada residu 325-367 (garis merah) yang dikelilingi oleh residu polar seperti asparagin, lysin, glutamin dan serin (Perozzo R, *et al.*, 2002). *PfENR* yang spesifik ini menjadikannya sangat potensial sebagai target baru antimalaria.

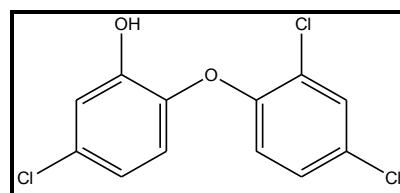


[Sumber: Perozzo R, *et al.*, 2002]

Gambar 2.7. Sekuens *Plasmodium falciparum Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (PfENR)*

2.3 Inhibitor *PfENR*

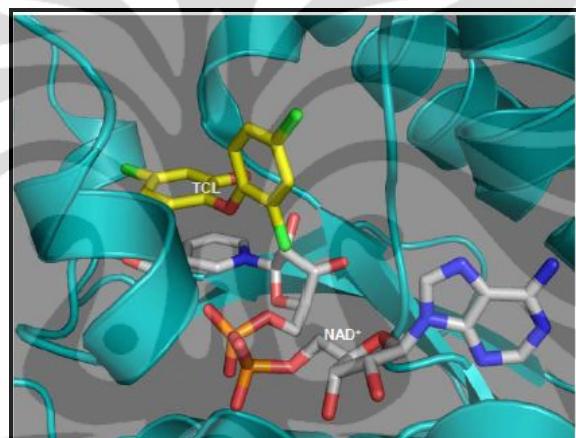
Biosintesis asam lemak adalah target yang sangat cocok untuk pengembangan obat anti bakteri. Hal ini berkaitan dengan terhambatnya biosintesis asam lemak yang sangat penting pada proses metabolisme bakteri dan protozoa. Inhibitor yang selama ini dikenal untuk *PfENR* yaitu triklosan.



[Sumber: Morde, Shaikh, Pissurlenkar, & Coutinho, 2009] "telah diolah kembali"

Gambar 2.8. Struktur Triklosan

Triklosan menghambat biosintesis asam lemak secara spesifik dengan cara menyerupai substrat alami dari *PfENR* yang memerlukan NADH untuk aktivitasnya dan menjadi tidak aktif ketika digantikan oleh NADPH sebagai koenzim. Hidroksil dari ribosa adenin diapit oleh situs aktif residu yang mencegah pengikatan fosfat tambahan pada NADPH. Sebuah studi kinetika dilakukan pada *PfENR* rekombinan menunjukkan bahwa kehadiran koenzim teroksidasi (NAD^+) mempromosikan pengikatan triklosan untuk enzim. Triklosan terikat di situs aktif *PfENR* dalam jarak dekat dengan cincin nikotinamid dari koenzim NAD^+ (Jeff Zhiqiang Lu, Lee, Waters, & Prigge, 2005).

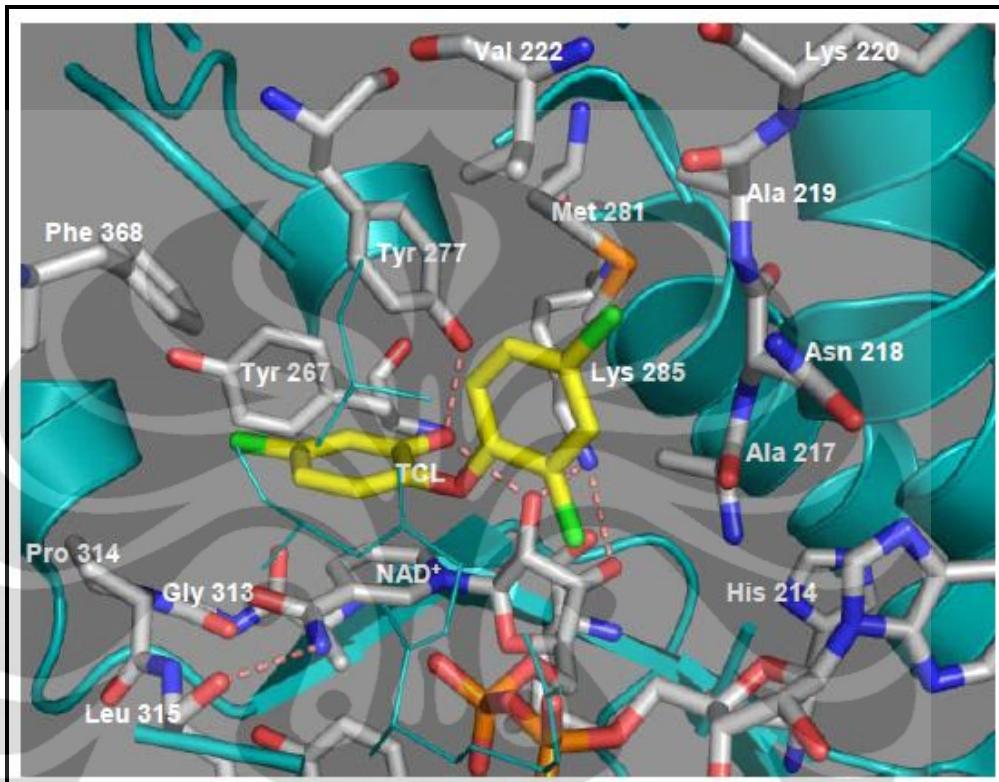


[Sumber: Moreno, 2005]

Gambar 2.9. Triklosan dan NAD^+ terikat pada situs aktif *PfENR*

Triklosan membentuk kompleks non kovalen dengan NAD^+ (NADH) dan membentuk ikatan hidrogen dengan *PfENR*. Ikatan ini menunjukkan adanya interaksi antara cincin nikotinamida pada NAD^+ (NADH) dengan cincin fenol (A) pada triklosan. Cincin yang sama membentuk interaksi van der Waals dengan residu pada Tyr267, Tyr277, Pro314, dan Ile369. Selain itu, ikatan hidrogen terbentuk antara hidroksil ribosa nikotinamida dan Tyr277. Pada cincin B, atom kloro pada posisi 4 akan membentuk ikatan dengan residu Val222 dan Met281, sedangkan kloro pada posisi 2 dikelilingi oleh atom α -karbon dan membentuk ikatan dengan residu Ala217. Berdasarkan informasi yang diperoleh dari struktur kristal *PfENR*, diketahui bahwa situs aktif *PfENR* dikelilingi oleh residu

hidrofobik yaitu Val222, Tyr277, Tyr267, Phe 368, Pro314, Gly313, Leu315, His214, Ala217, Asn218, Ala219, Lys220, Met231, dan Lys285 (Moreno, 2005).



[Sumber: Moreno, 2005]

Gambar 2.10. Interaksi ikatan triklosan dan NAD⁺ pada sisi aktif *PfENR*

2.6 Bioinformatika

Bioinformatika adalah suatu disiplin ilmu yang melibatkan ilmu biologi, ilmu komputer, statistika, dan teknologi informasi di dalamnya. Bioinformatika memanfaatkan teknologi komputer untuk penyimpanan, pencarian, manipulasi, dan distribusi informasi yang berkaitan dengan makromolekul biologi seperti protein, DNA, dan RNA. Bioinformatika terbatas hanya pada urutan, struktural, dan analisis fungsional gen, genom, dan produk yang berhubungan serta sering dianggap komputasi molekuler biologi dan juga dapat diaplikasikan dalam bidang bioteknologi dan ilmu biomedis. Interaksi protein dengan ligan memungkinkan adanya pemikiran untuk mengidentifikasi secara cepat untuk penemuan dan sintesis obat. Dengan mengetahui struktur 3 dimensi protein, sangat memungkinkan untuk melakukan

perancangan molekul yang mampu mengikat ke situs reseptor dengan afinitas yang besar (Jin Xiong, 2006).

Salah satu topik dalam bioinformatika adalah penemuan obat. Sebelum teknologi informasi digunakan dalam proses penemuan obat, pencarian senyawa yang cocok (*screening*) untuk menjadi calon obat harus dilakukan secara manual satu per satu di laboratorium. Hal ini menjadi mahal dan tidak efisien karena jumlah senyawa jumlahnya sangat banyak. Dengan adanya teknologi informasi yang membantu proses *screening* dari calon senyawa obat ini, maka telah berhasil mengurangi biaya riset dan waktu dalam penemuan obat. Walaupun penelitian di laboratorium tetap dilakukan untuk verifikasi, jumlah senyawa yang diuji tidak terlalu banyak karena komputer telah memberikan kandidat beberapa senyawa yang memiliki kriteria paling baik (Gareth, 2003).

2.7 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). 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 *in silico screening* atau *virtual screening*; dan memprediksi afinitas ikatan dari beberapa seri senyawa aktif (Leach, Shoichet, & Peishoff, 2006).

Dengan adanya dua molekul, sebagai reseptor dan ligan, penambatan molekuler merupakan usaha untuk memprediksi model pengikatan dengan cara mengevaluasi nilai energi dari konformasi ikatan berbeda menggunakan fungsi nilai tertentu. 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 variabel 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: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.

2.8 *Virtual Screening* (Penapisan *In Silico*)

Aplikasi yang cukup penting pada perangkat penambatan molekuler yaitu *virtual screening* atau disebut juga penapisan *in silico*. *Virtual screening* merupakan suatu metode komputasi dengan performa yang tinggi untuk menganalisa suatu set *database* dari senyawa kimia untuk mengidentifikasi kandidat senyawa obat. Metode komputasi ini membutuhkan biaya yang lebih ringan serta waktu yang lebih efisien dibandingkan dengan *screening* secara farmakologi (Tang & Marshall, 2011).

Metode yang digunakan pada penapisan *in silico* tergantung pada informasi yang didapat sebagai *input* dan tipe dari hasil yang dibutuhkan sebagai *output*. Contoh: jika struktur tiga dimensi dari protein target dapat diperoleh, maka penambatan molekuler dapat digunakan untuk melakukan *screening* berdasarkan reseptor, atau dikenal pula dengan nama *structure based virtual screening*. Namun bila struktur tiga dimensi dari reseptor tidak ada, maka digunakan model *pharmacophore* dari ligan bioaktif disebut pula *ligand based virtual screening* (Hou & Xu, 2004)

Structure based virtual screening merupakan prediksi ikatan pada protein target dengan menggunakan metode komputasi, dengan menggunakan struktur 3 dimensi target yang telah diketahui. Tujuan utama dari *structure based virtual screening* adalah untuk memprediksi posisi ikatan dari molekul kecil (ligan) dengan menggunakan penambatan molekuler (*docking*) dan selanjutnya memprediksi energi bebas dari molekul tersebut (*scoring*) (Alvarez & Shoichet, 2005). Beberapa metode tersedia untuk *structure based virtual screening* ini, dan perangkat lunak yang biasanya digunakan yaitu GLIDE, GOLD, ICM, AutoDock, dan FLEXX.

Ligand based virtual screening dilakukan apabila struktur tiga dimensi dari protein target tidak ada ataupun apabila diharuskan untuk mencari kesimpulan hubungan struktur aktivitas. *Ligand based virtual screening* ini

menggunakan model farmakofor untuk menemukan kandidat obat. Martin (Abbot) merupakan peneliti pertama yang mengembangkan perangkat lunak untuk melakukan *ligand based virtual screening* ini. Perangkat lunak tersebut dikenal dengan nama Aladdin yang dikembangkan pada akhir 1980 dan awal 1990. Saat ini, terdapat beberapa perangkat lunak lain yang digunakan untuk model penapisan *in silico* ini diantaranya MACCS- 3D dan ROCS. Kedua perangkat lunak ini bekerja melalui dua tahap, dimana tahap pertama ia memeriksa apakah senyawa tersebut memiliki gugus fungsional yang diperlukan oleh farmakofor, selanjutnya ia memeriksa konformasi spasial dari senyawa tersebut.

2.9 Protein Data Bank (Bank Data Protein)

Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB) adalah sebuah dokumen atau kumpulan data eksperimental struktur tiga dimensi dari 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 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 bertanggung jawab dalam pengaturan data dalam *PDB*. Secara umum, *RCSB* berkeinginan untuk menciptakan sumber berdasarkan teknologi modern sehingga data dapat digunakan untuk analisis struktur, yang lebih lanjut dapat digunakan untuk analisis secara biologis. *RCSB* dioperasikan oleh Rutgers, The State University of New Jersey, dan San Diego Supercomputer Center di University of California (Kouranov, *et al.*, 2006).

2.10 Database Tanaman Obat Indonesia

Database Tanaman Obat di Indonesia merupakan *database* struktur tiga dimensi senyawa kimia dari tanaman obat di Indonesia dibuat berdasarkan Materia Medika Indonesia jilid I sampai VI yang terdiri dari 222 spesies dengan

Universitas Indonesia

input struktur tiga dimensi sebanyak 1450 senyawa. Selain berisi struktur tiga dimensi senyawa kimia dari tanaman obat, *database* ini juga memuat nama latin, sinonim, famili, nama daerah, dan tempat penyebarannya, serta struktur dua dimensi senyawa kimia dari tanaman obat tersebut (Bertha, 2010). Database ini dapat diakses dengan alamat www.herbaldb.farmasi.ui.ac.id.

2.11 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* atau penapisan *in silico*. 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 memberikan beberapa pilihan dalam penilaian 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 Kriteria dan Parameter Penambatan

Hasil yang ditunjukkan oleh GOLD berupa GoldScore yang tersusun dari nilai tertinggi hingga nilai terendah. GoldScore lebih menunjukkan konformasi

ligan terbaik dan afinitas ikatan. GoldScore berbanding terbalik dengan energi afinitas. Semakin negatif ΔG , maka semakin besar nilai GoldScore. Konformasi terbaik ditunjukkan dengan nilai GoldScore yang besar (Nervall, *et al.*, 2007).

2.13 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).

2.14 Open Babel

Open Babel merupakan perangkat lunak yang berguna untuk mengubah format file dari satu format ke format lainnya yang akan digunakan dalam *molecular modelling*, kimia-informatik, dan bioinformatik. Perangkat lunak ini dapat mengubah lebih dari 110 format file. Open Babel dapat diunduh dan digunakan secara gratis dari <http://openbabel.org> (Hutchison, *et al.*, 2008).

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 pengaturan supramolekuler, penataan sekuens, 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 perangkat lunak untuk *molecular modeling* dengan antarmuka grafik 3 dimensi, 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 kalkulasi terhadap molekul. Saat ini, 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.

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 Januari hingga Mei 2011.

3.2 Alat

3.2.1 Perangkat Keras

Perangkat keras berupa komputer dengan spesifikasi RAM (*Random Access Memory*) empat gigabyte, *Quad Core processor* (Intel® CoreTM, Amerika), *Graphic Card* NVIDIA Ge Force GTS 9400 (Taiwan), dan sistem operasi Microsoft Windows 7® (Amerika). Kelengkapan komputer yakni monitor (AOC, China), CPU (*Central Processing Unit*) Asus (Taiwan), *mouse* (Logitech, China) dan *keyboard* (Simbadda, Indonesia). Komputer terhubung dengan koneksi internet dan UPS (*Uninterrupted Power Supply*).

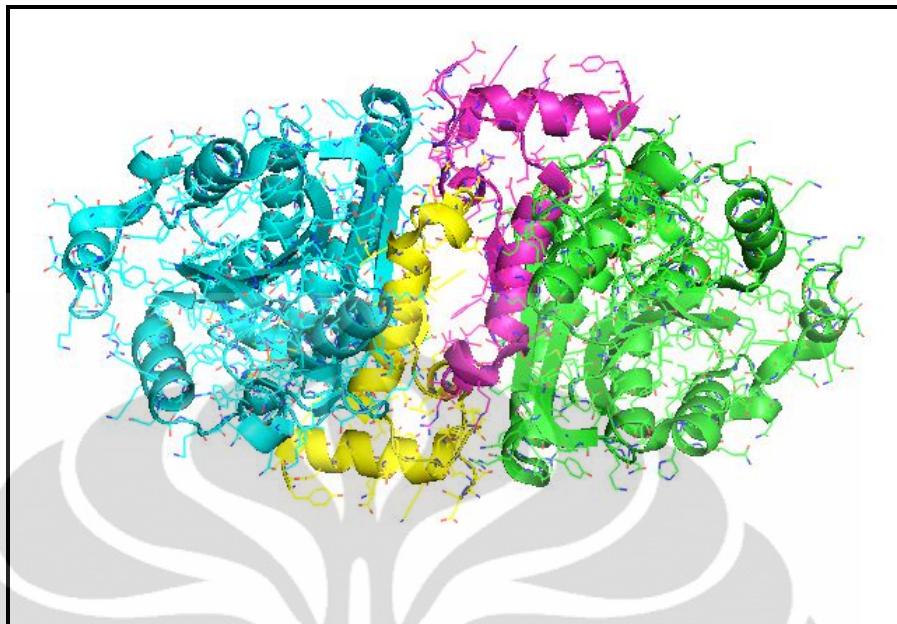
3.2.2 Perangkat Lunak

Perangkat lunak berupa UCSF Chimera (*Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatic*, University of California San Fransisco, Amerika), Vega ZZ (*The Drug Design Laboratory*, University of Milan, Italia), Open Babel (*The Blueobelisk Group*, America), GOLD (*The Cambridge Crystallographic Data Centre*, Inggris), PyMOL (DeLano Scientific LLC, Italia).

3.3 Bahan

3.3.1 Struktur Tiga Dimensi *Plasmodium falciparum Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (PfENR)* (Makromolekul)

Struktur tiga dimensi *PfENR* yang diunduh dari Bank Data Protein dengan situs <http://www.rcsb.org/pdb> (Perozzo,*et al.*,2002) dengan identitas 1NHG yang berupa tetramer.



[Sumber : Perozzo, et al., 2002 (PDB ID : 1NHG)]

Gambar 3.1 Struktur tiga dimensi makromolekul *PfENR*

3.3.2 Struktur Tiga Dimensi Ligan

Ligan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu struktur tiga dimensi dari tanaman obat di Indonesia yang telah ada pada *Database Tanaman Obat di Indonesia* (Bertha, 2010).

3.3.3 Kontrol Positif dan Negatif dari inhibitor *PfENR*

Kontrol positif dan negatif diunduh dari *PubChem Compound* dengan situs <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

3.4 Cara Kerja

Skema cara kerja terdapat pada Lampiran 1.

3.4.1 Penyiapan Struktur Protein

Pengunduhan makromolekul *Plasmodium falciparum Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase* (*PfENR*) dari Bank Data Protein dengan situs <http://www.rcsb.org.pdb>. Identitas molekul yang diinginkan yakni 1NHG yang terikat dengan nikotinamida adenin dinukleotida (NAD) dan triklosan (TCL). Data makromolekul disimpan dengan bentuk .pdb

3.4.2 Pemisahan Residu dari Molekul *Plasmodium falciparum Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (PfENR)* untuk Target Penambatan

Makromolekul dipisahkan dari pelarut dan ligan atau residu non standar. Pemisahan makromolekul dari molekul yang tidak diperlukan, dilakukan dengan menggunakan program UCSF Chimera. Hasil pemisahan tersebut akan digunakan untuk penambatan. Hasil pemisahan disimpan dalam bentuk .pdb.

3.4.3 Optimasi Makromolekul *Plasmodium falciparum Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (PfENR)*

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. Untuk perangkat lunak GOLD, selanjutnya hasil optimasi disimpan dalam bentuk .pdb

3.4.4 Validasi Metode Penapisan *In Silico*

Validasi metode penapisan *in silico* dilakukan dengan cara penambatan molekuler. Kontrol positif dan negatif diunduh dari <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> selanjutnya dilakukan optimasi dan dilakukan penambatan molekuler dengan makromolekul target. Penambatan ini dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak GOLD (Lampiran 2).

3.4.5 Penyiapan Struktur Ligan

Ligan yang digunakan diperoleh dari *database* Tanaman Obat di Indonesia, sebanyak 1450 ligan dalam bentuk tiga dimensi dengan format .mol. Sumber data yang dijadikan acuan adalah Materia Medika Indonesia jilid I sampai VI. Ligan telah dioptimasi dengan menggunakan perangkat lunak Vega ZZ berupa penambahan hidrogen dan minimisasi energi.

3.4.6 Penambatan Molekuler

Untuk penambatan molekuler ligan dan molekul target dilakukan dengan perangkat lunak GOLD. Skema kerja terdapat pada lampiran 3.

3.4.7 Kandidat Senyawa Inhibitor *PfENR*

Berdasarkan hasil penambatan molekuler dibuat peringkat 5 besar kandidat senyawa inhibitor *PfENR* sesuai dengan GoldScore tertinggi dan solusi terbaik.

3.4.8 Analisis dan Visualisasi Interaksi Protein-Ligan

Peringkat kandidat senyawa inhibitor *PfENR* divisualisasi menggunakan perangkat lunak GOLD dan PyMOL. Hasil penambatan GOLD disimpan dalam bentuk .conf dan .mol yang dapat dibuka menggunakan GOLD dan PyMOL. Program GOLD digunakan untuk melihat nilai GoldScore yang menggambarkan konformasi terbaik serta ikatan hidrogen ligan dengan protein yang juga dilengkapi dengan jarak ikatan. Program PyMOL selanjutnya digunakan untuk mengolah data hasil penambatan molekul untuk divisualisasi (Lampiran 4).

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penyiapan Struktur Protein

4.1.1 Pengunduhan Makromolekul *Plasmodium falciparum Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (PfENR)*

Tahap awal dalam penelitian ini adalah pengunduhan makromolekul *PfENR* sebagai target penambatan. Dari pencarian melalui Bank Data Protein dihasilkan satu makromolekul *PfENR* yang diunduh strukturnya dengan format .pdb. Struktur dengan identitas 1NHG memiliki 4 subunit (tetramer) yaitu subunit A,B,C,dan D. Makromolekul ini terikat dengan ligan nikotinamida adenin dinukleotida (NAD) dan triklosan (TCL) yang merupakan hasil difraksi sinar X. Kondisi dan kualitas dari struktur *PfENR* yang diunduh tercantum pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Struktur *PfENR* yang diunduh dari Bank Data Protein

Identitas	Sub Unit	Ligan terikat	Jenis Enzim	Resolusi (Å)
1NHG	A,B,C,D	NAD dan TCL yang terikat pada subunit A dan B	Oksidoreduktase	2,43

Struktur *PfENR* 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 *PfENR* yang digunakan adalah tetramer asli. Hal ini untuk melihat variasi pengikatan serta prediksi mekanisme dari penambatan ligan. Pemilihan struktur dengan identitas 1NHG didasarkan atas strukturnya yang utuh belum mengalami mutasi dan modifikasi serta identik dengan ekspresi *Plasmodium falciparum*.

4.1.2 Pemisahan Residu pada Rantai Makromolekul *PfENR* untuk target penambatan

Dari pengunduhan makromolekul *PfENR* 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 *PfENR* 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 air yang tersebar pada sekeliling makromolekul dapat mengganggu ikatan proses penambatan berupa kemungkinan terikatnya ligan dengan molekul air melalui ikatan hidrogen.

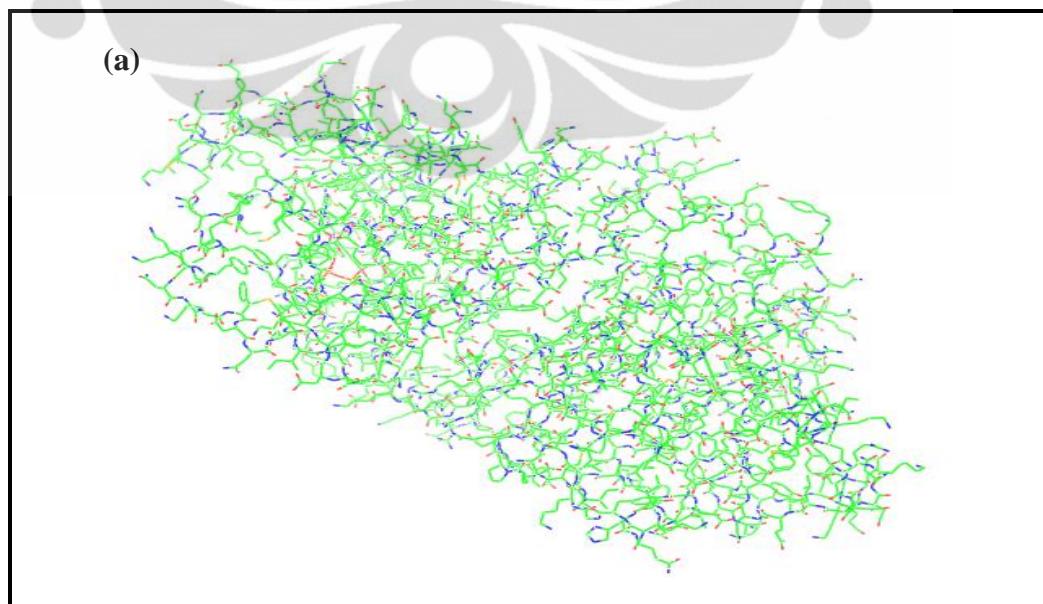
Perangkat lunak UCSF Chimera berfungsi memotong residu non-standard dengan tidak mengubah susunan atom-atom lain. Pada makromolekul *PfENR* yang diunduh (PDB ID: 1NHG), hanya terdapat residu non-standard berupa ligan dan molekul air.

4.1.3 Optimasi Makromolekul *PfENR*

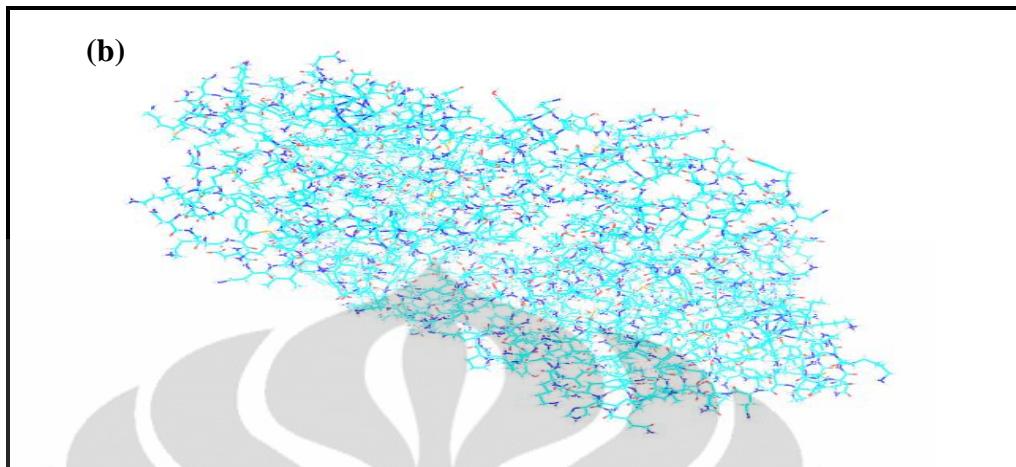
Pada tahap optimasi struktur, dilakukan kembali penghilangan molekul air dan penambahan hidrogen pada masing-masing residu. Struktur dengan hidrogen yang hilang menjadi terikat kembali. Pada tahap perbaikan muatan, ditambahkan *force field* AutoDock dan muatan *Gasteiger*. Selanjutnya dilakukan proses 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

Optimasi makromolekul hasil kristalisasi dari Bank Data Protein 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 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 GoldScore yang berdasarkan *force field*.

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.



(lanjutan)



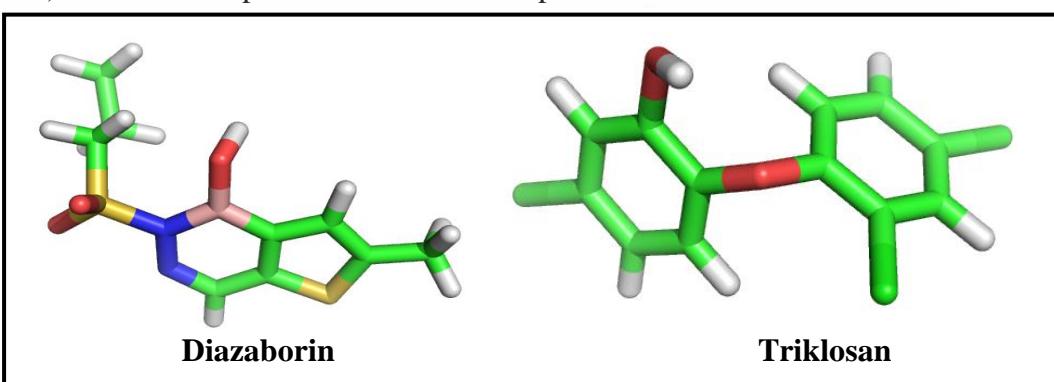
[Sumber: Olahan penulis dengan Vega ZZ dan PyMOL]

Gambar 4.1. Struktur 3 dimensi makromolekul *PfENR* (a) sebelum optimasi dan (b) setelah optimasi dengan situs aktif berada pada subunitA

4.2 Validasi Metode *Virtual screening* (*Penapisan In Silico*)

4.2.1 Pengunduhan Kontrol Positif dari Inhibitor *PfENR*

Kontrol positif dari inhibitor *PfENR* diunduh dari *PubChem Compound* dengan alamat situs <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Dari website ini diperoleh 2 senyawa inhibitor *PfENR* dengan struktur 3 dimensi. Kontrol positif yang diperoleh yaitu diazaborin (PubChem ID: CID [171833](#)) (Morde, Shaikh, Pissurlenkar, & Coutinho, 2009) dan triklosan (PubChem ID: CID [5564](#)) (Morde, Shaikh, Pissurlenkar, & Coutinho, 2009; Perozzo, *et al.*, 2002; Jeff Zhiqiang Lu, Lee, Waters, & Prigge, 2005) yang diketahui sebagai inhibitor *PfENR* (Gambar 4.2). Data kontrol positif kemudian disimpan dalam bentuk .sdf.



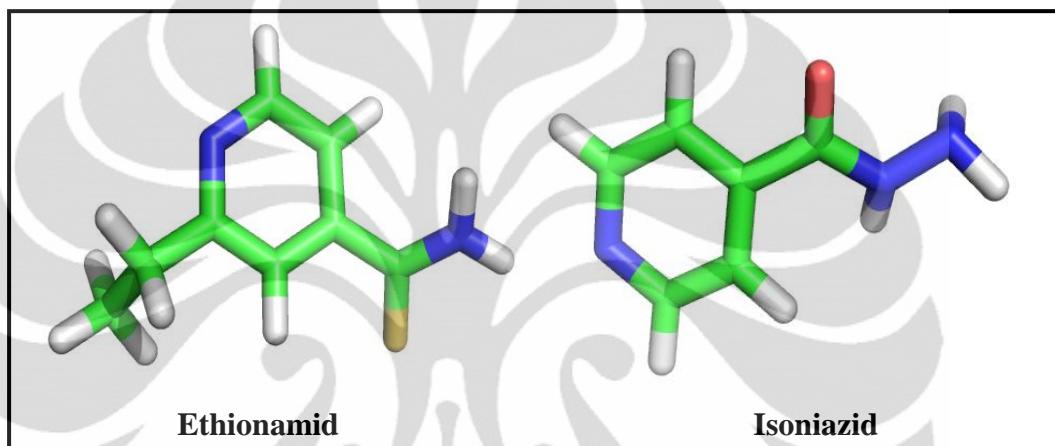
[Sumber: *PubChem Compound*] "telah diolah kembali"

Gambar 4.2 Struktur tiga dimensi kontrol positif inhibitor *PfENR*

Universitas Indonesia

4.2.2 Pengunduhan Kontrol Negatif dari Inhibitor *PfENR*

Kontrol negatif dari inhibitor *PfENR* dipilih dari senyawa yang juga diketahui sebagai inhibitor *ENR* namun berbeda spesies. Senyawa ini biasa digunakan pada *Mycobacterium tuberculosis* yang juga mempunyai enzim *ENR*. Untuk kontrol negatif digunakan 2 ligan, yaitu ethionamid (PubChem ID: CID [2761171](#)), dan isoniazid (PubChem ID: CID [3767](#)) (Perozzo, *et al.*, 2002). Data kontrol negatif kemudian disimpan dalam bentuk .sdf.



[Sumber: Pubchem Compound] "telah diolah kembali"

Gambar 4.3 Struktur tiga dimensi kontrol negatif inhibitor *PfENR*

4.2.3 Konversi File Kontrol Positif dan Negatif Dari Inhibitor *PfENR*

Untuk melakukan penambatan molekuler format file hasil unduhan dari *PubChem Compound* harus diubah formatnya, dari format file .sdf menjadi .mol. Untuk melakukan konversi format file ini digunakan program Open Babel (Lampiran 10). Open Babel sendiri merupakan perangkat lunak yang dapat diunduh secara gratis di internet. Open Babel ini biasa digunakan untuk mengkonversi format file kimia maupun *molecular modeling* secara mudah dan cepat.

4.2.4 Penambatan Molekuler Menggunakan GOLD

Penambatan molekuler terhadap kontrol positif dan kontrol negatif dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak GOLD. Pada saat penambatan

beberapa residu asam amino pada sisi aktif mengalami protonasi salah satunya yaitu His214 pada subunit A. Koordinat ruang penambatan yang digunakan ini akan digunakan pula pada penambatan molekuler saat penapisan *in silico*. Koordinat yang diperoleh untuk ruang penambatan yakni koordinat (X,Y,Z) 51,24; 93,77; 34,53.

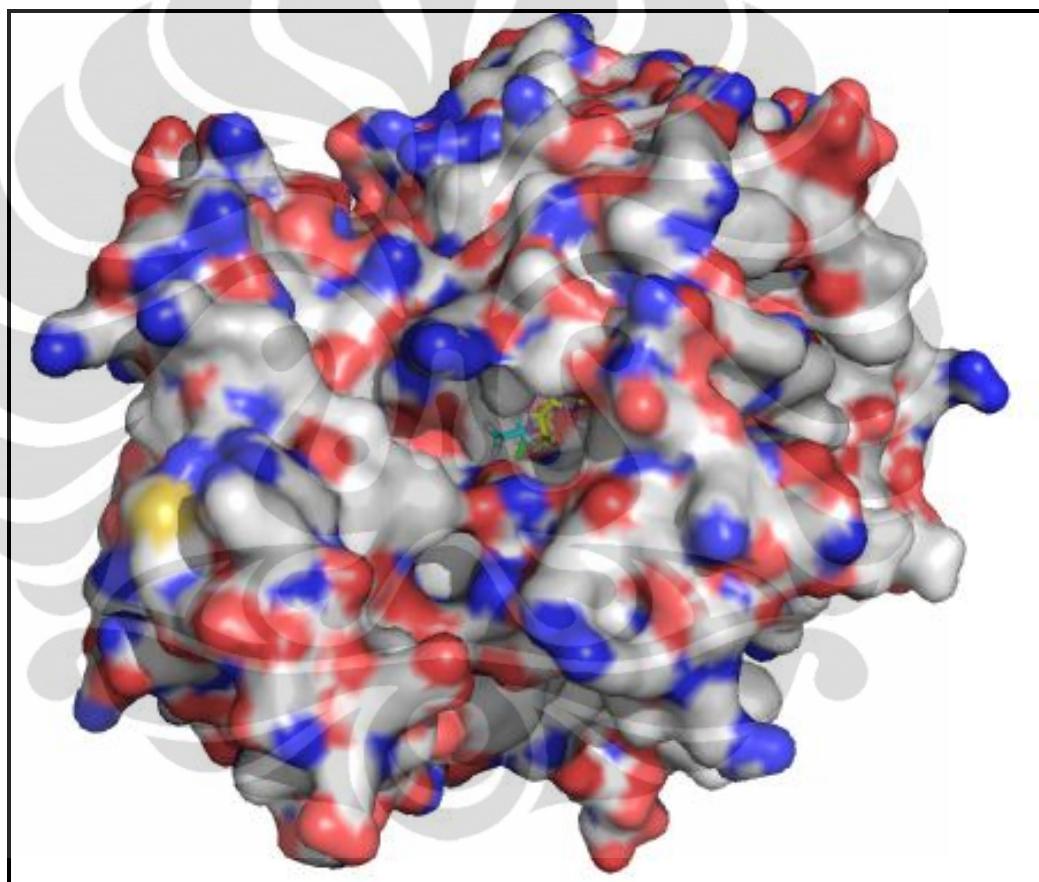
Untuk memvalidasi metode penapisan *in silico* yang akan digunakan, maka dilakukan penjalanan penambatan molekuler dengan menggunakan kecepatan *GA Search Option*, yaitu *fast*, *medium*, dan *slow*. Masing-masing kecepatan *GA Search Option* ini dilakukan penambatan molekuler sebanyak lima kali. Berdasarkan hasil penambatan molekuler pada kontrol positif dari inhibitor *PfENR* diperoleh hasil yang tercantum pada Tabel 4.2

Berdasarkan hasil validasi metode ini, maka dapat dilihat bahwa dengan *GA Search Option* kecepatan *slow* yang memberikan hasil yang paling baik sehingga untuk penambatan molekuler pada penapisan *in silico* akan dilakukan dengan *GA Search Option* kecepatan *slow* dengan koefisien variasi masing-masing sebesar 0,47% untuk diazaborin dan 1,47% untuk triklosan.

Tabel 4.2. Hasil penambatan molekuler pada kontrol positif inhibitor *PfENR* pada lima kali percobaan dengan kecepatan *Fast*, *Medium*, dan *Slow*

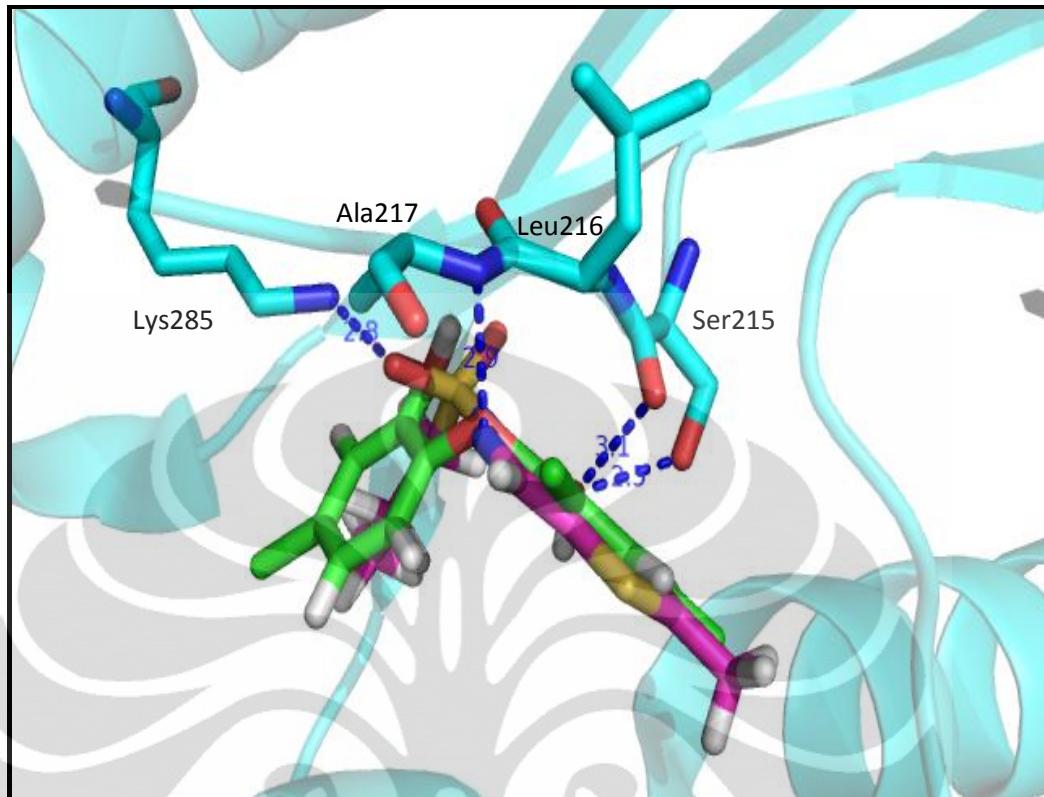
Fast		GoldScore					Rata-rata	SD	KV (%)
Diazaborin	44,8975	46,0123	44,0069	46,6248	45,3384	45,3759	1,01	2,22	
Triklosan	43,6904	43,4765	43,4369	42,0375	42,8274	43,0937	0,67	1,56	
Medium		GoldScore					Rata-rata	SD	KV (%)
Diazaborin	49,4241	47,5632	51,9251	45,4763	49,735	48,8247	2,43	4,97	
Triklosan	42,8652	43,0743	43,5948	43,7142	44,1878	43,4872	0,53	1,21	
Slow		GoldScore					Rata-rata	SD	KV (%)
Diazaborin	49,7496	50,2702	50,9745	49,2710	50,9272	50,2385	0,74	1,47	
Triklosan	43,6917	43,8588	43,5647	43,3111	43,5049	43,5862	0,21	0,47	

Pada hasil penambatan molekuler kontrol positif terlihat bahwa kontrol positif mengikat *PfENR* tepat masuk ke dalam situs aktif dari *PfENR* itu sendiri yaitu dibagian residu hidrofobik. Hal ini ditunjukkan oleh Gambar 4.4. Selain itu, konformasi ikatan pada *PfENR* oleh kedua kontrol positif pun hampir serupa. Dimana kontrol positif mengisi tempat situs aktif dari *PfENR*. Hal ini ditunjukkan pada Gambar 4.5.



[Sumber: Olahan penulis dengan PyMOL]

Gambar 4.4 Situs Aktif *PfENR* berikatan dengan kontrol positif



[Sumber: Olahan penulis dengan GOLD dan PyMOL]

Gambar 4.5 Konformasi ikatan kontrol positif diazaborin (ungu) dan triklosan (hijau) dengan *PfENR* (PDB ID: 1NHG)

Pada gambar di atas menunjukkan kontrol positif berikatan pada residu hidrofobik dari *PfENR* yaitu Ala217 dan Lys285 yang merupakan situs aktif dari *PfENR*. Gambar 4.6 dan 4.7 menunjukkan gambaran dari konformasi ikatan hidrogen pada kontrol positif terhadap *PfENR*.

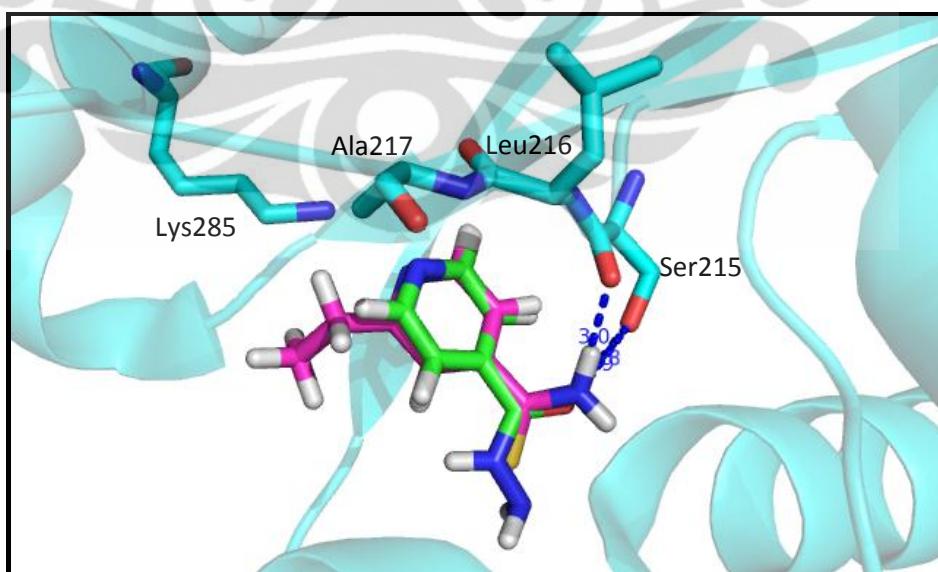
Pada penambatan molekuler dengan menggunakan kontrol negatif dilakukan dengan *GA Search Option* dalam tiga kecepatan, yaitu *fast*, *slow*, *medium*. Tiap kecepatan dilakukan masing-masing lima kali. Hasil dari penambatan molekuler pada kontrol negatif tercantum pada Tabel 4.3.

Berdasarkan hasil penambatan molekuler pada kontrol negatif, terlihat perbedaan GoldScore kontrol negatif memiliki nilai lebih kecil dan tidak adanya ikatan hidrogen pada situs aktif *PfENR*.

Tabel 4.3. Hasil penambatan molekuler pada kontrol negatif inhibitor *PfENR* pada lima kali percobaan dengan kecepatan *Fast*, *Medium*, dan *Slow*

Fast		GoldScore					Rata-rata	SD	KV (%)
Ethionamid	35,5500	36,0470	34,8881	34,5898	35,7485	35,3647	0,61	1,72	
Isoniazid	32,1582	31,9949	31,2847	31,7521	32,0932	31,8566	0,35	1,11	
Medium		GoldScore					Rata-rata	SD	KV (%)
Ethionamid	36,1899	35,9799	36,2296	35,8883	36,6417	36,1858	0,29	0,81	
Isoniazid	32,5137	32,4924	32,5649	32,9595	32,6197	32,6300	0,19	0,58	
Slow		GoldScore					Rata-rata	SD	KV (%)
Ethionamid	36,7058	35,8834	36,7176	35,9615	36,9252	36,4387	0,48	1,32	
Isoniazid	32,6942	32,6373	32,4083	32,5427	32,4636	32,5492	0,12	0,36	

Pada hasil penambatan molekuler, kontrol negatif dari semua posisi hasil penambatan tidak memiliki ikatan hidrogen terhadap residu yang berada pada situs aktif dari *PfENR*. Hal ini terlihat pada gambar di bawah ini.



[Sumber: Olahan penulis dengan GOLD dan PyMOL]

Gambar 4.8 Konformasi ikatan kontrol negatif ethionamid (ungu) dan isoniazid (hijau) dengan *PfENR* (PDB ID: 1NHG)

Universitas Indonesia

4.3 Penyiapan Struktur Ligan

Ligan yang digunakan diperoleh dari *database* Tanaman Obat di Indonesia, sebanyak 1450 ligan dalam bentuk tiga dimensi dengan format .mol. Sumber data yang dijadikan acuan adalah Materia Medika Indonesia jilid I sampai VI. *Database* ini merupakan hasil dari penelitian sebelumnya (Bertha, 2010). Ligan yang berada pada *database* ini merupakan senyawa kimia yang terkandung dalam tanaman obat yang di Indonesia. Ligan ini dapat diakses melalui situs www.herbaldb.farmasi.ui.ac.id.

4.4 Penambatan Molekuler *Database* Tanaman Obat di Indonesia pada *PfENR*

Penambatan molekuler untuk penapisan *in silico* dilakukan dengan menggunakan GOLD. GOLD sendiri merupakan perangkat lunak yang efisien dalam waktu untuk melakukan penapisan *in silico*. Alur proses program GOLD untuk penapisan *in silico* terdapat pada Lampiran 3. GOLD menggunakan pendekatan *genetic algorithm* dan menggunakan penilaian dengan pendekatan berdasarkan *force field*. Koordinat ruang penambatan pada GOLD digunakan koordinat yang sama dengan koordinat untuk memvalidasi metode sebelumnya yaitu koordinat (X,Y,Z) 51,24; 93,77; 34,53, serta dengan menggunakan radius 10Å untuk menandai daerah situs pengikatan. Penggunaan radius pada GOLD dikarenakan program ini membatasi daerah situs pengikatan dengan model sferis atau bulat. Pada penapisan *in silico* ini, penambatan molekuler untuk *database* dilakukan terhadap 1450 ligan. *GA Runs* dan *number of solution* yang digunakan masing-masing 10. *Scoring function* yang digunakan adalah GoldScore dan *GA Search Option* yang digunakan adalah *slow (most accurate)*. Pemilihan *GA Search Option* *slow* diperoleh dari hasil validasi metode penapisan *in silico* yang dilakukan, dimana *GA Search Option* *slow* memberikan hasil yang paling baik. Luaran dari proses penambatan dengan program GOLD dihasilkan berupa berkas .conf (*configuration gold file*) dan .mol (bentuk konformasi pengikatan ligan). Proses penambatan berlangsung dengan waktu sekitar 19-60 jam.

GOLD hanya menunjukkan hasil peringkat penambatan berdasarkan skor (GoldScore) serta konformasi-konformasi ikatan. Besar GoldScore ini yang akan

Universitas Indonesia

menentukan peringkat dari kandidat senyawa inhibitor. GoldScore merupakan fungsi nilai dari perangkat lunak GOLD dalam menentukan peringkat posisi terbaik.

4.5 Kandidat Senyawa Inhibitor

Hasil penapisan *in silico* terhadap target *PfENR* dengan menggunakan *database* tanaman obat di Indonesia tercantum pada Tabel 4.4. Penapisan *in silico* dilakukan sebanyak 5 kali. Hasil dalam tabel 4.5 merupakan peringkat 5 besar ligan dengan GoldScore tertinggi serta kemunculan dalam percobaan terbanyak. Sedangkan rumus struktur dari peringkat 5 terbesar senyawa ligan terdapat pada Gambar 4.9 – 4.10

Tabel 4.5. Hasil penapisan *in silico* terhadap target *PfENR*

Peringkat	Ligan	n	GoldScore		
			Rata- rata	SD	KV(%)
1	<i>Kaempferol 3-rhamnosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-glucoside</i>	5	94.7322	3.28	3.46
2	<i>Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside)</i>	4	95.9015	1.15	1.20
3	<i>8-Hydroxyapigenin 8-(2'',4''-disulfatoglucuronide)</i>	5	86.4559	0.49	0.56
4	<i>Epigallocatechin 3,5,-di-O-gallate</i>	5	85.3901	0.70	0.82
5	<i>Quercetin 3,4'-dimethyl ether 7-alpha-L-Arabinofuranosyl-(1-6)-glucoside</i>	4	84.4004	2.77	3.28

*) total percobaan sebanyak 5 kali

n= kemunculan dala percobaan

Berdasar hasil penapisan *in silico*, senyawa dengan kemunculan terbanyak pada percobaan yaitu *Kaempferol 3-rhamnosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-glucoside*, *8-Hydroxyapigenin 8-(2'',4''-disulfatoglucuronide)*, dan *Epigallocatechin 3,5,-di-O-gallate*. Hasil GoldScore menunjukkan posisi terbaik senyawa inhibitor *PfENR* dibandingkan dengan energi afinitas. Hasil penilaian GoldScore merupakan hasil negatif dari jumlah semua energi, sehingga makin besar skor, semakin baik ikatannya (Nervall, Hanspers, Calsson, Boukharta, & Aqvist, 2007).

Kaempferol 3-rhamnosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-glucoside merupakan senyawa flavonol glikosida yang berasal dari famili Theaceae dengan spesies tanaman asal yaitu, *Camellia sinensis*, *Camellia bohea*, *Camellia theifera*, *Thea sinensis*, *Thea assamica*, *Thea cochinchinensis*, *Thea cantoniensis* atau lebih dikenal dengan nama teh. Senyawa flavonoid diketahui mempunyai aktivitas antibakteri dan beberapa flavonoid mempunyai aktivitas antimalaria (Cushnie & Lamb, 2005). Penemuan dan pengembangan flavonoid sebagai antimalaria telah berkembang selama beberapa tahun terakhir (Cushnie & Lamb, 2005; Sannella, et al., 2007). Kebanyakan studi berfokus pada aktivitas flavonoid sebagai antibakteri dan penghambat pada fungsi membran sitoplasma serta metabolisme energi.

Selain mengandung *Kaempferol 3-rhamnosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-glucoside*, teh juga mengandung senyawa *Epigallocatechin 3,5,-di-O-gallate*. Sannella, et al., (2007) dalam penelitiannya menyatakan bahwa kandungan catechin di dalam teh terutama *epigallocatechin-3-gallate* (EGCG) dan *epicatechin gallate* (ECG) mempunyai aktivitas penghambatan pada pertumbuhan *Plasmodium falciparum* secara *in vitro*. Penelitian lain menyebutkan bahwa cathecin yang berasal dari teh mempunyai potensial yang sama dengan triklosan terhadap pengikatan dengan *PfENR*. *Epigallocatechin gallate* memiliki ikatan yang cukup kuat dengan *PfENR* dengan konformasi kompleks biner (Banerjee, Sharma, Surolia, & Surolia, 2008).

Quercetin 3,4'-dimethyl ether 7-alpha-L-Arabinofuranosyl-(1-6)-glucoside berasal dari famili Punicaceae dengan spesies tanaman asal yaitu, *Punica granatum*, *Malum granatum* atau lebih dikenal dengan nama delima. Dell'Agli, et al., (2009), telah melakukan penelitian mengenai ekstrak dari *Punica granatum* terhadap aktivitas antiplasmodial. Dalam penelitiannya, ia mengemukakan bahwa

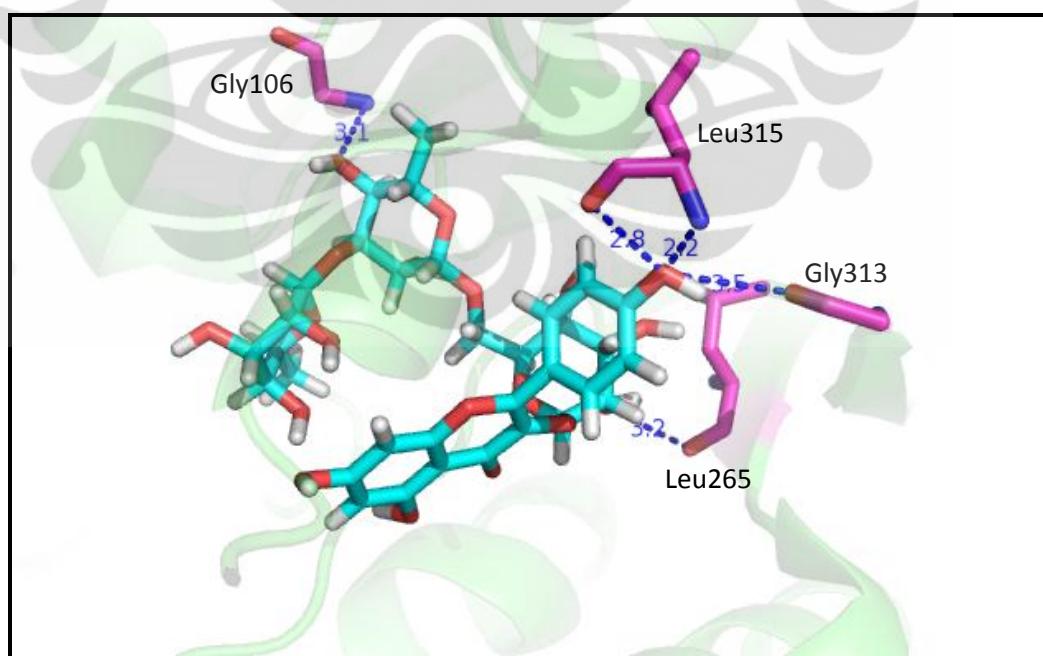
Universitas Indonesia

fraksi tanin berguna untuk menjadi inhibitor dari pertumbuhan Plasmodium dan aktivitas plasmepsin.

4.6 Analisis dan Visualisasi Interaksi Protein-Ligan

Hasil *virtual screening* yang memiliki banyak ikatan dengan situs aktif *PfENR* yaitu *Kaempferol 3-rhamnosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-glucoside* dan *Epigallocatechin 3,5,-di-O-gallate* divisualisasi dan dianalisis dengan menggunakan program GOLD dan PyMOL.

Kaempferol 3-rhamnosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-glucoside menunjukkan adanya ikatan hidrogen yaitu Leu315, Gly313, Leu265, dan Gly106 (Tabel 4.8). Ikatan pada situs aktif hidrogen terjadi karena adanya interaksi hidrofobik dan diperkuat dengan satu atau lebih ikatan hidrogen. Interaksi hidrofobik dapat terbentuk karena situs aktif *PfENR* dikelilingi oleh residu hidrofobik sedangkan ikatan hidrogen terbentuk pada residu asam amino dengan gugus elektronegatif seperti –OH dan O pada nomor 29 dan 44. Gugus tersebut berikatan dengan residu Gly313 dan Leu315. Ikatan hidrogen mempunyai jarak 2-3,5Å.

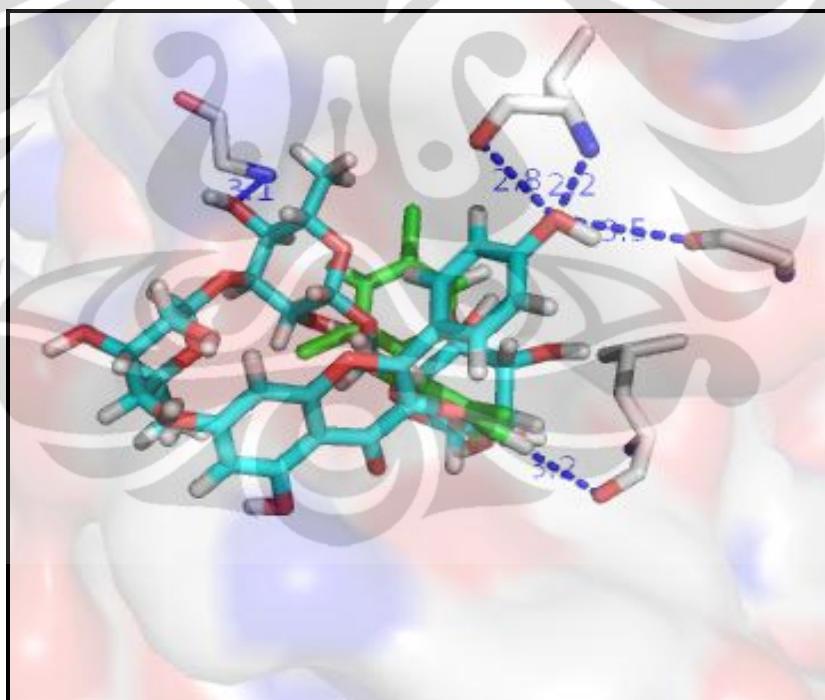


[Sumber: Olahan penulis PyMOL]

Gambar 4.11. Interaksi *Kaempferol 3-rhamnosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-glucoside* (biru) dengan beberapa residu asam amino (ungu) pada *PfENR*

Universitas Indonesia

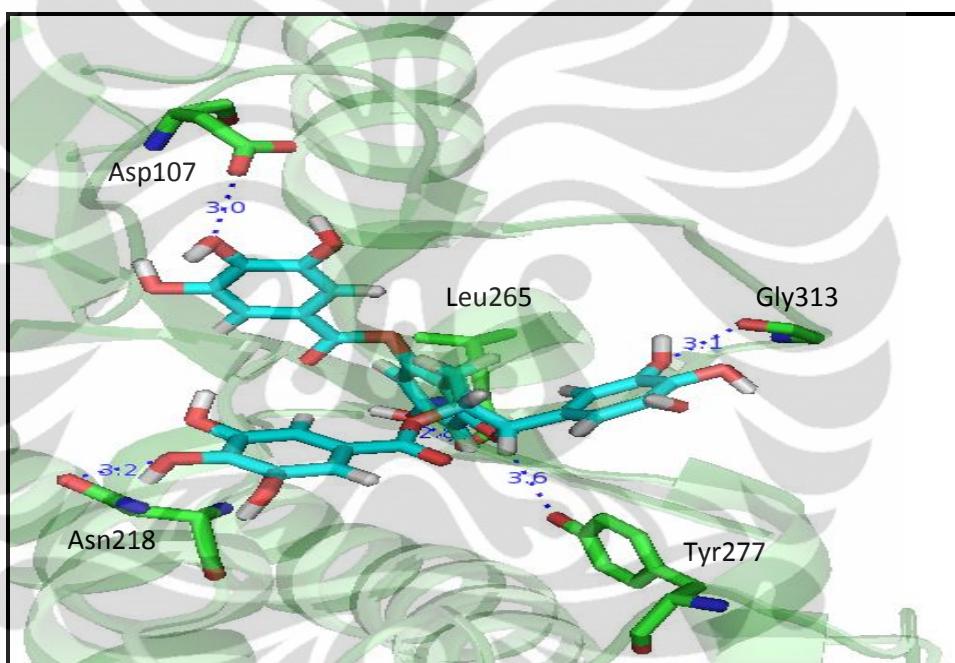
Kaempferol 3-rhamnosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-glucoside memiliki ikatan hidrogen dengan residu Leu315 yang terjadi karena pada cabang nomor 29 dimana terikat gugus hidroksi berinteraksi dengan gugus nitrogen dan oksigen dari residu Leu315. Ikatan hidrogen yang terbentuk dengan residu Gly313 terjadi karena atom O(29) memiliki jarak cukup dekat dengan residu Gly313 sehingga memungkinkan terjadinya ikatan. Jarak ikatan hidrogen yang terbentuk sebesar 2,2Å dan 2,8Å dengan Leu315 dan 3,5Å dengan Gly313. Residu Gly313 dan Leu315 merupakan daerah kantung nikotinamid sehingga dengan adanya pengikatan pada residu ini menyebabkan terjadinya penghambatan dari pengikatan enzim (Perozzo, et.al., 2002). Hambatan ini juga berpengaruh pada substrat dari *PfENR* yang tidak dapat menempati situs aktif dari enzim.



[Sumber: Olahan penulis PyMOL]

Gambar 4.12. Perbandingan hasil penambatan *Kaempferol 3-rhamnosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-glucoside* (biru) dengan triklosan (hijau)

Epigallocatechin 3,5,-di-O-gallate menunjukkan adanya ikatan hidrogen pada situs aktif yaitu dengan Gly313, Tyr277, Asn218, Leu265, dan Asp107 (Tabel 4.8). Ikatan hidrogen terjadi pada residu asam amino dengan gugus elektronegatif seperti OH dan O pada atom nomor 16, 31, dan 47. Gugus tersebut berikatan dengan residu hidrofobik yaitu Gly313, Tyr277, dan Asn218. Ikatan hidrogen memiliki jarak antara 2,5-3,5 Å. Jarak ikatan dengan situs aktif yang lebih besar dibanding senyawa inhibitor sebelumnya menjadikan GoldScorenya lebih kecil.



[Sumber: Olahan penulis PyMOL]

Gambar 4.13. Interaksi *Epigallocatechin 3,5,-di-O-gallate* (biru) dengan beberapa residu asam amino (hijau) pada *PfENR*

Seperti halnya *Kaempferol 3-rhamnosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-glucoside* yang memiliki sisi pengikatan pada bagian kantung nikotinamid, *Epigallocatechin 3,5,-di-O-gallate* pun memiliki ikatan dengan Gly313 dan Leu315 sehingga ia mampu menghambat pengikatan substrat dengan enzim. Hambatan ini menjadikan enzim tidak dapat bekerja untuk mengkatalisis reaksi dalam proses perpanjangan sintesis asam lemak pada *Plasmodium falciparum*.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penapisan *in silico* dengan menggunakan *database* Tanaman Obat di Indonesia terhadap target *PfENR* terdapat 5 kandidat senyawa kimia yang berpotensi sebagai inhibitor. Senyawa kimia tersebut yaitu *Kaempferol 3-rhamnosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-glucoside*, *Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside)*, *8-Hydroxyapigenin 8-(2'',4''-disulfatoglucuronide)*, *Epigallocatechin 3,5,-di-O-gallate*, dan *Quercetin 3,4'-dimethyl ether 7-alpha-L-Arabinofuranosyl-(1-6)-glucoside* dengan kisaran GoldScore dari 80,6236 sampai 100,4109.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan perangkat lunak AutoDock ataupun AutoDock Vina untuk mengetahui energi afinitas ikatan serta konstanta inhibisi. Selain itu dapat juga dilakukan simulasi dinamika molekuler.
2. Perlu dilakukan penambatan molekuler secara bersama antara ligan dan substrat alami untuk mengetahui konstanta inhibisi yang lebih potensial.

DAFTAR ACUAN

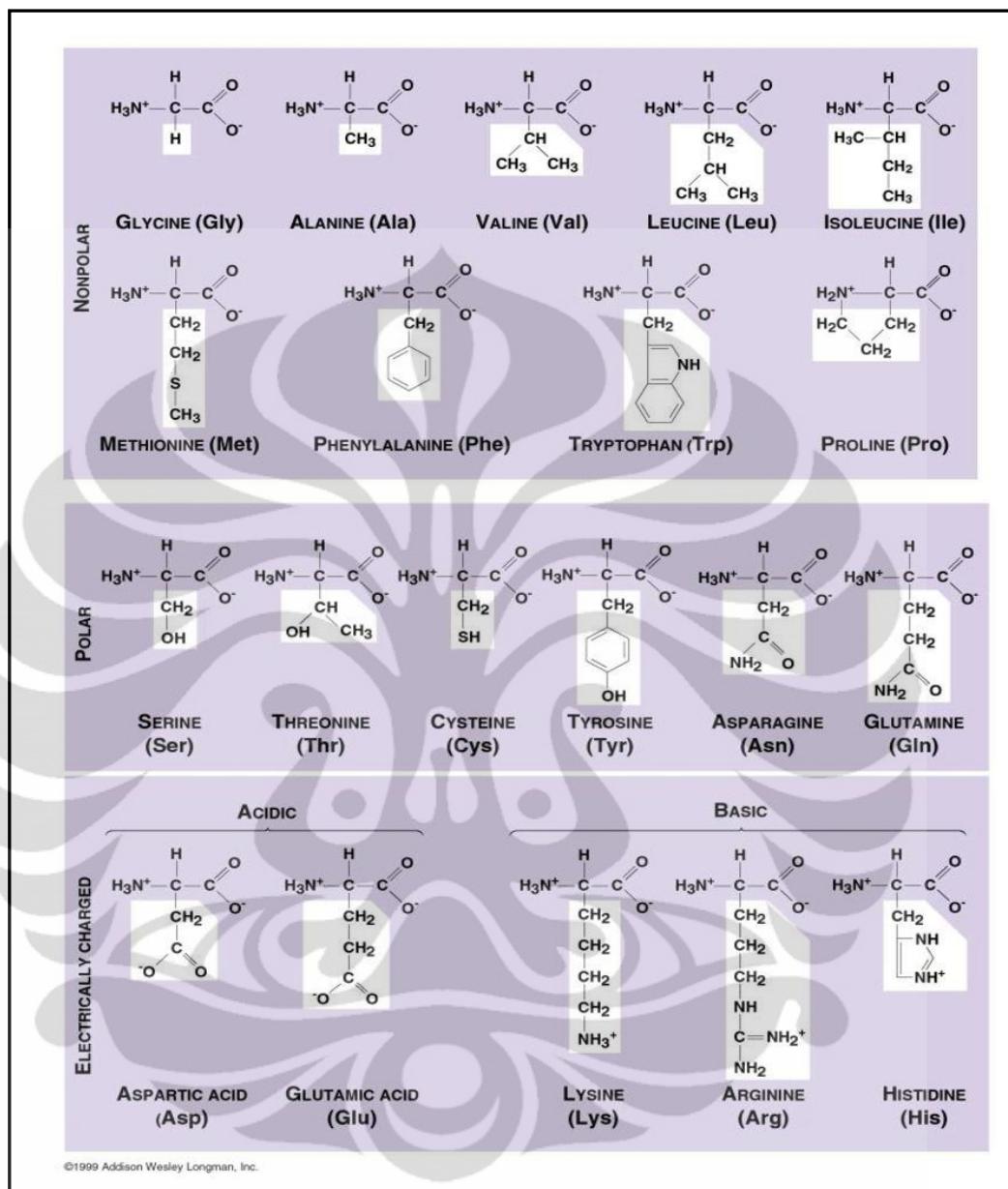
- Alvarez, J., & Shoichet, B. (2005). *Virtual Screening in Drug Discovery* (390). CRC Press Taylor & Francis Group.
- Banerjee, T., Sharma, S., Surolia, N., & Surolia, A. (2008). Epigallocatechin Gallate is a Slow-Tight Binding Inhibitor of Enoyl-ACP Reductase from *Plasmodium falciparum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377, 1238-1242.
- Berg, J., Tymoczko, J., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry 5th Edition* (84-85). Wisconsin: W.H.Freeman Company.
- Bertha, A. (2010). *Pembuatan Database Struktur Tiga Dimensi Senyawa Kimia dari Tanaman Obat di Indonesia*. FMIPA : Universitas Indonesia.
- Bruice, P. (2003). *Organic Chemistry 4th Edition*. New Jersey: Prentice Hall.
- Cushnie, T., & Lamb, A. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343-356.
- Delano, WL. (2004). PyMOL User's Guide. DeLano Scientific LLC. Diunduh pada 14 Desember 2010 pukul 09:16 dari <http://pymol.sourceforge.net/newman/userman.pdf>
- Dell'Agli, Galli, Corbett, Taramelli, Lucantoni, Habluetzel, Maschi, Caruso, Giavarini, Romeo, Bhattacharya, & Bosisio. (2009). Antiplasmodial Activity of *Punica granatum* L. fruit rind. *Journal of Ethnopharmacology*, 125, 279–285.
- Dziedzic, N. (2009). *Perspectives on Diseases and Disorders Malaria* (21-22). United States of America: Greenhaven Press.
- Gareth, T. (2004). An Introduction: Fundamental of Medicinal Chemistry. *Journal of Chemistry Education*, 81 (9), 1271.
- GOLD support-scientific FAQs*. (2010). Diunduh pada 19 Januari 2011 pukul 15:22 dari The Cambridge Crystallographic Data Centre: http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/faqs
- GOLD-protein ligand docking*. (2010). Diunduh pada 19 Januari 2011 pukul 15:22 dari The Cambridge Crystallographic Data Centre: http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/GOLD

- Harijanto, P. N., Nugroho, A., & Gunawan, C. A. (2009). *Malaria dari Molekuler ke Klinis* (118). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Hou, T., & Xu, X. (2004). Recent Development and Application of Virtual Screening in Drug Discovery: An Overview. *Current Pharmaceutical Design*, 10, 1011-1033.
- Hutchison, Morley, James, Swain, Winter, Vabdermeersch, & O'Boyle. (2008). Pybel: a Python Wrapper for the OBabel Cheminformatics toolkit. *Chem Cen J*, 5.
- Irwin, J., Shoichet, Brian., Mysinger., Huang, Nu., Colizzi, Fransesco., Wassam, Pascal., & Cao, Yiqun. (2009). Automated docking screens: a feasibility study. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52, 5712-5720.
- Jeff Zhiqiang Lu, Lee, P., Waters, N., & Prigge, S. (2005). Fatty Acid Synthesis as a Target for Antimalarial Drug Discovery. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 8, 15-26.
- Jin Xiong. (2006). *Essential Bioinformatics* (4-8). United States of America: Cambridge University Press.
- Kapoor, M., Gopalakrishnapai, J., Surolia, N., & Surolia, A. (2004). Mutational Analysis of the Triclosan-Binding Region of Enoyl-ACP (Acyl-Carrier Protein) Reductase from *Plasmodium falciparum*. *Biochem Journal*, 735-741.
- Katzung, B. G. (2006). *Basic and Clinical Pharmacology 10th Edition* (1545). New York: McGraw-Hill Companies.
- 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., Lie Xie, Cruz, Joanna., Westbrook, John., Bourne, Philip E., & Berman, Helen. (2006). The RCSB PDB information portal for structural genomics. *Nucleic Acid Research*, 34, D303-D305.
- Leach, A. R., Shoichet, B. K., & Peishoff, C. E. (2006). Prediction of Protein-Ligand Interactions. Docking and Scoring: Successes and Gaps. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49 (20), 5851-5855.

- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology 4th Edition*. New York: W.H. Freeman Company.
- Malaria. (2011). Diunduh pada tanggal 11 Januari 2011 pukul 13:57 dari <http://www.cdc.gov/malaria/>
- Mittamura, T., & Palacpac, N. M. (2003). Lipid Metabolism in *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes: Possible New Targets for Malaria Chemotherapy. *Microbes and Infection*, 545-552.
- Morde, V., Shaikh, M., Pissurlenkar, R., & Coutinho, E. (2009). Molecular Modelling Studies, Synthesis, and Biological Evaluation of Plasmodium falciparum Enoyl-Acyl Carrier Protein reductase (PfENR) inhibitors. *Mol Divers*, 13, 501-517.
- Moreno, E. (2005). *Structural Determination of Triclosan Derivatives as Inhibitors of Plasmodium falciparum Enoyl Reductase (PfENR)*. Texas A&M University.
- Murray, R., Granner, D., Mayes, P., & Rodwell, V. (2003). *Harper's Illustrated Biochemistry, 26th edition* (14-30). United States of America: McGraw-Hill Companies.
- Nelson, D., & Cox, M. (2001). *Lehninger Principles of Biochemistry 4th Edition* (86-117). Wisconsin: W.H.Freeman Company.
- Nervall, M., Hanspers, P., Carlsson, J., Boukharta, L., & Aqvist, J. (2007). Predicting Binding Modes from Free Energy Calculations. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51, 2657-2667.
- Ngili, Y. (2010). *Biokimia Dasar : Enzim* (175-177). Bandung: Rekayasa Sains.
- Pamela, C., & Harvey, R. (1994). *Lippincott's illustrated Reviewas : Biochemistry 3rd Edition*. New York: Lipincott Wiliams & Wilkins.
- Perozzo, Remo., Kuo, Marck., Sidhu, Amar bir Singh., Valiyaveettil, Jacob., Bittman, Robert., Jacobs, Wiliiam., Fidock, David A., & Sacchettini, James. (2002). Structural Elucidation of the Specificity of the Antibacterial Agent Triclosan for Malarial Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(15), 13106-13114.

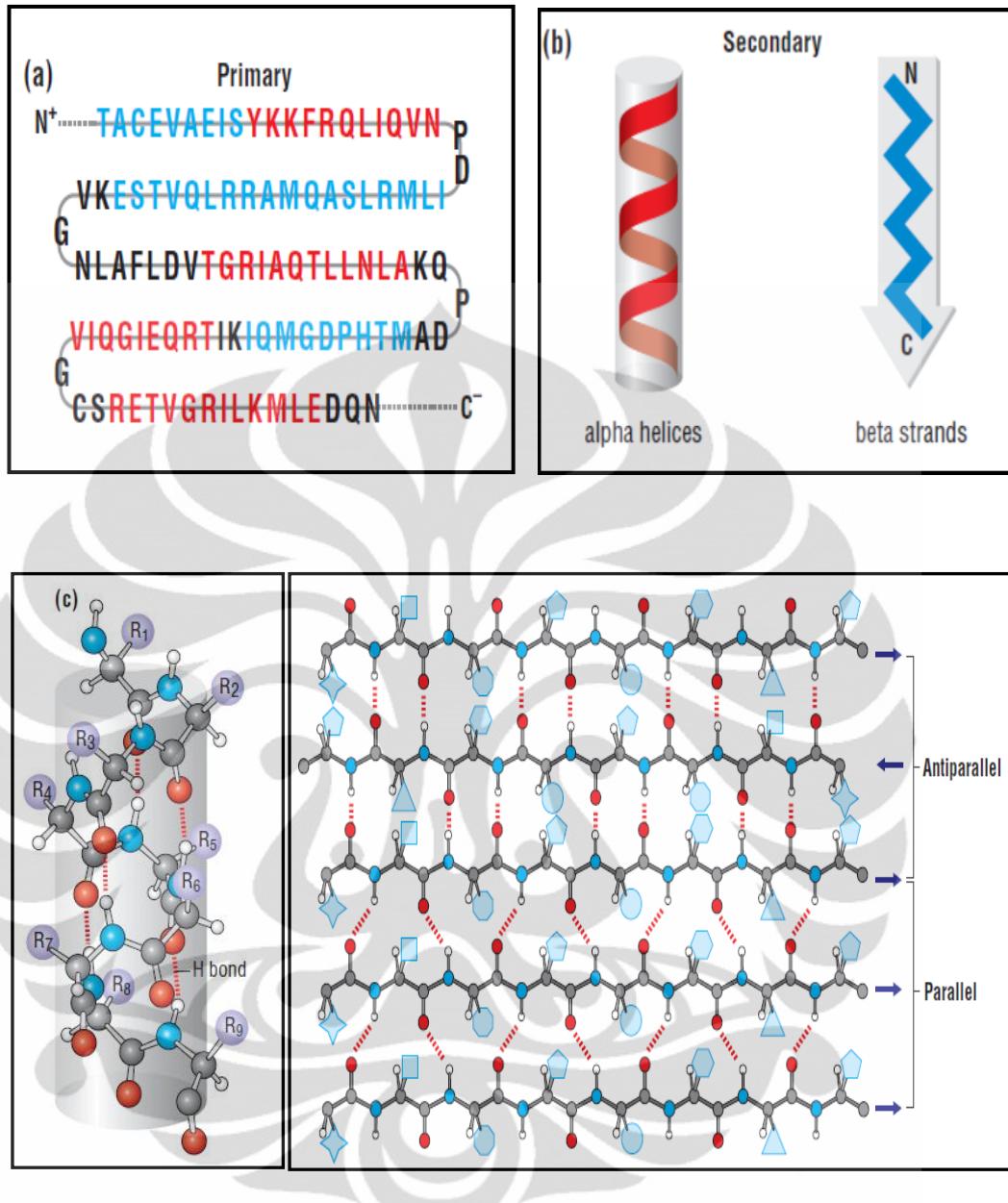
- Petsko, G., & Ringe, G. (2003). *Protein Structure and Function (Primers in Biology)* (3-45). United Kingdom: New Science Press.
- Pettersen, EF., Goddard, TD., Huang, CC., Couch, GS., Greenblatt, DM., Meng, EC., & Ferrin, TE. (2004). UCSF-Chimera - a Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25 (13), 1605-1612.
- Pribadi, W., & Muljono, R. (2004). Resistensi Parasit Malaria terhadap Obat Malaria. dalam S. Gandahusada, H. Ilahude, & W. Pribadi (Ed), *Parasitologi Kedokteran* (197-198). Jakarta: Gaya Baru.
- Sannella, Anna R., Messori, Luigi., Casini, Angela., Vincieri, Franco F., Bilia, Anna R., Majori, Giancarlo., & Severini, Carlo. (2007). Antimalarial Properties of Green Tea. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353, 177-181.
- Syarif, A., & Zunilda. (2007). Obat Malaria dalam Gunawan, Sulistia., Setiabudy, Rianto., Nafrialdi, Elysabeth (Ed) *Farmakologi dan Terapi Edisi 5* (556-570). Jakarta: Gayabaru.
- Tang, Y., & Marshall, G. (2011). *Drug Design and Discovery: Virtual Screening for Lead Discovery* (1-5). New York: Humana Press.
- Tasdemir, D. (2006). Type II Fatty Acid Biosynthesis, a New Approach in Antimalarial Natural Product Discovery. *Phytochemistry Reviews*, 99-108.
- Tiikkainen, P. (2010). Study of Ligand-Based Virtual Screening Tools in Computer-Aided Drug Design. *Medica-Odontologica*, 116-118.
- WHO. (2010). *Guidelines for the Treatment of Malaria*. Geneva: World Health Organization.
- Wolff, M. E. (1996). *Burgers Medicinal Chemistry and Drug Discovery 5th Edition Volume 1: Principles and Practice*. New York: Wiley-Interscience.





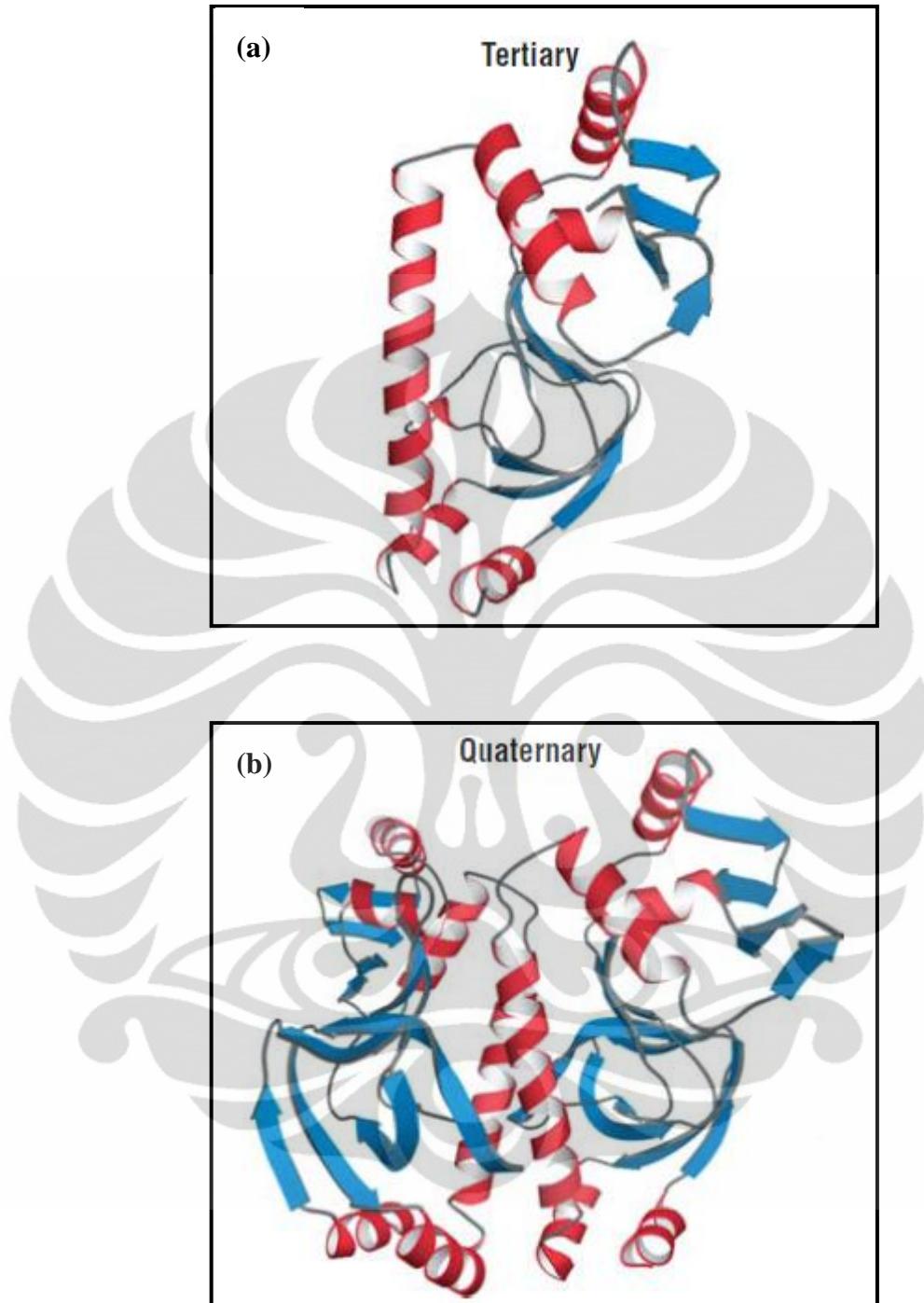
[Sumber: Nelson & Cox, 2001]

Gambar 2.1 Dua puluh jenis asam amino penyusun protein



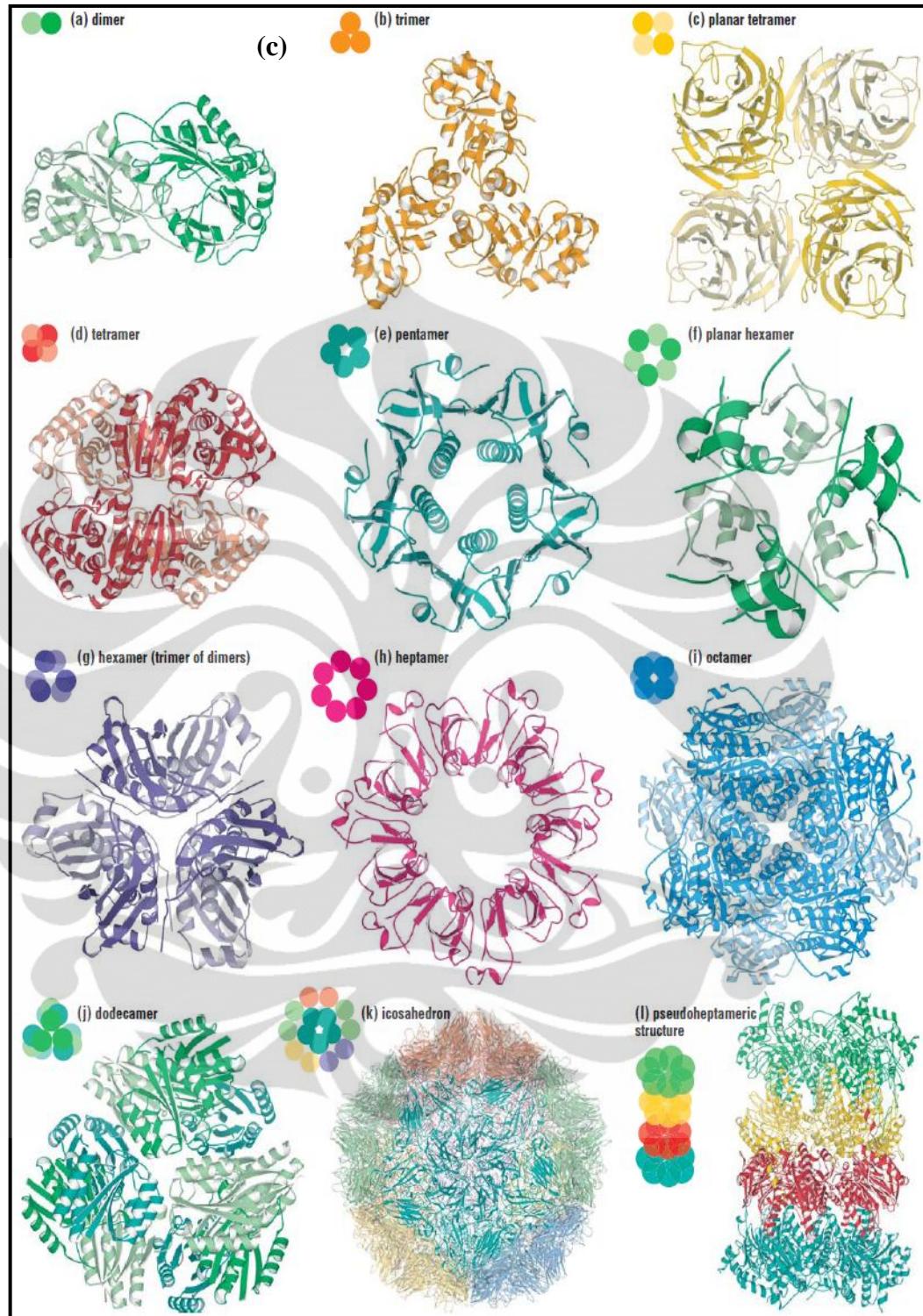
[Sumber: Petsko & Ringe, 2003]

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



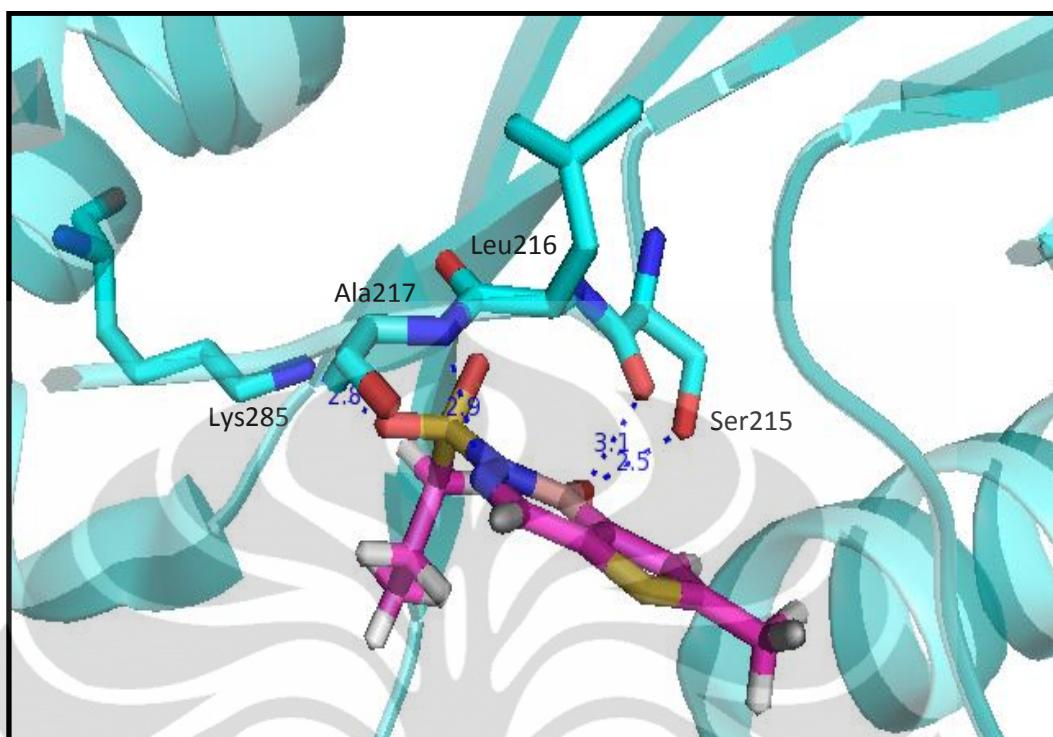
[Sumber: Petsko & Ringe, 2003]

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



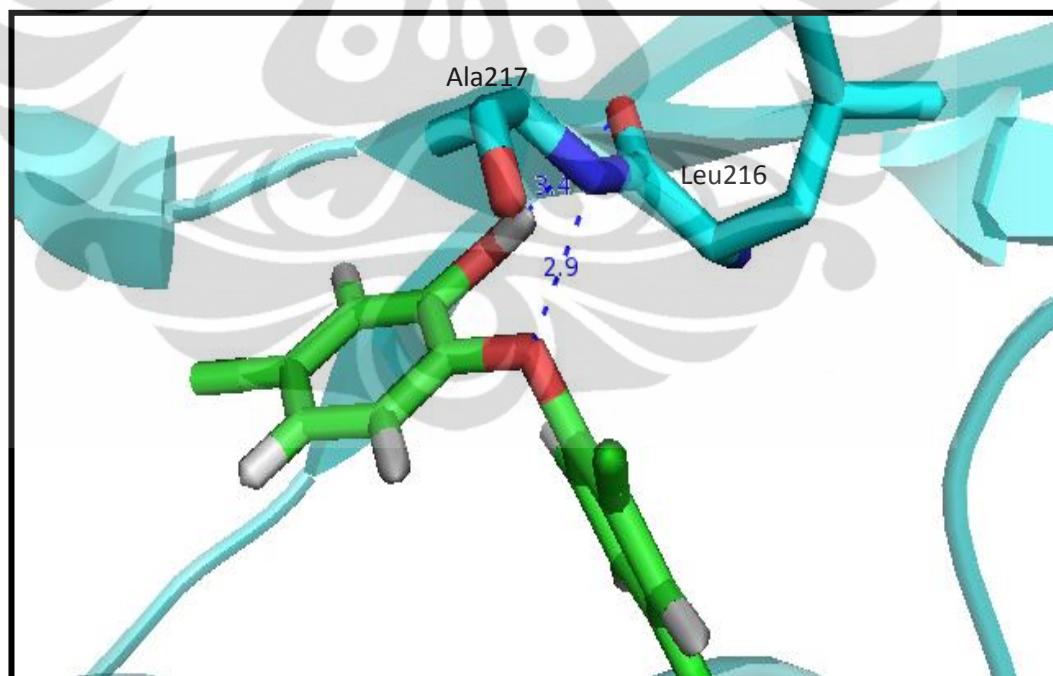
[Sumber: Petsko & Ringe, 2003]

Gambar 2.3c. Struktur oligomer



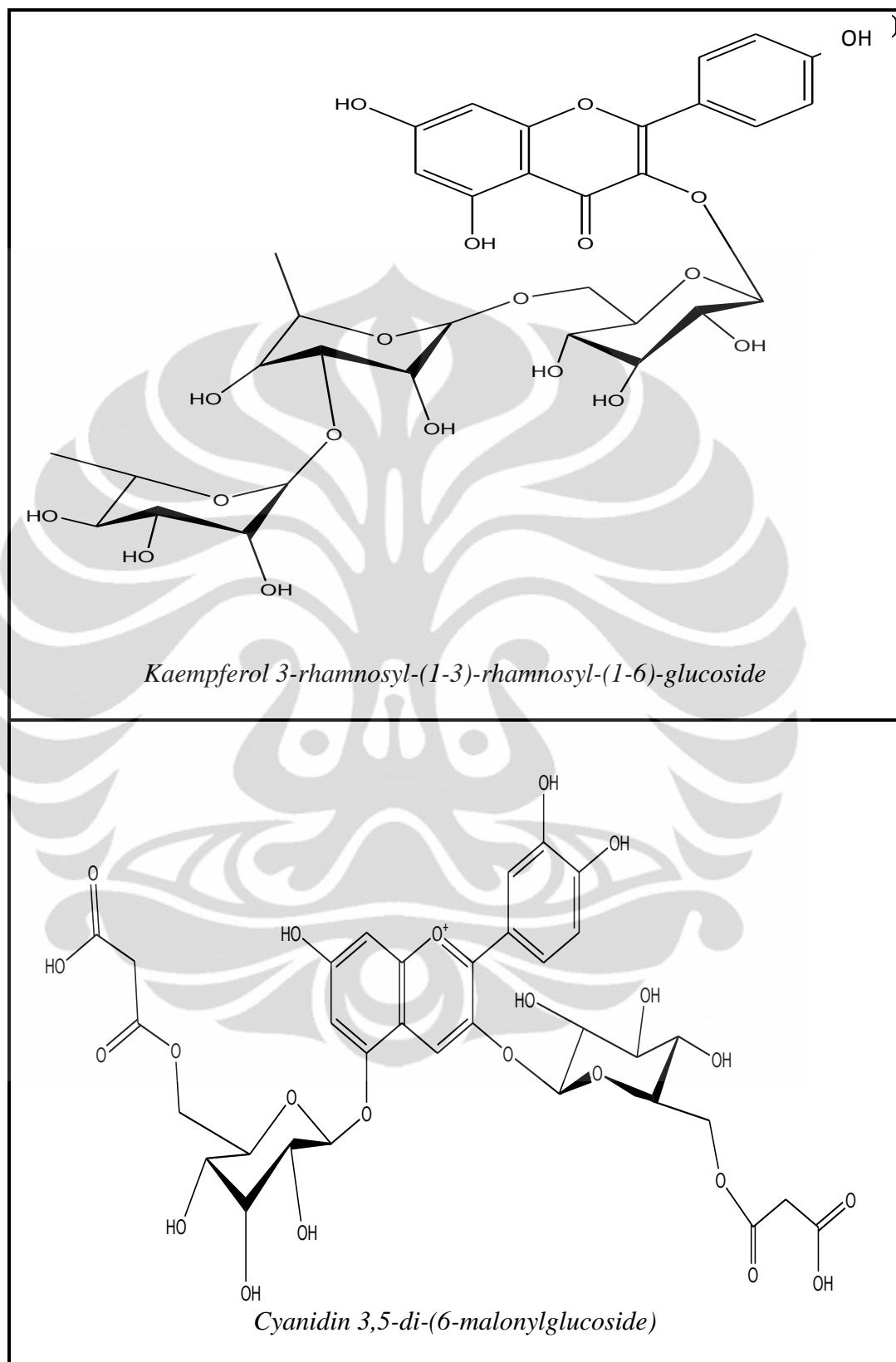
[Sumber: Olahan penulis dengan PyMOL]

Gambar 4.6. Konformasi kontrol positif diazaborin terhadap *PfENR*

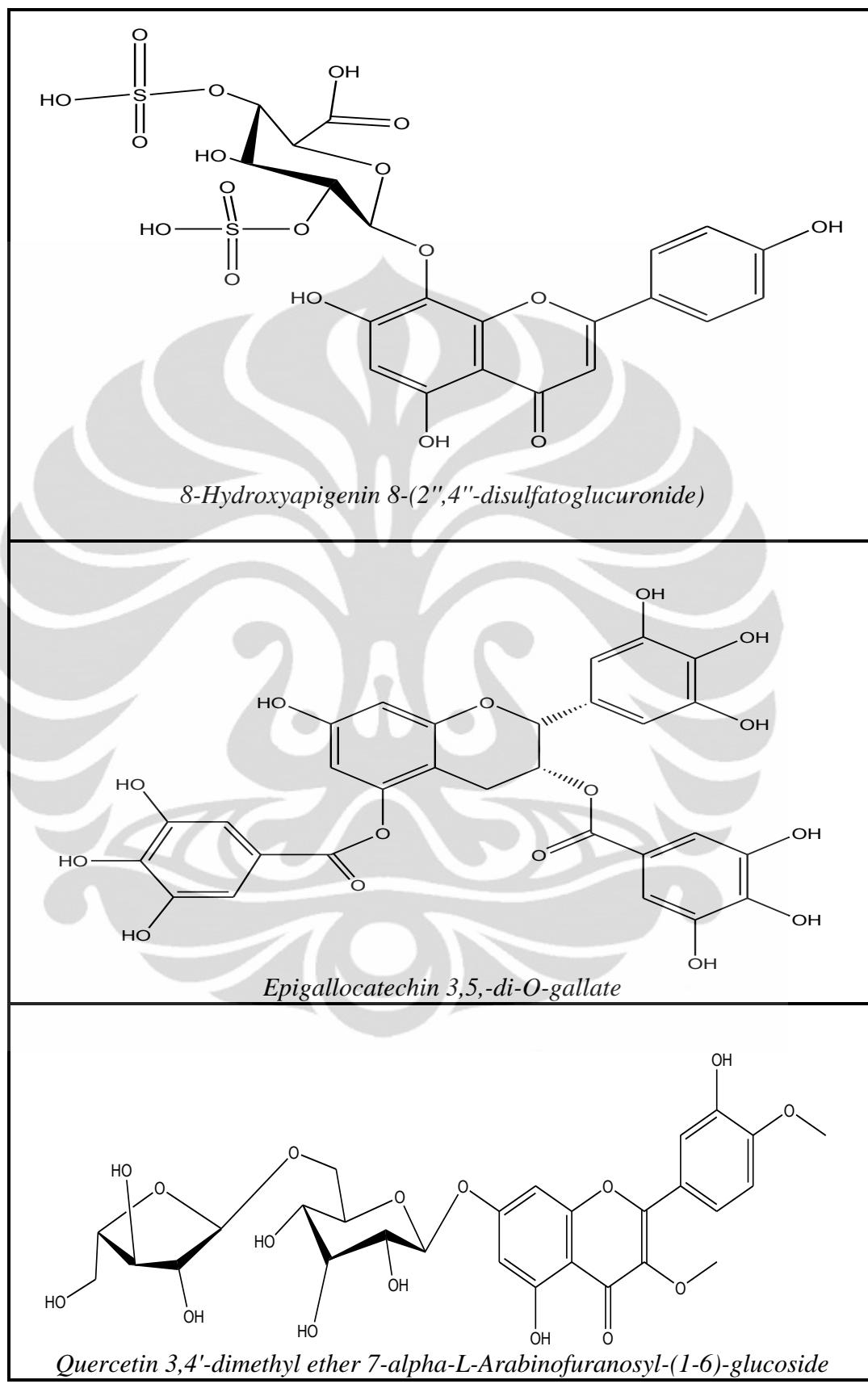


[Sumber: Olahan penulis dengan PyMOL]

Gambar 4.7. Konformasi kontrol positif triklosan terhadap *PfENR*



Gambar 4.9. Rumus struktur dari kandidat inhibitor hasil penapisan *in silico*



Gambar 4.10. Rumus struktur dari kandidat inhibitor hasil penapisan *in silico*



Tabel 4.4. Hasil penapisan *in silico* dengan menggunakan Database Tanaman Obat di Indonesia

Database Slow 1		
Peringkat	Ligan	GoldScore
1	<i>Kaempferol 3-rhamnosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-glucoside</i>	100,4109
2	<i>Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside)</i>	95,7726
3	<i>8-Hydroxyapigenin 8-(2'',4''-disulfatoglucuronide)</i>	86,8425
4	<i>Epigallocatechin 3,5,-di-O-gallate</i>	85,3358
5	<i>Quercetin 3,4'-dimethyl ether 7-alpha-L-Arabinofuranosyl-(1-6)-glucoside</i>	85,2813

Database Slow 2		
Peringkat	Ligan	GoldScore
1	<i>Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside)</i>	97,0331
2	<i>Kaempferol 3-rhamnosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-glucoside</i>	92,9853
3	<i>Quercetin 3,4'-dimethyl ether 7-alpha-L-Arabinofuranosyl-(1-6)-glucoside</i>	87,2221
4	<i>8-Hydroxyapigenin 8-(2'',4''-disulfatoglucuronide)</i>	86,6527
5	<i>Epigallocatechin 3,5,-di-O-gallate</i>	85,8995

Database Slow 3		
Peringkat	Ligan	GoldScore
1	<i>Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside)</i>	96,4494
2	<i>Kaempferol 3-rhamnosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-glucoside</i>	93,7727
3	<i>8-Hydroxyapigenin 8-(2'',4''-disulfatoglucuronide)</i>	85,6292
4	<i>Epigallocatechin 3,5,-di-O-gallate</i>	84,2164
5	<i>3-O-Galloylepicatechin-(4beta-8)-epicatechin-3-O-gallate</i>	83,9971

Database Slow 4		
Peringkat	Ligan	GoldScore
1	<i>Kaempferol 3-rhamnosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-glucoside</i>	94,3424
2	<i>Quercetin 3-2G-rhamnosylrutinoside</i>	89,9562
3	<i>8-Hydroxyapigenin 8-(2'',4''-disulfatoglucuronide)</i>	86,7413
4	<i>Epigallocatechin 3,5,-di-O-gallate</i>	85,5527
5	<i>Quercetin 3,4'-dimethyl ether 7-alpha-L-Arabinofuranosyl-(1-6)-glucoside</i>	84,4746

Database Slow 5		
Peringkat	Ligan	GoldScore
1	<i>Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside)</i>	95,9197
2	<i>Kaempferol 3-rhamnosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-glucoside</i>	95,6548
3	<i>Epigallocatechin 3,5,-di-O-gallate</i>	85,6112
4	<i>8-Hydroxyapigenin 8-(2'',4''-disulfatoglucuronide)</i>	85,4722
5	<i>Quercetin 3,4'-dimethyl ether 7-alpha-L-Arabinofuranosyl-(1-6)-glucoside</i>	83,5246

Tabel 4.6. Kandidat inhibitor berdasarkan hasil penapisan *in silico*

Peringkat	Ligan	n	GoldScore				Rata-rata GoldScore	SD	KV (%)	
1	<i>Kaempferol 3-rhamnosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-glucoside</i>	5	100,4109	92,9853	93,7727	94,3424	92,1496	94,7322	3,28	3,46
2	<i>Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside)</i>	4	95,7726	97,0331	96,4494		94,351	95,9015	1,15	1,20
3	<i>Epigallocatechin 3,5,-di-O-gallate</i>	5	86,8425	86,6527	85,6292	86,7413	86,4138	86,4559	0,49	0,56
4	<i>8-Hydroxyapigenin 8-(2'',4''-disulfatoglucuronide)</i>	5	85,3358	85,8995	84,2164	85,5527	85,9461	85,3901	0,70	0,82
5	<i>Quercetin 3,4'-dimethyl ether 7-alpha-L-Arabinofuranosyl-(1-6)-glucoside</i>	4	85,2813	87,2221		84,4746	80,6236	84,4004	2,77	3,28

*) n= kemunculan dalam percobaan, total percobaan= 5

Tabel 4.7. Kandidat inhibitor berdasarkan hasil penapisan *in silico* beserta famili dan spesies tanaman asal

No	Senyawa	Famili	Spesies	Nama Lain	Nama Lokal
1.	<i>Kaempferol 3-rhamnosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-glucoside</i>	Theaceae	<i>Camellia sinensis</i>	<i>Camellia bohea</i> , <i>Camellia theifera</i> , <i>Thea sinensis</i> , <i>Thea assamica</i>	Pokok cha, Pokok teh (Melayu)
2.	<i>Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside)</i>	Lamiaceae	<i>Thymus serpyllum</i>	<i>Thymus azaricus Loud</i> , <i>Thirsutus Anth not Bild</i>	Serpili, Timi
3.	<i>8-Hydroxyapigenin 8-(2",4"-disulfatoglucuronide)</i>	Sterculiaceae	<i>Helicteres isora</i>	<i>Fructus inpius</i>	Puteran (Sunda), Jelumpang (Jawa), Dlumpang (Jawa), Dlumpangan (Jawa), Kayu Ules
4.	<i>Epigallocatechin 3,5-di-O-gallate</i>	Theaceae	<i>Camellia sinensis</i>	<i>Camellia bohea</i> , <i>Camellia theifera</i> , <i>Thea sinensis</i> , <i>Thea assamica</i> , <i>Thea cochinchinensis</i> , <i>Thea cantoniensis</i>	Pokok cha, Pokok teh (Melayu)
5.	<i>Quercetin 3,4'-dimethyl ether 7-alpha-L-Arabinofuranosyl-(1-6)-glucoside</i>	Punicaceae	<i>Punica granatum</i>	<i>Malum granatum</i>	Dalimo (Batak), Gangsalan (Jawa), Dhalima (Madura), Lelo kese (NTT), Glimey Mekkah (Gayo), Teliman (Sasak)

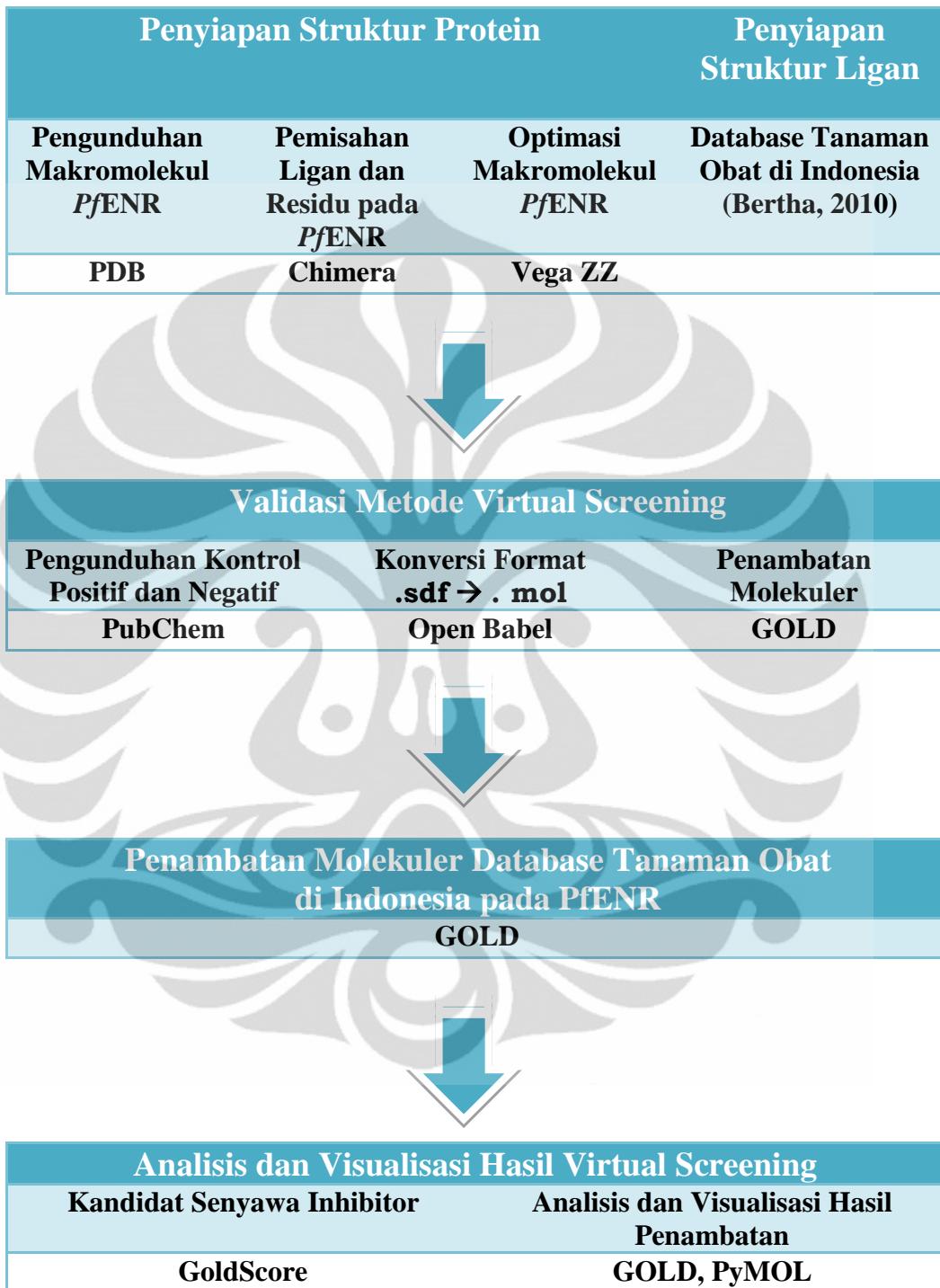
Tabel 4.8. Ikatan hidrogen yang terjadi pada target penambatan *PfENR* dengan ligan *Kaempferol 3-rhamnosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-glucoside* dan *Epigallocatechin 3,5,-di-O-gallate*

Ligan	Gugus (Nomor)	(Gugus) Residu	Jarak (Å)
<i>Kaempferol 3-rhamnosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-glucoside</i>	OH (29)	(O) Gly313	3,5
	OH (29)	(NH) Leu315	2,2
	OH (29)	(O) Leu315	2,8
	OH (44)	(O) Leu265	3,2
	OH (67)	(NH) Gly106	3,1
<i>Epigallocatechin 3,5,-di-O-gallate</i>	OH (31)	(O) Gly313	3,1
	O (16)	(OH) Tyr277	3,6
	OH (25)	(O) Leu265	2,8
	OH (47)	(O) Asn218	3,2
	OH (63)	(O) Asp107	3,0

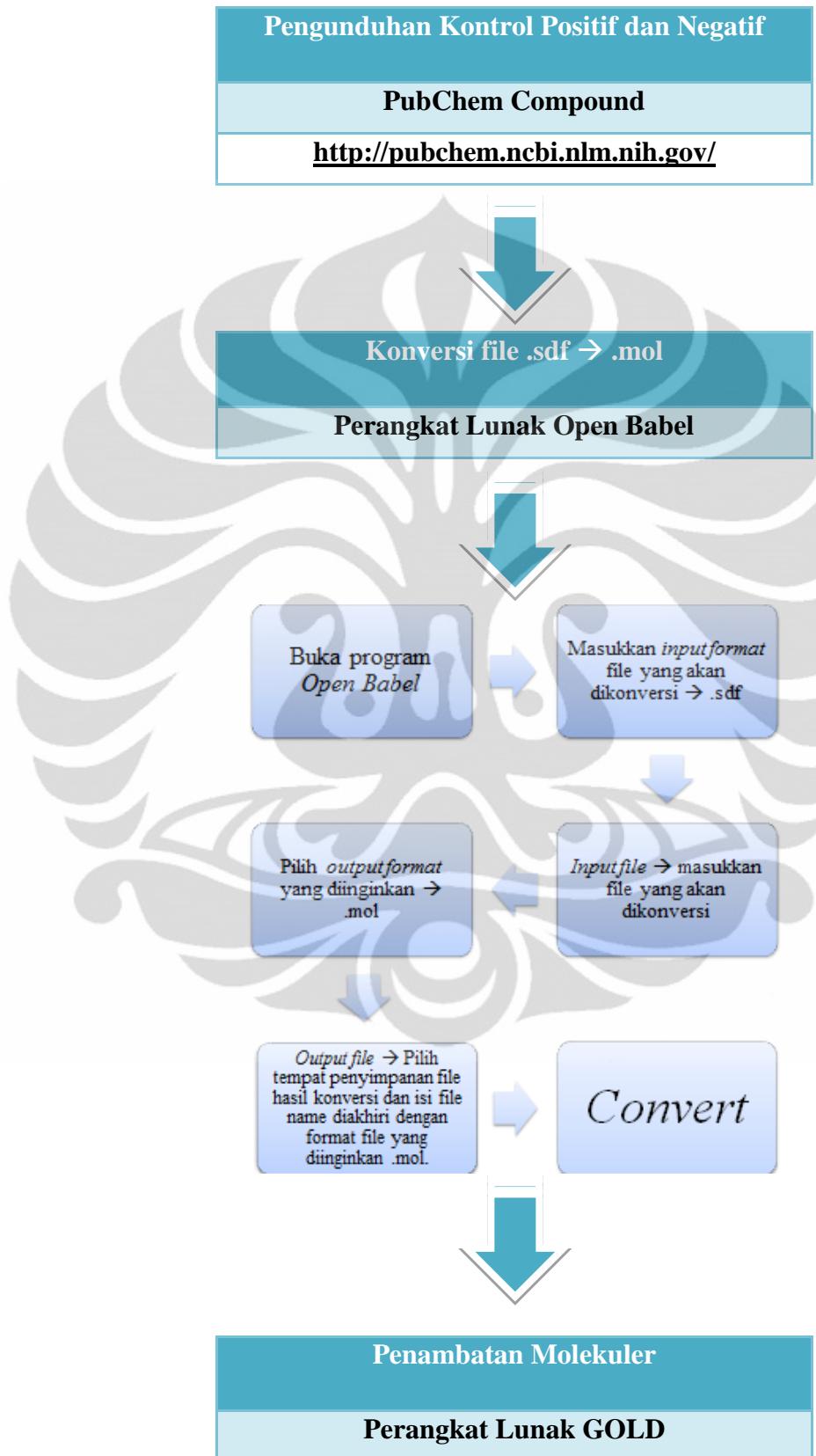


LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema kerja

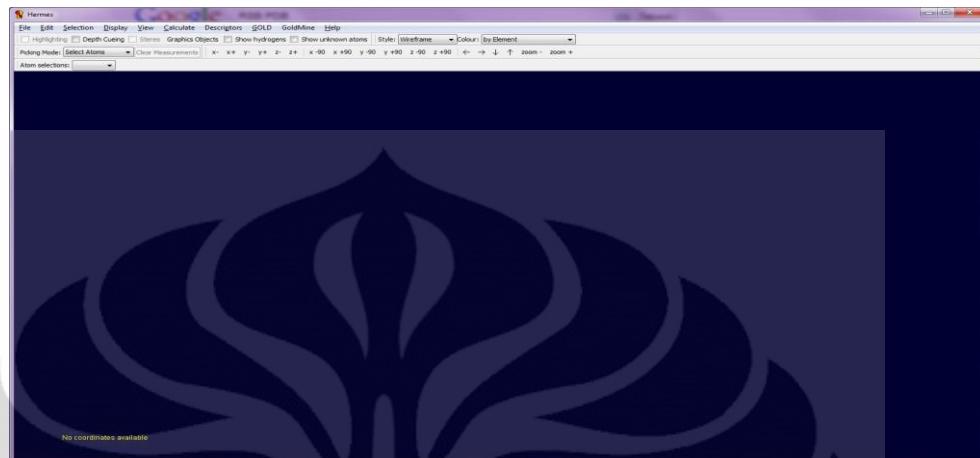


Lampiran 2. Skema kerja validasi *virtual screening* (penapisan *in silico*)

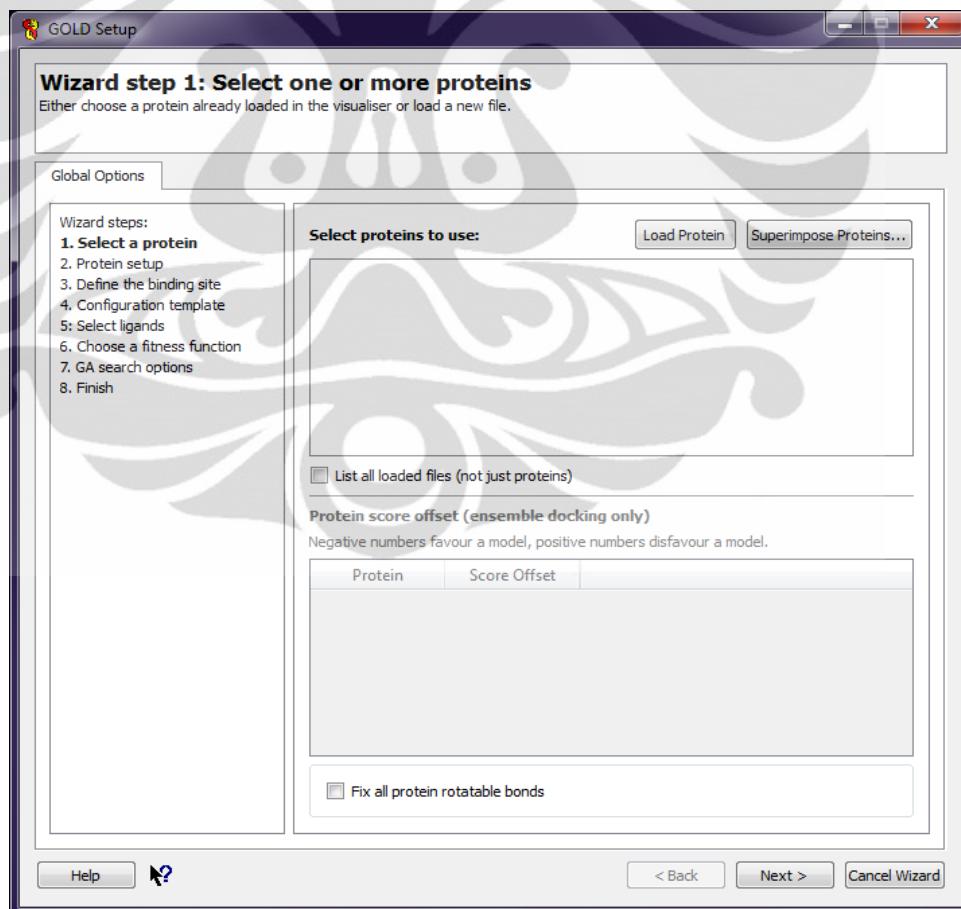


Lampiran 3. Skema kerja penjalanan perangkat lunak GOLD

1. Buka Aplikasi GOLD



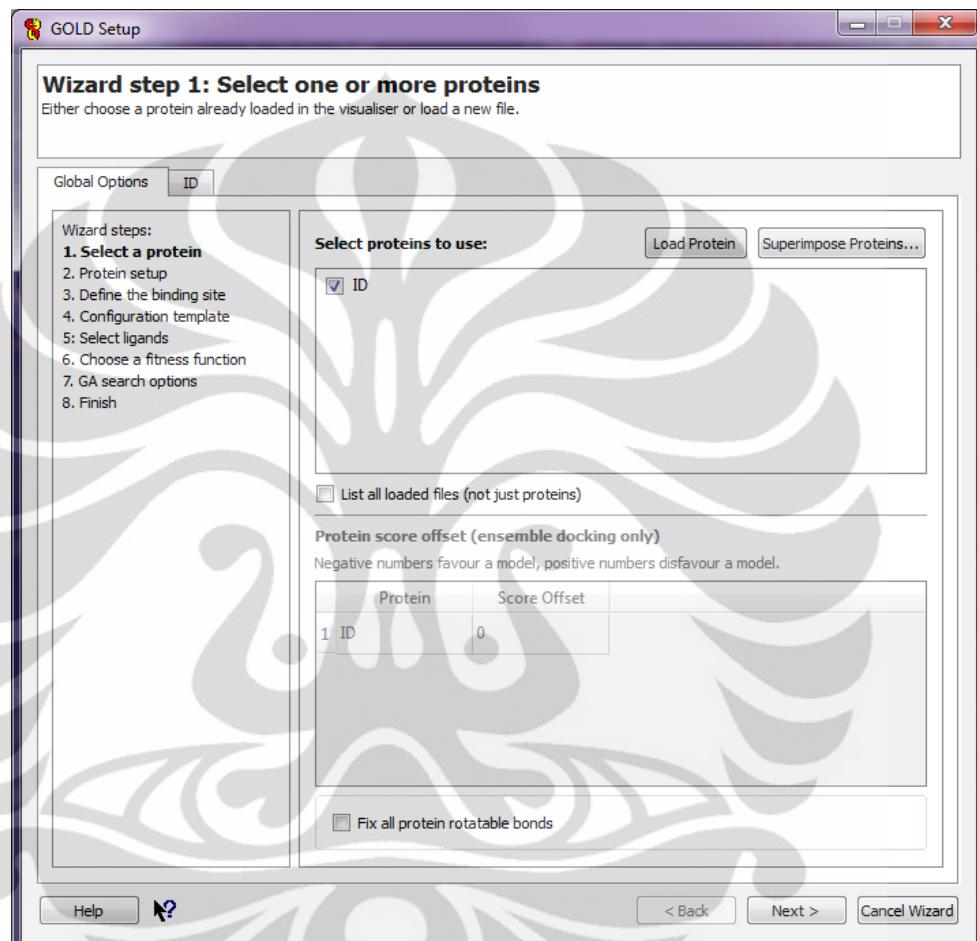
2. Pilih GOLD → Wizard. Akan muncul tampilan Wizard dari GOLD.



3. Proses persiapan penambatan

Muncul tampilan langkah 1 : Pemilihan protein

Select Protein → 1NHG Vega ZZ → LOAD → Next



4. Pengaturan Makromolekul

Muncul tampilan langkah 2 : Pengaturan protein

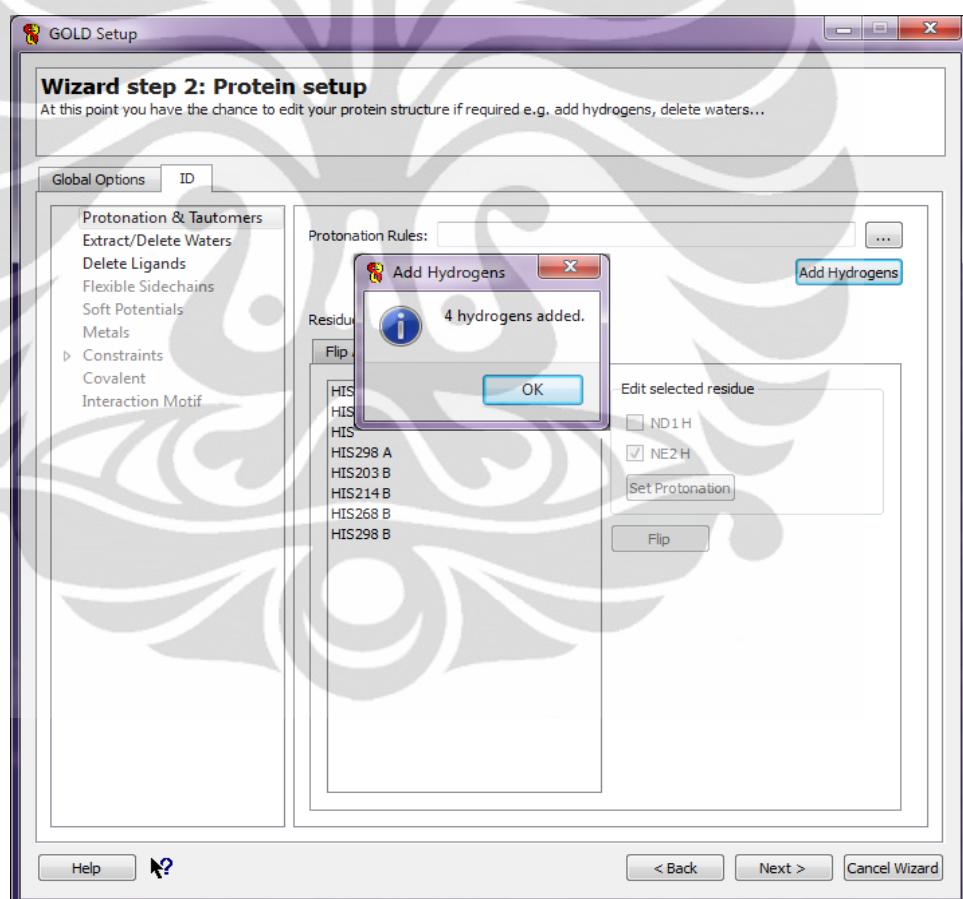
a. Protonation & Tautomers

Add Hydrogens untuk penambahan hydrogen

b. Extract/ Delete Waters untuk menghilangkan molekul air

c. Delete Ligands untuk menghilangkan ligan-ligan atau residu nonstandard lain.

Next



5. Penentuan ruang penambatan ligan pada makromolekul

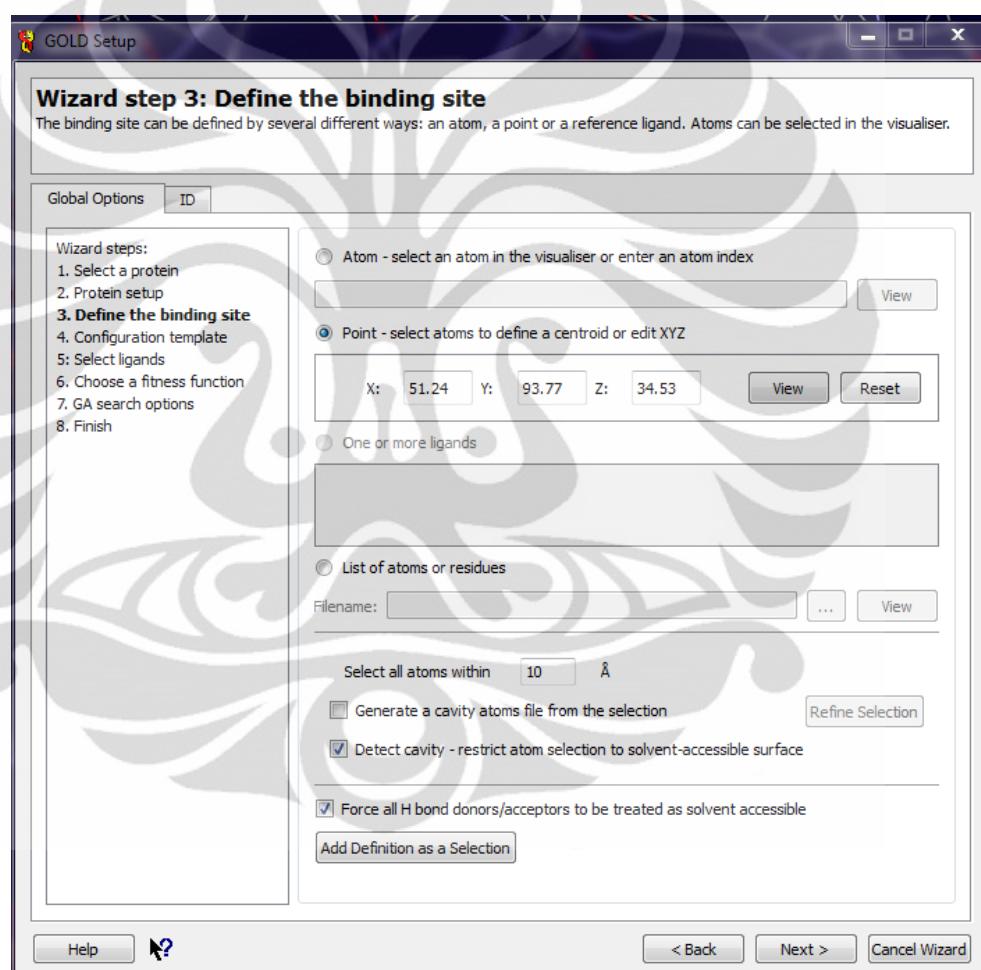
Muncul tampilan langkah 3 : Penentuan sisi pengikatan

Define Binding Site → penentuan koordinat ruang penambatan.

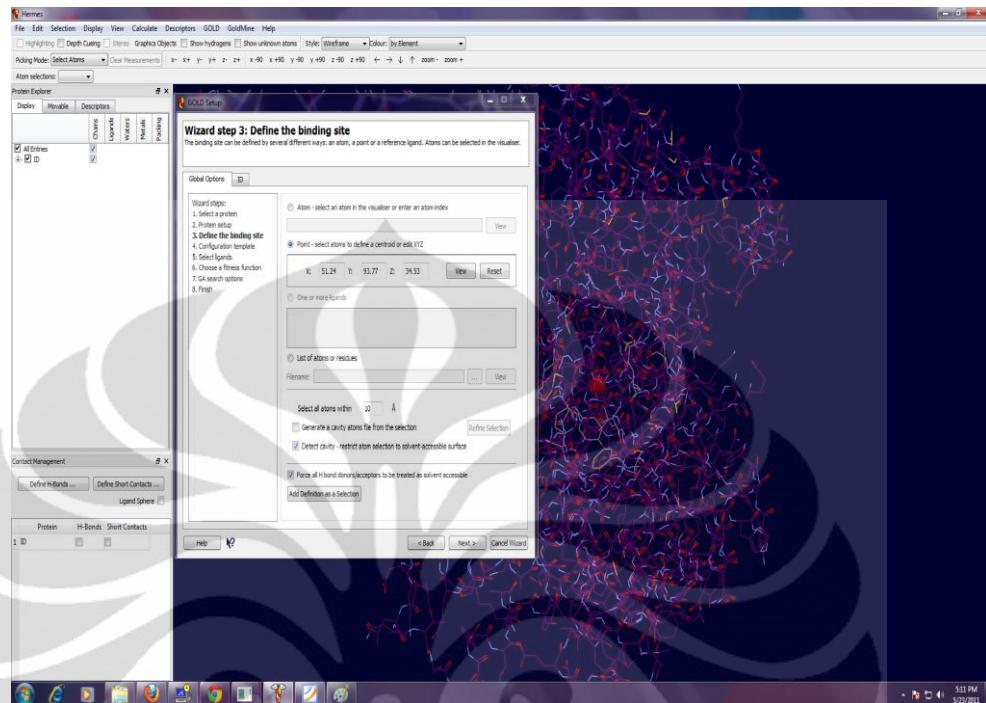
Pilih opsi Point → masukkan koordinat → tentukan radius speriks pada opsi

Ruang penambatan yang digunakan memakai koordinat x= 51,24; y= 93,77;

z= 34,53 dan *select all atoms within 10 Å* → View → Next



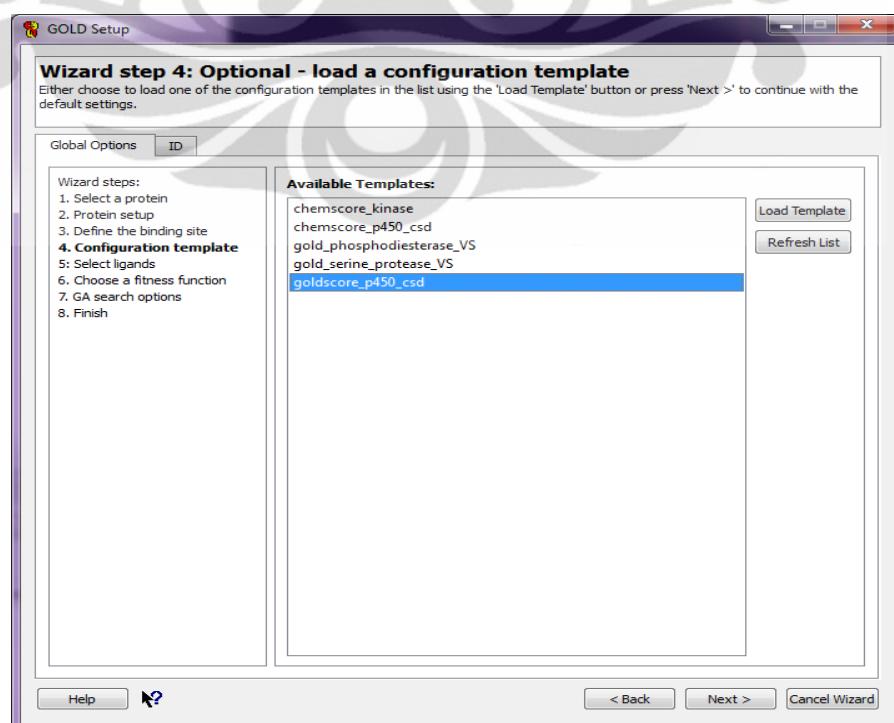
Tampilan daerah penambatan (bola merah)



6. Pemilihan cetakan (*template*)

Muncul tampilan langkah 4: Pemilihan cetakan

Pilih opsi goldscore_p450_csd → Next



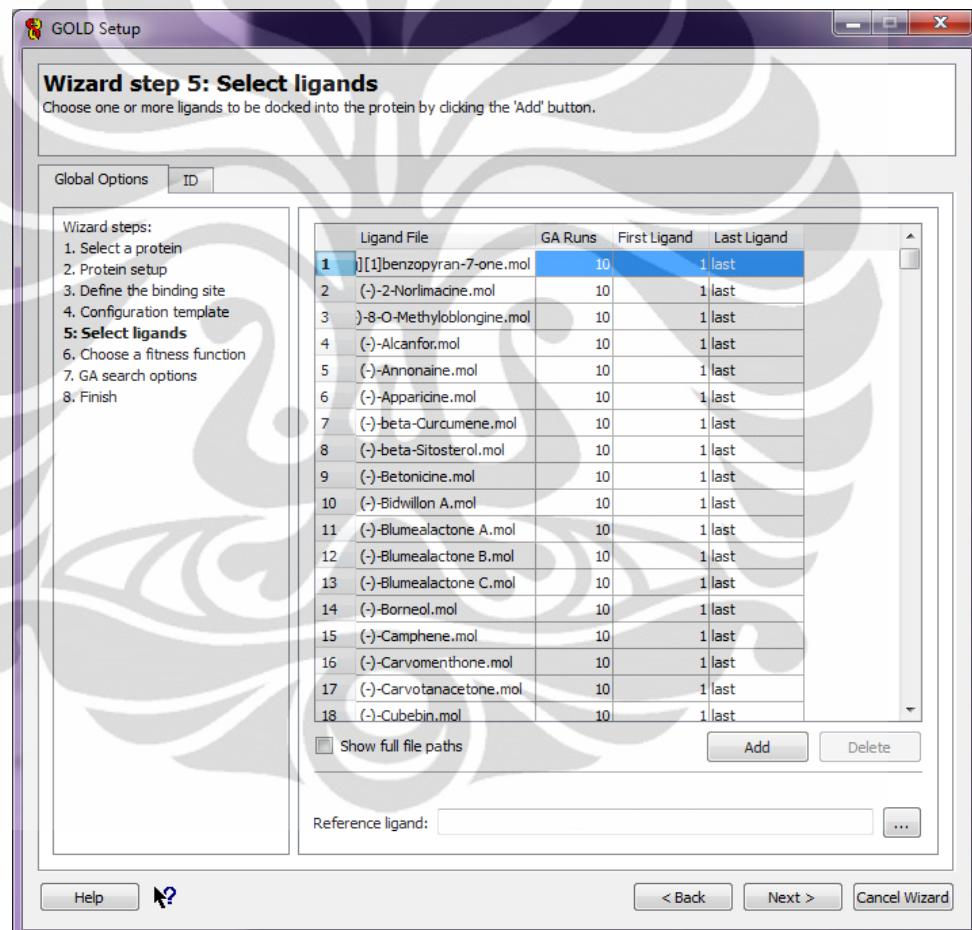
7. Pemilihan ligan

Muncul tampilan langkah 5: Pemilihan ligan

Select Ligands → Memasukkan ligan yang berasal dari *database Tanaman Obat di Indonesia*. *Database* ini berisi 1450 ligan dalam format .mol.

Selanjutnya, *number of solution* dipilih sebanyak 10 dan *GA Runs* 10 →

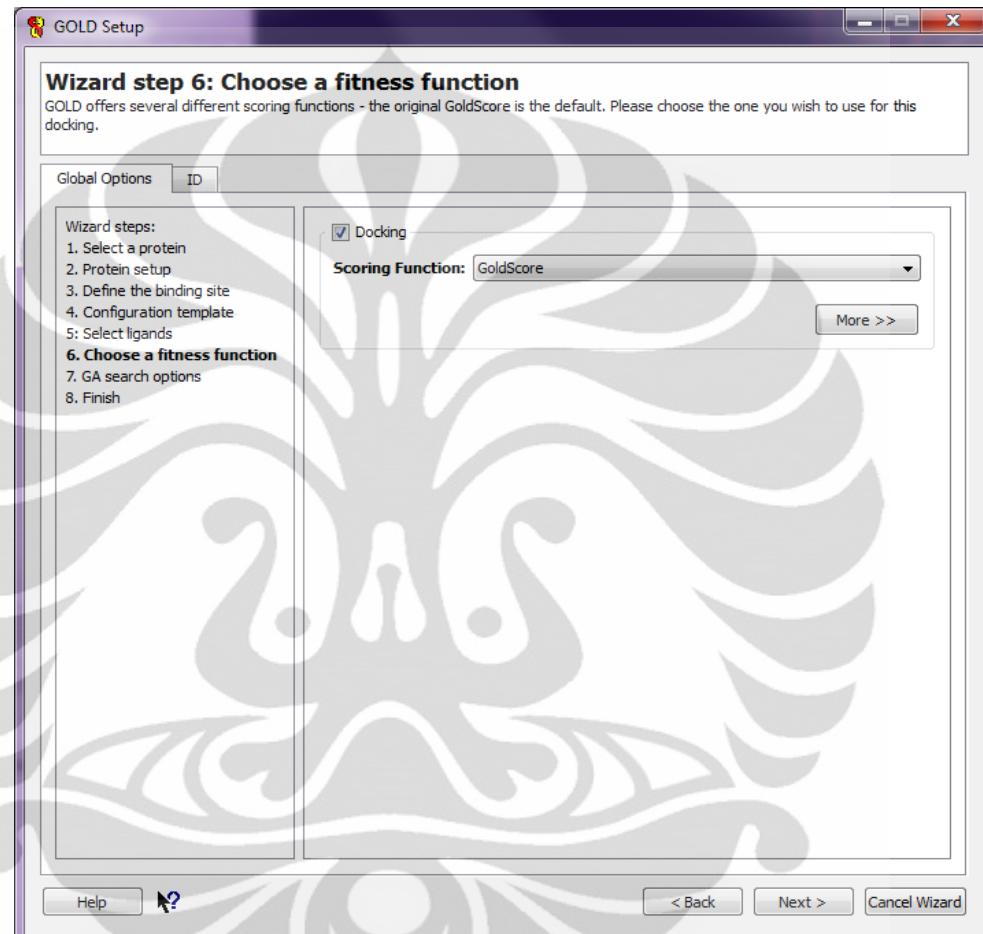
Next



8. Pemilihan fungsi skor

Muncul tampilan langkah 6 : Fungsi skor

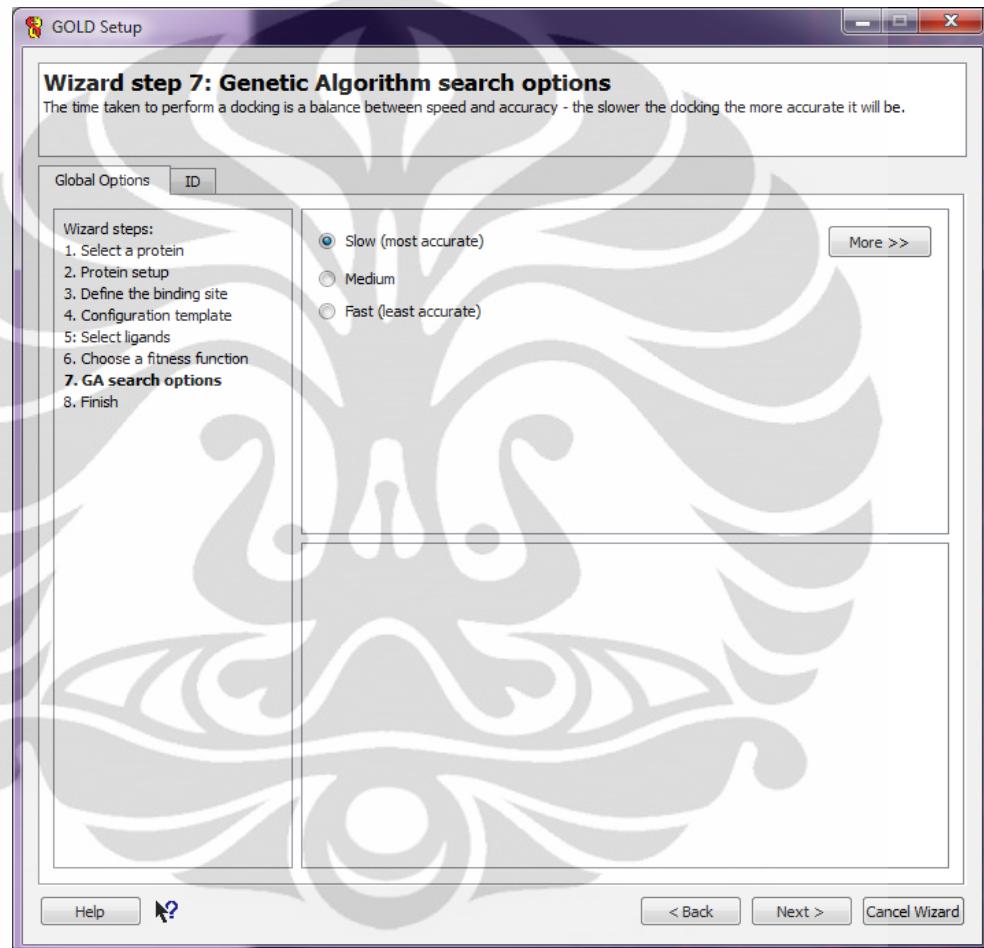
Pilih GoldScore (sesuai default) → Next



9. Penentuan kecepatan *screening*

Muncul tampilan langkah 7 : Pengaturan *Generic Algorithm*

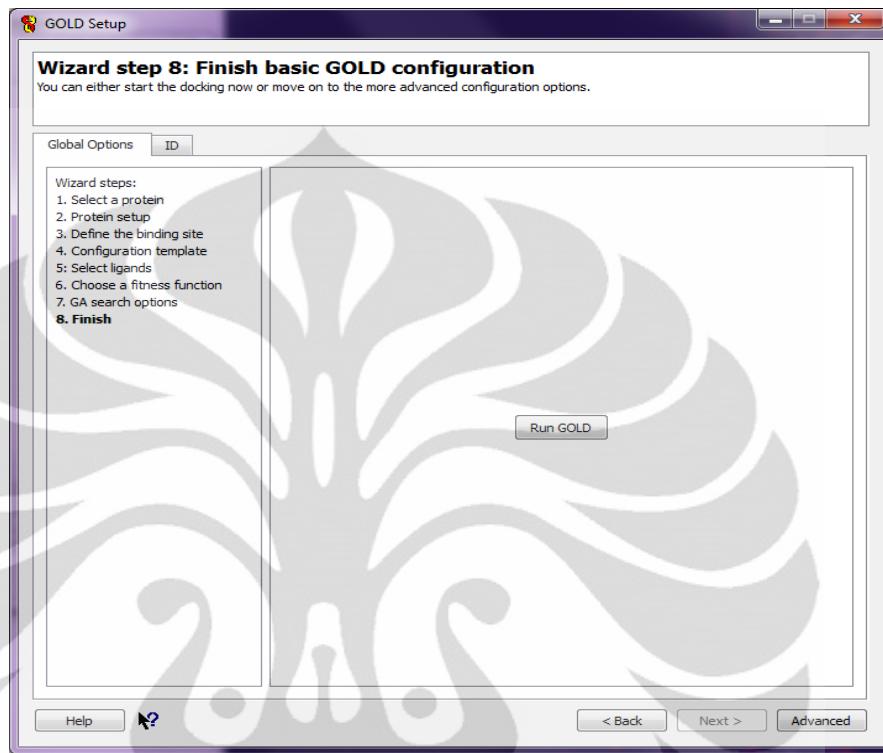
Terdapat 3 variasi kecepatan pada penambatan molekuler menggunakan GOLD, yaitu *fast (least accurate)* , *medium* dan *slow (most accurate)*.



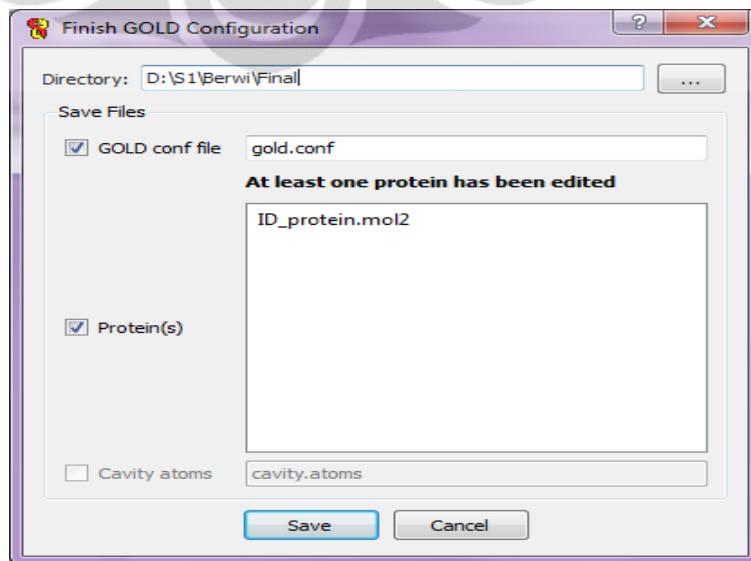
10. Tahap Akhir

Muncul tampilan langkah 8 : Konfigurasi final

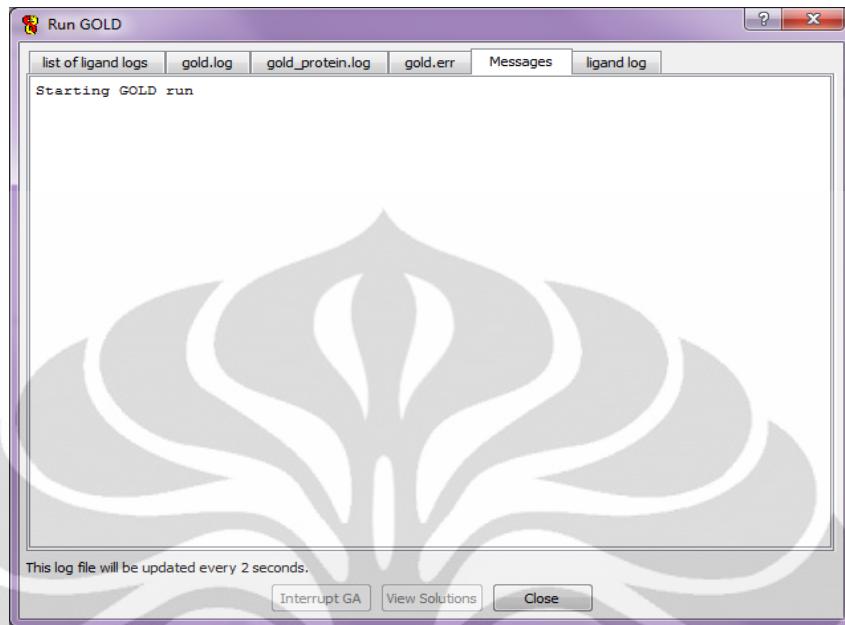
Klik Run GOLD



11. Setelah pemilihan opsi Run GOLD akan muncul opsi pemilihan direktori penyimpanan yang akan dibuat dalam satu *folder*. Hasil penambatan berupa berkas .conf atau *configuration gold file* dan bentuk konformasi pengikatan ligan berupa .mol → Save

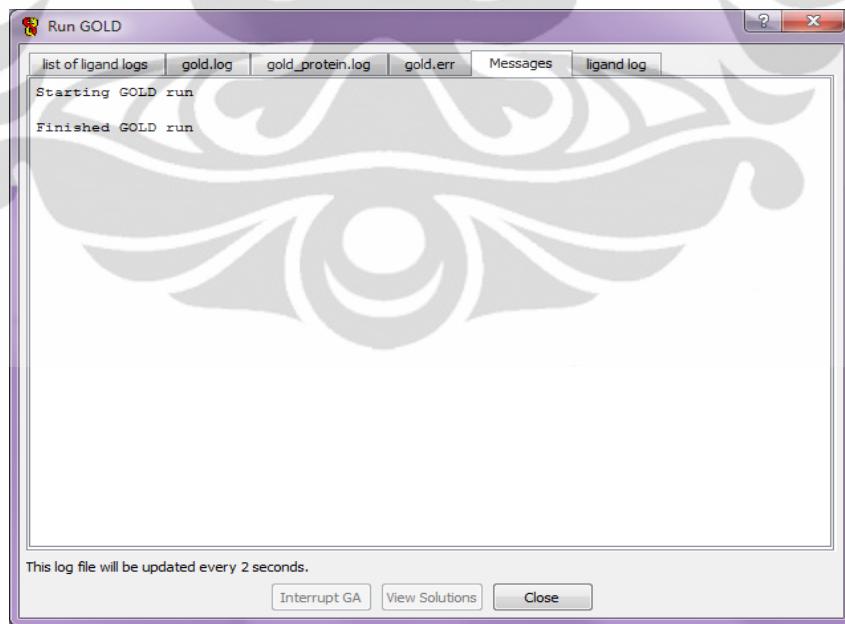


12. Penambatan dimulai



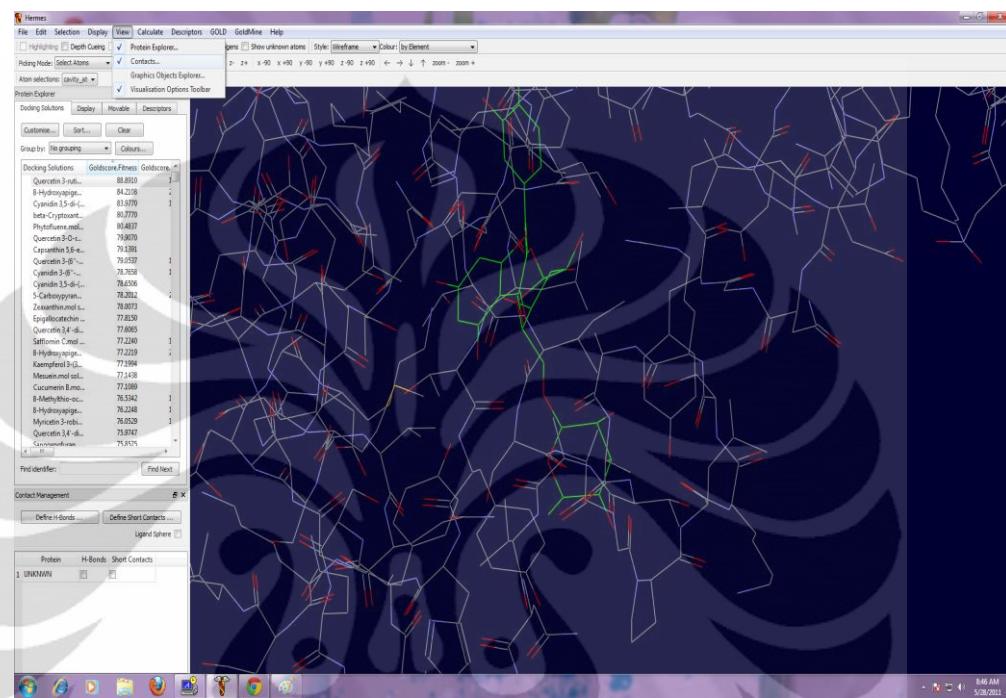
13. Tunggu hingga proses penambatan selesai

14. Penambatan selesai



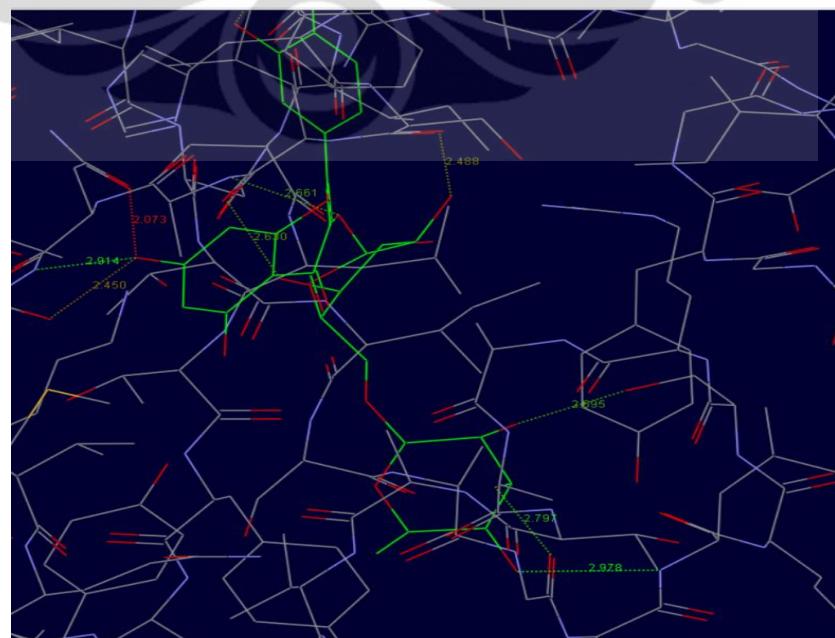
Lampiran 4. Analisis Hasil Penambatan dengan Perangkat Lunak GOLD

- Setelah penambatan selesai (lampiran 3) maka akan muncul GoldScore mulai dari terbesar hingga terkecil.



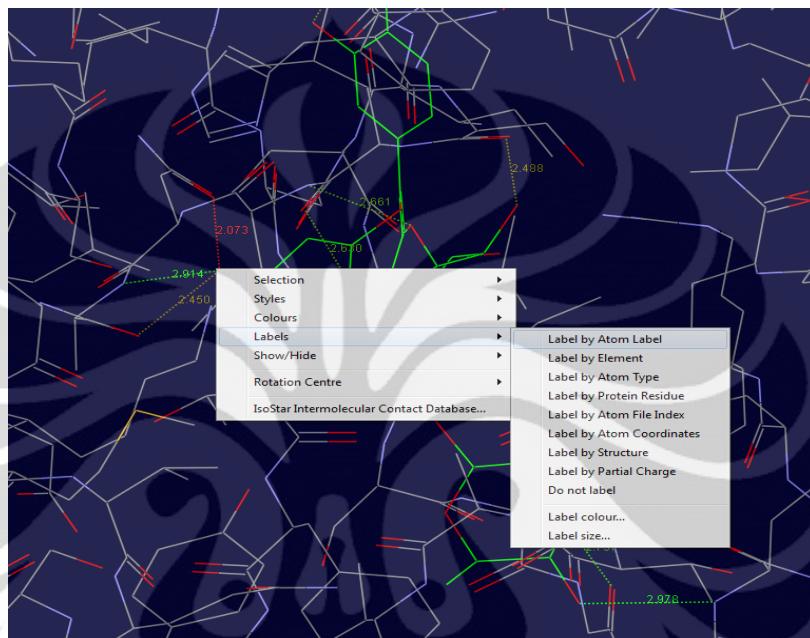
- Untuk melihat adanya ikatan hidrogen beserta jarak

View → Contacts



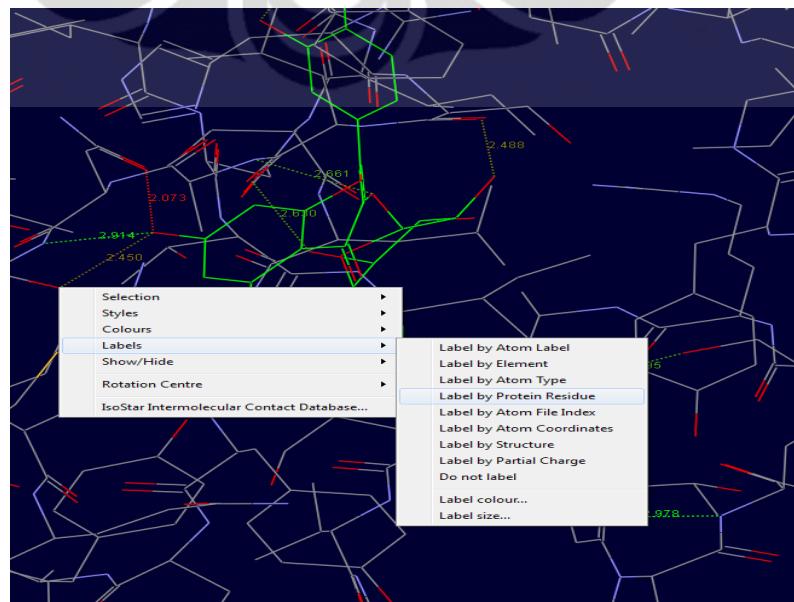
3. Untuk mengetahui gugus dan nomor atom pada ligan yang berikatan pada situs aktif target penambatan

Pada atom yang memiliki ikatan, Klik kanan → Labels → Label by Atom Label



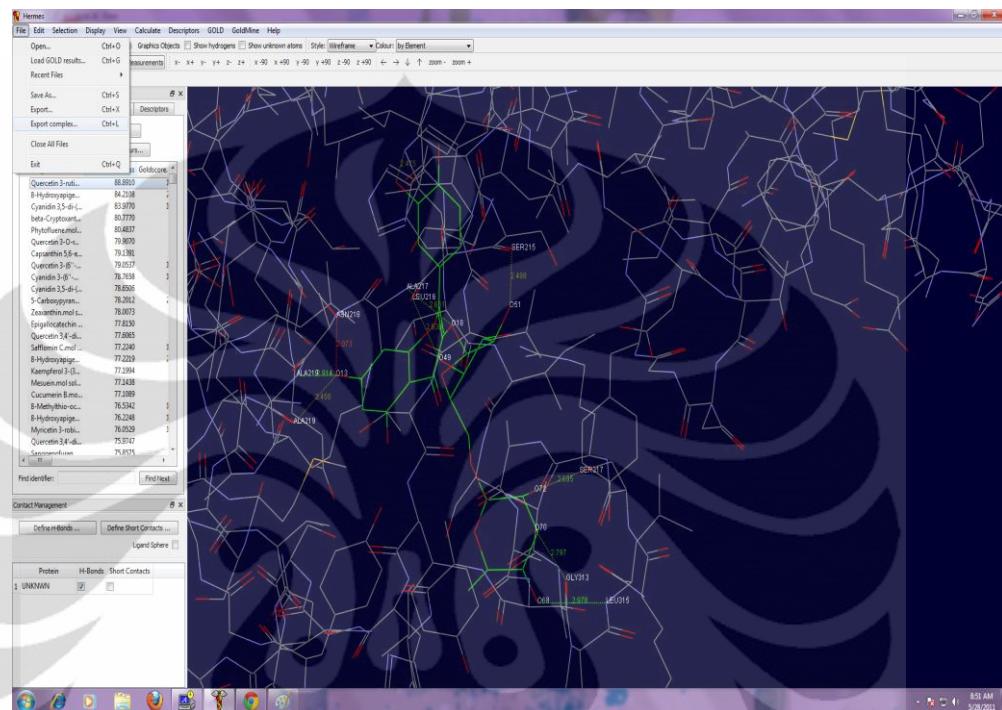
4. Untuk mengetahui gugus residu asam amino pada situs aktif target penambatan yang berikatan dengan ligan.

Pada residu yang memiliki ikatan, Klik kanan → Labels → Label by Protein Residue



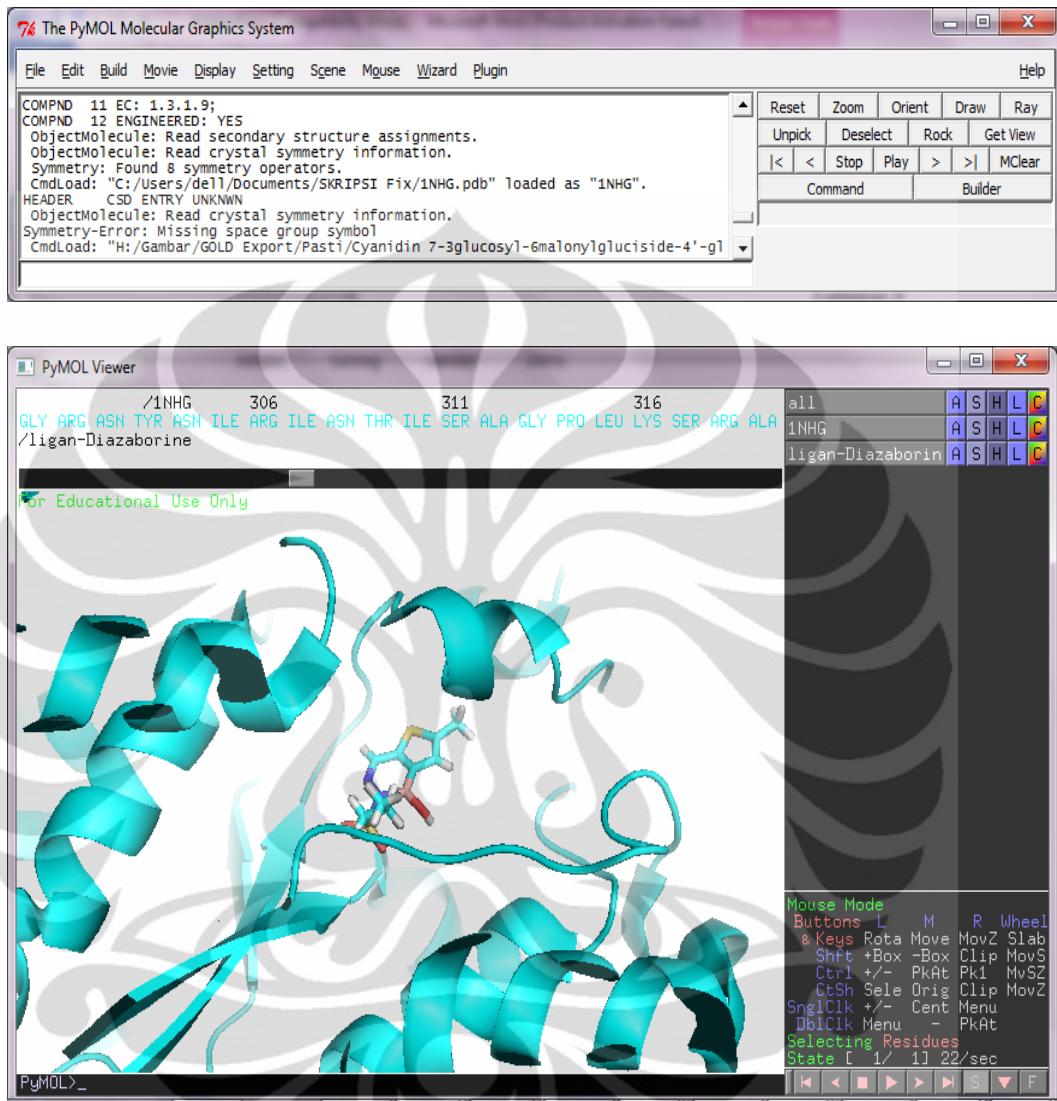
5. Setelah semua nomor atom ligan dan residu asam amino diketahui selanjutnya disimpan dengan format .pdb

File → Export Complex



6. Selanjutnya dilakukan visualisasi menggunakan perangkat lunak PyMOL.

Lampiran 5. Tampilan perangkat lunak PyMOL



Lampiran 6. Tampilan situs *Protein Data Bank* (Bank Data Protein)

The screenshot shows the RCSB PDB website interface. At the top, there is a navigation bar with links for 'Contact Us | Print', 'PDB ID or Text' search, and 'Advanced Search'. The main header features the 'RCSB PDB' logo and the text 'A MEMBER OF THE PDB An Information Portal to Biological Macromolecular Structures'. Below this, it says 'As of Tuesday May 17, 2011 at 5 PM PDT there are 73153 Structures'.

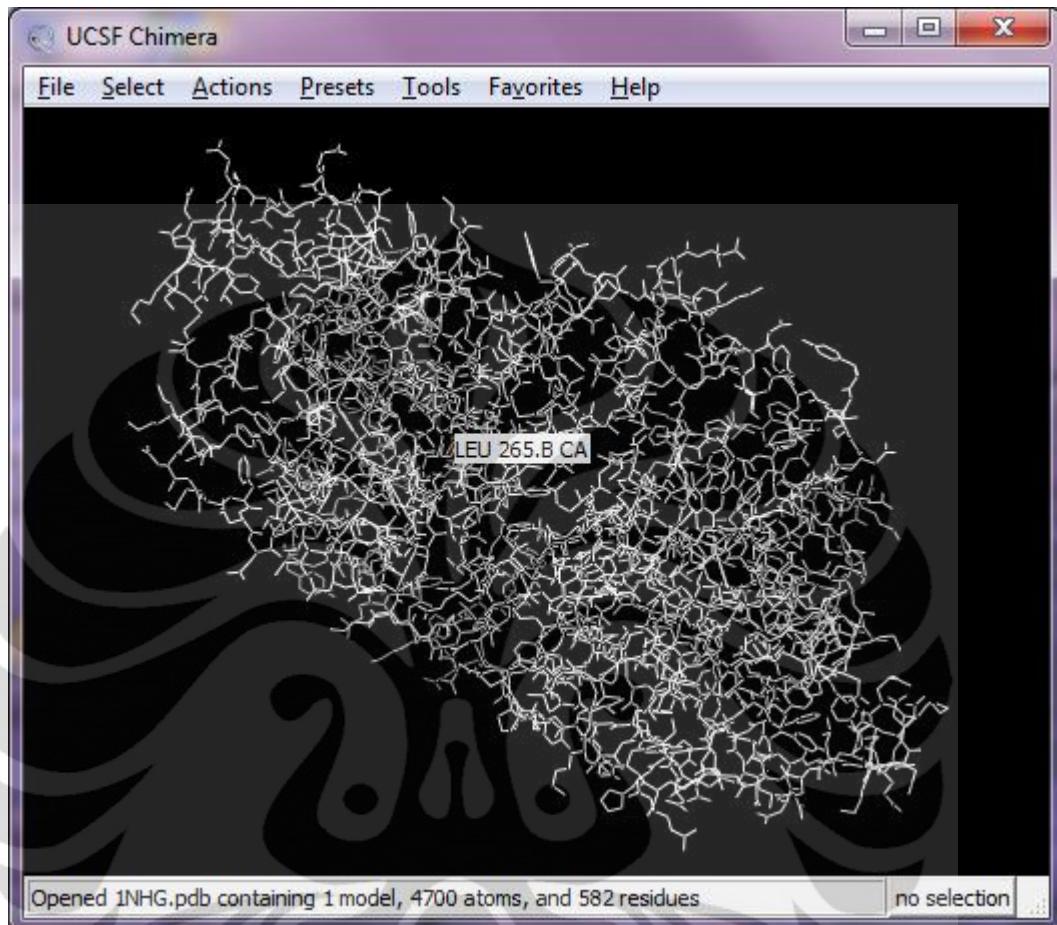
The central content area displays the title 'CRYSTAL STRUCTURE ANALYSIS OF PLASMODIUM FALCIPARUM ENOYL-ACYL-CARRIER-PROTEIN REDUCTASE WITH TRICLOSAN' and the PDB ID '1NHG'. There are buttons for 'Display Files', 'Download Files', and 'Share this Page'.

On the left, there is a sidebar with three expandable sections: 'MyPDB', 'Home', and 'Deposition'. The 'Deposition' section contains links for 'All Deposit Services', 'Electron Microscopy', 'X-ray | NMR', 'Validation Server', 'BioSync Beamlines/Facilities', and 'Related Tools'. Below these sections is another 'Search' section with 'Advanced Search' and 'Latest Release' options.

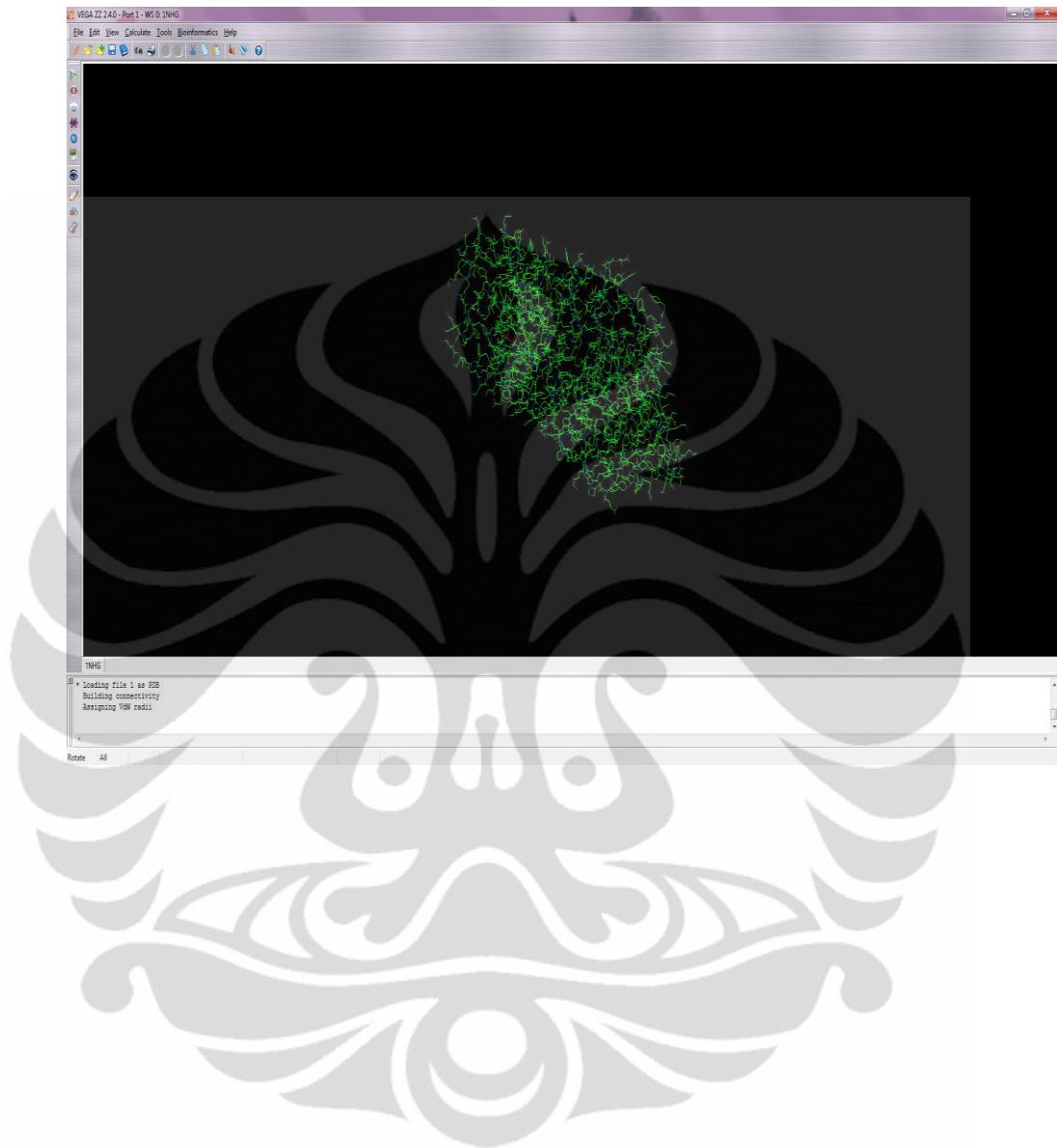
The main content area includes a 'Primary Citation' section with the reference: 'Structural elucidation of the specificity of the antibacterial agent triclosan for malarial enoyl acyl carrier protein reductase. Perazzo, R., Kuo, M., Sidhu, A.S., Valliyaveettil, J.T., Blitman, R., Jacobs Jr., W.R., Fidock, D.A., Sacchettini, J.C. (2002) J.Biol.Chem. 277: 13106-13114'. It also includes a 'PubMed Abstract' section with the text: 'The human malaria parasite Plasmodium falciparum synthesizes fatty acids using a type II pathway that is absent in humans. The final step in fatty acid elongation is catalyzed by enoyl acyl carrier protein reductase, a validated antimicrobial drug target. Here... [Read More & Search PubMed Abstracts]'.

On the right, there is a large 3D ribbon diagram of the protein structure labeled 'Biological Assembly 1'. Below the diagram are buttons for 'More Images...'.

Lampiran 7. Tampilan perangkat lunak UCSF Chimera



Lampiran 8. Tampilan perangkat lunak Vega ZZ



Lampiran 9. Tampilan situs *PubChem Compound*

1. Kontrol Positif

The screenshot shows the PubChem Compound Summary page for Triclosan (CID 5564). The page includes a chemical structure of triclosan (2,4-dichlorophenoxyethanol), its BioMedical Annotation (Total:1), and detailed compound information such as Compound ID (5564), Molecular Weight (289.54178 g/mol), and XLogP3-AA (5).

2. Kontrol Negatif

The screenshot shows the PubChem Compound Summary page for Ethionamide (CID 2761171). The page includes a chemical structure of ethionamide (2-(butylamino)-N-methylbenzylthiourea), its BioMedical Annotation (Total:1), and detailed compound information such as Compound ID (2761171), Molecular Weight (166.2434 g/mol), and XLogP3 (1.1).

Lampiran 10. Tampilan perangkat lunak Open Babel

