



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENAPISAN *IN SILICO* ANTIMALARIA DARI BASIS
DATA TANAMAN OBAT INDONESIA TERHADAP TARGET
PLASMEPSIN**

SKRIPSI

**EKO ADITYA RIFAI
0706264601**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JANUARI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENAPISAN *IN SILICO* ANTIMALARIA DARI BASIS
DATA TANAMAN OBAT INDONESIA TERHADAP TARGET
PLASMEPSIN**

SKRIPSI

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

**EKO ADITYA RIFAI
0706264601**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JANUARI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Eko Aditya Rifai

NPM : 0706264601

Tanda Tangan : 




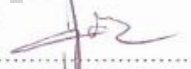
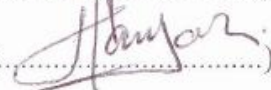
Tanggal : 10 Januari 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Eko Aditya Rifai
NPM : 0706264601
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Penapisan *In Silico* Antimalaria dari Basis Data
Tanaman Obat Indonesia terhadap Target
Plasmepsin

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., Apt	()
Pembimbing II	: Drs. Hayun, M. Si., Apt.	()
Penguji I	: Prof. Dr. Atiek Soemiati, M. S., Apt.	()
Penguji II	: Dr. Katrin, M. S., Apt.	()
Penguji III	: Dra. Maryati Kurniadi, M. Si., Apt.	()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 10 Januari 2012

KATA PENGANTAR

Segenap puji serta syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT, karena atas berkat dan rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

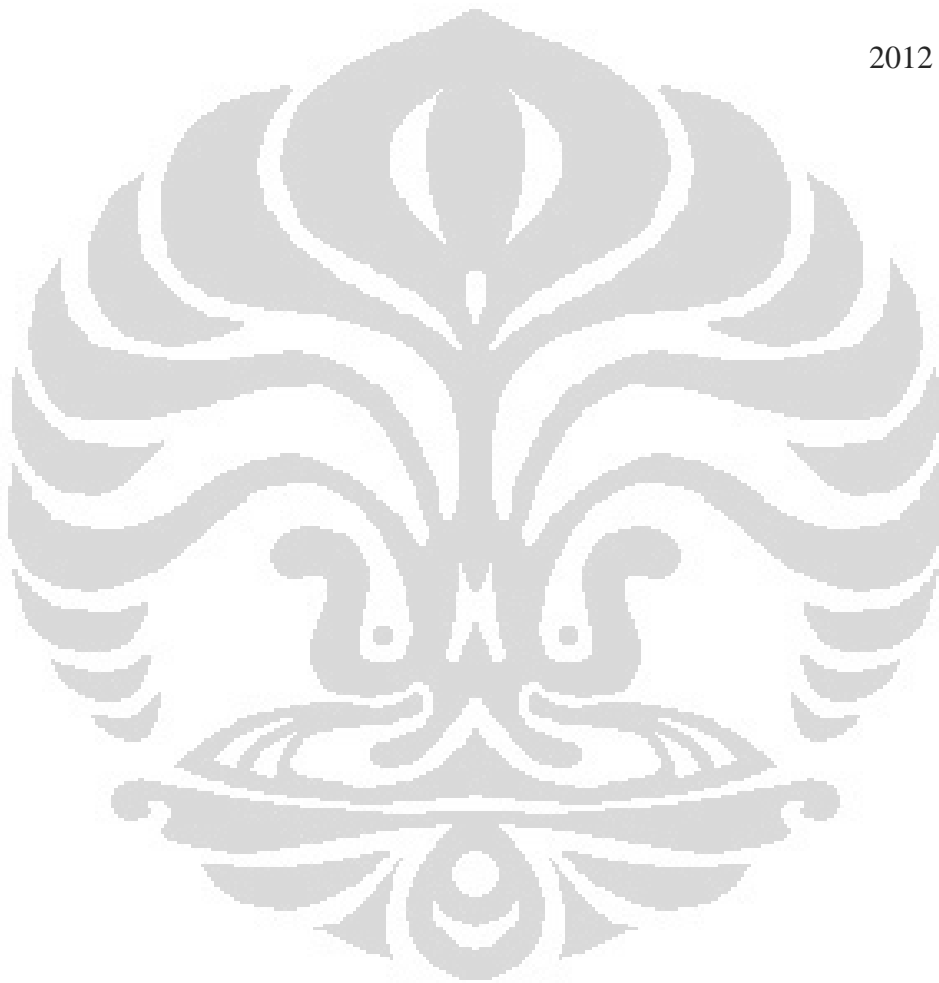
Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak dari masa perkuliahan sampai penyusunan skripsi, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

- (1) Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M. S., Apt. selaku ketua Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk melaksanakan penelitian ini;
- (2) Bapak Dr. Arry Yanuar, M. Si., Apt. dan Bapak Drs. Hayun, M. Si, Apt. selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penyusunan skripsi ini;
- (3) Ibu Pharm. Dr. Joshita Djajadisastra M. S., Ph. D., Apt. selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan selama penulis menempuh pendidikan di Farmasi FMIPA UI;
- (4) Para dosen yang telah memberikan ilmu pengetahuan selama penulis menempuh pendidikan di Farmasi FMIPA UI;
- (5) Seluruh pegawai Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah membantu penulis selama menempuh pendidikan di Farmasi FMIPA UI;
- (6) Orang tua dan keluarga yang telah memberikan bantuan dukungan material dan moral;
- (7) Teman-teman Farmasi angkatan 2007 yang telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini; dan
- (8) Semua pihak yang turut membantu dan memberikan dukungan selama penulis melakukan penelitian dan penyusunan skripsi.

Akhir kata, penulis berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Penulis menyadari masih banyak kekurangan pada skripsi ini, namun penulis juga berharap agar skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Penulis

2012



**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Eko Aditya Rifai
NPM : 0706264601
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 dari Basis Data Tanaman Obat Indonesia terhadap Target Plasmeptin

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di: Depok

Pada tanggal: 10 Januari 2012

Yang menyatakan



(Eko Aditya Rifai)

ABSTRAK

Nama : Eko Aditya Rifai

Program Studi : Farmasi

Judul : Penapisan *In Silico* Antimalaria dari Basis Data Tanaman Obat
Indonesia terhadap Target Plasmepsin

Malaria merupakan salah satu penyakit yang menyebabkan korban jutaan jiwa setiap tahun. Plasmepsin adalah enzim utama di antara enzim lain dalam siklus hidup plasmodium penyebab malaria yang mendegradasi hemoglobin selama fase eritrosit di dalam vakuola makanan. Dewasa ini, industri farmasi telah berupaya untuk mengembangkan agen terapeutik yang dapat menyembuhkan penyakit malaria melalui penemuan senyawa baru penghambat plasmepsin mengingat adanya penyebaran strain yang resisten terhadap obat antimalaria. Namun, karena biaya yang tinggi dan waktu yang lama, metode konvensional untuk penemuan obat baru yang dilakukan secara *in vivo* dan *in vitro* sulit terealisasi sehingga para ilmuwan kemudian beralih kepada metode baru yaitu penapisan *in silico*. Jenis penapisan *in silico* yang akan dilakukan dalam penelitian ini adalah penapisan berbasis struktur dengan menggunakan Basis Data Tanaman Obat Indonesia dan perangkat lunak *GOLD*. Berdasarkan penapisan ini, didapatkan hasil 11 kandidat senyawa inhibitor yang diharapkan dapat dikembangkan sebagai obat antimalaria. Senyawa tersebut yaitu *Trimyrustin*; *Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside)*; *Isoscutellarein 4'-methyl ether 8-(6"-n-butylglucuronide)*; *Cyanidin 3-(6"-malonylglucoside)-5-glucoside*; *Multioloroside*; *Delphinidin 3-(2-rhamnosyl-6-malonylglucoside)*; *Delphinidin 3-(6-malonylglucoside)-3',5'-di-(6-p-coumaroylglucoside)*; *Cyanidin 3-[6-(6-sinapylglucosyl)-2-xylosylgalactoside]*; *Kaempferol 3-glucosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-galactoside*; *Sanggenofuran A*; dan *Lycopene* dengan kisaran *GOLDScore* dari 78,4647 sampai 98,2836. Dua kandidat di antaranya berikatan dengan seluruh residu dari sisi katalitik plasmepsin yaitu Asp34 dan Asp214.

Kata Kunci : antimalaria, *GOLD*, malaria, penapisan *in silico*, plasmepsin

xvi + 100 halaman; 23 gambar; 14 tabel; 9 lampiran

Bibliografi : 58 (1992-2011)

ABSTRACT

Name : Eko Aditya Rifai
Major : Pharmacy
Title : *In Silico* Screening of Antimalarial from Indonesian Medicinal
Plants Database to Plasmeptin Target

Malaria is one of diseases that annually emerge millions victim. Among the other enzymes, plasmeptin is the main enzyme in plasmodium life cycle that degrades hemoglobin during erythrocytic phase in food vacuole. Recently, pharmaceutical industries have been trying to develop therapeutic agents that be able to cure malaria through discovery of new plasmeptin inhibitor compounds, regarding to the spread of drug-resistant strains for antimalarial. However, due to high cost and long term, conventional methods for discovery of new drugs that were done *in vivo* and *in vitro* were difficult to be realized so that the scientists then shift to the new method called *in silico* screening. The chosen *in silico* screening method in this experiment is structure-based screening by using GOLD software and Indonesian Medicinal Plants Database. Based on the obtained results from this screening, there are 11 inhibitor candidates which are expected to be developed as antimalarial. These compounds are Trimyristin; Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside); Isoscutellarein 4'-methyl ether 8-(6''-n-butylglucuronide); Cyanidin 3-(6''-malonylglucoside)-5-glucoside; Multifloroside; Delphinidin 3-(2-rhamnosyl-6-malonylglucoside); Delphinidin 3-(6-malonylglucoside)-3',5'-di-(6-p-coumaroylglucoside); Cyanidin 3-[6-(6-sinapylglucosyl)-2-xylosylgalactoside]; Kaempferol 3-glucosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-galactoside; Sanggenofuran A; and Lycopene with GOLDScore range from 78,4647 to 98,2836. Two of them bind with all residues in catalytic site of plasmeptin which are Asp34 and Asp214.

Keywords : antimalarial, GOLD, *in silico* screening, malaria, plasmeptin

xvi + 100 pages; 23 figures; 14 tables; 9 appendixes

Bibliography : 58 (1992-2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Tujuan Penelitian	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1. Malaria.....	4
2.2. Plasmepsin	6
2.3. Enzim	9
2.4. Inhibitor Plasmepsin	11
2.5. Asam Amino dan Protein.....	13
2.5.1. Struktur Protein	13
2.5.2. Interaksi Protein dengan Ligan.....	17
2.6. Bioinformatika.....	20
2.7. Penambatan Molekuler.....	20
2.8. Penapisan <i>In Silico</i>	22
2.9. Basis Data Tanaman Obat Indonesia.....	25
2.10. <i>Protein Data Bank</i>	25

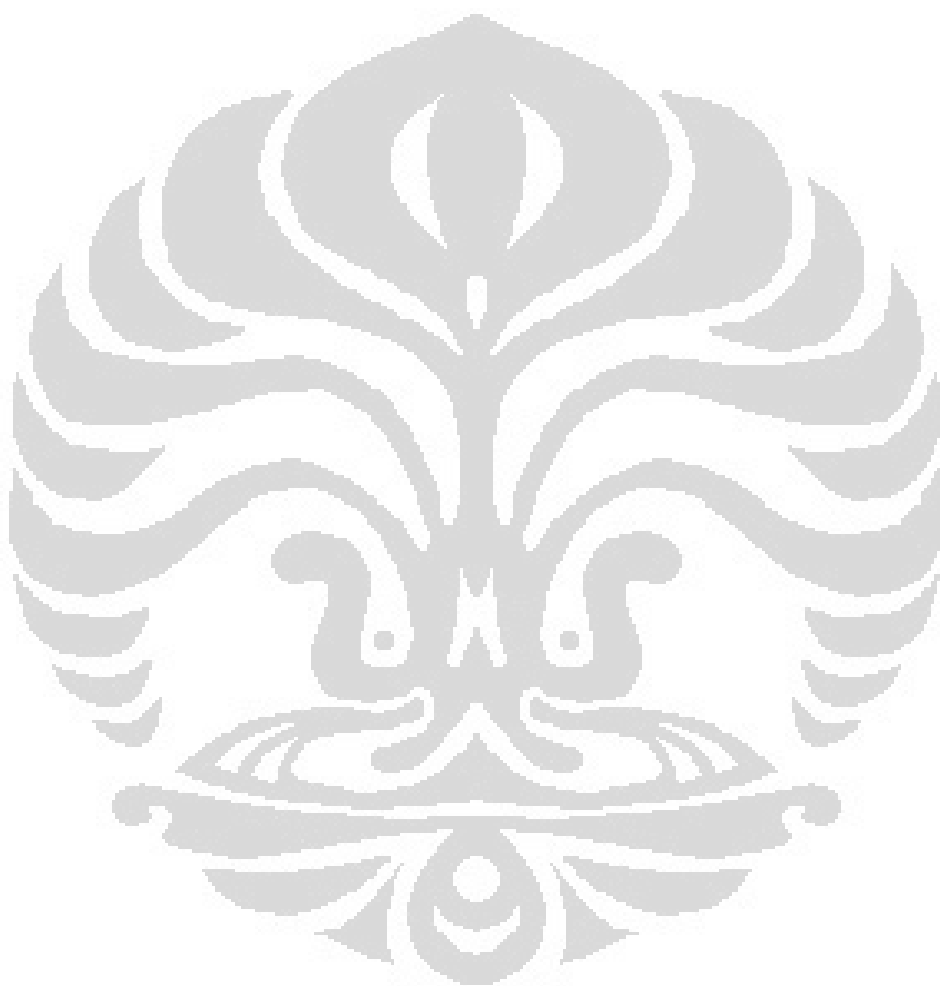
2.11. Pubchem Compound.....	25
2.12. Perangkat Lunak yang Digunakan dalam Bioinformatika	26
2.12.1. GOLD	26
2.12.2. PyMOL	27
2.12.3. UCSF Chimera	28
2.12.4. Vega ZZ	28
BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN.....	30
3.1. Tempat dan Waktu.....	30
3.2. Alat	30
3.2.1. Perangkat Keras	30
3.2.2. Perangkat Lunak	30
3.3. Bahan	31
3.3.1. Struktur Tiga Dimensi Plasmepsin	31
3.3.2. Struktur Tiga Dimensi Ligan	31
3.3.3. Kontrol Positif dari Inhibitor Plasmepsin	32
3.4. Cara Kerja	32
3.4.1. Penyiapan Struktur Protein	32
3.4.2. Pemisahan Residu dari Makromolekul Plasmepsin.....	32
3.4.3. Optimasi Makromolekul Plasmepsin	32
3.4.4. Validasi Metode Penapisan <i>In Silico</i>	33
3.4.5. Penyiapan Struktur Ligan	33
3.4.6. Penapisan <i>In Silico</i> Ligan dari Basis Data Tanaman Obat Indonesia terhadap Target Plasmepsin	33
3.4.7. Kandidat Senyawa Inhibitor Plasmepsin	33
3.4.8. Analisis dan Visualisasi Interaksi Protein-Ligan.....	34
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	35
4.1. Penyiapan Struktur Protein	35
4.1.1. Pengunduhan Makromolekul Plasmepsin.....	35
4.1.2. Pemisahan Residu pada Rantai Makromolekul Plasmepsin .	36
4.1.3. Optimasi Makromolekul Plasmepsin.....	36

4.2. Validasi Metode Penapisan <i>In Silico</i>	37
4.2.1. Pengunduhan Kontrol Positif dari Inhibitor Plasmepsin	37
4.2.2. Konversi Berkas Kontrol Positif Inhibitor Plasmepsin.....	40
4.2.3. Penambatan Molekuler Menggunakan <i>GOLD</i>	40
4.3. Penyiapan Struktur Ligan	44
4.4. Penapisan <i>In Silico</i> Ligan dari Basis Data Tanaman Obat Indonesia terhadap Target Plasmepsin	45
4.5. Kandidat Senyawa Inhibitor Plasmepsin	46
4.6. Analisis dan Visualisasi Interaksi Protein-Ligan.....	48
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	52
5.1. Kesimpulan	52
5.2. Saran	52
DAFTAR ACUAN.....	53

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Siklus Hidup Plasmodium	6
Gambar 2.2.	Jalur Degradasi Hemoglobin dalam Vakuola Makanan <i>Plasmodium falciparum</i>	7
Gambar 2.3.	Mekanisme Kerja Plasmepsin	8
Gambar 2.4.	Sekuens Plasmepsin II	9
Gambar 2.5.	Rumus Bangun Pepstatin.....	12
Gambar 2.6.	Dua Puluh Jenis Asam Amino Penyusun Protein.....	60
Gambar 2.7.	Struktur Protein	61
Gambar 2.8.	Hubungan antara Energi Interaksi van der Waals dengan Jarak antar Atom	19
Gambar 3.1.	Struktur Kristal Plasmepsin II dari <i>Plasmodium falciparum</i> dengan Inhibitor R36.....	31
Gambar 4.1.	Struktur Tiga Dimensi Kontrol Positif Inhibitor Plasmepsin	38
Gambar 4.2.	Situs Aktif Plasmepsin Berikatan dengan Kontrol Positif	42
Gambar 4.3.	Konformasi Ikatan Kontrol Positif Pepstatin dengan Plasmepsin..	43
Gambar 4.4.	Konformasi Ikatan Kontrol Positif Norstatin dengan Plasmepsin ..	44
Gambar 4.5.	Rumus Struktur Kandidat Inhibitor Hasil Penapisan <i>In Silico</i>	63
Gambar 4.6.	Rumus Struktur Kandidat Inhibitor Hasil Penapisan <i>In Silico</i>	64
Gambar 4.7.	Rumus Struktur Kandidat Inhibitor Hasil Penapisan <i>In Silico</i>	65
Gambar 4.8.	Rumus Struktur Kandidat Inhibitor Hasil Penapisan <i>In Silico</i>	66
Gambar 4.9.	Interaksi Kandidat Inhibitor Plasmepsin dengan Beberapa Residu Asam Amino pada Plasmepsin	67
Gambar 4.10.	Interaksi Kandidat Inhibitor Plasmepsin dengan Beberapa Residu Asam Amino pada Plasmepsin	68
Gambar 4.11.	Interaksi Kandidat Inhibitor Plasmepsin dengan Beberapa Residu Asam Amino pada Plasmepsin	69
Gambar 4.12.	Interaksi Kandidat Inhibitor Plasmepsin dengan Beberapa Residu Asam Amino pada Plasmepsin	70
Gambar 4.13.	Interaksi <i>Delphinidin 3-(2-rhamnosyl-6-malonylglucoside)</i> dengan Beberapa Residu Asam Amino pada Plasmepsin	49

Gambar 4.14. Interaksi *Isoscutellarein 4'-methyl ether 8-(6''-n-butylglucuronide)*
dengan Beberapa Residu Asam Amino pada Plasmepsin50



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1.	Struktur Plasmepsin yang Diunduh dari <i>Protein Data Bank</i>	35
Tabel 4.2.	Daftar Kontrol Positif Inhibitor Plasmepsin.....	39
Tabel 4.3.	Hasil Penambatan Molekuler pada Kontrol Positif Inhibitor Plasmepsin pada Lima Kali Percobaan dengan Kecepatan <i>Fast</i>	41
Tabel 4.4.	Hasil Penambatan Molekuler pada Kontrol Positif Inhibitor Plasmepsin pada Lima Kali Percobaan dengan Kecepatan <i>Medium</i>	41
Tabel 4.5.	Hasil Penambatan Molekuler pada Kontrol Positif Inhibitor Plasmepsin pada Lima Kali Percobaan dengan Kecepatan <i>Slow</i> ...	42
Tabel 4.6.	Hasil Penapisan <i>In Silico</i> 1-2 dengan Menggunakan Basis Data Tanaman Obat Indonesia.....	71
Tabel 4.7.	Hasil Penapisan <i>In Silico</i> 3-4 dengan Menggunakan Basis Data Tanaman Obat Indonesia.....	72
Tabel 4.8.	Hasil Penapisan <i>In Silico</i> 5-6 dengan Menggunakan Basis Data Tanaman Obat Indonesia.....	73
Tabel 4.9.	Hasil Penapisan <i>In Silico</i> 7-8 dengan Menggunakan Basis Data Tanaman Obat Indonesia.....	74
Tabel 4.10.	Hasil Penapisan <i>In Silico</i> 9-10 dengan Menggunakan Basis Data Tanaman Obat Indonesia.....	75
Tabel 4.11.	Hasil Penapisan <i>In Silico</i> terhadap Target Plasmepsin.....	46
Tabel 4.12.	Kandidat Inhibitor Berdasarkan Hasil Penapisan <i>In Silico</i>	76
Tabel 4.13.	Kandidat Inhibitor Hasil Penapisan <i>In Silico</i> beserta Famili dan Spesies Tanaman Asal.....	78
Tabel 4.14.	Ikatan Hidrogen yang Terjadi pada Target Penambatan Plasmepsin dengan Ligan Hasil Penapisan <i>In Silico</i> Peringkat 11 Besar	80

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Skema Kerja.	82
Lampiran 2.	Skema Kerja Validasi Penapisan <i>In Silico</i>	83
Lampiran 3.	Skema Kerja Perangkat Lunak <i>GOLD</i>	84
Lampiran 4.	Analisis Hasil Penambatan dengan Perangkat Lunak <i>GOLD</i>	93
Lampiran 5.	Tampilan Perangkat Lunak <i>PyMOL</i>	96
Lampiran 6.	Tampilan Situs <i>Protein Data Bank</i>	97
Lampiran 7.	Tampilan Perangkat Lunak <i>UCSF Chimera</i>	98
Lampiran 8.	Tampilan Perangkat Lunak <i>Vega ZZ</i>	99
Lampiran 9.	Tampilan Situs <i>PubChem Compound</i>	100



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit malaria adalah salah satu permasalahan kesehatan yang mendunia. Setidaknya milyaran korban muncul tiap tahunnya dikarenakan penyakit ini dan 2,5 juta orang di antaranya meninggal dunia (Maurice, 2010). Penyakit malaria disebabkan oleh 4 spesies utama, yaitu *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, dan *P. ovale* serta diperantarai oleh nyamuk Anopheles betina. Di antara spesies tersebut, *P. falciparum* menyebabkan hampir 95% dari penyakit malaria. *P. falciparum* menyebabkan satu hingga tiga juta kematian dan ratusan ribu kasus klinik per tahun (Daugherty, *et al.*, 1997). *P. falciparum* menyebabkan penyakit malaria serebral, yang ditandai dengan koma, lesu, susah makan, hemoglobinuria, pendarahan mendadak, dan gejala lainnya (*World Health Organization*, 2010). Fase aseksual dari *P. falciparum* melibatkan sel darah merah dalam kinerjanya. Selama fase aseksual ini, parasit malaria menggunakan hemoglobin dari sel darah merah sebagai sumber makanannya (Miura, *et al.*, 2010).

Penyakit malaria adalah penyebab kematian dan penyakit pada anak-anak dan dewasa, terutama di negara tropis. Pengendalian penyakit malaria membutuhkan pendekatan terintegrasi yang melibatkan pencegahan (terutama pengendalian vektor) dan pengobatan tepat dengan antimalaria yang efektif. Sejak publikasi edisi pertama tentang petunjuk penanganan penyakit malaria dari *World Health Organization (WHO)* pada tahun 2006, kebanyakan negara yang menjadi endemik *P. falciparum* telah memperbarui kebijakan pengobatan dari klorokuin dan sulfadoksin-pirimetamin ke pengobatan kombinasi berbasis artemisinin yang direkomendasikan. Metode ini merupakan pengobatan terkini dan terbaik untuk penyakit malaria falciparum. Sayangnya, penerapan kebijakan ini terhambat oleh beberapa faktor salah satunya karena kendala biaya (*World Health Organization*, 2010).

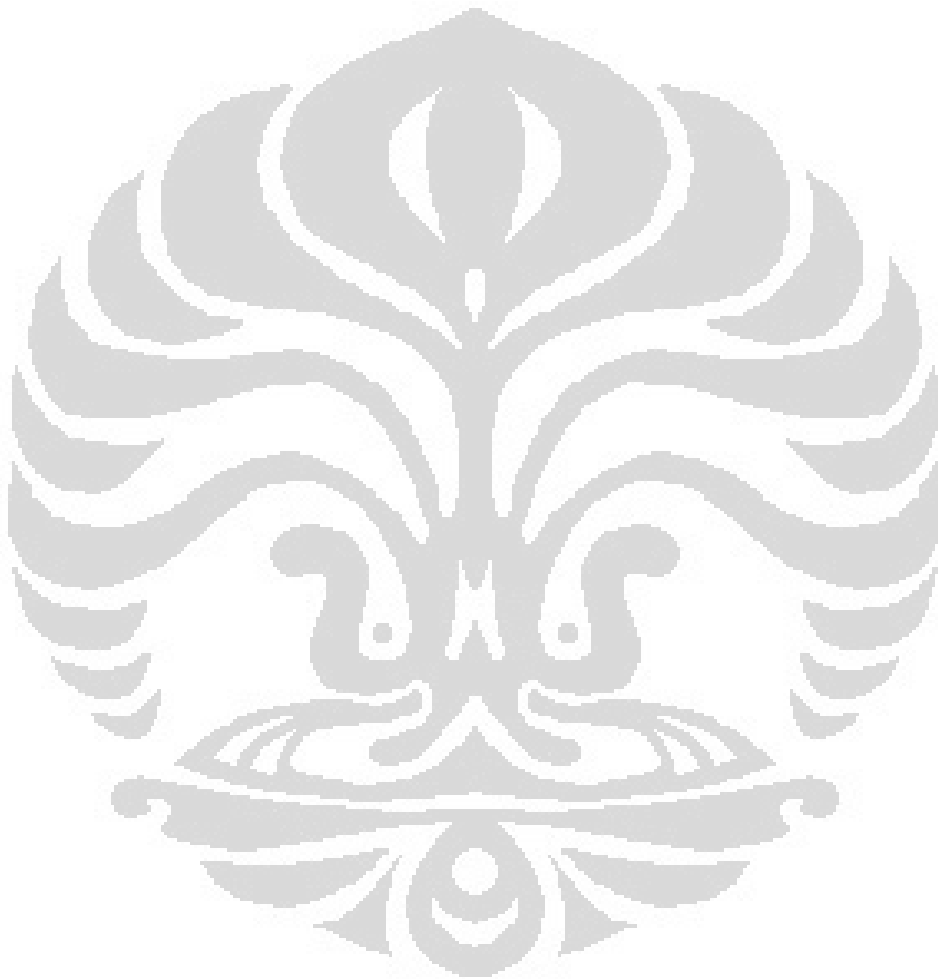
Dalam proses degradasi hemoglobin yang terjadi pada penyakit malaria yang disebabkan oleh *P. falciparum*, enzim-enzim yang berperan antara lain falsipain, falsilisin, dan plasmepsin (Miura, *et al.*, 2010). Di antara ketiga enzim tersebut, plasmepsin adalah enzim utama pada siklus hidup parasit malaria. Para peneliti kemudian memfokuskan penelitian pada penghambatan plasmepsin, sehingga proses pemecahan hemoglobin pun dapat dihambat, yang berujung kepada pengobatan penyakit malaria. Secara sederhana, para peneliti berusaha untuk menemukan obat-obat malaria baru dengan target plasmepsin, terutama dari tanaman obat.

Untuk negara berkembang seperti Indonesia, hal ini jelas membutuhkan strategi tersendiri agar penemuan obat-obat baru yang berguna bagi masyarakat dapat tercapai namun tidak memakan biaya yang sangat besar. Upaya-upaya ini tidak hanya dilakukan oleh pihak-pihak yang bergerak dalam sektor ekonomi, namun juga oleh para ilmuwan dan teknolog. Dewasa ini ada sebuah jalan alternatif dalam upaya penemuan obat baru yang dimunculkan oleh para ahli komputer dan teknologi informasi. Selama ini obat diuji coba sebelum dipasarkan dengan metode *in vitro* dan *in vivo* saja, sedangkan sekarang muncul metode ketiga yang tak kalah penting, yaitu metode *in silico* atau di dalam komputer. Penggunaan komputer dalam penemuan obat baru bertujuan untuk meningkatkan efisiensi proses simulasi dan kalkulasi dalam merancang obat (*drug design*). Komputer menawarkan metode *in silico* sebagai komplemen metode *in vitro* dan *in vivo* yang lazim digunakan dalam proses penemuan obat. Ilmu yang berperan dalam proses ini adalah bioinformatika.

Salah satu cabang dari bioinformatika adalah *in silico screening* atau penapisan *in silico*, yang melibatkan basis data dengan struktur molekul relevan yang ditambahkan pada target protein. Hasil penilaian kemudian digunakan sebagai identifikasi struktur dengan ikatan dan aktivitas fisiologis potensial yang lebih jauh dapat dievaluasi dalam percobaan (Pripp, 2006).

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh kandidat senyawa inhibitor atau senyawa penuntun dengan cara penambatan molekuler menggunakan ligan dari Basis Data Tanaman Obat Indonesia yang berasal dari bahan alam yang memiliki aktivitas terhadap plasmepsin sebagai tahap awal dari rangkaian proses pencarian obat antimalaria.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Malaria

Malaria adalah salah satu penyakit yang menyebabkan efek serius di seluruh dunia. Penyebarannya semakin meningkat seiring dengan resistensi yang muncul pada parasit maupun vektor terhadap senyawa kimia berupa obat (Daugherty, *et al.*, 1997).

Terdapat tiga jenis penyakit malaria, yaitu penyakit malaria kuartana yang disebabkan oleh *Plasmodium malariae*, penyakit malaria tropika yang disebabkan oleh *Plasmodium falciparum*, dan penyakit malaria tersiana yang disebabkan oleh *Plasmodium vivax*. Sejauh ini, *Plasmodium falciparum* merupakan spesies malaria yang mematikan bagi manusia dan memiliki prioritas tertinggi dalam pencarian obat efektif (Bjelic, Nervall, Gutierrez-de-Teran, Ersmark, Hallberg, & Aqvist, 2007). Hal ini disebabkan karena *P. falciparum* menyebabkan penyakit malaria serebral, yang ditandai dengan koma, lesu, susah makan, hemoglobinuria, pendarahan mendadak, dan gejala lainnya (World Health Organization, 2010). Dalam menyebarkan penyakit malaria, Plasmodium melibatkan dua hospes, yaitu manusia sebagai hospes antara (tempat nyamuk melakukan skizogoni atau fase aseksual) dan nyamuk Anopheles betina sebagai hospes definitif (tempat terjadinya siklus seksual dan reproduksi yang dilengkapi dengan sporogoni) (Zucker, 1996).

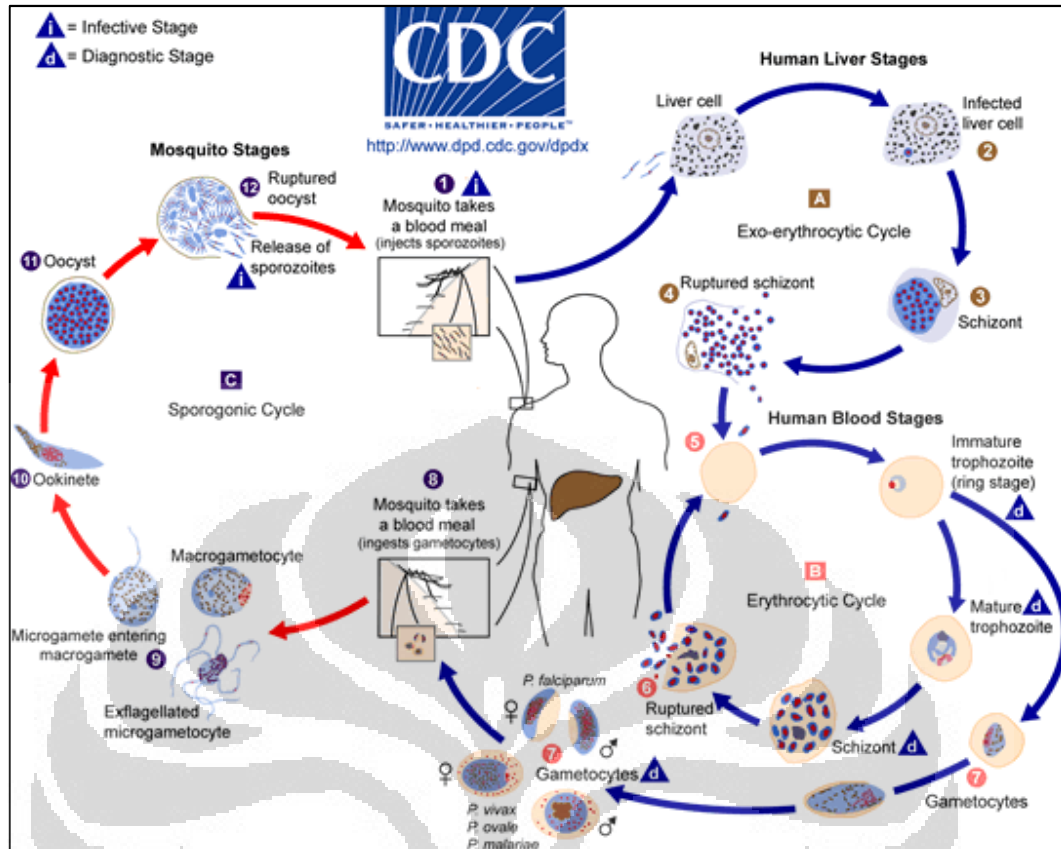
Siklus hidup Plasmodium dimulai dari proses inokulasi sporozoit malaria ke dalam inang manusia yang terjadi karena gigitan nyamuk terinfeksi yang akan mengantarkan sporozoit dari kelenjar ludah nyamuk ke aliran darah manusia untuk menuju hepatosit atau hati (Sullivan & Krishna, 2005). Dalam waktu 30-60 menit, seluruh parasit memasuki hati dan tidak ada yang tersisa dalam darah sirkulasi. Setelah berada di hati, Plasmodium menggandakan diri secara aseksual. Proses ini terus berlangsung hingga 9-16 hari sebelum memasuki sel darah merah (Marcus, 2009).

Sporozoit kemudian segera hilang dari sirkulasi darah dan menggandakan diri di sel parenkim hati hingga berkembang menjadi skizon jaringan. Bagian ini dikenal dengan fase pre-eritrosit atau eksoeritrosit dan berlangsung selama 5-15 hari tergantung dari jenis Plasmodium. *P. vivax* dan *P. ovale* memiliki fase dorman bernama hipnozoit yang tinggal di hati selama beberapa minggu hingga beberapa tahun sebelum perkembangan skizogoni pre-eritrosit (Perlmann & Troye-Blomberg, 2002).

Setelah mengalami perkembangan, skizon jaringan akan pecah dan melepaskan 10.000 merozoit ke sirkulasi darah. Merozoit kemudian berkembang menjadi parasit intraeritrositik (fase cincin) yang matang menjadi tropozoit dan skizon dalam eritrosit pada 48-72 jam setelahnya tergantung spesies (Sullivan & Krishna, 2005).

Kurang dari 1% merozoit berdiferensiasi dalam eritrosit menjadi bentuk seksual yaitu makrogametosit (betina) dan mikrogametosit (jantan). Proses gametogenesis dalam nyamuk *Anopheles* kemudian dilanjutkan dengan pembuahan makrogamet oleh mikrogamet untuk membentuk zigot. Dalam 24 jam, zigot berdiferensiasi menjadi ookinet yang nantinya akan menjadi ookista. Ribuan sporozoit baru diproduksi dari ookista dan bermigrasi ke kelenjar ludah untuk menuju ke epitelium kelenjar, dan akhirnya masuk ke dalam inang manusia lain selama proses konsumsi darah berikutnya, dan oleh karenanya siklus hidup Plasmodium terulang sebagaimana dijelaskan pada Gambar 2.1 (Sullivan & Krishna, 2005).

Beberapa enzim memegang peran penting dalam siklus hidup Plasmodium, di antaranya haematin, hemozoin, plasmepsin, falsipain, falsisilin, dihidrofolat reduktase, dihidroperooat sintase, *Plasmodium falciparum* *Enoyl-ACP reductase* (*PfENR*), dan lain-lain. Penghambatan enzim-enzim tersebut merupakan awalan dari pengembangan obat antimalaria (Sullivan & Krishna, 2005).

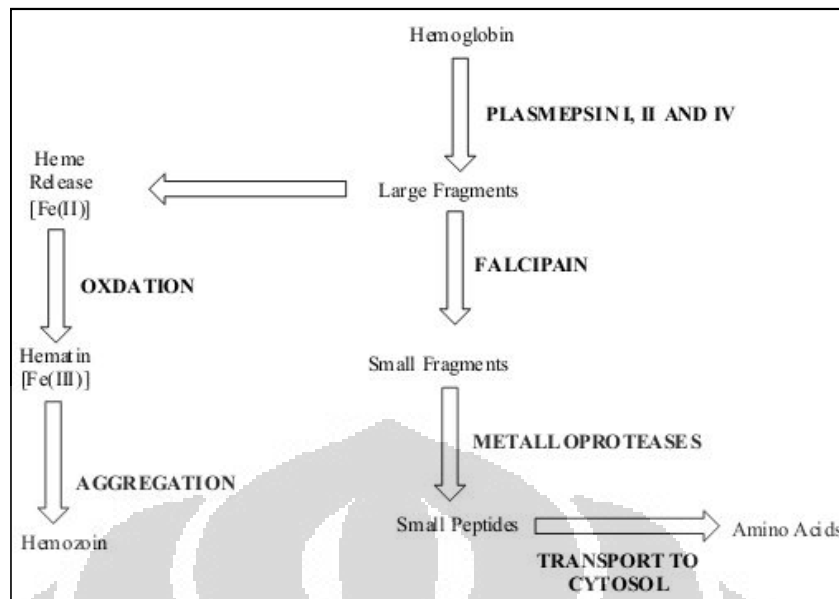


[Sumber: diunduh dari <http://www.dpd.cdc.gov>]

Gambar 2.1. Siklus hidup Plasmodium

2.2 Plasmepsin

Parasit *Plasmodium falciparum* membutuhkan sel darah merah dalam perkembangbiakannya dan bagian yang dibutuhkan adalah hemoglobin, karena berperan sebagai nutrisi bagi parasit tersebut. Hemoglobin dicerna oleh vakuola makanan bersuasana asam. Proses degradasi tersebut diperantarai oleh beberapa enzim sebagaimana yang dijelaskan dalam Gambar 2.2., di antaranya adalah aspartat protease (plasmepsin), sistein protease (falsipain), dan metalo protease (falsilisin) (Ersmark, *et al.*, 2005).



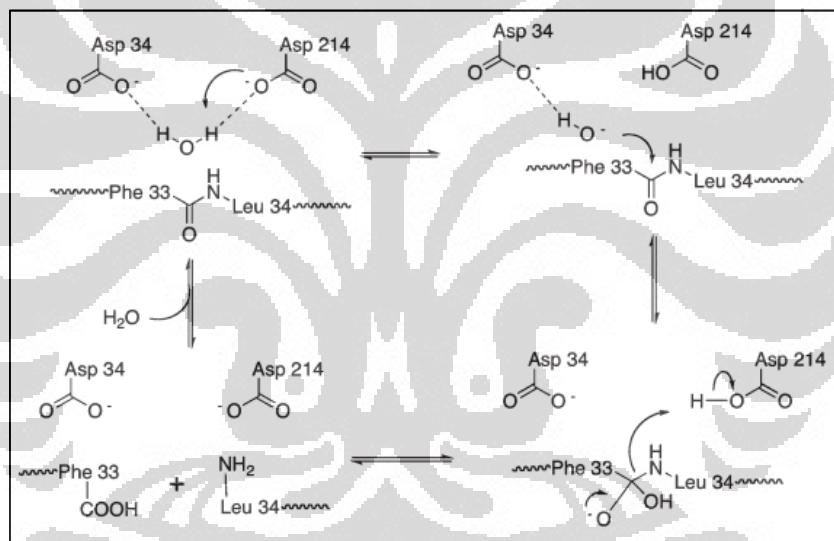
[Sumber: Boss, Richard-Bildstein, Weller, Fischli, Meyer, & Binkert, 2003]

Gambar 2.2. Jalur degradasi hemoglobin dalam vakuola makanan *Plasmodium falciparum*

Di antara ketiga jenis enzim tersebut, plasmepsin adalah enzim yang paling berperan dalam proses degradasi hemoglobin (Maurice, 2010). Plasmepsin terdiri dari 10 jenis enzim, yaitu plasmepsin I, plasmepsin II, plasmepsin IV, plasmepsin V, plasmepsin VI, plasmepsin VII, plasmepsin VIII, plasmepsin IX, plasmepsin X, dan *HAP (Histo-Aspartic Protease)* yang juga disebut dengan plasmepsin III. Plasmepsin I berperan dalam proses pemecahan tahap awal agar hemoglobin tidak rusak dan proses pemecahan selanjutnya dapat terjadi dengan cepat kemudian dilanjutkan oleh plasmepsin II (Silva, *et al.*, 1996). Jenis plasmepsin yang paling letal dan ganas adalah plasmepsin I sampai IV karena aktif dalam vakuola makanan selama fase intraeritrosit. Plasmepsin I dan II 73% identik satu sama lain, sedangkan kedua plasmepsin tersebut memiliki kemiripan sebesar 64% dengan plasmepsin IV dan 60% dengan *HAP* (Asojo, *et al.*, 2002).

Plasmepsin II adalah plasmepsin yang paling sering dipelajari (Friedman & Caflisch, 2007). Plasmepsin II menginisiasi degradasi hemoglobin melalui pemutusan rantai- α antara Phe33 dan Leu34. Hasil pemecahan ini kemudian

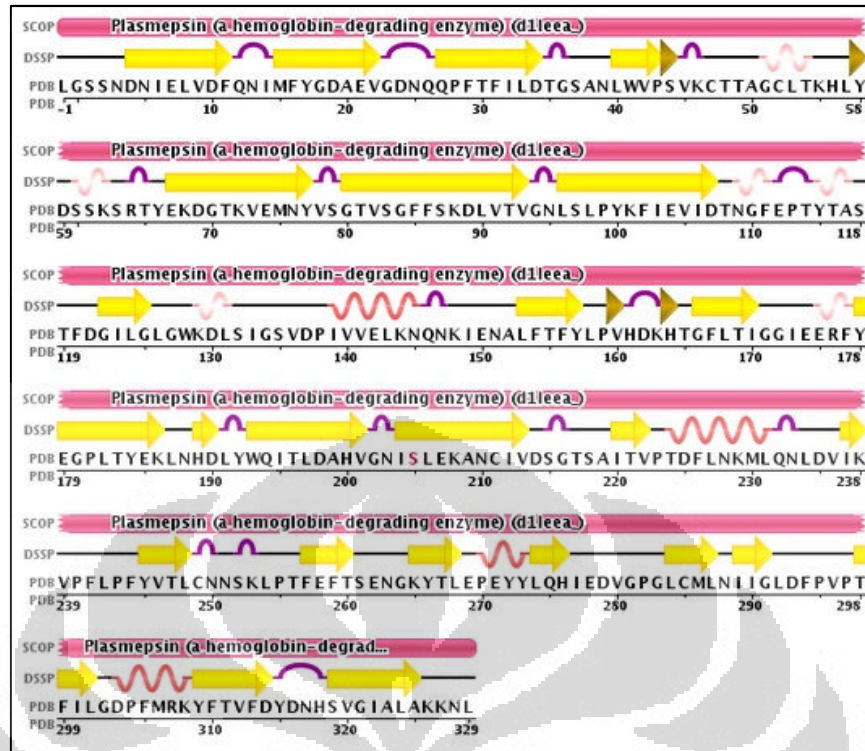
dikatalisasi lebih lanjut oleh sistein protease (falsipain), metallo protease (falsisilin), dan sitoplasmik aminopeptidase (Gupta, Yedidi, Varghese, Kovari, & Woster, 2010). Residu pengikatan yang bekerja pada plasmepsin II antara lain Val78 dan Ser79 sebagai residu penutup, Asp34 dan Asp214 sebagai residu katalitik, serta Gly36 dan Ser218 sebagai residu yang memiliki jarak yang dekat dengan residu katalitik (Asojo, *et al.*, 2002). Dalam penjelasan mekanisme kerja plasmepsin pada Gambar 2.3., residu Asp34 dan Asp214 mengarahkan molekul air dan proton dari residu Asp214 untuk memecahkan ikatan peptida Phe33 dan Leu34 pada rantai- α hemoglobin inang (Gupta, Yedidi, Varghese, Kovari, & Woster, 2010).



[Sumber: Gupta, Yedidi, Varghese, Kovari, & Woster, 2010]

Gambar 2.3. Mekanisme kerja plasmepsin

Proses degradasi hemoglobin melibatkan residu yang spesifik dari plasmepsin. Dengan mengetahui residu pada sekuens plasmepsin yang berperan dalam proses degradasi hemoglobin, proses pencarian inhibitor pun dapat lebih terfokus pada pencarian senyawa yang dapat menghambat kinerja residu tersebut. Sekuens plasmepsin terdapat pada Gambar 2.4.



[Sumber: diunduh dari <http://rcsb.org>]

Gambar 2.4. Sekuens plasmepsin II (PDB ID: 1LEE)

2.3 Enzim

Enzim adalah protein yang dapat meningkatkan laju reaksi kimia, baik dengan pembuatan maupun pemecahan ikatan kovalen, di mana ligannya dinamakan substrat. Walaupun tidak semua protein adalah enzim, namun enzim merupakan kelas yang cukup besar dan penting dalam protein karena hampir setiap reaksi kimia pada sel dikatalisasi oleh enzim yang spesifik (Lodish, *et al.*, 2008).

Ribuan jenis enzim telah teridentifikasi. Enzim tertentu ditemukan pada sel kebanyakan karena perannya mengkatalisasi sintesis produk sel yang umum, seperti protein, asam nukleat, dan fosfolipid, atau berperan dalam pembentukan energi seperti proses fotosintesis. Enzim lainnya hanya ada di sel tertentu karena perannya dalam mengkatalisasi reaksi kimia yang khas pada sel tersebut, misalnya enzim pada sel saraf mengubah tirosin menjadi dopamin yang merupakan

neurotransmitter. Walaupun sebagian enzim berlokasi di dalam sel, beberapa lainnya disekresikan dan berfungsi di luar sel, seperti darah, saluran pencernaan, atau bahkan di luar organisme, seperti enzim beracun pada bisa ular (Lodish, *et al.*, 2008).

Asam amino tertentu pada enzim bersifat penting dalam spesifisitas dan kekuatan katalitik. Dalam konformasi enzim, bagian ini dinamakan sisi aktif. Sisi aktif terdiri dari dua bagian yaitu sisi pengikatan substrat yang mengenali dan mengikat substrat dan sisi katalitik yang gugus katalitiknya memperantarai reaksi kimia ketika substrat telah terikat. Pada beberapa enzim, letak dua sisi ini saling tumpang tindih, namun pada beberapa lainnya berbeda sebagaimana fungsinya (Lodish, *et al.*, 2008).

Sebagai katalis, enzim meningkatkan kecepatan reaksi namun tidak mempengaruhi jumlah hasil reaksi, yang ditentukan oleh perubahan energi bebas ΔG antara reaktan dan produk, dan enzim itu sendiri tidak berubah sebagai konsekuensi reaksi yang dikatalisasi. Enzim meningkatkan reaksi dengan menurunkan energi keadaan transisi dan dengan sendirinya energi aktivasi (Lodish, *et al.*, 2008).

Kebanyakan enzim memiliki akhiran “-ase” yang ditambahkan pada substrat reaksi, misalnya glukosidase, urease, dan sukrase, atau pada deskripsi reaksi seperti laktat dehidrogenase dan adenilil siklase. Beberapa enzim juga memiliki nama yang khas, tidak mengikuti kaidah umum manapun, contohnya tripsin dan pepsin (Champe & Harvey, 2007).

Enzim diklasifikasikan berdasarkan fungsinya menjadi 6 kelas utama menurut *EC (Enzyme Commission)*, diiringi dengan 4 digit nomor dari 1-3, contohnya *EC 1.1.1.1*. Fungsi yang dimaksud di sini berkaitan erat dengan tipe reaksi yang dikatalisasi oleh enzim tersebut. Enam kelas utama tersebut diwakili dengan digit pertama dari kode di atas, antara lain oksidoreduktase (transfer hidrida), transferase (transfer gugus selain hidrogen), hidrolase (substrat dipecah oleh air), liase (enzim pemecah nonhidrolitik melepaskan atau menambahkan gugus pada ikatan rangkap), isomerase (mengkatalisis perubahan struktural atau

geometris dalam satu molekul), dan ligase (menggabungkan dua gugus, diiringi dengan pemecahan ATP atau trifosfatase serupa). Digit kedua merujuk kepada subkelas, digit ketiga mewakili sub dari subkelas, sedangkan digit keempat adalah nomor urutan enzim pada sub dari subkelas tersebut (Smith & Simons, 2005).

Katalisis enzim sangatlah penting bagi kehidupan. Oleh karenanya inhibisi pada organisme penginfeksi seperti virus, bakteri, maupun parasit menarik perhatian bagi keterlibatan kemoterapeutik pada penyakit. Strategi ini diwakili oleh pengobatan modern dengan pengembangan obat antivirus, antibiotik, dan antiparasit pada penggunaan klinis melalui penghambatan enzim tertentu (Copeland, 2005).

Senyawa apa pun yang dapat mengurangi kecepatan dari reaksi yang dikatalisis enzim dinamakan inhibitor. Inhibitor ireversibel berikatan dengan enzim melalui ikatan kovalen sementara inhibitor reversibel berikatan melalui ikatan non kovalen. Dua jenis penghambatan reversibel yang paling umum adalah jenis kompetitif dan nonkompetitif. Inhibisi kompetitif terjadi ketika inhibitor berikatan dengan sisi yang sama di mana substrat biasanya berada dan oleh karenanya berkompetisi dengan substrat di sisi tersebut sedangkan inhibisi non kompetitif terjadi ketika inhibitor dan substrat berikatan pada sisi enzim yang berbeda. Inhibitor nonkompetitif dapat berikatan dengan enzim bebas maupun kompleks enzim-substrat, yang oleh karenanya mencegah reaksi terjadi (Champe & Harvey, 2007).

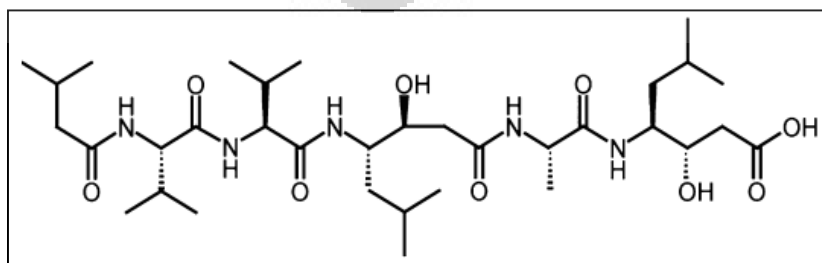
2.4 Inhibitor Plasmepsin

Alkohol sekunder dijadikan pilihan elemen struktural untuk menghambat protease aspartat seperti plasmepsin. Unsur seperti ini menyerupai intermediat tetrahedral selama pemutusan peptida oleh protease aspartat. Prinsip ini kemudian sukses digunakan untuk mengembangkan inhibitor potensial untuk enzim-enzim ini, contohnya norstatin dan hidroksietilpiperazin (Cunico, *et al.*, 2009). Prinsip yang serupa juga dimiliki oleh 1,2-dihidroksietilen dan diasilhidrazin (Ersmark, *et al.*, 2005).

Selain zat-zat di atas, halofantrin juga termasuk zat potensial untuk menghambat kinerja plasmepsin. Halofantrin merupakan skizontosid darah kerja cepat (*Rapidly-acting blood schizontocides*). Metabolitnya yaitu desbutil halofantrin bersifat aktif dan potensinya setara dengan halofantrin. Halofantrin ditemukan sejak empat dekade yang lalu dan mulai dipasarkan sejak 1988. Zat ini diperkirakan bereaksi dengan hematin, metabolit dari degradasi hemoglobin, yang bersifat toksik terhadap plasmodium (Friedman & Caflisch, 2009).

Berbeda dengan halofantrin, beberapa antimalaria seperti 4-aminokuinolin dan 8-aminokuinolin berperan terhadap proses pembentukan hemozoin. Hemozoin adalah senyawa non toksik yang diturunkan dari heme, hasil pemecahan hemoglobin. Maka dengan dihambatnya kinerja plasmepsin, obat-obat tersebut dapat mengurangi penyakit karena jalur hemozoin menjadi terhambat (Maurice, 2010).

Senyawa lain yang dapat menjadi inhibitor plasmepsin di antaranya pepstatin (Gambar 2.5). Pepstatin biasa dikombinasikan dengan inhibitor falsipain (Bjelic, Nervall, Gutierrez-de-Teran, Ersmark, Hallberg, & Aqvist, 2007). Sebagaimana inhibitor aspartil protease yang lain, pepstatin mengandung gugus hidroksil yang berhubungan dengan sisi katalitik yang menyerupai ikatan peptida yang tidak dapat dihidrolisis. Pepstatin berhubungan dengan Asp34 dan Asp214 pada sisi aktif plasmepsin. Oleh karena itu, pepstatin berperan sebagai senyawa penuntun dalam rancangan beragam inhibitor aspartil protease yang lain (Silva, *et al.*, 1996).



[Sumber: Bjelic, Nervall, Gutierrez-de-Teran, Ersmark, Hallberg, & Aqvist, 2007]

Gambar 2.5. Rumus bangun pepstatin

Universitas Indonesia

2.5 Asam Amino dan Protein

Asam amino adalah struktur penyusun polimer protein. Asam amino merupakan senyawa yang memiliki atom hidrogen, gugus karboksil, dan gugus amino yang terikat pada atom karbon yang sama (karbon- α). Selain tiga gugus tersebut, terdapat juga gugus R yang merupakan rantai samping yang akan membedakan tiap asam amino dalam hal struktur, ukuran, dan muatan listrik. Terdapat 20 jenis asam amino umum yang menyusun protein (Gambar 2.6). Asam amino yang pertama kali ditemukan adalah asparagin pada tahun 1806, sedangkan asam amino yang terakhir kali ditemukan adalah treonin, yang belum teridentifikasi hingga 1938 (Nelson & Cox, 2008).

Dengan menghubungkan gugus karboksil- α dari satu asam amino dengan gugus amino- α dari asam amino yang lain, kita dapat membentuk polimer linier bernama protein. Hubungan yang dimaksud adalah ikatan peptida atau ikatan amida. Pembentukan dipeptida dari dua asam amino diiringi dengan penghilangan molekul air (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2007).

Protein dapat diklasifikasikan berdasarkan kelarutan, bentuk, fungsi biologis, atau struktur tiga dimensinya. Berdasarkan fungsi biologis tersebut, protein dapat diklasifikasikan sebagai enzim (dehidrogenase, kinase), protein penyimpanan (ferritin, 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).

2.5.1 Struktur Protein

Untuk makromolekul besar seperti protein, penjelasan dan pengertian struktur didapatkan pada beberapa level kompleksitas, bergantung pada tingkatan konseptual. Struktur protein yang umum dijelaskan memiliki empat level, yaitu struktur primer, struktur sekunder, struktur tersier, dan struktur kuartener (Gambar

2.7a). Struktur primer menjelaskan tentang ikatan kovalen (terutama ikatan peptida dan ikatan disulfida) yang menghubungkan residu asam amino pada rantai polipeptida. Unsur terpenting pada struktur primer adalah sekuens dari residu asam amino. Struktur sekunder merujuk pada susunan yang stabil secara partikuler dari residu asam amino yang memberikan pola struktural berulang. Struktur tersier menjelaskan tentang semua aspek pelipatan tiga dimensi dari polipeptida. Ketika protein memiliki dua atau lebih subunit polipeptida, susunan tersebut dinamakan struktur kuaterner (Nelson & Cox, 2008).

2.5.1.1 Struktur Primer

Secara sederhana, struktur primer adalah sekuens asam amino pada rantai polipeptida. Pada protein, asam amino dihubungkan secara kovalen melalui ikatan peptida yang merupakan hubungan amida antara gugus karboksil- α dari satu asam amino dan gugus amino- α dari asam amino yang lain. Sebagai contoh, valin dan alanin dapat membentuk dipeptida valilalanin melalui pembentukan ikatan peptida. Berdasarkan kesepakatan, gugus amin bebas dari rantai peptida (terminal N) ditulis di sebelah kiri sedangkan gugus karboksil bebas (terminal C) di sebelah kanan. Oleh karena itu, semua sekuens asam amino dibaca dari terminal N ke terminal C. Setiap komponen asam amino pada polipeptida disebut “residu” karena merupakan bagian asam amino yang tertinggal setelah hilangnya molekul air pada pembentukan ikatan peptida. Dalam penamaan polipeptida, semua akhiran residu asam amino diubah menjadi “-il”, dengan pengecualian asam amino pada terminal C. Sebagai contoh, tripeptida yang tersusun dari valin terminal N, glisin, dan leusin terminal C dinamakan valilglisilleusin (Champe & Harvey, 2007).

2.5.1.2 Struktur Sekunder

Istilah struktur sekunder merujuk pada segmen rantai polipeptida yang menggambarkan susunan lokal atom rantai utamanya, tanpa memperhatikan

konformasi rantai sampingnya atau hubungannya dengan segmen lain. Ada beberapa tipe struktur sekunder yang stabil secara partikuler dan terdapat secara luas pada protein, yang paling utama adalah heliks- α dan konformasi- β (Nelson & Cox, 2008).

Heliks- α adalah konformasi menggulung yang menyerupai tangga berputar spiral dengan rentangan berturut-turut dari asam amino di mana tulang punggung (*backbone*) gugus $-N-H$ dari setiap residu n mendonasikan sebuah ikatan hidrogen pada gugus $C=O$ dari setiap residu $n+4$ (Petsko & Ringe, 2003). Heliks- α memiliki sudut phi serta psi yang menguntungkan dan pola pengikatan hidrogen yang memberikan stabilitas maksimal. Heliks- α protein mengandung antara 4 hingga 50 residu (rata-rata sekitar 12 residu). Parameter yang relevan untuk sebuah heliks- α adalah $n=3,6$ residu per puntiran dan $p=0,54$ nm ($5,4 \text{ \AA}$) (Gambar 2.7b). Jarak sepanjang sumbu heliks yang memisahkan atom-atom rantai utama yang sama dari residu-residu berdekatan adalah $0,15$ nm ($1,5 \text{ \AA}$). Gugus R aminoasil mengarah ke luar dari sumbu heliks, meminimalkan gangguan sterik mutual (Murray, Granner, Mayes, & Rodwell, 2003).

Berbeda dengan heliks- α , pada konformasi- β , tulang punggung rantai polipeptida diulurkan menjadi berliku-berliku atau *zigzag*. Rantai polipeptida *zigzag* dapat disusun sisi demi sisi untuk membentuk struktur yang menyerupai rangkaian lipatan dengan ikatan hidrogen yang terjadi antara segmen yang berhadapan dari rantai polipeptida (Nelson & Cox, 2008). Konformasi- β , yang kemudian lebih sering disebut lembaran- β , dapat dibentuk oleh dua atau lebih rantai polipeptida terpisah atau segmen rantai polipeptida yang disusun baik secara antiparalel (dengan terminal N dan terminal C saling berlawanan terhadap rantai yang berdekatan) maupun paralel (dengan masing-masing terminal berada pada arah yang sama) (Gambar 2.7c) (Champe & Harvey, 2007).

2.5.1.3 Struktur Tersier

Pada protein yang terlipat, unsur dari struktur sekunder terlipat menjadi obyek yang tersusun rapat dan hampir padat yang distabilkan oleh interaksi lemah

yang melibatkan baik gugus polar maupun nonpolar. Bentuk terlipat padat yang dihasilkan dinamakan struktur tersier dari protein (Petsko & Ringe, 2003).

Struktur tiga dimensi yang khas dari tiap polipeptida ditentukan oleh sekuens asam aminonya. Interaksi antara rantai samping asam amino mengarahkan pelipatan polipeptida agar membentuk struktur yang rapat. Interaksi yang menstabilkan struktur tersier dari protein di antaranya ikatan disulfida, interaksi hidrofobik, ikatan hidrogen, dan interaksi ionik (Champe & Harvey, 2007).

Ikatan disulfida adalah hubungan kovalen yang dibentuk dari gugus sulfidril (-SH) dari masing-masing dari dua residu protein sistein untuk membentuk satu residu sistein. Ikatan disulfida berperan terhadap kestabilan bentuk tiga dimensi molekul protein dan mencegahnya terdenaturasi di lingkungan eksternal (Champe & Harvey, 2007).

Asam amino dengan rantai sisi non polar cenderung berada di bagian dalam dari molekul polipeptida, di mana mereka berhubungan dengan asam amino hidrofobik lainnya. Sebagai perbandingan, asam amino dengan rantai sisi polar atau bermuatan cenderung berada pada permukaan molekul, melakukan kontak dengan pelarut polar (Champe & Harvey, 2007).

Rantai samping asam amino yang mengandung hidrogen yang terikat oksigen atau nitrogen dapat membentuk ikatan hidrogen dengan atom kaya elektron. Pembentukan ikatan hidrogen antara gugus polar pada permukaan protein dan pelarut cair meningkatkan kelarutan protein (Champe & Harvey, 2007).

Selain ketiga interaksi di atas, kestabilan struktur tersier dapat juga tercapai dengan adanya interaksi ionik. Interaksi ionik dapat terjadi antara gugus bermuatan negatif, seperti gugus karboksil pada rantai samping aspartat atau glutamat, dengan gugus bermuatan positif seperti gugus amino pada rantai samping lisin (Champe & Harvey, 2007).

2.5.1.4 Struktur Kuartener

Struktur kuartener merujuk kepada susunan ruang dari subunit dan sifat interaksi di antara subunit tersebut. Subunit adalah istilah bagi tiap rantai polipeptida pada protein yang dimaksud. Jenis paling sederhana dari struktur kuartener adalah dimer, yang terdiri dari dua subunit identik (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2007). Gabungan protein yang terdiri lebih dari satu rantai polipeptida ini dinamakan oligomer dan rantai tunggal yang menyusunnya dinamakan monomer atau subunit. Oligomer yang terdiri dari dua, tiga, empat, lima, enam, bahkan lebih dinamakan dimer, trimer, tetramer, pentamer, heksamer, dan seterusnya (Gambar 2.7d). Beberapa oligomer hanya mengandung satu jenis monomer, dan memiliki awalan “homo-“, misalnya homotrimer. Sementara oligomer lainnya memiliki lebih dari satu jenis monomer, dan diawali dengan “hetero-“, misalnya heterotrimer (Petsko & Ringe, 2003).

2.5.2 Interaksi Protein dengan Ligan

2.5.2.1 Ikatan Hidrogen

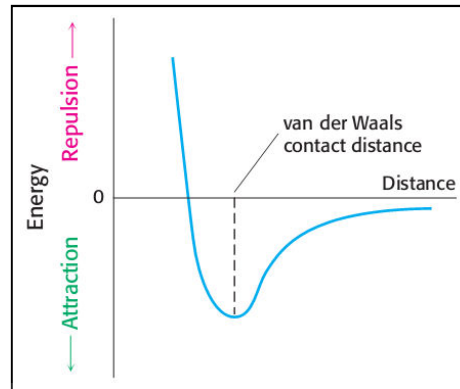
Ikatan hidrogen adalah interaksi antara atom hidrogen bermuatan positif parsial dalam dipol molekuler dengan elektron tidak berpasangan dari atom lain, baik pada molekul yang sama maupun molekul yang lain. Secara normal, atom hidrogen membentuk ikatan hidrogen hanya dengan satu atom lainnya, namun atom hidrogen yang terikat secara kovalen dengan atom donor elektronegatif dapat berinteraksi membentuk ikatan hidrogen dengan atom akseptor. Ikatan hidrogen yang terkuat memiliki susunan atom donor, atom hidrogen, dan atom akseptor pada garis lurus (Lodish, *et al.*, 2008). Atom yang mengikat atom hidrogen dinamakan atom donor, pasangannya adalah atom akseptor. Jika salah satu atau kedua atom pada ikatan hidrogen bermuatan penuh, maka interaksi keduanya akan lebih kuat. Jika keduanya bermuatan penuh, energi ikatan di antaranya sangat tinggi dan pasangan ion ikatan hidrogen tersebut dinamakan jembatan garam (Petsko & Ringe, 2003).

Ikatan hidrogen lebih panjang dan lebih lemah dari ikatan kovalen pada atom-atom yang sama. Contohnya pada air, jarak ikatan hidrogen sekitar 0,27 nm, sekitar dua kali panjang ikatan kovalen. Kekuatan ikatan hidrogen antara molekul air (+ 5 kkal/mol) jauh lebih lemah daripada ikatan kovalen O-H (+110 kkal/mol) (Lodish, *et al.*, 2008).

2.5.2.2 Ikatan van der Waals

Ketika dua atom tidak bermuatan didekatkan, awan elektron di sekelilingnya mempengaruhi satu sama lain. Variasi acak pada posisi elektron sekitar inti dapat menyebabkan dipol listrik sementara, yang dapat menginduksi dipol listrik sementara yang berlawanan pada atom di dekatnya. Dua dipol berinteraksi secara lemah satu sama lain, sehingga mendekatkan kedua inti. Ketika kedua inti semakin mendekat, awan elektron justru saling tolak-menolak. Gaya tarik-menarik yang lemah ini dinamakan interaksi van der Waals (juga dikenal dengan gaya London) (Nelson & Cox, 2008).

Energi ikatan van der Waals terbilang kecil, yaitu sekitar 2-4 kJ/mol per pasang atom (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2007). Interaksi van der Waals berkurang ketika jarak antar atom menjauh, maka hanya atom yang saling berdekatan (hanya terpisah 5 Å atau kurang) yang memungkinkan terjadinya interaksi ini (Gambar 2.8). Interaksi van der Waals yang ada pun biasanya lemah, namun jumlahnya yang banyak pada protein memberikan peran yang cukup besar (Petsko & Ringe, 2003).



[Sumber: Berg, Tymoczko, & Stryer, 2007]

Gambar 2.8. Hubungan antara energi interaksi van der Waals dengan jarak antar atom

2.5.2.3 Interaksi Hidrofobik

Hidrokarbon adalah molekul yang terdiri atas karbon dan hidrogen dan tidak larut dalam air. Ikatan kovalen antara dua atom karbon dan antara atom karbon dan atom hidrogen adalah ikatan nonpolar yang paling umum dalam sistem biologis. Molekul nonpolar tidak mengandung gugus bermuatan, momen dipol, atau terhidrasi, sehingga tidak larut atau hampir tidak larut dalam air. Karenanya, mereka disebut hidrofobik (Lodish, *et al.*, 2008). Interaksi hidrofobik merujuk pada kecenderungan senyawa nonpolar untuk bergabung satu sama lain dalam lingkungan encer (Murray, Granner, Mayes, & Rodwell, 2003).

Molekul nonpolar juga dapat bergabung melalui interaksi van der Waals walaupun lemah. Gabungan antara interaksi hidrofobik dan van der Waals membuat molekul hidrofobik cenderung berinteraksi dengan satu sama lainnya, bukan dengan air. Sederhananya, sesuai kaidah *like dissolves like*, molekul polar terlarut dalam pelarut polar seperti air, sementara molekul nonpolar terlarut dalam pelarut nonpolar seperti heksan (Lodish, *et al.*, 2008).

2.6 Bioinformatika

Secara sederhana, bioinformatika adalah aplikasi teknologi komputer yang digunakan untuk memecahkan permasalahan biologis. Bioinformatika digunakan sebagai pengelola data interaksi protein-protein dan struktur tiga dimensinya, ekspresi gen, *cell imaging*, dan lain-lain. Dalam pelaksanaannya, bioinformatika membutuhkan beberapa perangkat seperti bahasa pemrograman dan juga sistem operasi yang dapat mendukung bidang ilmu ini (Abraham, 2003).

Ada beberapa metode pemodelan komputer dari bioinformatika yang digunakan dalam proses penemuan obat di antaranya mekanika molekuler, dinamika molekuler, mekanika kuantum, dan penambatan molekuler. Mekanika molekuler merupakan metode dalam menganalisa energi pada sebuah atom yang diasumsikan diam sehingga mengurangi waktu komputansi dan lebih mudah digunakan. Dinamika molekuler menggunakan pendekatan sebaliknya, metode ini memungkinkan penghitungan energi dengan asumsi atom dalam keadaan bergerak dinamis. Mekanika kuantum menggunakan pendekatan fisika kuantum dalam menghitung energi. Sementara penambatan molekuler merupakan metode yang menerapkan simulasi grafis tiga dimensi yang mengamati interaksi antara ligan dan reseptor (Thomas, 2003).

2.7 Penambatan Molekuler

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

Penambatan molekuler digunakan untuk memprediksi struktur kompleks intermolekuler yang terbentuk antara dua atau lebih molekul. Kasus paling menarik adalah interaksi ligan dan protein karena penerapannya pada bidang kedokteran. Ligan adalah molekul kecil yang berinteraksi dengan lokasi ikatan protein. Lokasi ikatan adalah daerah protein yang diketahui aktif dalam pembentukan senyawa. Ada beberapa konformasi mutual yang memungkinkan di mana ikatan dapat terjadi. Hal tersebut dinamakan model ikatan.

Dalam penambatan molekuler, dua unsur utama yang berperan adalah molekul obat sebagai ligan dan protein sebagai reseptor. Dua unsur ini akan diikat secara *in silico* dengan beberapa perangkat lunak tertentu. Hasil dari penambatan ini adalah sebuah model yang akan dijadikan desain dalam pembuatan obat baru. Metode *in silico* memiliki daya tarik tersendiri dibandingkan dengan metode yang hanya menggunakan percobaan di laboratorium atau makhluk hidup saja. Walaupun hasil dari penambatan molekuler tetap harus dikonfirmasi dahulu melalui eksperimen di laboratorium, namun dengannya dapat diperkirakan senyawa yang berinteraksi dan menekan fungsi suatu reseptor secara lebih cepat sehingga lebih efisien dari segi waktu maupun finansial.

Dalam penambatan molekuler, ada dua prosedur yang terlibat. Prosedur yang pertama adalah algoritma penambatan yang akan menciptakan konfigurasi optimum, dimana selanjutnya konfigurasi ini akan dinilai menggunakan *scoring function* atau fungsi penilaian (Tiikkainen, 2010).

Beberapa algoritma penambatan yang umum digunakan antara lain dinamika molekuler, metode Monte Carlo, algoritma genetika, *Fragment-based methods*, *point complementary methods*, *distance geometry methods*, *tabu searches*, dan *systematic searches*. Dua pendekatan yang paling populer adalah metode Monte Carlo dan algoritma genetika (Kitchen, Decornez, Furr, & Bajorath, 2004).

Setelah melalui beberapa metode algoritma penambatan seperti yang dijelaskan di atas, proses penambatan molekuler dilanjutkan dengan fungsi penilaian untuk memperkirakan energi bebas dari ligan dalam model ikatannya.

Fungsi penilaian dikelompokkan menjadi beberapa bagian yaitu berdasarkan empiris, berdasarkan *force field*, dan berdasarkan pengetahuan (*knowledge-based*) (Tiikkainen, 2010). Proses penambatan molekuler menyangkut prediksi konformasi ligan dan orientasi (penentuan posisi) dengan sisi penambatan yang ditargetkan. Aspek teoritis mengenai penambatan molekuler dilakukan 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. Perubahan energi ini dipengaruhi oleh perubahan entalpi (ΔH) dan perubahan entropi (ΔS). Energi bebas ikatan digambarkan melalui persamaan Gibbs:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2.1)$$

Setelah dilakukan fungsi penilaian, selanjutnya dilihat energi ikatan masing-masing konformasi di mana energi terendah menunjukkan ikatan dari konformasi yang paling stabil dan optimum untuk perancangan obat.

2.8 Penapisan *In Silico*

Sintesis tradisional sejumlah senyawa baru menggunakan cara konvensional memakan waktu dan biaya yang besar. Di sisi lain, penapisan secara *in silico* memberi alternatif baru. Penapisan secara *in silico* jauh lebih efektif daripada penapisan *in vitro* atau *in vivo*. Penapisan *in silico* dalam kaitannya dengan penyakit dilakukan untuk menemukan inhibitor potensial (Jenwitheesuk, Horst, Rivas, Voorhis, & Samudrala, 2008). Kelebihan dari penapisan *in silico* adalah kemampuannya untuk membedakan senyawa aktif dan inaktif sehingga hal ini dapat menghemat waktu dan sumber daya lainnya (Kirchmair, Markt, Distinto, Wolber, & Langer, 2008). Penapisan *in silico* melibatkan sejumlah besar data molekul, dan mengurutkannya dari yang terbaik hingga yang terburuk, bahkan ada

beberapa di antaranya yang tidak bisa berikatan dengan reseptor sehingga tidak bisa dilibatkan dalam percobaan selanjutnya (Irwin, 2008).

Teknik penapisan *in silico* dapat digolongkan berdasarkan pemodelan khusus dari pengenalan molekuler dan jenis algoritma yang digunakan dalam pencarian basis data. Jika struktur tiga dimensi dari target diketahui (atau setidaknya sisi aktif dari target diketahui), maka kita dapat melakukan penapisan *in silico* berbasis struktur. Metode ini berdasarkan pada prinsip saling melengkapi, yaitu reseptor dari senyawa yang aktif secara biologis melengkapi senyawa itu sendiri layaknya model gembok dan kunci. Sebaliknya, jika ligan diketahui struktur dan aktivitasnya, maka kita dapat melakukan penapisan *in silico* berbasis ligan dengan prinsip kemiripan, di mana senyawa yang serupa diasumsikan memiliki efek yang juga serupa (Marrero-Ponce, *et al.*, 2005).

Penapisan *in silico* berbasis struktur adalah sarana yang berguna untuk mengidentifikasi senyawa penuntun ketika struktur tiga dimensi dari target telah ditentukan (Wang & Wang, 2001). Hal ini berguna untuk mempersempit pustaka kimia yang perlu diselidiki sehingga fokus para peneliti dapat diarahkan pada senyawa hasil penapisan *in silico*. Oleh karena itu, tidak perlu diragukan bahwa metode ini akan sangat berguna dalam proses penemuan obat baru di masa depan. Beberapa program yang digunakan untuk penapisan *in silico* antara lain *DOCK*, *FlexX*, *GOLD*, *ICM*, *GLIDE*, *SLIDE*, *LigandFit*, *FRED*, dan *Surflex* (Park, Lee, & Lee, 2006).

Dalam praktiknya, penapisan *in silico* melibatkan metode penambatan molekuler sehingga metode ini pun turut dikembangkan (Kang, Li, Jiang, & Wang, 2008). Target yang ingin dicapai dari dilakukannya penapisan *in silico* adalah ditentukannya ligan yang memiliki prospek terbaik untuk dijadikan obat baru sehingga hal yang disoroti adalah afinitas ikatan ligan dengan reseptor. Hal yang juga penting dalam proses penapisan *in silico* adalah fungsi penilaian. Fungsi penilaian dalam proses penambatan molekuler digunakan untuk dua tujuan. Pada proses penambatan, fungsi ini digunakan untuk mendeteksi konformasi ikatan yang benar di antara yang salah, sedangkan setelah penambatan digunakan untuk memperkirakan afinitas ikatan dari molekul calon. Karena proses

penapisan *in silico* melibatkan ratusan bahkan ribuan molekul, maka fungsi penilaian harus dilakukan dengan cepat. Pada masa sekarang, fungsi penilaian dapat dilakukan dengan *empirical scoring functions*, *force-field-based scoring functions*, atau *knowledge-based scoring functions* (Holtje, Sippl, Rognan, & Folkers, 2008).

Empirical scoring functions menggunakan beberapa istilah yang menggambarkan karakteristik yang diketahui penting dalam ikatan obat. Beberapa istilah tersebut secara umum menjelaskan tentang interaksi polar seperti ikatan hidrogen dan interaksi ionik, interaksi non polar seperti interaksi lipofilik dan aromatik, entropi, dan efek desolvasi. Fungsi penilaian jenis kedua yaitu *force-field-based scoring functions* berdasarkan pada istilah medan gaya mekanika molekuler di mana terdapat potensial Lennard-Jones yang menggambarkan interaksi van der Waals dan energi Coulomb yang menggambarkan komponen elektrostatik dari interaksi yang ada. Sementara itu, *knowledge-based scoring functions* berkaitan erat dengan potensial gaya rata-rata yang menyandikan informasi struktural yang diperoleh dari koordinat sinar-x antara protein dan ligan ke dalam energi interaksi bebas Helmholtz dari pasangan atom protein-ligan (Holtje, Sippl, Rognan, & Folkers, 2008).

Salah satu contoh proyek penapisan *in silico* yang sedang dikembangkan saat ini adalah *WISDOM (Wide In Silico Docking of Malaria) Project*. *WISDOM* adalah usaha internasional untuk melaksanakan penapisan *in silico* dalam infrastruktur jaringan. Percobaan pertamanya adalah menyebarkan penambatan *in silico* skala besar pada infrastruktur jaringan publik. Percobaan penambatan skala besar yang pertama dijalankan pada layanan produksi jaringan *EGEE* sejak 11 Juli 2005 hingga 19 Agustus 2005 terhadap target yang sesuai dalam penelitian terhadap malaria dengan jumlah lebih dari 41 juta senyawa yang ditambatkan yang sebanding dengan 80 tahun lama kerja *CPU*. Hingga 1.700 komputer digunakan secara bersamaan di 15 negara dari seluruh dunia untuk melakukan proyek ini (Jacq, N., *et al.*, 2008).

2.9 Basis Data Tanaman Obat Indonesia

Basis Data Tanaman Obat Indonesia adalah basis data struktur tiga dimensi senyawa kimia dari tanaman obat di Indonesia yang disusun berdasarkan data dari *Materia Medica Indonesia* jilid I sampai VI yang terdiri dari 3.825 spesies dengan input struktur tiga dimensi sebanyak 1450 senyawa dengan format .mol. Selain berisi struktur tiga dimensi senyawa kimia dari tanaman obat, basis data ini juga memuat nama latin, sinonim, famili, nama daerah, tempat penyebaran, serta struktur dua dimensi senyawa kimia dari tanaman obat tersebut. Alamat situs dari Basis Data Tanaman Obat Indonesia adalah <http://herbaldb.farmasi.ui.ac.id> (Yanuar, Mun'im, Lagho, Syahdi, Rahmat, & Suhartanto, 2011).

2.10 Protein Data Bank

Protein Data Bank adalah situs yang menyimpan data struktural dari makromolekul biologis. Situs ini dibuat di *Brookhaven National Laboratories (BNL)* pada tahun 1971 untuk menyimpan struktur kristal makromolekul biologis. Pada awal pendirian, situs ini hanya menyimpan tujuh struktur, dan mulai meningkat dalam segi jumlah sejak tahun 1980-an karena adanya perbaikan teknologi pada bidang proses kristalografi, penambahan struktur yang ditetapkan melalui metode *NMR (Nuclear Magnetic Resonance)*, dan perubahan pandangan masyarakat mengenai *data sharing*. Pada tahun 1998, manajemen situs ini diberikan kepada *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB)*. *Protein Data bank* dapat diakses pada situs <http://rcsb.org> (Berman, *et al.*, 2000).

2.11 PubChem Compound

PubChem Compound adalah salah satu basis data yang terdapat dalam situs *Pubchem*, selain *PubChem Substance* dan *PubChem BioAssay*. *PubChem Compound* menyimpan kandungan struktur kimia yang khas dari *PubChem Substance*. Senyawa tersebut dapat dicari dengan sifat kimia terukur dan

Universitas Indonesia

digolongkan berdasarkan perbandingan struktur ke dalam kelompok yang memiliki kemiripan dan kesamaan identitas. Senyawa tersebut dihubungkan melalui *PubChem Substance* untuk mendapatkan informasi aktivitas biologisnya. Situs *PubChem Compound* adalah <http://ncbi.nlm.nih.gov/pccompound> (Bolton, Wang, Thiessen, & Bryant, 2008).

2.12 Perangkat Lunak yang Digunakan dalam Bioinformatika

2.12.1 GOLD

GOLD (*Genetic Optimization for Ligand Docking*) adalah sebuah perangkat lunak untuk menambatkan ligan yang fleksibel terhadap tempat ikatan protein. Program ini diciptakan oleh Jones di Universitas Sheffield, Inggris dan diluncurkan pada tahun 1998. Semenjak kemunculannya, program ini dikembangkan oleh *Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC)*, begitu pula oleh *Astex Technology, Ltd.* dan *Glaxo Smith Kline PLC* (*GOLD-Protein Ligand Docking, 2010*).

GOLD menggunakan *genetic algorithm (GA)* untuk mencari penambatan ligan terbaik. Populasi kromosom dimainkan selama setiap *GA run*, tiap kromosom mewakili penambatan yang dicoba. Kromosom mengandung semua informasi yang dibutuhkan untuk menggambarkan secara lengkap pose ligan yang dicoba dan dihubungkan dengan nilai kecocokan, dihitung berdasarkan fungsi penilaian yang digunakan (Alvarez & Shoichet, 2005).

GOLD memiliki dua fungsi penilaian, yaitu *GOLDScore* dan *ChemScore* (*GOLD Support-Scientific FAQs, 2010*). *GOLDScore* menggambarkan tiga istilah yaitu energi ikatan hidrogen antara protein dan ligan, energi van der Waals antara protein dan ligan, dan energi ketegangan internal ligan. Istilah keempat yaitu energi ikatan hidrogen antar molekul ligan dapat juga ditambahkan. Semua istilah tersebut dihitung dari ekspresi mekanika molekuler menggunakan medan gaya semua atom. *GOLDScore* tidak menggunakan bentuk atom, muatan parsial, atau dipol ikatan dan oleh karenanya bergantung pada penggunaan tipe atom dan

hubungan molekuler untuk menyimpulkan karakteristik atom. *GOLDScore* merupakan fungsi penilaian utama dari *GOLD* (Alvarez & Shoichet, 2005).

Berbeda dengan *GOLDScore*, *ChemScore* diturunkan untuk prediksi ikatan dan memiliki parameter regresi terhadap konstanta ikatan protein dan ligan dalam literatur. Fungsi penilaian ini biasa digunakan pada program *PRO_LEADS* (Alvarez & Shoichet, 2005).

GOLD akan menunjukkan hasil berupa *GOLDScore* yang tersusun dari nilai tertinggi hingga terendah. *GOLDScore* lebih menunjukkan konformasi ligan terbaik dibanding afinitas ikatan. *GOLDScore* berbanding terbalik dengan energi afinitas yang berarti makin negatif ΔG , makin tinggi nilai *GOLDScore*. Konformasi terbaik ditunjukkan dengan nilai *GOLDScore* yang paling tinggi (Nervall, Hanspers, Carlsson, Boukharta, & Aqvist, 2008).

2.12.2 *PyMOL*

Semua orang yang pernah mempelajari rumitnya struktur molekuler sepakat bahwa untuk memahami biologi secara struktural diperlukan visualisasi. Namun terkadang keinginan untuk meneliti ini terhambat karena kendala dana. Program atau perangkat lunak yang dapat dengan mudah diakses atau dengan kata lain berupa *open source* tak dapat dipungkiri merupakan sarana yang dapat dimanfaatkan oleh para peneliti untuk memahami struktur molekuler lebih jauh lagi. *PyMOL* merupakan satu di antara banyak perangkat lunak bioinformatika yang dapat diakses secara bebas karena sifatnya yang berupa *open source*. Diluncurkan pada bulan Desember tahun 1999, *PyMOL* dirancang untuk memvisualisasikan konformasi berlipat dari struktur tunggal, *interface* dengan program eksternal, menyediakan grafis yang baik di bawah *Windows* maupun *Unix*, mempersiapkan gambar berkualitas, dan mencocokkan dengan anggaran yang ketat (DeLano, 2004).

2.12.3 UCSF Chimera (University of California at San Fransisco Chimera)

UCSF (University of California at San Fransisco) 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, Goddard, Huang, Couch, Greenblatt, Meng, & Ferrin, 2004).

2.12.4 Vega ZZ

Vega ZZ adalah suatu proyek kimia komputasi yang dikembangkan untuk menciptakan suatu perangkat lunak untuk pemodelan molekuler dengan antarmuka grafik 3 dimensi. *Vega ZZ* pertama kali digunakan untuk menghubungkan perangkat lunak sejenis dan mempermudah proses pembelajaran dari penambatan molekuler (Pedretti, Mazzolari, & Vistoli, 2004). *Vega ZZ* dilengkapi dengan fitur-fitur seperti tampilan grafis untuk pengguna, perangkat lunak untuk mengedit, dan perangkat lunak untuk melakukan kalkulasi terhadap molekul. Saat ini, *Vega ZZ* dapat digunakan untuk menyelesaikan permasalahan kimia komputasi baik untuk desain obat, optimasi ligan, *homology modeling* dari suatu protein, serta kalkulasi penggambaran *QSAR* (*Quantitative Structural Analysis Relationship*) molekuler.

Struktur tiga dimensi yang diperoleh untuk penambatan molekuler tidak seluruhnya memiliki konformasi dengan energi terkecil. Oleh karena itu, struktur tersebut harus melalui tahap minimisasi energi. Salah satu teknik minimisasi yang umumnya digunakan adalah teknik turunan-pertama (*first-derivative*). Dalam teknik ini, terdapat beberapa prosedur seperti metode *steepest descent* dan *conjugate gradient* (Tiikkainen, 2010).

Pada fase pertama, metode *steepest descent* diaplikasikan ketika suatu struktur masih memiliki energi yang tinggi. Setiap atom digerakkan pada suatu arah dalam sebuah ruang dan perubahannya disimpan. Setelah semua atom mengalami pengulangan, konformasi diubah ke arah di mana terjadi pengurangan terbesar dalam energi total (posisi di bagian dasar permukaan energi). Proses ini terus berlanjut hingga didapatkan suatu angka atau energi yang cukup kecil. Metode ini merupakan metode yang cukup lambat untuk mencapai energi minimum. *Steepest descent* biasanya digunakan untuk konformasi yang jauh dari energi minimum sebagai tahap awal minimisasi secara kasar. Untuk penerapannya, *steepest descent* umumnya dilakukan pada 100-1000 tahap pengulangan dan dilanjutkan dengan tahap yang lebih tinggi yakni *conjugate gradient* (Tiikkainen, 2010).

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

BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Komputer Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia selama bulan Februari hingga November 2011.

3.2 Alat

3.2.1 Perangkat Keras

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

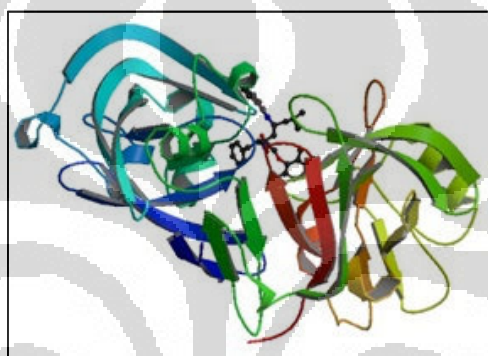
3.2.2 Perangkat Lunak

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

3.3 Bahan

3.3.1 Struktur Tiga Dimensi Plasmepsin

Struktur tiga dimensi plasmepsin yang dipilih adalah plasmepsin II karena merupakan plasmepsin yang paling sering dipelajari (Friedman & Caflisch, 2007). Struktur tersebut diunduh dari *Protein Data Bank* dengan situs <http://www.rcsb.org/pdb> dengan identitas 1LEE yang berupa monomer (Gambar 3.1).



[Sumber: diunduh dari <http://rcsb.org>]

Gambar 3.1. Struktur kristal plasmepsin II dari *Plasmodium falciparum* dengan inhibitor R36

3.3.2 Struktur Tiga Dimensi Ligan

Ligan yang digunakan dalam penelitian ini adalah struktur tiga dimensi dari tanaman obat di Indonesia yang terdapat dalam Basis Data Tanaman Obat Indonesia (Yanuar, Mun'im, Lagho, Syahdi, Rahmat, & Suhartanto, 2011).

3.3.3 Kontrol Positif dari Inhibitor Plasmepsin

Kontrol positif diunduh dari *PubChem Compound* dengan situs <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> dan *Protein Data Bank* dengan situs <http://rcsb.org>.

3.4 Cara Kerja

Skema cara kerja terdapat pada Lampiran 1.

3.4.1 Penyiapan Struktur Protein

Pengunduhan makromolekul plasmepsin dari *Protein Data Bank* dengan situs <http://www.rcsb.org/pdb>. Identitas makromolekul yang diinginkan yakni 1LEE yang terikat dengan inhibitor R36 atau disebut juga *4-amino-N-{4-[2-(2,6-dimethyl-phenoxy)-acetylamino]-3-hydroxy-1-isobutyl-5-phenyl-pentyl}benzamide* ($C_{32}H_{41}N_3O_4$). Data makromolekul disimpan dalam bentuk .pdb.

3.4.2 Pemisahan Residu dari Makromolekul Plasmepsin

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 Plasmepsin

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*, 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 diunduh dari <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> dan <http://rcsb.org> selanjutnya dilakukan optimasi dan penambatan molekuler dengan makromolekul target. Penambatan ini dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *GOLD* (Lampiran 2).

3.4.5 Penyiapan Struktur Ligan

Ligan yang digunakan sebanyak 1.449 ligan diperoleh dari Basis Data Tanaman Obat Indonesia dalam bentuk tiga dimensi dengan format *.mol*.

3.4.6 Penapisan *In Silico* Ligan dari Basis Data Tanaman Obat Indonesia terhadap Target Plasmepsin

Untuk penapisan *in silico* ligan dan molekul target dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *GOLD* dengan model *wizard*. Skema kerja terdapat pada Lampiran 3.

3.4.7 Kandidat Senyawa Inhibitor Plasmepsin

Berdasarkan hasil penapisan *in silico*, dibuat peringkat 10 besar kandidat senyawa inhibitor plasmepsin dengan *GOLDScore* tertinggi dan solusi terbaik.

3.4.8 Analisis dan Visualisasi Interaksi Protein-Ligan

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



BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penyiapan Struktur Protein

4.1.1 Pengunduhan Makromolekul Plasmepsin

Tahap awal penelitian ini yaitu pengunduhan makromolekul plasmepsin sebagai target penambatan. Setelah pencarian melalui *Protein Data Bank*, dihasilkan satu makromolekul plasmepsin yang diunduh strukturnya dengan format .pdb. Struktur dengan identitas 1LEE ini memiliki satu subunit (monomer) yaitu subunit A dan memiliki satu ligan yaitu *4-amino-N-{4-[2-(2,6-dimethyl-phenoxy)-acetylamino]-3-hydroxy-1-isobutyl-5-phenyl-pentyl}benzamide* (R36) yang merupakan hasil difraksi sinar-X. Kondisi dan kualitas dari struktur plasmepsin yang diunduh tersebut tercantum dalam Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Struktur plasmepsin yang diunduh dari *Protein Data Bank*

Identitas	Sub Unit	Ligan Terikat	Klasifikasi Enzim	Resolusi (Å)
1LEE	A	Inhibitor R36	Hidrolase	1,90

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

4.1.2 Pemisahan Residu pada Rantai Makromolekul Plasmepsin

Setelah diunduh dari *Protein Data Bank*, didapatkan struktur makromolekul plasmepsin yang terikat dengan ligan, pelarut, serta residu non-standar lainnya. Struktur ini kemudian dipisahkan dari residu-residu non-standar tersebut. Proses pemisahan dilakukan dengan perangkat lunak *UCSF Chimera* dan dihasilkan struktur plasmepsin yang utuh dan siap melalui tahap selanjutnya. Struktur hasil pemisahan ini kemudian disimpan dengan dalam format *.pdb*.

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

Perangkat lunak *UCSF Chimera* berfungsi memotong residu non-standar dengan tidak mengubah susunan atom lain. Pada makromolekul plasmepsin yang diunduh (1LEE), hanya terdapat residu non-standar berupa ligan dan molekul air.

4.1.3 Optimasi Makromolekul Plasmepsin

Pada tahap optimasi makromolekul dengan menggunakan perangkat lunak *Vega ZZ*, dilakukan kembali penghilangan molekul air sekaligus penambahan hidrogen pada masing-masing residu. Ditambahkan pula *force field AutoDock* dan muatan *Gasteiger* dalam rangka perbaikan muatan. Kemudian dilakukan proses optimasi minimisasi dengan metode *steepest descent* sebanyak 100 kali dan *conjugate gradients* sebanyak 1000 kali. Dari hasil minimisasi, terlihat adanya pergeseran posisi struktur. Hasil minimisasi ini disimpan dalam format *.pdb*.

Optimasi ini perlu dilakukan dalam rangka mempersiapkan penambatan yang sesuai dengan kondisi yang diperlukan oleh perangkat lunak penambatan.

Universitas Indonesia

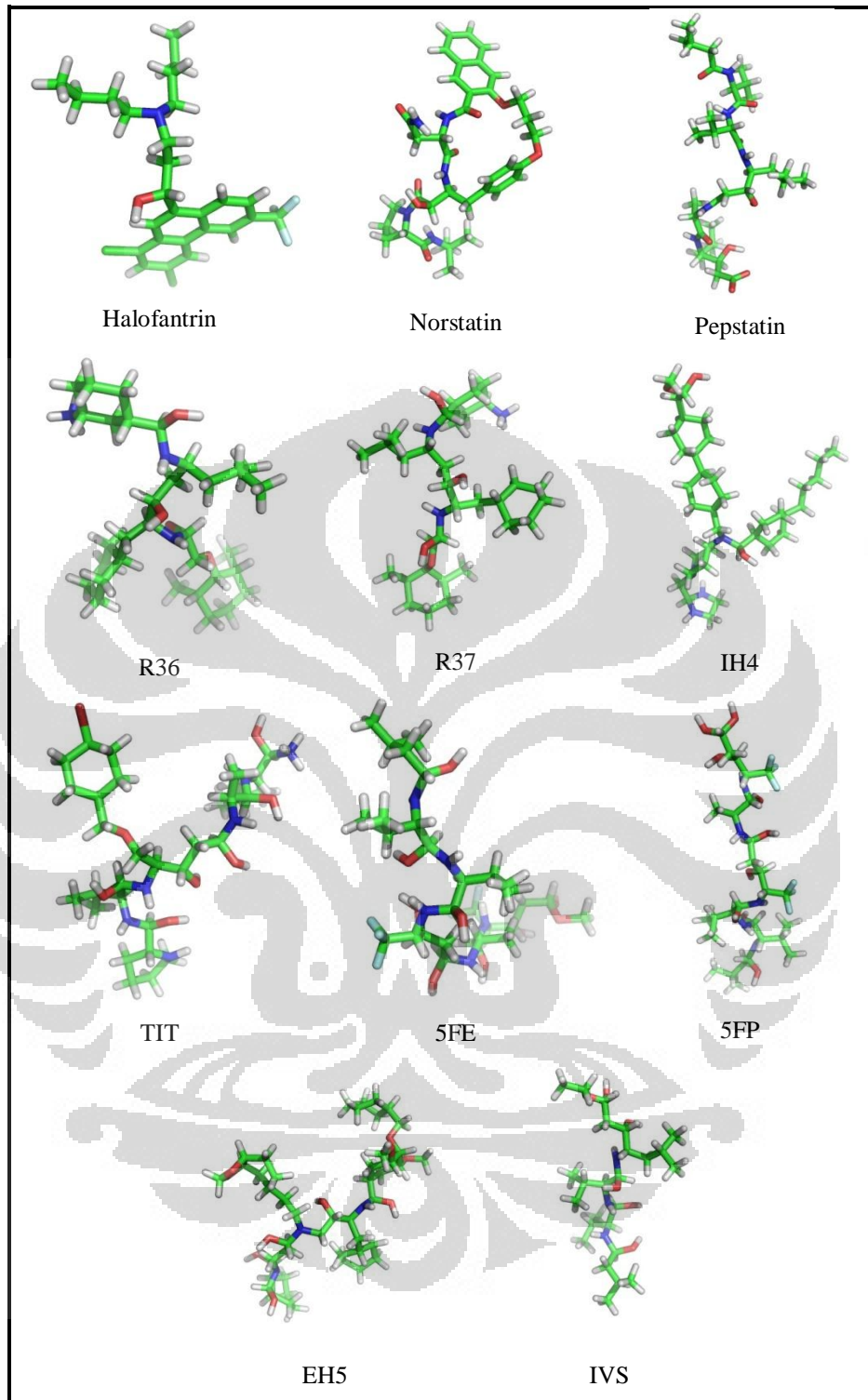
Pada tahap ini, diperlukan penghilangan air agar tidak mempengaruhi interaksi penambatan. Penambahan atom hidrogen juga perlu dilakukan karena keberadaannya dapat mempengaruhi interaksi penambatan melalui terbentuknya ikatan hidrogen. Pada proses perbaikan muatan, dilakukan penambahan *force field AutoDock* serta muatan *Gasteiger*. Penambahan *force field* dan muatan perlu dilakukan dalam penilaian hasil akhir dari perangkat lunak penambatan. Hal ini didasarkan atas perhitungan *GOLDScore* yang berbasis *force field*.

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

4.2 Validasi Metode Penapisan *In Silico*

4.2.1 Pengunduhan Kontrol Positif dari Inhibitor Plasmepsin

Kontrol positif dari inhibitor plasmepsin diunduh dari *PubChem Compound* dengan alamat situs <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Dari situs ini diperoleh 3 senyawa inhibitor plasmepsin dengan struktur 2 dimensi. Kontrol positif yang diperoleh yaitu halofantrin (*PubChem ID*: CID 37392), norstatin (*PubChem ID*: CID 468052), dan pepstatin (*PubChem ID*: CID 5478883) yang diketahui sebagai inhibitor plasmepsin. Data kontrol positif kemudian disimpan dalam bentuk *.sdf*. Selain didapatkan dari situs *PubChem Compound*, beberapa kontrol positif didapatkan dari *Protein Data Bank* dengan memisahkan ligan dari protein. Seluruh kontrol positif tersebut tercantum dalam Gambar 4.1 dan Tabel 4.2.



[Sumber: *PubChem Compound & Protein Data Bank*, telah diolah kembali]

Gambar 4.1. Struktur tiga dimensi kontrol positif inhibitor plasmeptin

Tabel 4.2. Daftar Kontrol Positif Inhibitor Plasmeptin

No.	Nama/Kode Ligan	Nama IUPAC	PubChem Compound ID/PDB ID
1	Halofantrin	<i>3-dibutylamino-1-[1,3-dichloro-6-(trifluoromethyl)phenanthren-9-yl]-propan-1-ol</i>	CID 37392
2	Norstatin	<i>1-[(2R)-2-[(1S,14S)-14-(2-Amino-2-oxoethyl)-13,16-dioxo-3,4,11,12,13,14,15,16-octahydro-2H,10H-6,9-ethenonaphtho[2,3-b][1,15,5,8]dioxadiazacyclooctadecin-11-yl]-2-hydroxyacetyl]-N-(tert-butyl)-L-prol</i>	CID 468052
3	Pepstatin	<i>(3S,4S)-3-hydroxy-4-[[[(2S)-2-[[[(3S,4S)-3-hydroxy-6-methyl-4-[[[(2S)-3-methyl-2-[[[(2S)-3-methyl-2-(3-methylbutanoyl amino)butanoyl]amino]butanoyl]amino]heptanoyl]amino]propanoyl]amino]-6-methylheptanoic acid</i>	CID 5478883
4	R36	<i>4-amino-N-{4-[2-(2,6-dimethyl-phenoxy)-acetylamino]-3-hydroxy-1-isobutyl-5-phenyl-pentyl}-benzamide</i>	1LEE
5	R37	<i>3-amino-N-{4-[2-(2,6-dimethyl-phenoxy)-acetylamino]-3-hydroxy-1-isobutyl-5-phenyl-pentyl}-benzamide</i>	1LF2
6	IH4	<i>N-(R-carboxy-ethyl)-alpha-(S)-(2-phenylethyl)</i>	2BJU
7	TIT	<i>N-((3S,4S)-5-[(4-bromobenzyl)oxy]-3-hydroxy-4-[[N-(pyridin-2-ylcarbonyl)-L-valyl]amino]pentanoyl)-L-alanyl-L-leucinamide</i>	1W6H
8	5FE	<i>5,5,5-trifluoro-3-hydroxy-4-[2-(5,5,5-trifluoro-3-hydroxy-4-{3-methyl-2-[3-methyl-2-(3-methyl-butrylamino)-butrylamino]-butrylamino]-pentanoylamino)-propionylamino]-pentanoic acid methyl ester</i>	1XE5
9	5FP	<i>5,5,5-trifluoro-3-hydroxy-4-[2-(5,5,5-trifluoro-3-hydroxy-4-{3-methyl-2-[3-methyl-2-(3-methyl-butrylamino)-butrylamino]-butrylamino]-pentanoylamino)-propionylamino]-pentanoic acid</i>	1XE6
10	EH5	<i>N-(1-benzyl-3-[[3-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-isoindol-2-yl)propionyl]-[2-(hexahydro-benzo[1,3]dioxol-5-yl)-ethyl]-amino]-2-hydroxy-propyl)-4-benzyloxy-3,5-dimethoxy-benzamide</i>	1LF3
11	IVS	<i>3-hydroxy-6-methyl-4-(3-methyl-2-(3-methyl-2-(3-methyl-butrylamino)-butrylamino)-butrylamino)-heptanoic acid ethyl ester</i>	1ME6

4.2.2 Konversi Berkas Kontrol Positif dari Inhibitor Plasmepsin

Untuk melakukan penambatan molekuler, format data hasil unduhan dari *PubChem Compound* harus diubah formatnya, dari struktur 2 dimensi menjadi 3 dimensi dan format *.sdf* diubah menjadi *.mol*. Untuk melakukan konversi format data ini digunakan program *Vega ZZ*.

4.2.3 Penambatan Molekuler Menggunakan *GOLD*

Penambatan molekuler dengan 11 kontrol positif dilakukan menggunakan perangkat lunak *GOLD*. Koordinat ruang penambatan yang digunakan pada validasi ini akan digunakan pula pada penambatan molekuler saat penapisan *in silico*. Koordinat yang diperoleh untuk ruang penambatan yaitu koordinat (X,Y,Z) 31,7977; 33,2087;12,3365.

Untuk memvalidasi metode penapisan *in silico* yang akan digunakan, maka dilakukan penambatan molekuler dengan kecepatan *GA Search Option*, yaitu *fast*, *medium*, dan *slow*. Masing-masing kecepatan ini dilakukan sebanyak lima kali. Berdasarkan penambatan molekuler pada kontrol positif dari inhibitor plasmepsin, diperoleh hasil yang tercantum pada Tabel 4.3-Tabel 4.5.

Berdasarkan hasil validasi metode ini, dapat dilihat bahwa dengan *GA Search Option* kecepatan *slow* memberikan hasil terbaik sehingga penambatan molekuler pada penapisan *in silico* akan dilakukan dengan *GA Search Option* kecepatan *slow*.

Pada hasil penambatan molekuler kontrol positif terlihat bahwa kontrol positif mengikat plasmepsin tepat masuk ke dalam situs aktif plasmepsin dan bagian penutup plasmepsin. Selain itu, konformasi ikatan pada plasmepsin oleh 11 kontrol positif juga serupa. Hal ini ditunjukkan pada Gambar 4.2.

Tabel 4.3. Hasil penambatan molekuler pada kontrol positif inhibitor plasmepsin pada lima kali percobaan dengan kecepatan *Fast*

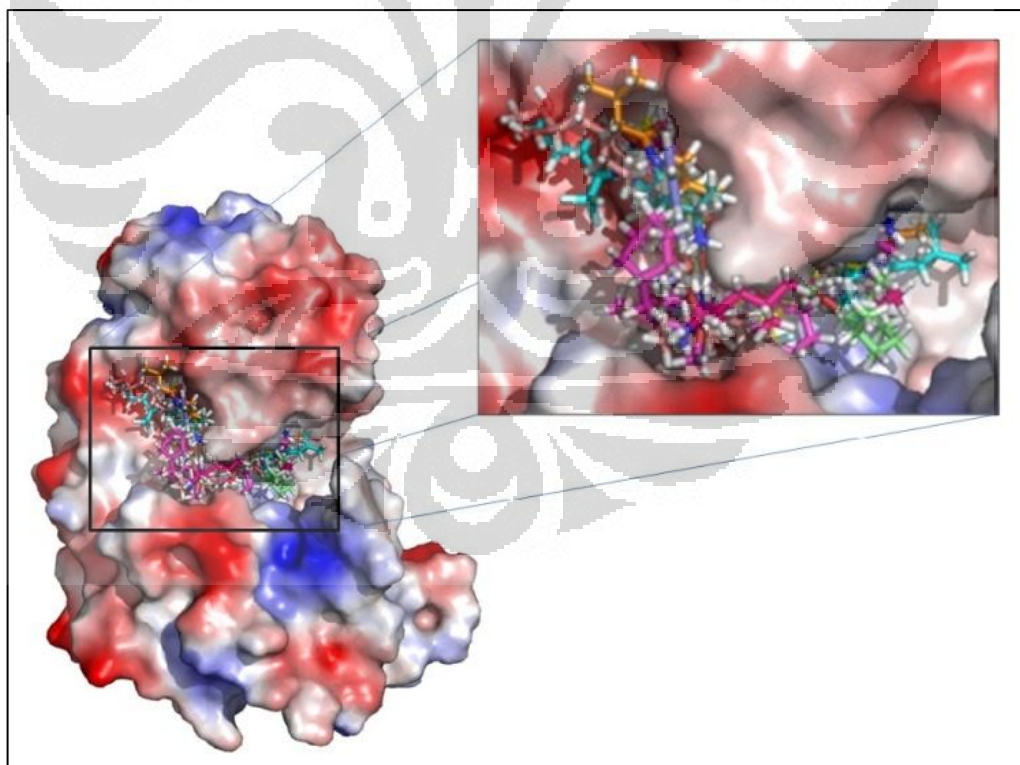
Kontrol Positif	<i>GOLDScore</i>					Rata -rata	SD	KV (%)
Halofantrin	53,9149	47,913	64,4616	55,2577	57,8836	55,89	6,03	10,79
Norstatin	61,7891	46,7835	44,0476	55,7409	41,7982	50,03	8,44	16,87
Pepstatin	76,0784	69,7397	71,0919	73,5098	64,2025	70,92	4,47	6,30
R36	60,2787	57,8123	54,9918	57,0619	61,4392	58,32	2,57	4,41
R37	51,0738	58,2139	58,2241	47,4911	67,0033	56,40	7,53	13,35
IH4	52,3677	31,2641	35,632	44,3590	43,6695	41,46	8,22	19,82
TIT	55,2062	63,0959	48,6781	69,1846	47,7979	56,79	9,25	16,29
5FE	49,6150	51,3237	48,3756	51,9968	50,1509	50,29	1,42	2,83
5FP	57,1989	53,0183	57,7495	65,1003	64,8342	59,58	5,25	8,81
EH5	43,0687	55,5235	49,7357	36,8874	54,9943	48,04	8,01	16,66
IVS	61,6916	47,2639	53,7176	44,3043	62,8889	53,97	8,33	15,44

Tabel 4.4. Hasil penambatan molekuler pada kontrol positif inhibitor plasmepsin pada lima kali percobaan dengan kecepatan *Medium*

Kontrol Positif	<i>GOLDScore</i>					Rata -rata	SD	KV
Halofantrin	58,2912	63,4184	62,4321	63,3825	66,0032	62,71	2,80	4,47
Norstatin	44,3298	62,3925	60,9724	47,7471	41,6190	51,41	9,64	18,74
Pepstatin	81,2270	81,1616	75,1543	82,5348	83,2044	80,66	3,20	3,96
R36	70,9981	69,2649	69,4293	76,5936	69,9539	71,25	3,06	4,30
R37	69,7373	69,1763	73,1578	74,5335	72,6993	71,86	2,30	3,21
IH4	51,8322	45,7011	60,8735	60,2910	61,4043	56,02	6,98	12,46
TIT	66,7302	73,5452	73,5640	68,6651	66,1952	69,74	3,60	5,16
5FE	70,7598	60,7440	62,8913	72,2060	62,5467	65,83	5,25	7,97
5FP	70,8290	69,7983	64,8327	70,5710	76,8526	70,58	4,27	6,06
EH5	75,0257	52,7508	67,4130	51,0680	53,7022	59,99	10,64	17,73
IVS	54,8416	65,4646	58,2751	59,3562	55,5764	58,70	4,21	7,18

Tabel 4.5. Hasil penambatan molekuler pada kontrol positif inhibitor plasmepsin pada lima kali percobaan dengan kecepatan *Slow*

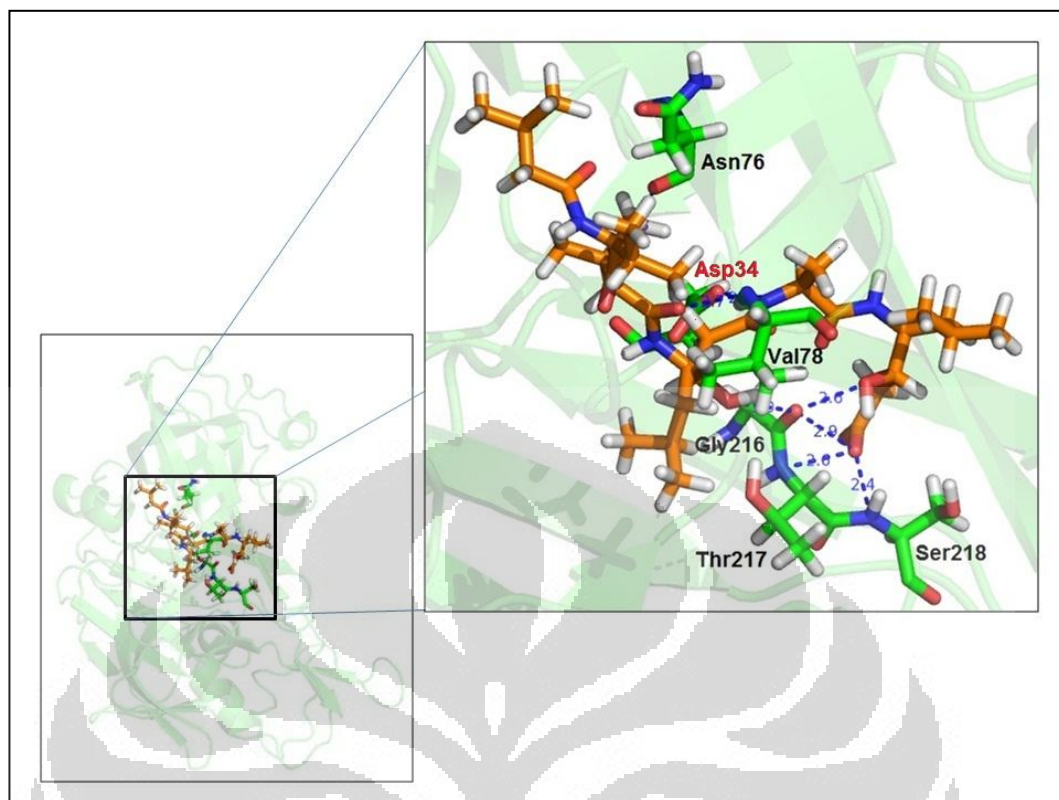
Kontrol Positif	GOLDScore					Rata-rata	SD	KV
Halofantrin	64,0112	63,3400	67,2119	66,4321	68,1126	65,82	2,06	3,13
Norstatin	62,5136	60,3550	59,7286	60,9879	63,0377	61,32	1,41	2,30
Pepstatin	87,4629	86,8260	89,4577	84,2102	86,4819	86,89	1,89	2,17
R36	67,8756	68,7883	69,0052	74,8401	74,6758	71,04	3,42	4,82
R37	67,3284	75,6172	71,8293	79,3149	71,4117	73,10	4,55	6,22
IH4	63,3244	63,5116	66,3901	64,7881	58,2438	63,25	3,06	4,83
TIT	82,2333	63,4676	55,8931	78,0757	61,5325	68,24	11,32	16,59
5FE	68,8048	56,8437	79,5210	61,6830	64,1444	66,20	8,61	13,00
5FP	67,6988	58,2356	65,5953	65,3160	61,7916	63,73	3,73	5,86
EH5	77,6721	58,0811	70,1331	48,1638	57,9643	62,40	11,55	18,52
IVS	63,2907	54,7059	65,8020	60,7670	66,4301	62,20	4,75	7,64



[Sumber: Olahan penulis dengan *PyMOL*]

Gambar 4.2. Situs aktif plasmepsin berikatan dengan kontrol positif

Universitas Indonesia

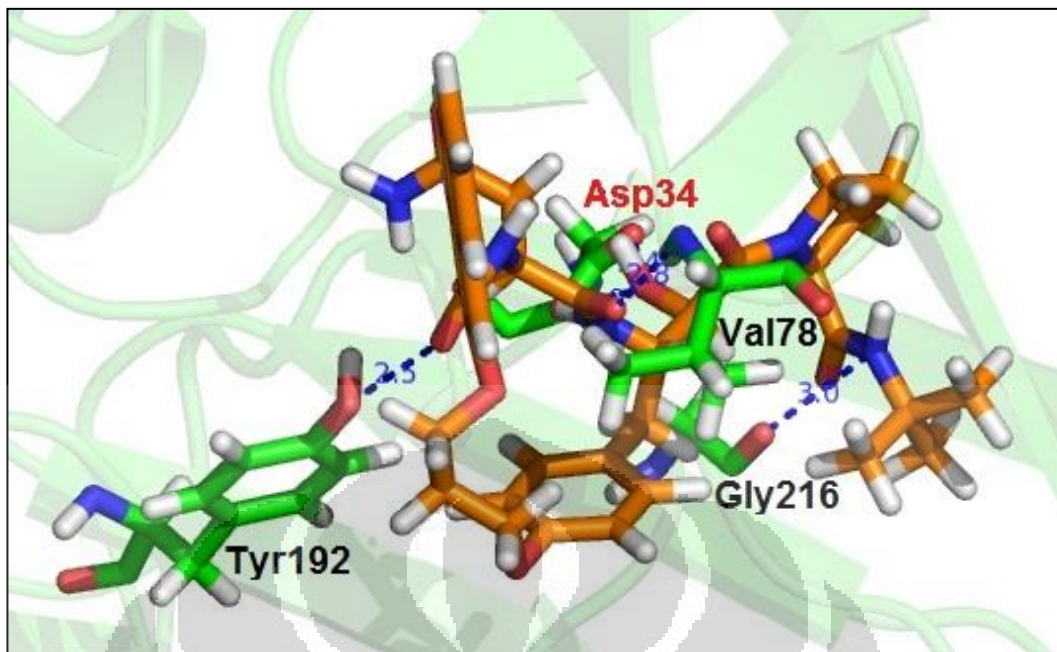


[Sumber: Olahan penulis dengan *GOLD* dan *PyMOL*]

Keterangan: Warna merah ditunjukkan oleh residu katalitik yaitu Asp34

Gambar 4.3. Konformasi ikatan kontrol positif pepstatin dengan plasmepsin
(*PDB ID: 1LEE*)

Pada Gambar 4.3 di atas, kontrol positif pepstatin berikatan dengan plasmepsin pada residu hidrofobik dari plasmepsin yaitu Asp34, Asn76, Val78, Gly216, Thr217, dan Ser218 di mana Asp34 merupakan residu katalitik dari plasmepsin. Sedangkan pada Gambar 4.4 di bawah ini, ditunjukkan bahwa kontrol positif norstatin berikatan pada residu hidrofobik dari plasmepsin yaitu Asp34, Val78, Tyr192, dan Gly216 di mana Asp34 merupakan residu katalitik dari plasmepsin (Asojo, *et al.*, 2002).



[Sumber: Olahan penulis dengan *GOLD* dan *PyMOL*]

Keterangan: Warna merah ditunjukkan oleh residu katalitik yaitu Asp34

Gambar 4.4. Konformasi ikatan kontrol positif norstatin dengan plasmepsin
(*PDB ID: 1LEE*)

4.3 Penyiapan Struktur Ligan

Ligan yang digunakan diperoleh dari Basis Data Tanaman Obat Indonesia, sebanyak 1.449 ligan dalam bentuk tiga dimensi dengan format .mol. Sumber acuannya adalah *Materia Medika Indonesia* jilid I sampai VI. Basis data ini merupakan hasil dari penelitian sebelumnya (Yanuar, Mun'im, Lagho, Syahdi, Rahmat, & Suhartanto, 2011). Ligan pada basis data ini merupakan senyawa kimia yang terkandung dalam tanaman obat yang ada di Indonesia. Ligan ini dapat diakses melalui situs <http://herbaldb.farmasi.ui.ac.id>.

4.4 Penapisan *In Silico* Ligan dari Basis Data Tanaman Obat Indonesia terhadap Target Plasmeptin

Penambatan molekuler untuk penapisan *in silico* dilakukan dengan menggunakan *GOLD*, perangkat lunak yang efisien dari segi waktu untuk melakukan penapisan *in silico*. *GOLD* menggunakan pendekatan *genetic algorithm* dan menggunakan penilaian dengan pendekatan berdasarkan *force field*. Koordinat ruang penambatan pada penapisan *in silico* sama dengan koordinat yang digunakan untuk validasi metode, yaitu koordinat (X,Y,Z) 31,7977; 33,2087;12,3365, serta dengan radius 15 Å 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 basis data dilakukan terhadap 1.449 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, yaitu *GA Search Option slow* memberikan hasil terbaik. Luaran dari proses penambatan dengan program *GOLD* adalah berkas dengan format *.conf (configuration gold file)* dan *.mol* (bentuk konformasi pengikatan ligan). Proses penapisan awal berlangsung sekitar 1 minggu. Setelah itu, dipilih 100 besar senyawa dengan *GOLDScore* tertinggi yang kemudian diikutsertakan dalam penapisan ulangan selanjutnya yang berlangsung 10 kali. Hal ini dilakukan untuk menghemat waktu percobaan.

GOLD menunjukkan hasil peringkat penambatan berdasarkan skor (*GOLDScore*) serta konformasi-konformasi ikatan. Pemilihan *GOLDScore* dilakukan berdasarkan penilaiannya yang lebih akurat jika dibandingkan *ChemScore*. Besar *GOLDScore* ini yang akan menentukan peringkat dari kandidat senyawa inhibitor. *GOLDScore* merupakan fungsi nilai dari perangkat lunak *GOLD* dalam menentukan peringkat posisi terbaik.

4.5 Kandidat Senyawa Inhibitor Plasmepsin

Hasil penapisan *in silico* terhadap target plasmepsin dengan menggunakan Basis Data Tanaman Obat Indonesia tercantum pada Tabel 4.6-4.10. Penapisan *in silico* dilakukan sebanyak 10 kali dan dipilih 10 besar senyawa dengan frekuensi kemunculan tertinggi. Namun karena ligan peringkat 7-11 memiliki frekuensi kemunculan yang sama yaitu 4 kali, maka kandidat senyawa inhibitor yang dipilih sebanyak 11 besar. Hasil dalam Tabel 4.11 merupakan peringkat 11 besar ligan dengan *GOLDScore* tertinggi serta kemunculan terbanyak dengan data keseluruhan *GOLDScore* terdapat pada Tabel 4.12 sedangkan rumus struktur dari peringkat besar senyawa ligan hasil penapisan *in silico* terdapat pada Gambar 4.5-4.8.

Tabel 4.11. Hasil penapisan *in silico* terhadap target plasmepsin

Peringkat	Ligan	n	<i>GOLDScore</i>		
			Rata-rata	SD	KV (%)
1	<i>Trimyrustin</i>	9	85,4396	4,9025	5,7379
2	<i>Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside)</i>	9	84,4627	3,6624	4,3362
3	<i>Isoscutellarein 4'-methyl ether 8-(6''-n-butylglucuronide)</i>	9	80,8250	1,6951	2,0972
4	<i>Cyanidin 3-(6''-malonylglucoside)-5-glucoside</i>	7	83,1239	2,2321	2,6852
5	<i>Multifloroside</i>	7	82,3070	2,5021	3,0399
6	<i>Delphinidin 3-(2-rhamnosyl-6-malonylglucoside)</i>	6	87,8589	3,1734	3,6119
7	<i>Delphinidin 3-(6-malonylglucoside)-3',5'-di-(6-p-coumaroylglucoside)</i>	4	92,5770	6,0155	6,4979
8	<i>Cyanidin 3-[6-(6-sinapylglucosyl)-2-xylosylgalactoside]</i>	4	84,5243	4,0815	4,8288
9	<i>Kaempferol 3-glucosyl-(1-</i>	4	82,1026	0,9071	1,1048

Universitas Indonesia

	<i>3)-rhamnosyl-(1-6)-galactoside</i>				
10	<i>Sanggenofuran A</i>	4	81,1762	1,8186	2,2404
11	<i>Lycopene</i>	4	81,0619	1,6951	2,0911

Keterangan: n= kemunculan data percobaan (total percobaan sebanyak 10 kali)

Berdasarkan hasil penapisan *in silico*, senyawa dengan frekuensi kemunculan terbanyak pada percobaan yaitu *Trimyristin*, *Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside)*, dan *Isoscutellarein 4'-methyl ether 8-(6''-n-butylglucuronide)*. Ketiga kandidat inhibitor plasmepsin tersebut memiliki frekuensi kemunculan sebanyak 9 dari 10 kali percobaan. Keseluruhan data kandidat inhibitor hasil penapisan *in silico* beserta famili dan spesies tanaman asal terdapat dalam Tabel 4.13.

Trimyristin merupakan senyawa trigliserida yang berasal dari famili Euphorbiaceae dengan spesies tanaman asal yaitu *Aleurites moluccana* atau lebih dikenal dengan nama kemiri. *Trimyristin* juga ditemukan pada *Myristica fragrans* atau yang lebih dikenal dengan nama pala yang berasal dari famili Myristicaceae. *Trimyristin* digunakan sebagai nanopartikel lipid yang dikombinasikan dengan kurkuminoid dalam pengobatan malaria (Nayak, Tiyaboonchai, Patankar, Madhusudhan, & Souto, 2010). Senyawa trigliserida juga dilibatkan dalam pengobatan malaria sebagai fase minyak pengangkut zat antimalaria. Contohnya adalah *SMEDDS (Self-microemulsifying Drug Delivery Systems)* yang berubah menjadi mikroemulsi setelah melewati rute oral (Santos-Magalhaes & Mosqueira, 2010).

Senyawa lain yang muncul dengan frekuensi terbanyak adalah *Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside)*. Senyawa tersebut merupakan senyawa flavonoid kelas antosianin yang berasal dari famili Lamiaceae dengan spesies tanaman asal yaitu *Thymus serpyllum* atau dikenal dengan nama serpili. Senyawa antosianin diketahui mempunyai aktivitas antimalaria. Salah satunya terdapat pada *Corchorus olitorius* yang mengandung antosianin dan diketahui dapat menghambat parasit malaria yaitu *Plasmodium falciparum* di atas 96% (Morris & Wang, 2007). Beberapa senyawa glukosida flavonoid cukup aman ketika

melewati jalur oral dalam pengonsumsi obat, seperti yang dihasilkan oleh quercitrin, rutin, dan naringin dalam percobaan yang dilakukan oleh Walle, Browning, Steed, Reed, & Walle (2005).

Senyawa yang muncul dengan frekuensi yang sama dengan dua senyawa di atas adalah *Isoscutellarein 4'-methyl ether 8-(6''-n-butylglucuronide)*. Senyawa ini merupakan flavonoid glukuronida yang berasal dari famili Sterculiaceae dengan spesies tanaman asal yaitu *Helicteres isora* atau puteran. Analisis kimia dari *Helicteres isora* telah mendeteksi adanya kukurbitasin, flavonoid, neolignan, dan derivat asam rosmarinat. Kamiya, *et al.*, (2000) dalam penelitiannya mengekstraksi beberapa flavonoid dari *Helicteres isora*, di antaranya *Isoscutellarein 4'-methyl ether 8-O-β-D-glucuronide*, *Isoscutellarein 4'-methyl ether 8-O-β-D-glucuronide 6''-n-butyl ester*, *Isoscutellarein 4'-methyl ether 8-O-β-D-glucuronide 2''-sulfate*, *Isoscutellarein 4'-methyl ether 8-O-β-D-glucuronide 2'', 4''-disulfate*, *Isoscutellarein 8-O-β-D-glucuronide 2'', 4''-disulfate*.

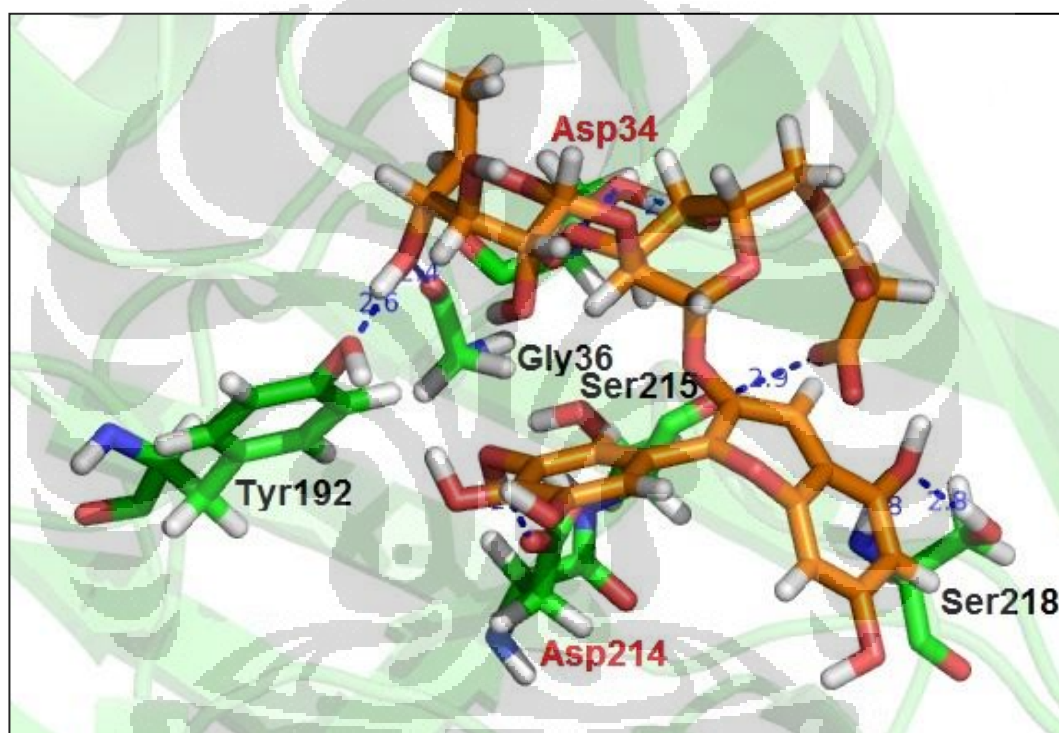
Flavonoid alami maupun sintesis menunjukkan aktivitas antimalaria (Lim, Kim, & Lee, 2007). Penelitian yang dilakukan oleh Liu, Yang, Roberts, Elford, & Phillipson (1992) memberikan hasil bahwa flavonoid dari *Artemisia annua* yang diuji menunjukkan aktivitas antiplasmodial *in vitro* dengan nilai IC₅₀ dalam rentang 2,3-6,5 x 10⁻⁵ M. Flavonoid juga dapat disinergiskan dengan artemisinin untuk mengobati malaria dengan cara meningkatkan aktivitas artemisinin (Ferreira, Luthria, Sasaki, & Heyerick, 2010).

4.6 Analisis dan Visualisasi Interaksi Protein-Ligan

Kesebelas kandidat inhibitor plasmepsin hasil penapisan *in silico* divisualisasi dan dianalisis dengan menggunakan program *GOLD* dan *PyMOL* (Gambar 4.9-4.12). Berdasarkan Tabel 4.14 yang merangkum ikatan hidrogen yang terjadi pada target penambatan plasmepsin dengan ligan hasil penapisan *in silico* peringkat 11 besar, hasil penapisan *in silico* yang memiliki ikatan dengan seluruh residu katalitik plasmepsin yaitu Asp34 dan Asp214 adalah *Delphinidin 3-*

(2-rhamnosyl-6-malonylglucoside) dan *Isoscutellarein 4'-methyl ether 8-(6''-n-butylglucuronide)*.

Delphinidin 3-(2-rhamnosyl-6-malonylglucoside) selain menunjukkan adanya ikatan hidrogen pada Asp34 dan Asp214 yang merupakan residu katalitik, juga memiliki ikatan dengan residu Gly36, Tyr192, Ser215, dan Ser218 (Tabel 4.14). Ikatan hidrogen terbentuk pada residu asam amino dengan gugus elektronegatif seperti –OH dan –O pada nomor 27, 42, 58, 60, 70, dan 81. Ikatan hidrogen yang dimiliki berjarak 2,4-2,9 Å.



[Sumber: Olahan penulis dengan *PyMOL*]

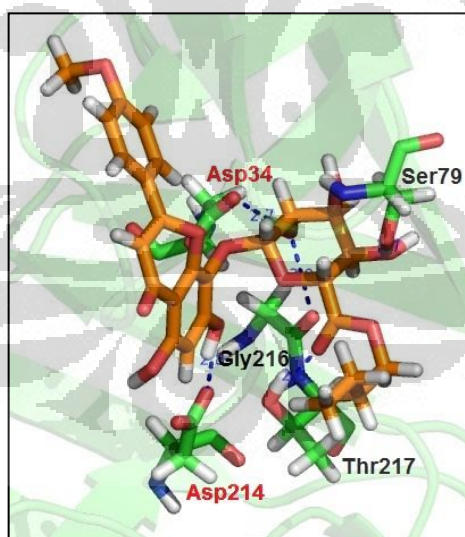
Keterangan: Warna merah ditunjukkan oleh residu katalitik yaitu Asp34 dan Asp214

Gambar 4.13. Interaksi *Delphinidin 3-(2-rhamnosyl-6-malonylglucoside)* (jingga) dengan beberapa residu asam amino (hijau) pada plasmepsin

Delphinidin 3-(2-rhamnosyl-6-malonylglucoside) memiliki ikatan hidrogen dengan tiga residu pada sisi aktif plasmepsin, yaitu Asp34, Gly36, dan

Asp214. Residu Gly36 merupakan sisi aktif yang berada dekat dengan sisi katalitik, yaitu Asp34 dan Asp 214. Dalam proses degradasi hemoglobin, residu Asp 34 dan Asp214 mengarahkan molekul air dan proton dari residu Asp214 untuk memecahkan ikatan peptida Phe33 dan Leu34 pada rantai- α hemoglobin inang (Gupta, Yedidi, Varghese, Kovari, & Woster, 2010). Hambatan ini berpengaruh pada substrat dari plasmepsin yang tidak dapat menempati situs aktif dari enzim. Dengan dihambatnya dua sisi katalitik oleh *Delphinidin 3-(2-rhamnosyl-6-malonylglucoside)*, proses degradasi hemoglobin akan terhambat dan demikian juga dengan munculnya gejala malaria.

Isoscutellarein 4'-methyl ether 8-(6''-n-butylglucuronide) menunjukkan adanya ikatan hidrogen pada makromolekul plasmepsin, yaitu dengan Asp34, Ser79, Asp214, Gly216, dan Thr217. Ikatan hidrogen terjadi pada residu asam amino dengan gugus elektronegatif seperti $-OH$ dan $-O$ pada atom nomor 26, 41, 45, dan 48. Ikatan hidrogen yang dimiliki berjarak antara 2,6-3,0 Å. Jarak ikatan dengan situs aktif yang lebih besar dibanding senyawa inhibitor sebelumnya menjadikan *GOLDScore*-nya lebih kecil.



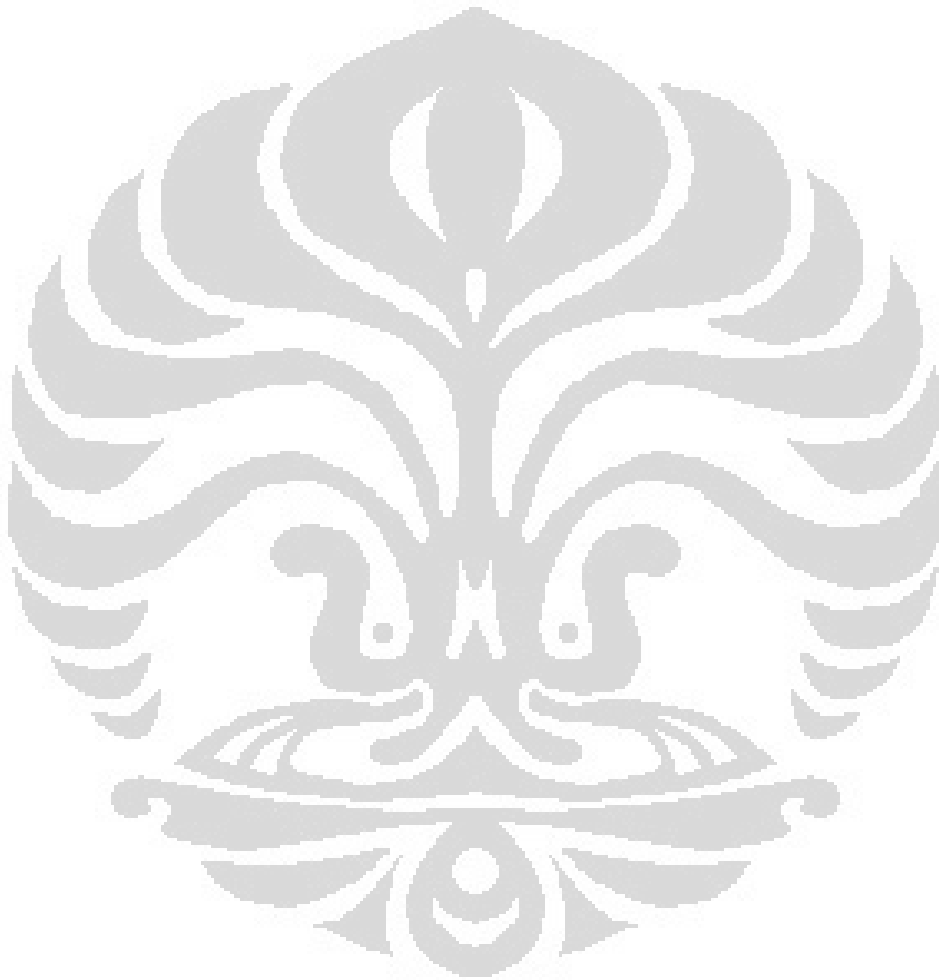
[Sumber: Olahan penulis dengan *PyMOL*]

Keterangan: Warna merah ditunjukkan oleh residu katalitik yaitu Asp34 dan Asp214

Gambar 4.14. Interaksi *Isoscutellarein 4'-methyl ether 8-(6''-n-butylglucuronide)* (jingga) dengan beberapa residu asam amino (hijau) pada plasmepsin

Universitas Indonesia

Sebagaimana halnya *Delphinidin 3-(2-rhamnosyl-6-malonylglucoside)* yang memiliki sisi pengikatan pada sisi katalitik plasmepsin, *Isoscutellarein 4'-methyl ether 8-(6''-n-butylglucuronide)* pun memiliki ikatan dengan dua residu pada sisi katalitik, yaitu Asp34 dan Asp214 sehingga mampu menghambat pengikatan substrat dengan enzim. Hambatan ini menjadikan enzim tidak dapat bekerja untuk mengkatalisis reaksi dalam proses degradasi hemoglobin inang.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penapisan *in silico* antimalaria dengan menggunakan Basis Data Tanaman Obat Indonesia terhadap target plasmepsin, diperoleh 11 senyawa kimia yang berpotensi sebagai inhibitor plasmepsin. Senyawa kimia tersebut yaitu *Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside)*; *Isoscutellarein 4'methyl ether 8-(6"-n-butylglucuronide)*; *Trimyrustin*; *Cyanidin 3-(6"-malonylglucoside)-5-glucoside*; *Multifloroside*; *Delphinidin 3-(2-rhamnosyl-6-malonylglucoside)*; *Cyanidin 3-[6-(6-sinapylglucosyl)-2-xylosylgalactoside]*; *Delphinidin 3-(6-malonylglucoside)-3',5'-di-(6-p-coumaroylglucoside)*; *Kaempferol 3-glucosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-galactoside*; *Lycopene*; dan *Sanggenofuran A* dengan kisaran *GoldScore* dari 78,4647 sampai 98,2836. Dua kandidat di antaranya yaitu *Delphinidin 3-(2-rhamnosyl-6-malonylglucoside)* dan *Isoscutellarein 4'methyl ether 8-(6"-n-butylglucuronide)* berikatan dengan seluruh residu dari sisi katalitik plasmepsin yaitu Asp34 dan Asp214.

5.2 Saran

1. Dapat dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan perangkat lunak lain misalnya *DOCK*, *FlexX*, *ICM*, *GLIDE*, *SLIDE*, *LigandFit*, *FRED*, *Surflex*, dan lain-lain untuk mengetahui perbandingan hasil antara perangkat lunak tersebut. Selain itu dapat juga dilakukan simulasi dinamika molekuler.
2. Dapat dilakukan uji *in vitro* untuk mengetahui aktivitas senyawa-senyawa hasil penapisan *in silico* terhadap penghambatannya pada plasmepsin.

DAFTAR ACUAN

- Abraham, D. J. (2003). *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery Sixth Edition, Volume 1: Drug Discovery*. John Wiley & Sons.
- Alvarez, J., & Shoichet, B. (2005). *Virtual Screening in Drug Discovery*. CRC Press Taylor & Francis Group.
- Asojo, O. A., *et al.* (2002). Structures of Ser205 mutant plasmepsin II from *Plasmodium falciparum* at 1.8 Å in complex with the inhibitors rs367 and rs370. *Acta Crystallographica*, D58, 2001-2008.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2007). *Biochemistry Seventh Edition*. New York: W. H. Freeman and Company.
- Berman, H. M., *et al.* (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28, 235-242.
- Bjelic, S., Nervall, M., Gutierrez-de-Teran, H., Ersmark, K., Hallberg, A., & Aqvist, J. (2007). Computational inhibitor design against malaria plasmepsins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 2285-2305.
- Bolton, E. E., Wang, Y., Thiessen, P. A., & Bryant, S. H. (2008). PubChem: Integrated platform of small molecules and biological activities. *Annual Reports in Computational Chemistry*, 4, 217-241.
- Boss, C., Richard-Bildstein, S., Weller, T., Fischli, W., Meyer, S., & Binkert, C. (2003). Inhibitors of the *Plasmodium falciparum* parasite aspartic protease plasmepsin II as potential antimalarial agents. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 883-907.
- Champe, P. C. & Harvey, R. A. (2007). *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry 4th edition*. New York: Lippincott Williams & Wilkins.

- Copeland, R. A. (2005). *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Cunico, W., *et al.* (2009). Synthesis, antimalarial evaluation and molecular modeling studies of hydroxyethylpiperazines, potential aspartyl protease inhibitors, Part 2. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 3816-3820.
- Daugherty, J. R., *et al.* (1997). Baculovirus-Mediated expression of *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen 175 polypeptides and their recognition by human antibodies. *American Society for Microbiology*, 65, 3631–3637.
- DeLano, W. L. (2004). *PyMOL User's Guide*. DeLano Scientific LLC. Diunduh pada 22 Desember 2011 pukul 15:05 dari <http://pymol.sourceforge.net/newman/userman.pdf>
- Ersmark, K., *et al.* (2005). Synthesis of malarial plasmepsin inhibitors and prediction of binding modes by molecular dynamics simulations. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48, 6090-6106.
- Ferreira, J. F. S., Luthria, D. L., Sasaki, T., & Heyerick, A. (2010). Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. *Molecules*, 15, 3135-3170.
- Friedman, R. & Caflisch, A. (2007). The protonation state of the catalytic aspartates in plasmepsin II. *FEBS Letters*, 581, 4120-4124.
- Friedman, R. & Caflisch, A. (2009). Discovery of plasmepsin inhibitors by fragment-based docking and consensus scoring. *ChemMedChem*, 4, 1317–1326.
- GOLD support-scientific FAQs*. (2010). Diunduh pada 30 Desember 2011 pukul 8.45 dari The Cambridge Crystallographic Data Centre: http://www.ccdc.cam.uk/products/life_sciences/faqs

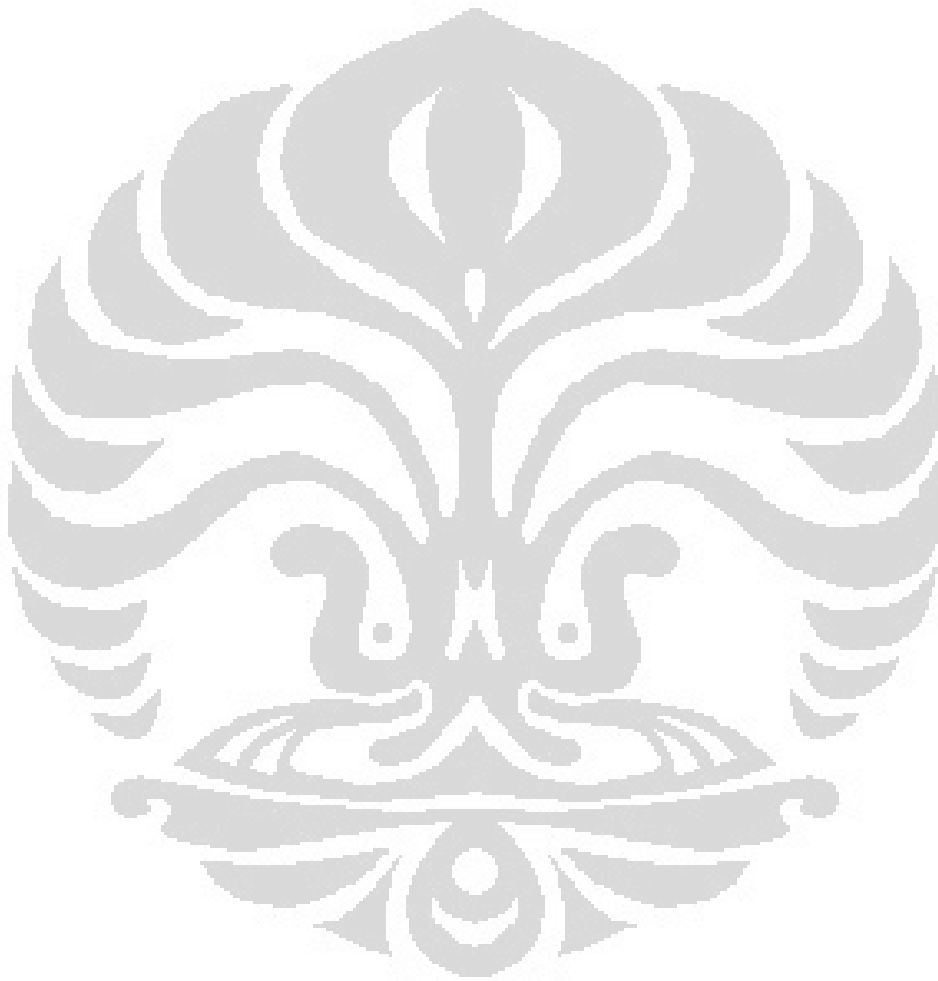
- GOLD-protein ligand docking*. (2010). Diunduh pada 30 Desember 2011 pukul 8.45 dari The Cambridge Crystallographic Data Centre: http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/GOLD
- Gupta, D., Yedidi, R. S., Varghese, S., Kovari, L. C., & Woster, P. M. (2010). Mechanism-based inhibitors of the aspartyl protease plasmepsin II as potential antimalarial agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53, 4234-4247.
- Holtje, H. D., Sippl, W., Rognan, D., & Folkers, G. (2008). *Molecular Modeling: Basic Principles and Applications, 3rd Edition*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Irwin, J. J. (2008). Community benchmarks for virtual screening. *Journal of Computer Aided Molecular Design*, 22, 193-199.
- Jacq, N., et al. (2008). Grid-enabled virtual screening against malaria. *J Grid Computing*, 6, 29-43.
- Jenwitheesuk, E., Horst, J. A., Rivas, K. L., Voorhis, W. C. V., & Samudrala, R. (2008). Novel paradigms for drug discovery: Computational multitarget screening. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29, 62-71.
- Kamiya, K., et al. (2000). Flavonoid glucuronides from *Helicteres isora*. *Phytochemistry*, 57, 297-301.
- Kang, L., Li, H., Jiang, H., & Wang, X. (2008). An improved adaptive genetic algorithm for protein-ligand docking. *Journal of Computer Aided Molecular Design*. DOI 10.1007/s10822-008-9232-5.
- Kirchmair, J., Markt, P., Distinto, S., Wolber, G., & Langer, T. (2008). Evaluation of the performance of 3D virtual screening protocols: RMSD comparisons, enrichment assessments, and decoy selection-what can we learn from earlier mistakes? *Journal of Computer Aided Molecular Design*, 22, 213-228.

- Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., & Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and application, *Nature Reviews*, 3, 935-949.
- Lim, S. S., Kim, H., & Lee, D. (2007). *In vitro* antimalarial activity of flavonoid and chalcones. *Bull. Korean Chem. Society*, 28, 2495-2497.
- Liu, K. C. C., Yang, S., Roberts, M. F., Elford, B. C., & Phillipson, J. D. (1992). Antimalarial activity of *Artemisia annua* flavonoids from whole plants and cell culture. *Plant Cell Reports*, 11, 637-640.
- Lodish, H., *et al.* (2008). *Molecular Cell Biology Sixth Edition*. New York: W.H. Freeman and Company.
- Maurice, H. B. (2010). Virtual high screening combining docking and 3D QSAR protocols in identifying plasmepsin II enzyme inhibitors of *Plasmodium falciparum*. *St. John's University of Tanzania*.
- Marcus, B. (2009). *Deadly Diseases and Epidemics Malaria Second Edition*. New York: Chelsea House.
- Marrero-Ponce, Y., *et al.* (2005). Ligand-based virtual screening and *in silico* design of new antimalarial compounds using nonstochastic and stochastic total and atom-type quadratic maps. *J. Chem. Inf. Model*, 45, 1082-1100.
- Miura, T., *et al.* (2010). Improvement of both plasmepsin inhibitory activity and antimalarial activity by 2-aminoethylamino substitution. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20, 4836-4839.
- Morris, J. B. & Wang, M. L. (2007). Anthocyanin and potential therapeutic traits in *Clitoria*, *Desmodium*, *Corchorus*, *Catharanthus* and *Hibiscus* Species. *Med. and Nutraceutical Plants*, 756, 381-388.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., & Rodwell, V. W. (2003). *Harper's Illustrated Biochemistry Twenty-Sixth Edition*. USA: McGraw-Hill Companies.

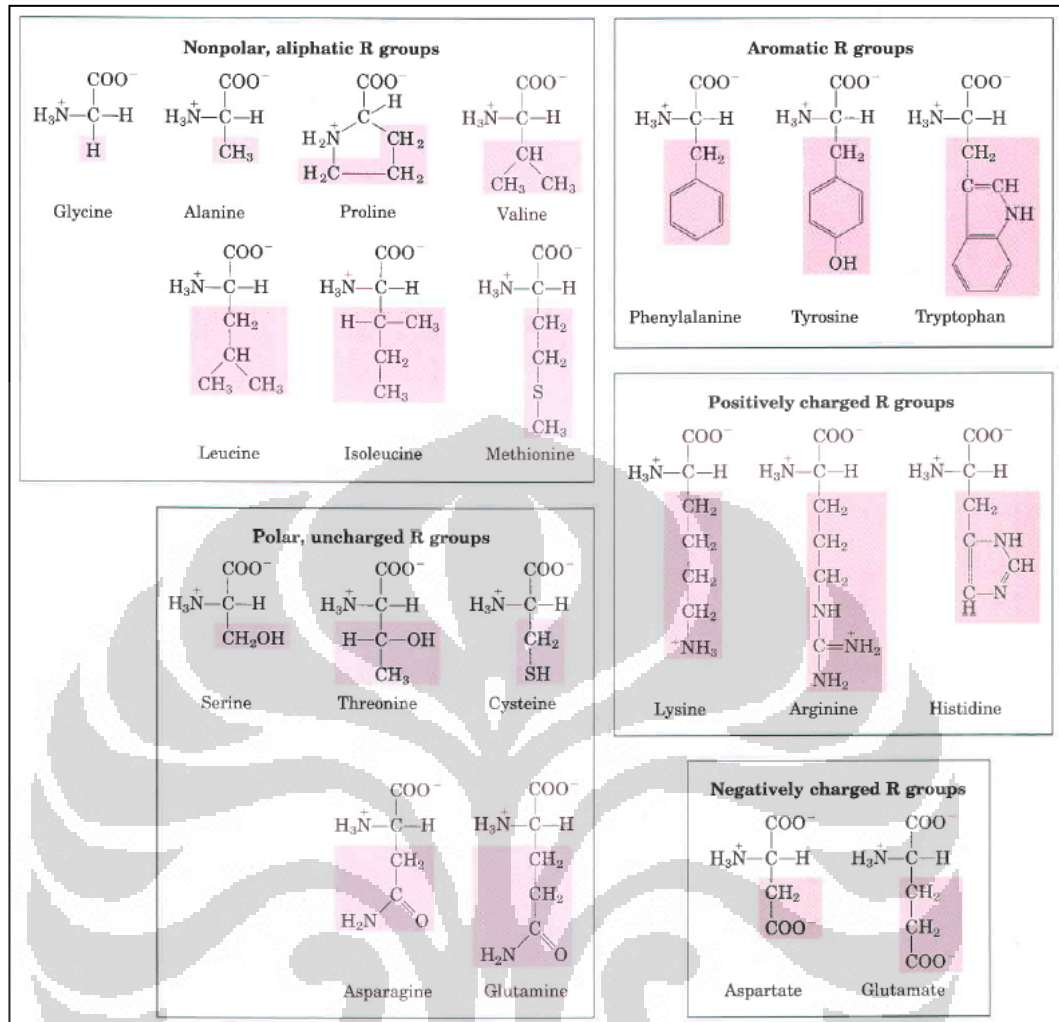
- Nayak, A. P., Tiyaboonchai, W., Patankar, S., Madhusudhan, B., & Souto, E. B. (2010). Curcuminoids-loaded lipid nanoparticles: Novel approach towards malaria treatment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81, 263–273.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry Fifth Edition*. New York: W.H. Freeman and Company.
- Nervall, M., Hanspers, P., Carlsson, J., Boukharta, L., & Aqvist, J. (2008). Predicting binding modes from free energy calculations. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51, 2657-2667.
- Park, H., Lee, J., & Lee, S. (2006). Critical assessment of the automated AutoDock as a new docking tool for virtual screening. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 65, 549-554.
- Pedretti, A., Mazzolari, A., & Vistoli, G. (2004). Vega ZZ: a versatile toolkit for drug design and protein modeling. *Journal of Computer Aided Molecular Design*, 18, 167-173.
- Perlmann, P. & Troye-Blomberg, M. (2002). *Malaria Immunology: 2nd, revised, and enlarged edition*. Basel: Karger.
- Petsko, G., & Ringe, G. (2003). *Protein Structure and Function (Primers in Biology)*. United Kingdom: New Science Press.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25, 1605-1612.
- Pripp, A. H. (2006). Docking and virtual screening of ACE inhibitory dipeptides. *Eur Food Res Technol*, 225, 589-592.
- Santos-Magalhaes, N. S. & Mosqueira, V. C. F. (2010). Nanotechnology applied to the treatment of malaria. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 560-575.

- Silva, A. M., *et al.* (1996). Structure and inhibition of plasmepsin II, a hemoglobin-degrading enzyme from *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 93, 10034-10039.
- Smith, H. J. & Simons, C. (2005). *Enzymes and Their Inhibition: Drug Development*. Florida: CRC Press.
- Sullivan, D. J. & Krishna, S. (2005). *Malaria: Drugs, Disease, and Post-genomic Biology*. Berlin: Springer.
- Thomas, G. (2003). *Fundamental of Medicinal Chemistry*. Sussex: John Wiley & Sons.
- Tiikkainen, P. (2010). Study of ligand-based virtual screening tools in computer-aided drug design. *Medica-Odontologica*, 1-98.
- Trott, O. & Olson, A. J. (2009). Software news and update AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *Journal of Computational Chemistry*, 0, 1-7.
- Walle, T., Browning, A. M., Steed, L. L., Reed, S. G., & Walle, U. K. (2005). Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *American Society for Nutritional Sciences*, 48-52.
- Wang, R. & Wang, S. (2001). How does consensus scoring work for virtual library screening? An idealized computer experiment. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 41, 1422-1426.
- World Health Organization. (2010). *Guidelines for the Treatment of Malaria, Second Edition*. Jenewa: World Health Organization.
- Yanuar, A., Mun'im, A., Lagho, A. B. A., Syahdi, R. R., Rahmat, M., & Suhartanto, H. (2011). Medicinal plants database and three dimensional structure of the chemical compounds from medicinal plants in Indonesia. *International Journal of Computer Science Issues*, 8, 180-183.

Zucker, J. R. (1996). Changing patterns of autochthonous malaria transmission in the United States: A review of recent outbreaks. *Emerging Infectious Diseases*, 2, 37-43.

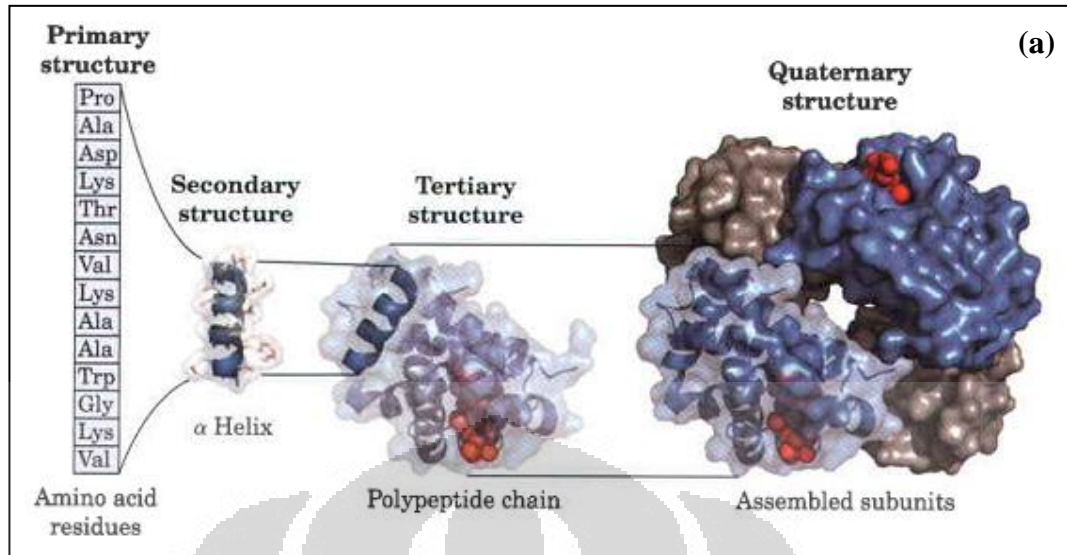


Universitas Indonesia

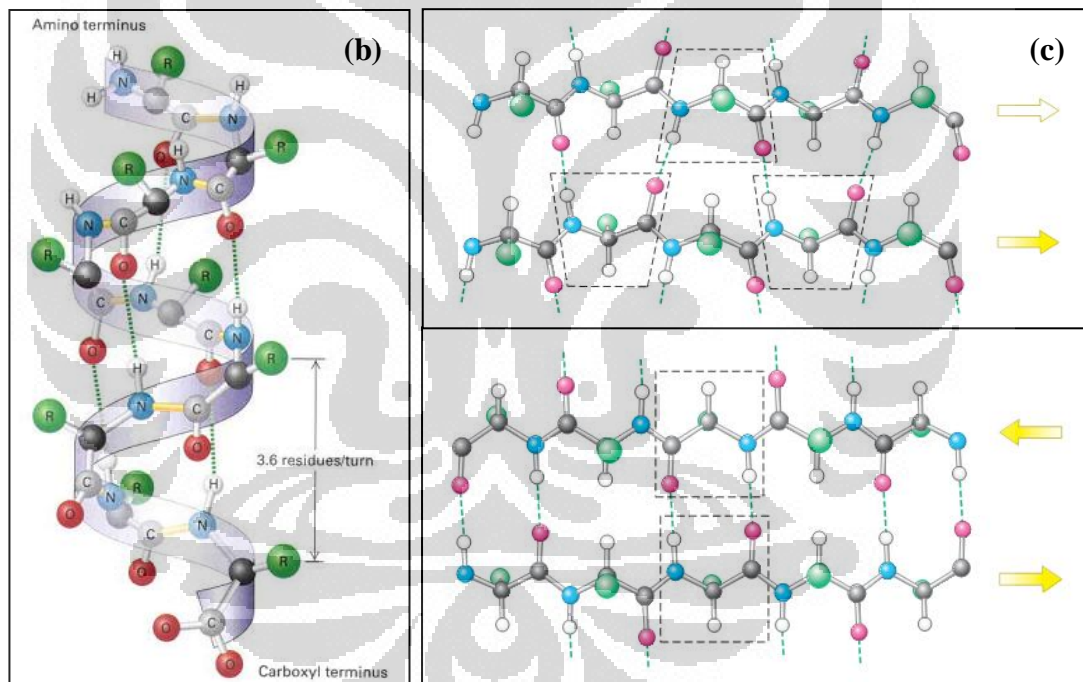


[Sumber: Nelson & Cox, 2008]

Gambar 2.6. Dua puluh jenis asam amino penyusun protein



[Sumber: Nelson & Cox, 2008]

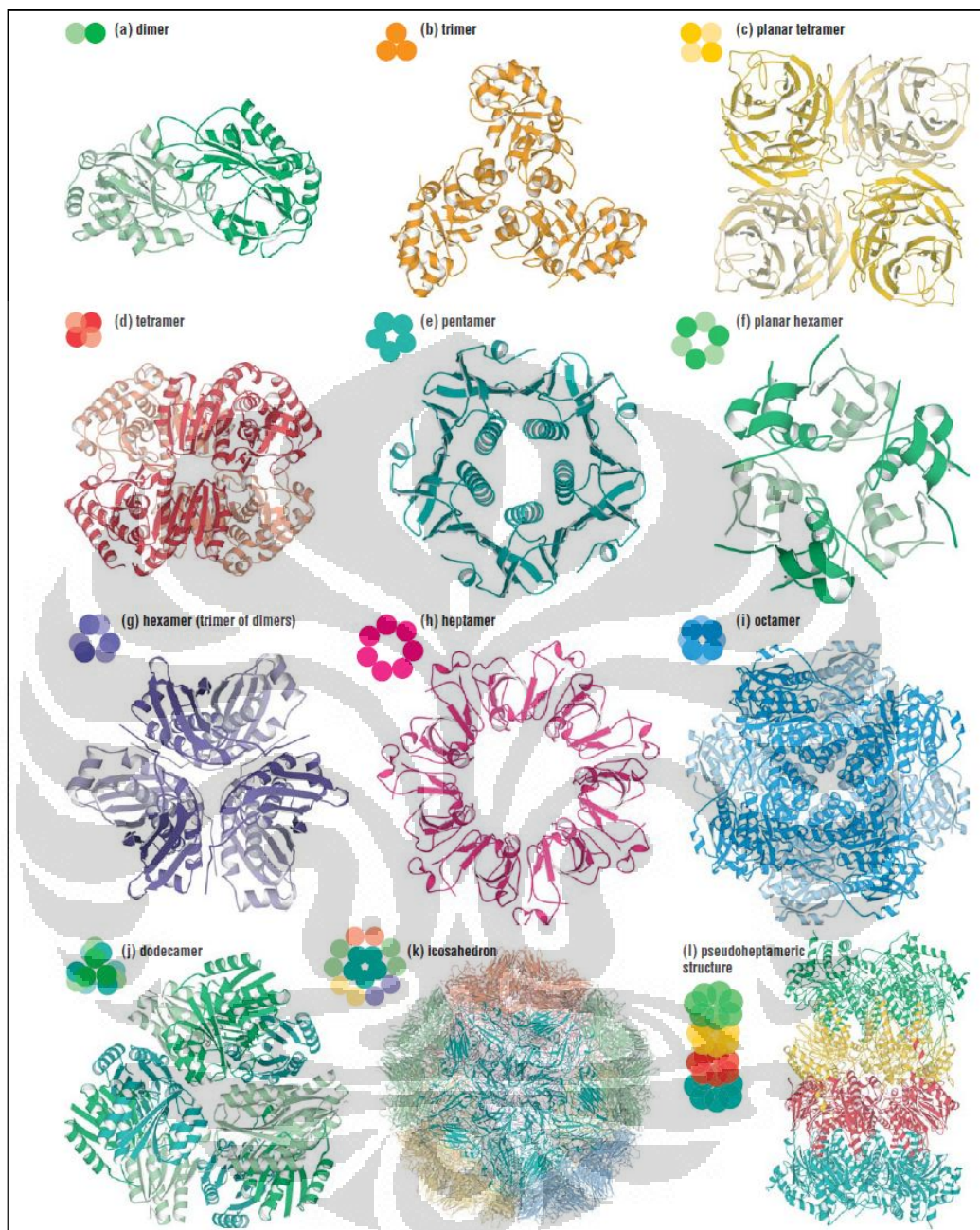


[Sumber: Lodish, *et al.*, 2008]

[Sumber: Berg, Tymoczko, & Stryer, 2007]

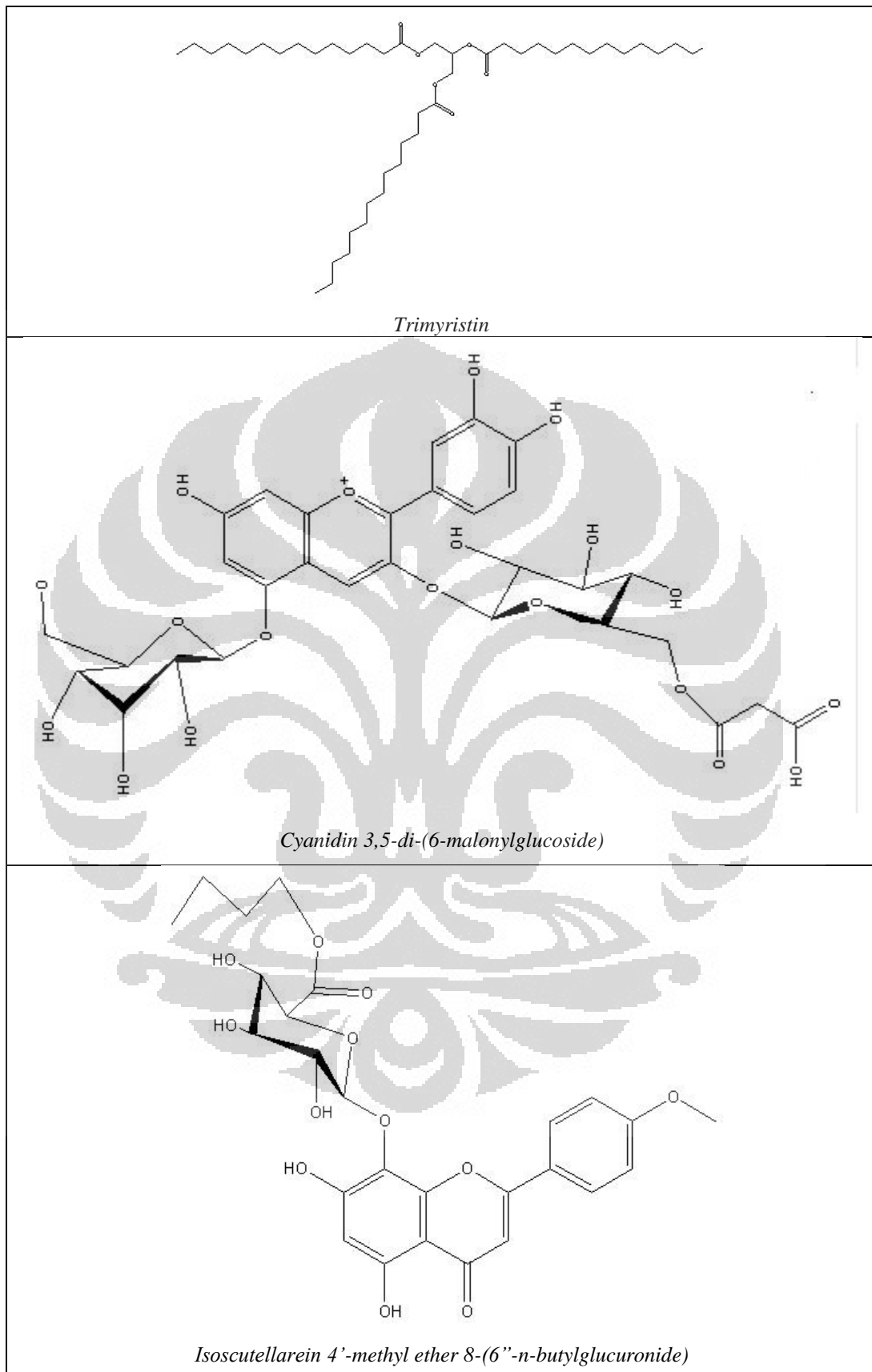
Gambar 2.7. Struktur protein (a) empat tingkatan struktur protein, (b) heliks- α , dan (c) lembaran- β paralel dan anti-paralel

(lanjutan)

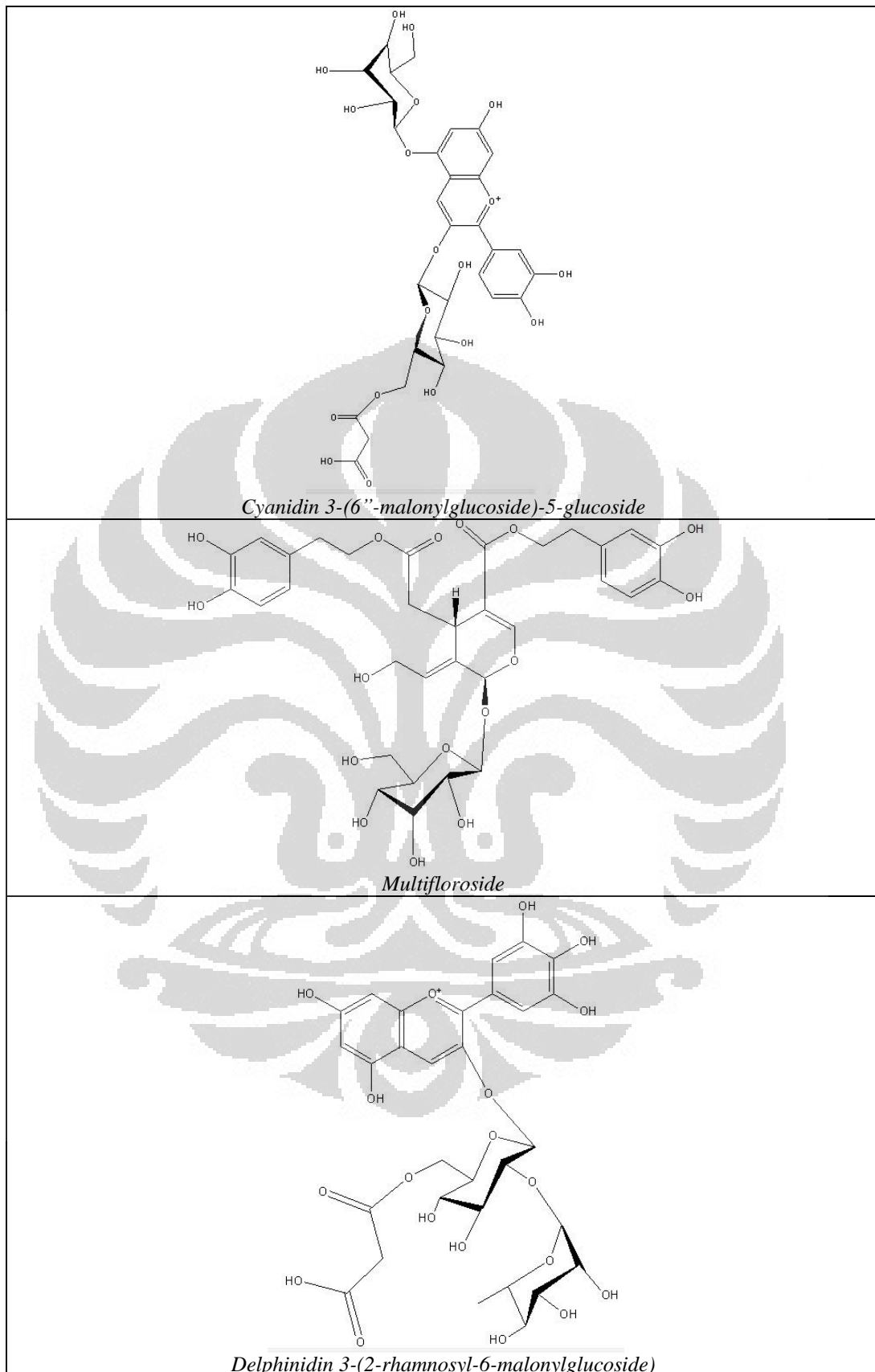


[Sumber: Petsko & Ringe, 2003]

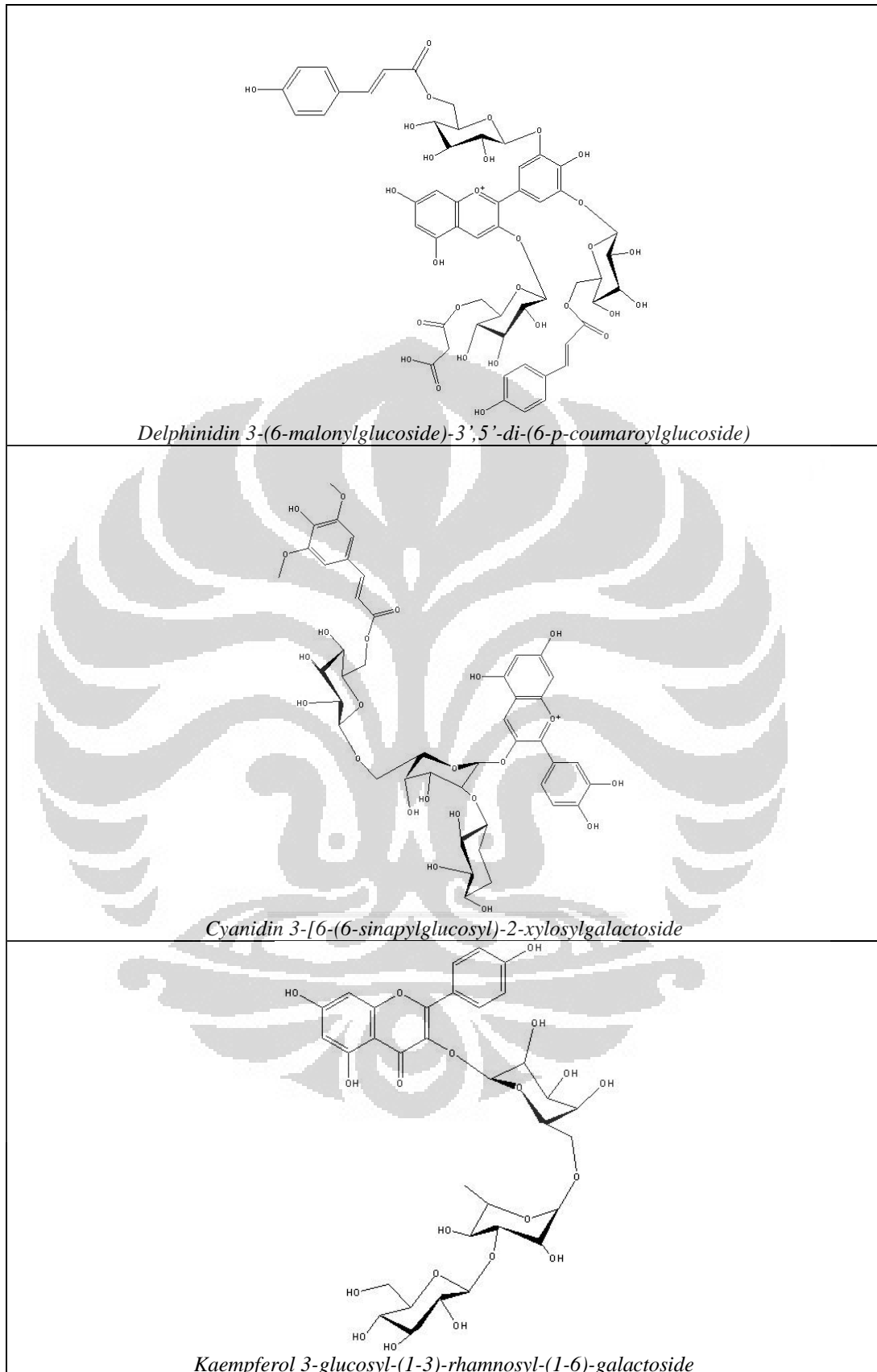
Gambar 2.7. (d) struktur oligomer



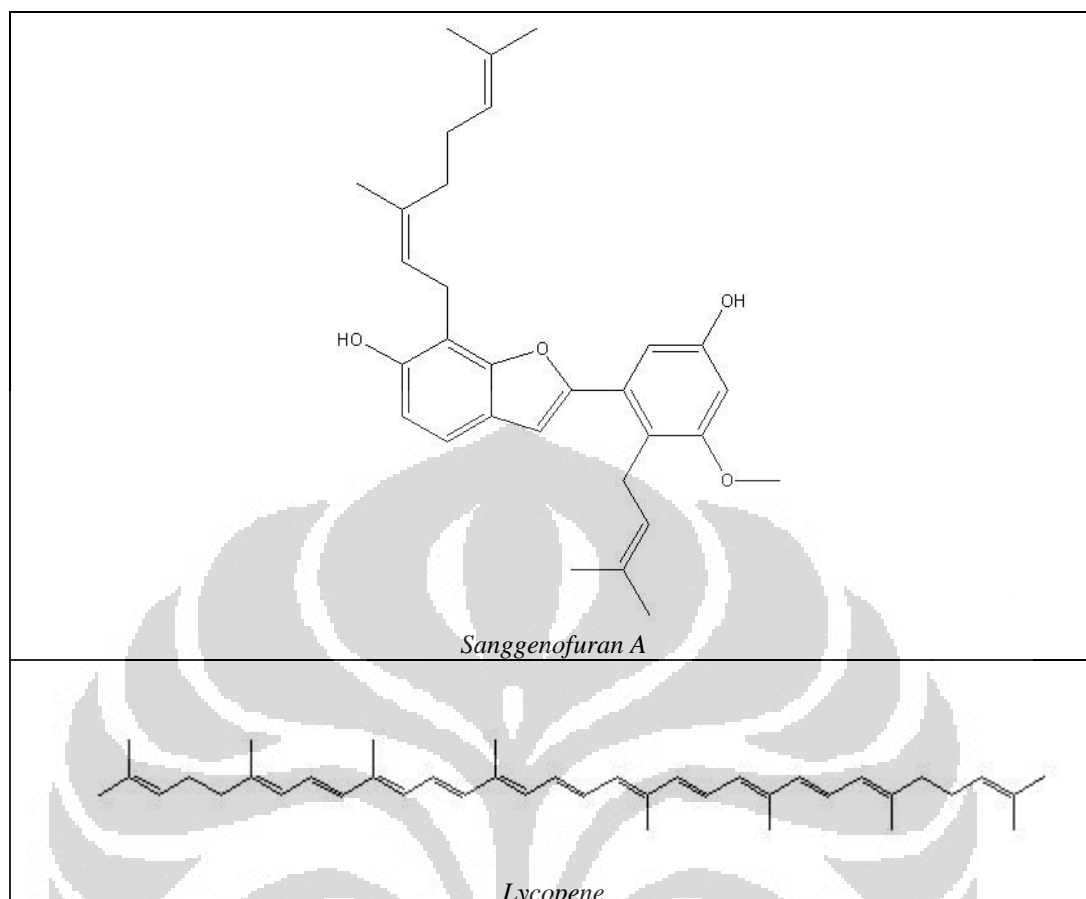
Gambar 4.5. Rumus struktur kandidat inhibitor hasil penapisan *in silico*



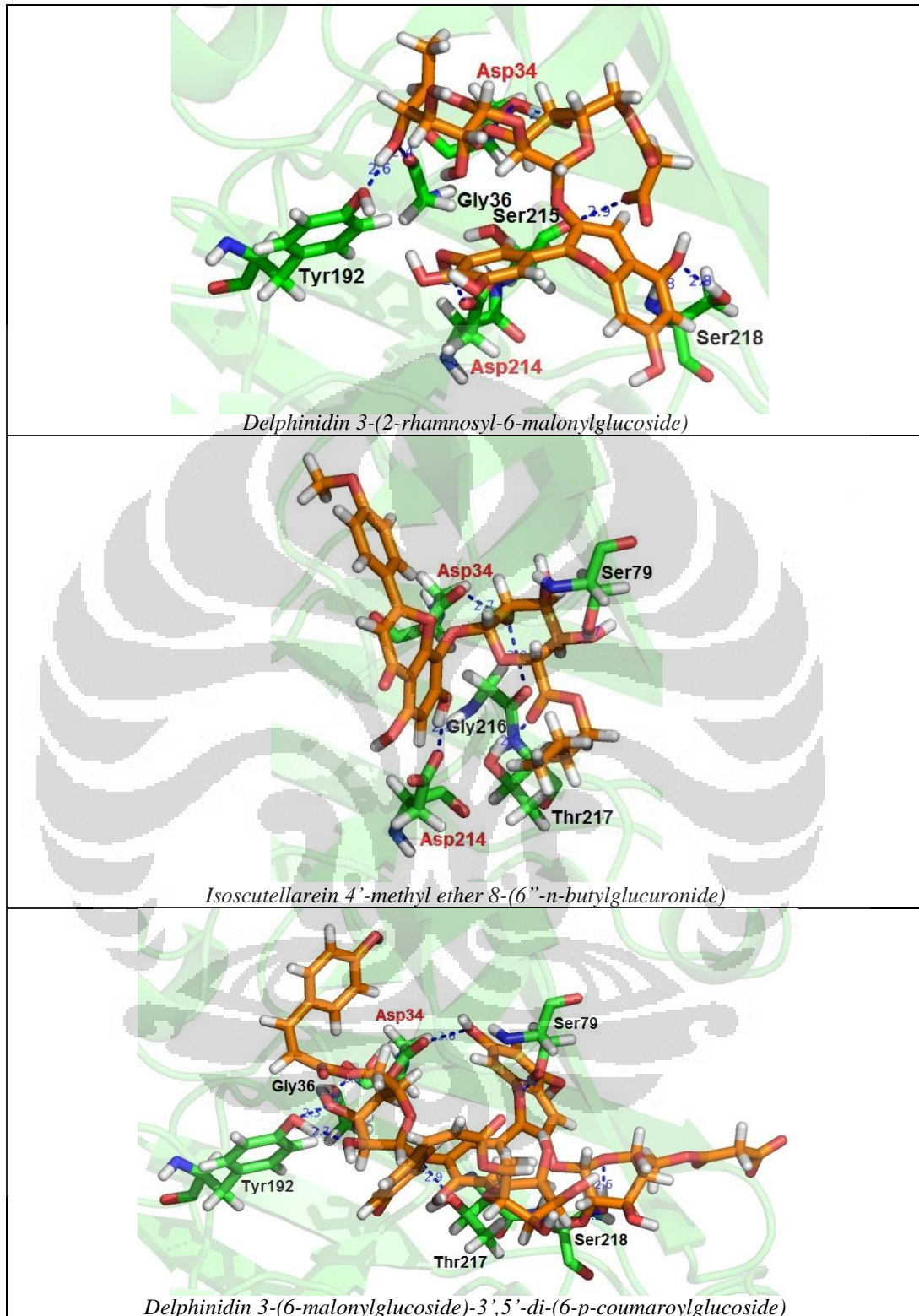
Gambar 4.6. Rumus struktur kandidat inhibitor hasil penapisan *in silico*



Gambar 4.7. Rumus struktur kandidat inhibitor hasil penapisan *in silico*



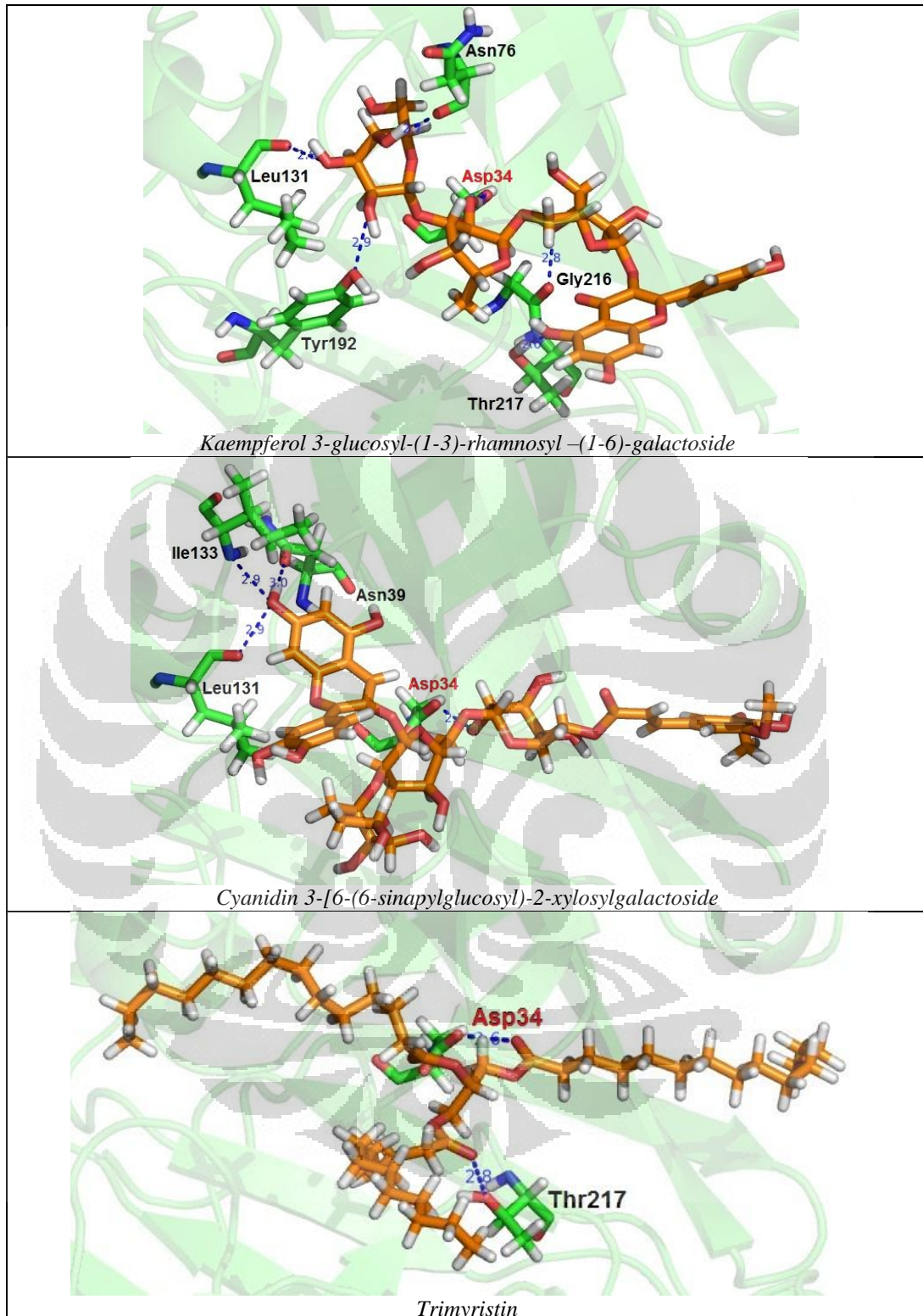
Gambar 4.8. Rumus struktur kandidat inhibitor hasil penapisan *in silico*



[Sumber: Olahan penulis dengan PyMOL]

Keterangan: warna merah ditunjukkan oleh residu katalitik yaitu Asp34 dan Asp214

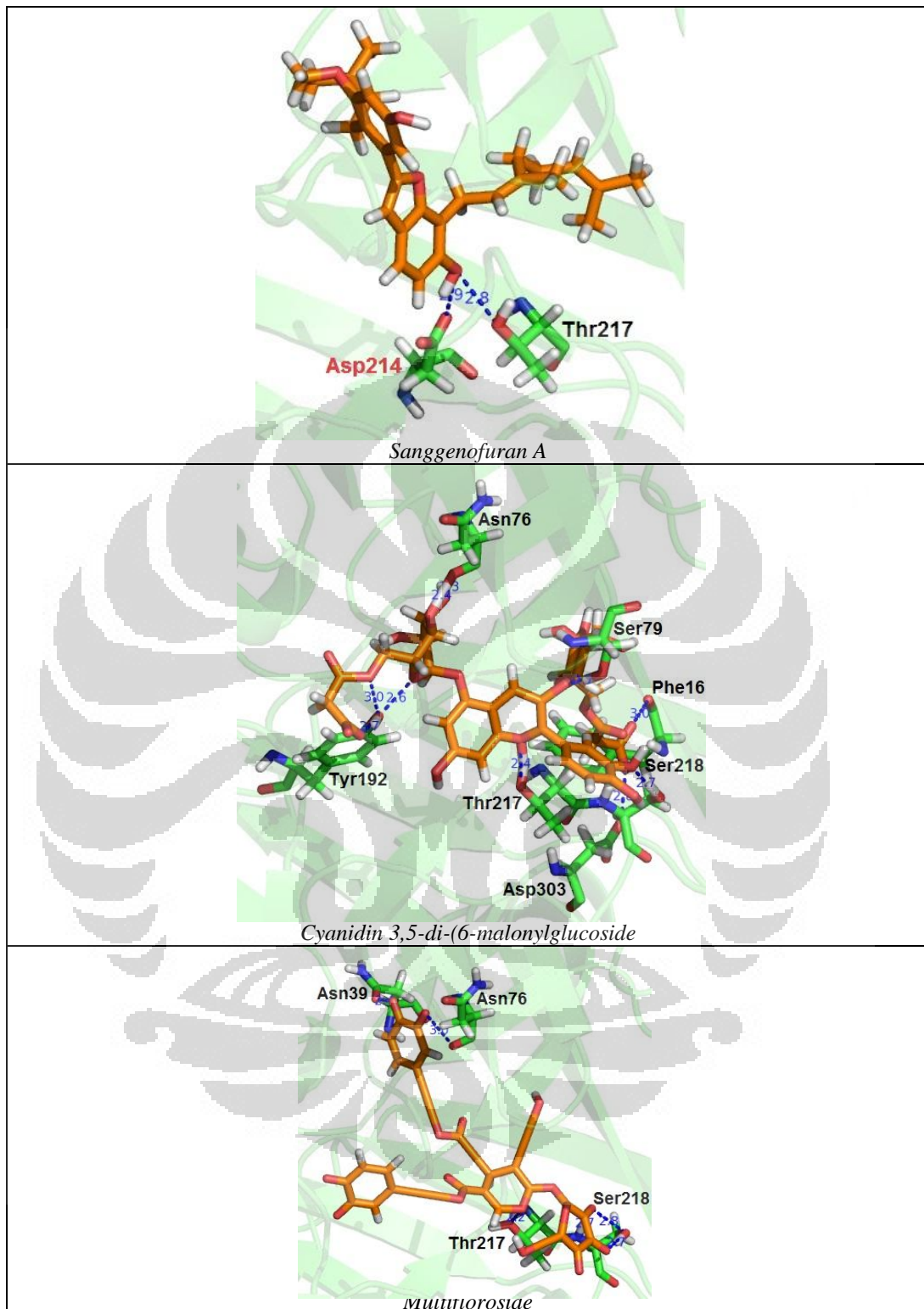
Gambar 4.9. Interaksi kandidat inhibitor plasmepsin dengan beberapa residu asam amino pada plasmepsin



[Sumber: Olahan penulis dengan *PyMOL*]

Keterangan: Warna merah ditunjukkan oleh residu katalitik yaitu Asp34

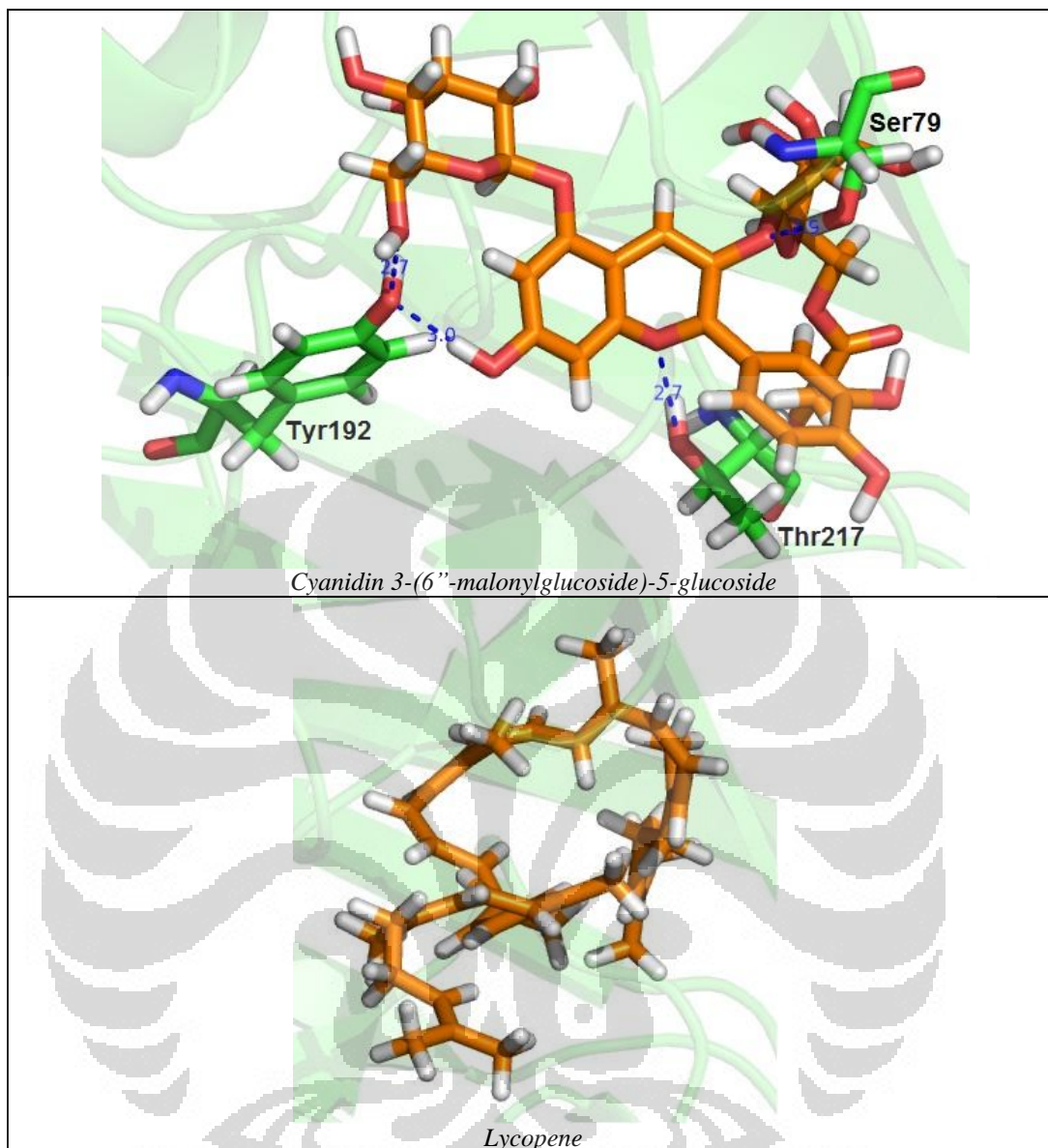
Gambar 4.10. Interaksi kandidat inhibitor plasmepsin dengan beberapa residu asam amino pada plasmepsin



[Sumber: Olahan penulis dengan *PyMOL*]

Keterangan: Warna merah ditunjukkan oleh residu katalitik yaitu Asp214

Gambar 4.11. Interaksi kandidat inhibitor plasmepsin dengan beberapa residu asam amino pada plasmepsin



[Sumber: Olahan penulis dengan *PyMOL*]

Keterangan: Senyawa di atas tidak memiliki ikatan sama sekali dengan residu katalitik baik Asp34 maupun Asp214

Gambar 4.12. Interaksi kandidat inhibitor plasmepsin dengan beberapa residu asam amino pada plasmepsin

Tabel 4.6. Hasil penapisan *in silico* 1-2 dengan menggunakan basis data tanaman obat Indonesia

Peringkat	Hasil 1	GOLDScore	Hasil 2	GOLDScore
1	<i>Trimyristin</i>	85,0624	<i>Delphinidin 3-(6-malonylglucoside)-3',5'-di-(6-p-coumaroylglucoside)</i>	98,2836
2	<i>Multifloroside</i>	85,0341	<i>Trimyristin</i>	95,5180
3	<i>Artonin C</i>	85,0216	<i>Delphinidin 3-(2-rhamnosyl-6-malonylglucoside)</i>	86,0711
4	<i>Isoscutellarein 4'-methyl ether 8-(6''-n-butylglucuronide)</i>	82,2019	<i>Artonin C</i>	83,8613
5	<i>Cyanidin 3-(6''-malonylglucoside)-5-glucoside</i>	81,0973	<i>Cyanidin 3-[6-(6-sinapylglucosyl)-2-xylosylgalactoside]</i>	83,5469
6	<i>Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside)</i>	81,0598	<i>Rubixanthin</i>	82,3588
7	<i>Nervonic acid</i>	79,4303	<i>Cyanidin 7-(3-glucosyl-6-malonylglucoside)-4'-glucoside</i>	82,2995
8	<i>Sanggenofuran A</i>	78,4677	<i>Multifloroside</i>	81,8853
9	<i>Zeta-carotene</i>	78,3908	<i>Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside)</i>	81,8711
10	<i>9-methylthiononyl glucosinolate</i>	78,3852	<i>Isoscutellarein 4'-methyl ether 8-(6''-n-butylglucuronide)</i>	81,1257

Tabel 4.7. Hasil penapisan *in silico* 3-4 dengan menggunakan basis data tanaman obat Indonesia

Peringkat	Hasil 3	GOLDScore	Hasil 4	GOLDScore
1	<i>Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside)</i>	90,8304	<i>Delphinidin 3-(2-rhamnosyl-6-malonylglucoside)</i>	88,4782
2	<i>Trimyristin</i>	84,4449	<i>Trimyristin</i>	87,3441
3	<i>Cyanidin 3-(6''-malonylglucoside)-5-glucoside</i>	84,3193	<i>Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside)</i>	86,2619
4	<i>Kaempferol 3-glucosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-galactoside</i>	83,4469	<i>Cyanidin 3-(6''-malonylglucoside)-5-glucoside</i>	83,9616
5	<i>Delphinidin 3-(2-rhamnosyl-6-malonylglucoside)</i>	83,2210	<i>Kaempferol 3-glucosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-galactoside</i>	81,8264
6	<i>Multifloroside</i>	82,3774	<i>Isoscoparin 2''-(6-(E)-p-coumaroylglucoside)</i>	80,9881
7	<i>Isoscutellarein 4'-methyl ether 8-(6''-n-butylglucuronide)</i>	82,3728	<i>Lycopene</i>	79,4639
8	<i>Quercetin 3-(6'''-sinapylglucosyl)(1-2)-galactoside</i>	79,6329	<i>Peonidin 3-(6'-malonylglucoside)-5-glucoside</i>	78,7964
9	<i>Gamma-carotene</i>	79,1206	<i>Sylvestroside I</i>	78,7617
10	<i>Artonin X</i>	78,5275	<i>Isoscutellarein 4'-methyl ether 8-(6''-n-butylglucuronide)</i>	78,5953

Tabel 4.8. Hasil penapisan *in silico* 5-6 dengan menggunakan basis data tanaman obat Indonesia

Peringkat	Hasil 5	GOLDScore	Hasil 6	GOLDScore
1	<i>Cyanidin 3-(6''-malonylglucoside)-5-glucoside</i>	82,5797	<i>Delphinidin 3-(6-malonylglucoside)-3',5'-di-(6-p-coumaroylglucoside)</i>	87,5755
2	<i>Sanggenofuran A</i>	82,3822	<i>Delphinidin 3-(2-rhamnosyl-6-malonylglucoside)</i>	87,0613
3	<i>Kaempferol 3-glucosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-galactoside</i>	81,6537	<i>Cyanidin 3-[6-(6-ferurylglucosyl)-2-xylosylgalactoside</i>	86,3750
4	<i>Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside)</i>	80,3284	<i>Cyanidin 3-[6-(6-sinapylglucosyl)-2-xylosylgalactoside</i>	83,9307
5	<i>8-methylsulfinyloctyl glucosinolate</i>	79,9607	<i>Lycopene</i>	82,8542
6	<i>Isoscutellarein 4'-methyl ether 8-(6''-n-butylglucuronide)</i>	79,1203	<i>Cyanidin 3-(6''-malonylglucoside)-5-glucoside</i>	81,9687
7	<i>Trimyristin</i>	78,6375	<i>Sanggenofuran A</i>	81,8871
8	<i>Multifloroside</i>	78,5102	<i>Squamocin</i>	81,5000
9	<i>Zeta-carotene</i>	78,2677	<i>Kaempferol 3-glucosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-galactoside</i>	81,4833
10	<i>Cyanidin 3,4'-diglucoside</i>	78,2630	<i>Multifloroside</i>	80,8414

Tabel 4.9. Hasil penapisan *in silico* 7-8 dengan menggunakan basis data tanaman obat Indonesia

Peringkat	Hasil 7	GOLDScore	Hasil 8	GOLDScore
1	<i>Delphinidin 3-(2-rhamnosyl-6-malonylglucoside)</i>	89,9738	<i>Trimyrustin</i>	87,7456
2	<i>Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside)</i>	87,2489	<i>Multifloroside</i>	85,8965
3	<i>Phytofluene</i>	83,8060	<i>Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside)</i>	84,3891
4	<i>Cyanidin 3-(3'',6''-dimalonylglucoside)</i>	82,9971	<i>Isoscutellarein 4'-methyl ether 8-(6''-n-butylglucuronide)</i>	82,7014
5	<i>Trimyrustin</i>	81,4020	<i>Phytofluene</i>	81,0050
6	<i>Occidentoside</i>	80,8303	<i>Cyanidin 3-[6-(6-sinapylglucosyl)-2-xylosylgalactoside]</i>	80,4397
7	<i>Cyanidin 3-(6''-malonylglucoside)-5-glucoside</i>	80,7617	<i>8-methylsulfinyloctyl glucosinolate</i>	80,3753
8	<i>Isoscutellarein 4'-methyl ether 8-(6''-n-butylglucuronide)</i>	80,1742	<i>Lycopene</i>	79,7741
9	<i>Quercetin 3-sophoroside-7-glucoside</i>	80,1727	<i>8-methylthio-octyl glucosinolate</i>	78,9566
10	<i>Nirurin</i>	79,5798	<i>Capsanthin</i>	78,8113

Tabel 4.10. Hasil penapisan *in silico* 9-10 dengan menggunakan basis data tanaman obat Indonesia

Peringkat	Hasil 9	GOLDScore	Hasil 10	GOLDScore
1	<i>Delphinidin 3-(6-malonylglucoside)-3',5'-di-(6-p-coumaroylglucoside)</i>	97,2609	<i>Delphinidin 3-(2-rhamnosyl-6-malonylglucoside)</i>	92,3481
2	<i>Cyanidin 3-(6''-malonylglucoside)-5-glucoside</i>	87,1790	<i>Cyanidin 3-[6-(6-sinapylglucosyl)-2-xylosylgalactoside]</i>	90,1797
3	<i>Isoscutellarein 4'-methyl ether 8-(6''-n-butylglucuronide)</i>	82,3898	<i>Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside)</i>	87,2563
4	<i>Lycopene</i>	82,1553	<i>Trimyrustin</i>	87,2202
5	<i>Sanggenofuran A</i>	81,9678	<i>Delphinidin 3-(6-malonylglucoside)-3',5'-di-(6-p-coumaroylglucoside)</i>	87,1881
6	<i>Trimyrustin</i>	81,5820	<i>Multifloroside</i>	81,6042
7	<i>Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside)</i>	8,9185	<i>Artonin C</i>	80,8983
8	<i>Cyanidin 3-(3'',6''-dimalonylglucoside)</i>	80,8936	<i>Cyanidin 3-(3'',6''-dimalonylglucoside)</i>	80,3475
9	<i>Quercetin 3-sophoroside-7-glucoside</i>	80,4577	<i>Peonidin 3-(6'-malonylglucoside)-5-glucoside</i>	79,0320
10	<i>9-methylthiononyl glucosinolate</i>	80,3713	<i>Isoscutellarein 4'-methyl ether 8-(6''-n-butylglucuronide)</i>	78,7433

Tabel 4.12. Kandidat inhibitor berdasarkan hasil penapisan *in silico*

Peringkat	Ligan	n	GOLDScore									Rata-rata GOLDScore	SD	KV
1	<i>Trimyristin</i>	9	85,0624	95,5180	84,4449	87,3441	78,6375	81,4020	87,7456	81,5820	87,2202	85,4396	4,90	5,74
2	<i>Cyanidin 3,5-di-(6-malonyl glucoside)</i>	9	81,0598	81,8711	90,8304	86,2619	80,3284	87,2489	84,3891	80,9185	87,2563	84,4627	3,66	4,34
3	<i>Isoscutellarein 4'-methyl ether 8-(6"-n-butyl glucuronide)</i>	9	82,2019	81,1257	82,3728	78,5953	79,1203	80,1742	80,1742	82,3898	78,7433	80,825	1,70	2,10
4	<i>Cyanidin 3-(6"-malonyl glucoside)-5-glucoside</i>	7	81,0973	84,3193	83,9616	82,5797	81,9687	80,7617	87,1790			83,1239	2,23	2,69
5	<i>Multifloroside</i>	7	85,0341	81,8853	82,3774	78,5102	80,8414	85,8965	81,6042			82,307	2,50	3,04
6	<i>Delphinidin 3-(2-rhamnosyl-6-malonyl glucoside)</i>	6	86,0711	83,2210	88,4782	87,0613	89,9738	92,3481				87,8589	3,17	3,61
7	<i>Delphinidin 3-(6-malonylglucoside)</i>	4	98,2836	87,5755	97,2609	87,1881						92,577	6,02	6,50

	<i>)-3',5'-di-(6-p-coumaroyl glucoside)</i>												
8	<i>Cyanidin 3-[6-(6-sinapyl glucosyl)-2-xylosyl galactoside]</i>	4	83,5469	86,3750	80,4397	90,1797					84,5243	4,08	4,83
9	<i>Kaempferol 3-glucosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-galactoside</i>	4	83,4469	81,8264	81,6537	81,4833					82,1026	0,91	1,10
10	<i>Sanggenofuran A</i>	4	78,4677	82,3822	81,8871	81,9678					81,1762	1,82	2,24
11	<i>Lycopene</i>	4	79,4639	82,8542	79,7741	82,1553					81,0619	1,70	2,09

Keterangan: n= kemunculan dalam percobaan (total percobaan= 10)

Tabel 4.13. Kandidat inhibitor hasil penapisan *in silico* beserta famili dan spesies tanaman asal

No	Senyawa	Famili	Spesies	Nama Lain
1	<i>Trimyristin</i>	Euphorbiaceae	<i>Aleurites moluccana</i>	<i>Aleurites javanica, Aleurites tribolo, Camirium</i>
		Myristicaceae	<i>Myristica fragrans</i>	-
2	<i>Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside)</i>	Lamiaceae / Labiatae	<i>Thymus serpyllum</i>	
3	<i>Isoscutellarein 4'-methyl ether 8-(6"-n-butylglucuronide)</i>	Sterculiaceae	<i>Helicteres isora</i>	<i>Fructus inpius</i>
4	<i>Cyanidin 3-(6"-malonylglucoside)-5-glucoside</i>	Lamiaceae / Labiatae	<i>Thymus serpyllum</i>	
5	<i>Multifloroside</i>	Oleaceae	<i>Jasminum multiflorum</i>	<i>Jasminum acuminatissimum, Jasminum fraternum, Jasminum glabriusculum, Jasminum glabrum, Jasminum heteropleurum, Jasminum ligustrinum, Jasminum mixtinervium, Jasminum pedale, Jasminum pendulum, Jasminum pubescens, Jasminum quinquenervium, Jasminum sub pubescens, Jasminum subelongatum, Jasminum vulcanicum</i>
6	<i>Delphinidin 3-(2-rhamnosyl-6-malonylglucoside)</i>	Fabaceae	<i>Clitoria ternatea</i>	<i>Flos coeruleus</i>
7	<i>Delphinidin 3-(6-malonylglucoside)-3',5'-di-(6-p-coumaroylglucoside)</i>	Fabaceae	<i>Clitoria ternatea</i>	<i>Flos coeruleus</i>
8	<i>Cyanidin 3-[6-(6-</i>	Apiaceae /	<i>Apium graveolens</i>	

	<i>sinapylglucosyl</i> -2- <i>xylosylgalactoside</i>	Umbelliferae		
		Apiaceae / Umbelliferae	<i>Foeniculum vulgare</i>	<i>Foeniculum commune, Foeniculum capillaceum, Foeniculum dulce, Foeniculum foeniculum, Foeniculum panmorium, Foeniculum piperitum, Foeniculum sativum, Anethum foeniculum, Anethum rupestre, Foeniculum azoricum, Foeniculum officinale, Ligusticum divaricatum, Meum Foeniculum, Ozodia foeniculacea, Selinum Foeniculum</i>
9	<i>Kaempferol 3-glucosyl</i> - <i>(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-galactoside</i>	Theaceae	<i>Camellia sinensis</i>	<i>Camellia bohea, Camellia sinensis, Camellia thea, Camellia theifera, Thea cantoniensis, Thea viridis, Thea assamica, Thea chinensis, Thea cochinchinensis, Thea sinensis</i>
10	<i>Sanggenofuran A</i>	Moraceae	<i>Morus australis</i>	<i>Morus alba, Morus atropurpurea, Morus constantinopalitana, Morus indica, Morus rubra</i>
11	<i>Lycopene</i>		<i>Brassica napus</i>	-
			<i>Diospyros Kaki</i>	-
			<i>Momordica charantia</i>	<i>Momordica jagorana, Amara indica, Amara sinica, Cucumis africanus, Momordica cylindria, Momordica balsamina, Momordica operculata</i>
			<i>Psidium guajava</i>	<i>Cujavillus agrestis, Cujavillus domestica, Psidium aromaticum, Psidium pomiferum, Psidium pyriferum</i>

[Sumber: <http://herbaldb.farmasi.ui.ac.id> telah diolah kembali]

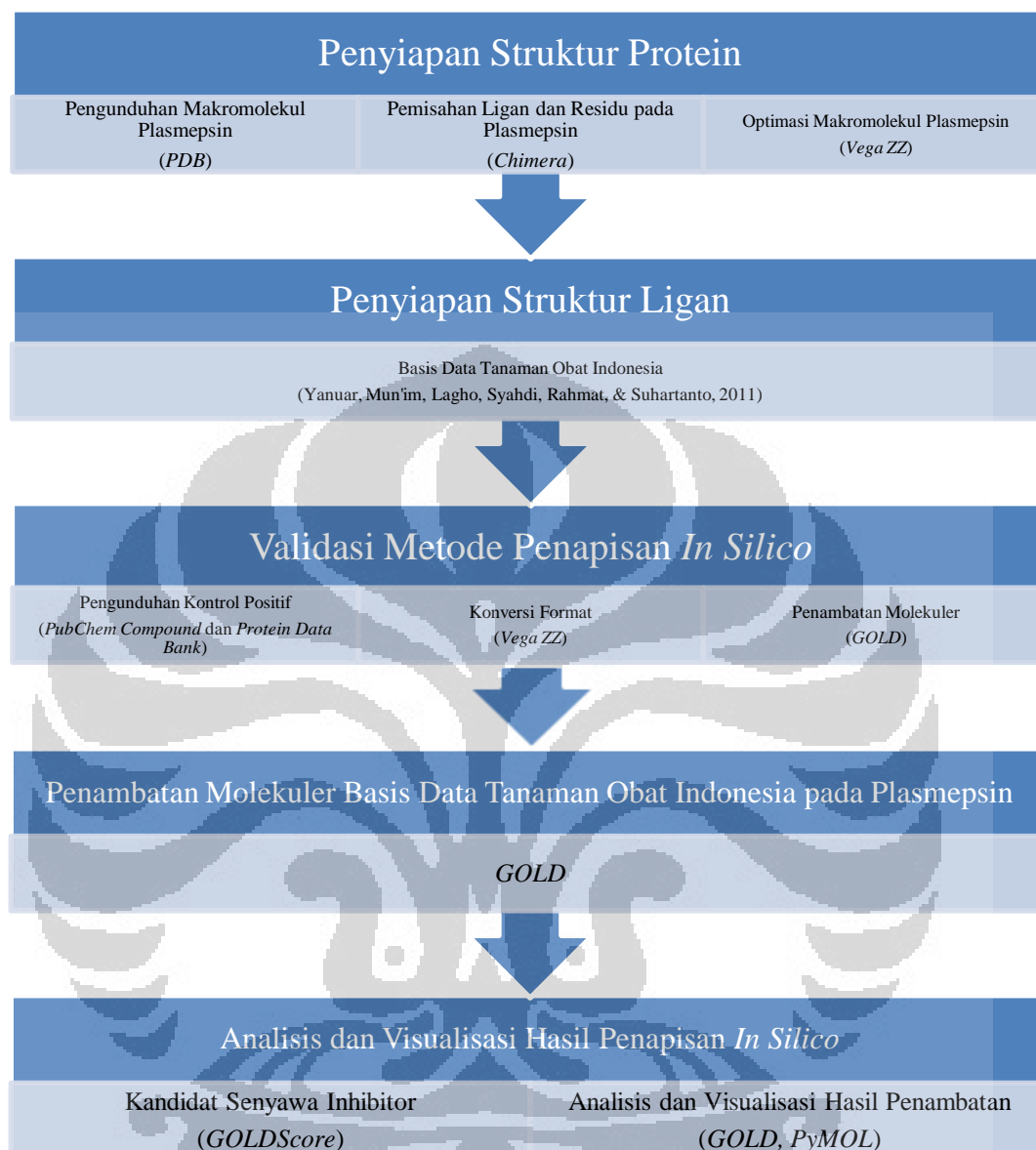
Tabel 4.14. Ikatan hidrogen yang terjadi pada target penambatan plasmepsin dengan ligan hasil penapisan *in silico* peringkat 11 besar

Nomor	Ligan	Gugus (Nomor)	(Gugus) Residu	Jarak (Å)
1	<i>Delphinidin 3-(2-rhamnosyl-6-malonylglucoside)</i>	OH (42)	(O) Asp34*	2,5
		OH (58)	(O) Asp34*	2,8 & 2,9
		OH (60)	(O) Gly36	2,4
		OH (60)	(O) Tyr192	2,6
		OH (70)	(O) Asp214*	2,8
		OH (81)	(O) Ser215	2,9
		OH (27)	(O) Ser218	2,8 & 2,8
2	<i>Isoscutellarein 4'-methyl ether 8-(6''-n-butylglucuronide)</i>	OH (41)	(O) Asp34*	2,7
		OH (48)	(O) Ser79	2,7
		OH (26)	(O) Asp214*	2,8
		OH (41)	(O) Gly216	3,0
		O (45)	(OH) Thr217	2,6
3	<i>Delphinidin 3-(6-malonylglucoside)-3',5'-di-(6-p-coumaroylglucoside)</i>	OH (21)	(O) Asp34*	2,6
		OH (95)	(O) Gly36	2,1
		OH (97)	(O) Gly36	2,3
		O (12)	(OH) Ser79	2,7
		O (71)	(OH) Tyr192	2,7
		O (95)	(OH) Tyr192	2,3
		O (27)	(OH) Thr217	2,9
		O (40)	(OH) Ser218	2,6
4	<i>Kaempferol 3-glucosyl-(1-3)-rhamnosyl-(1-6)-galactoside</i>	OH (57)	(O) Asp34*	2,7
		OH (92)	(O) Asn76	2,7
		OH (76)	(O) Leu131	2,8
		O (80)	(OH) Tyr192	2,9
		OH (44)	(O) Gly216	2,8
5	<i>Cyanidin 3-[6-(6-sinapylglucosyl)-2-xylosylgalactoside]</i>	OH (11)	(O) Asp34*	2,1
		OH (71)	(O) Asn39	3,0
		OH (71)	(O) Leu131	2,9
		OH (71)	(NH) Ile133	2,9
6	<i>Trimyristin</i>	O (6)	(OH) Asp34*	2,6
		O (5)	(OH) Thr217	2,8

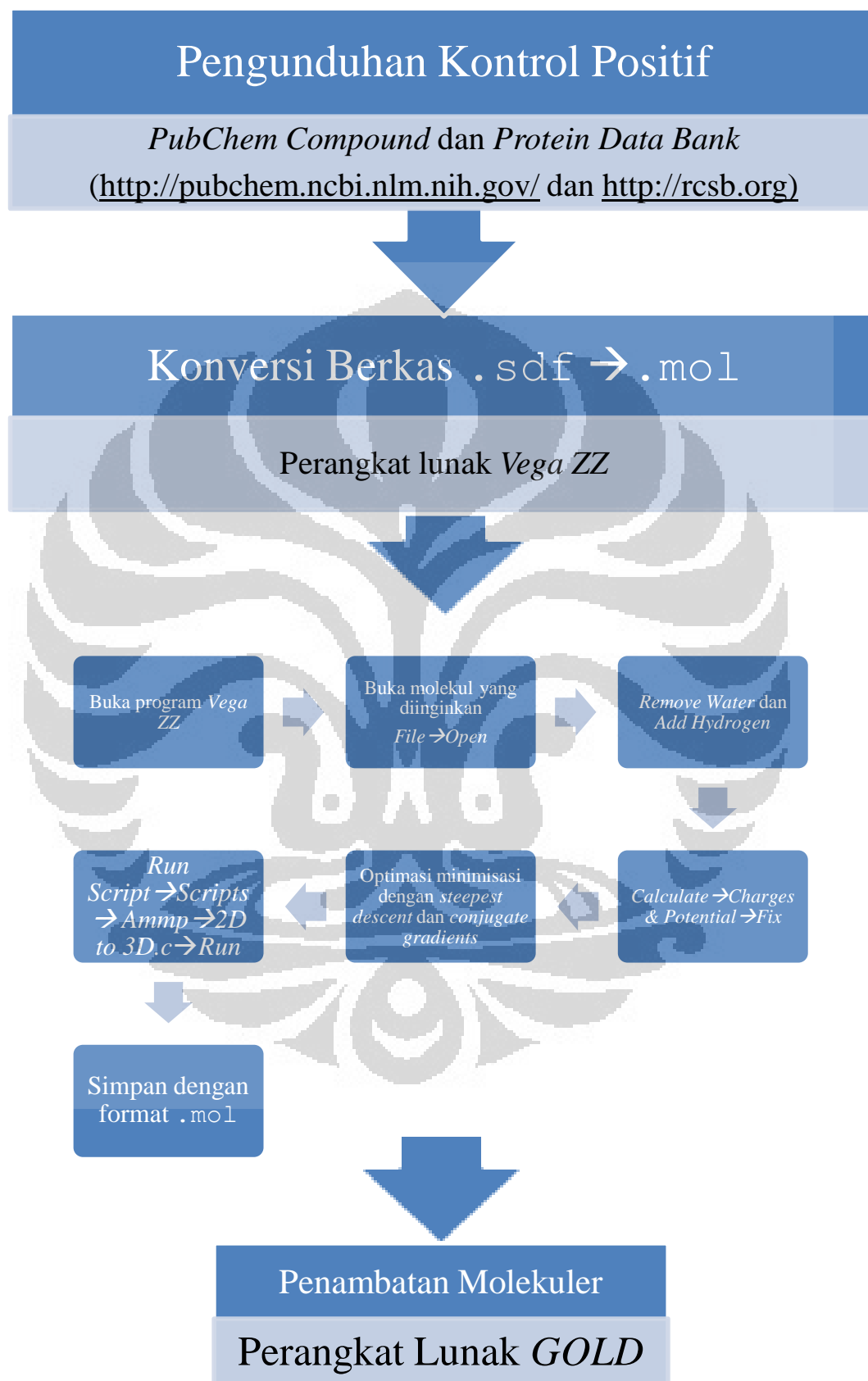
7	<i>Sanggenofuran A</i>	OH (42)	(O) Asp214*	2,9
		OH (42)	(O) Thr217	2,8
8	<i>Cyanidin 3,5-di-(6-malonylglucoside)</i>	OH (80)	(O) Phe16	3,0
		OH (46)	(O) Asn76	2,4
		OH (48)	(O) Asn76	2,3
		O (30)	(OH) Ser79	2,7
		O (41)	(OH) Tyr192	2,6
		O (45)	(OH) Tyr192	3,0
		O (87)	(OH) Tyr192	2,7
		O (13)	(OH) Thr217	2,4
		OH (23)	(O) Ser218	2,7
9	<i>Multifloroside</i>	O (79)	(OH) Asp303	2,8
		OH (8)	(O) Asn39	2,4
		OH (7)	(O) Asn76	3,0
		O (18)	(OH) Thr217	2,2
		OH (44)	(NH) Ser218	2,7
		OH (44)	(O) Ser218	2,8
10	<i>Cyanidin 3-(6''-malonylglucoside)-5-glucoside</i>	OH (45)	(O) Ser218	2,7
		O (30)	(OH) Ser79	2,9
		O (27)	(OH) Tyr192	3,0
		O (45)	(OH) Tyr192	2,7
11	<i>Lycopene</i>	O (13)	(OH) Thr217	2,7
		-	-	-

Keterangan: *=residu katalitik plasmepsin

Lampiran 1. Skema kerja

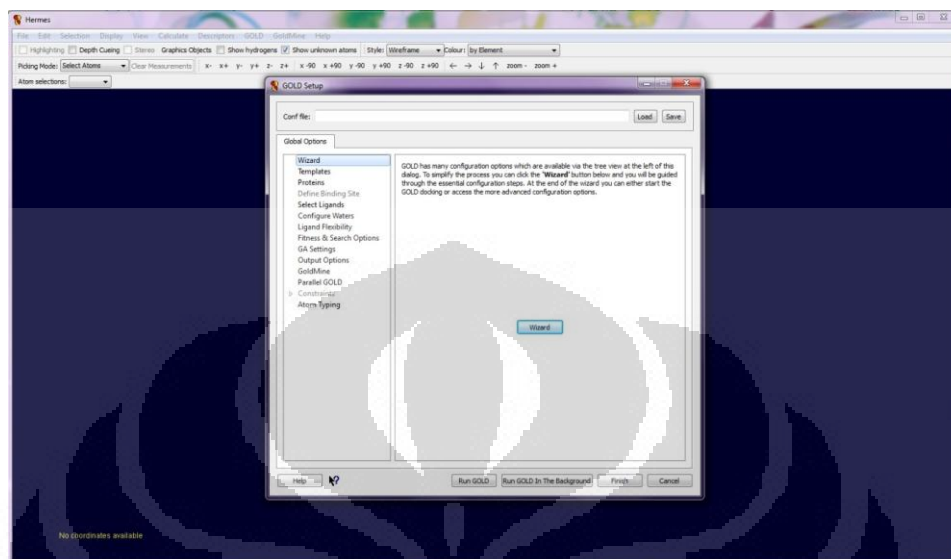


Lampiran 2. Skema kerja validasi penapisan *in silico*



Lampiran 3. Skema kerja perangkat lunak GOLD

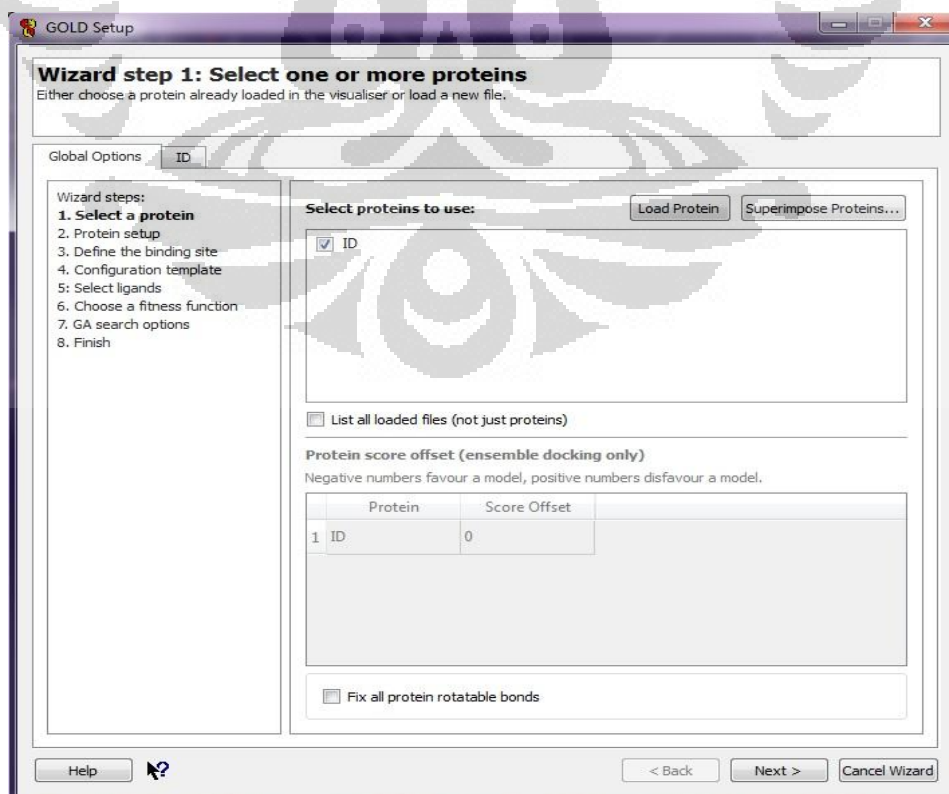
1. Buka aplikasi *GOLD*. Klik tombol “*Wizard*”. Akan muncul tampilan *Wizard* dari *GOLD*



2. Proses persiapan penambatan

Muncul tampilan langkah 1: Pemilihan protein

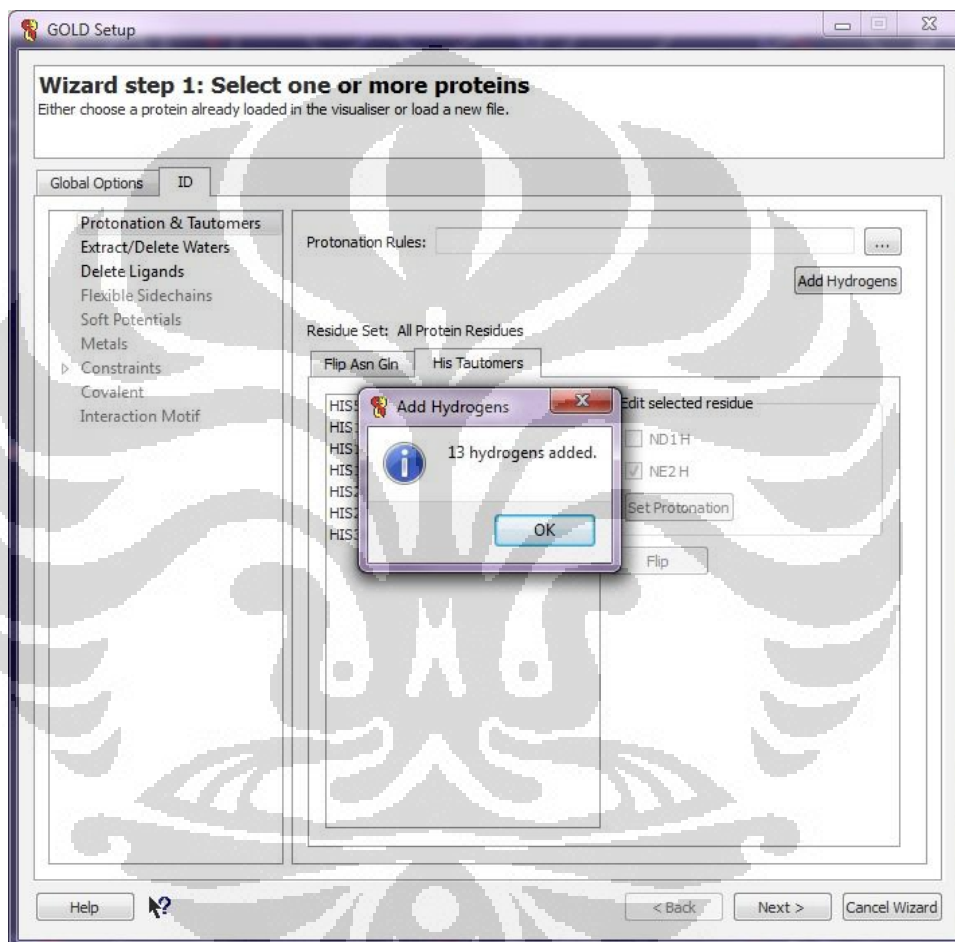
Load Protein → 1LEE Vega ZZ → *Load* → *Next*



3. Pengaturan makromolekul

Muncul tampilan langkah 2: Pengaturan Protein

- Protonation & Tautomers: Add Hydrogens* untuk penambahan hidrogen
- Extract/ Delete Waters* untuk menghilangkan molekul air
- Delete Ligands* untuk menghilangkan ligan-ligan atau residu non standar lain
- Klik *Next*



4. Penentuan ruang penambatan ligan pada makromolekul

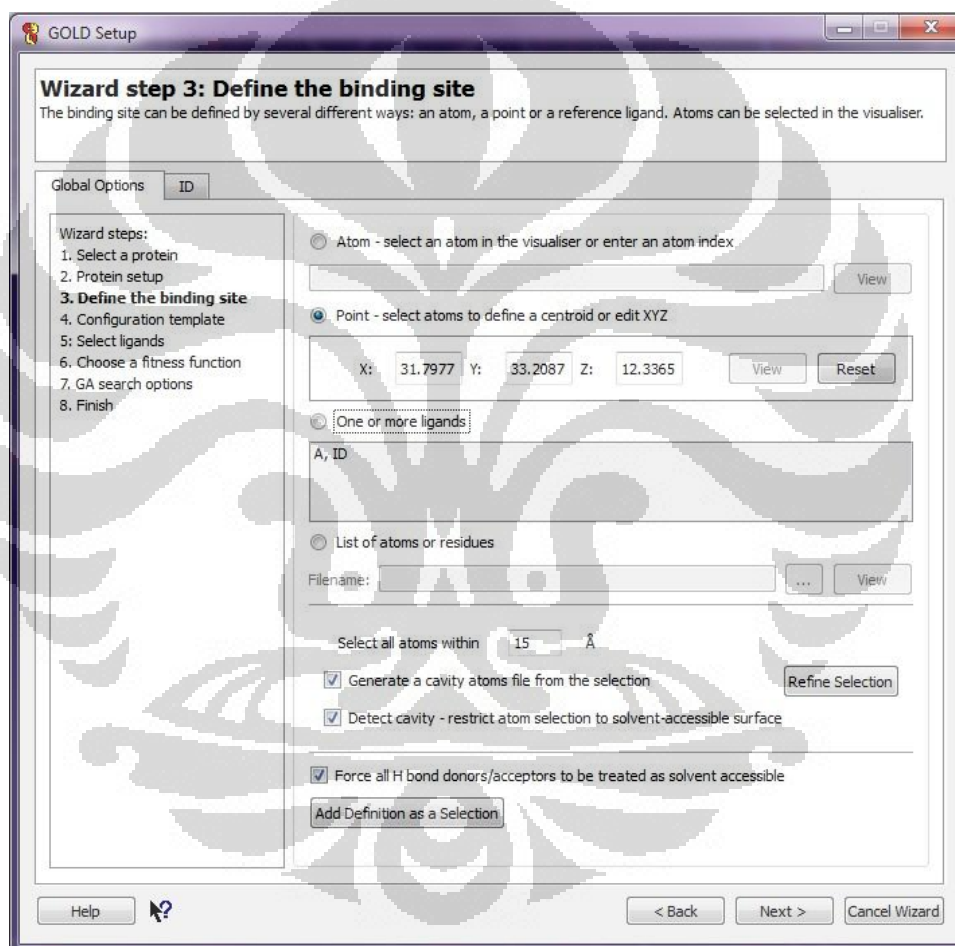
Muncul tampilan langkah 3: Penentuan situs ikatan

Define the binding site → penentuan koordinat ruang penambatan

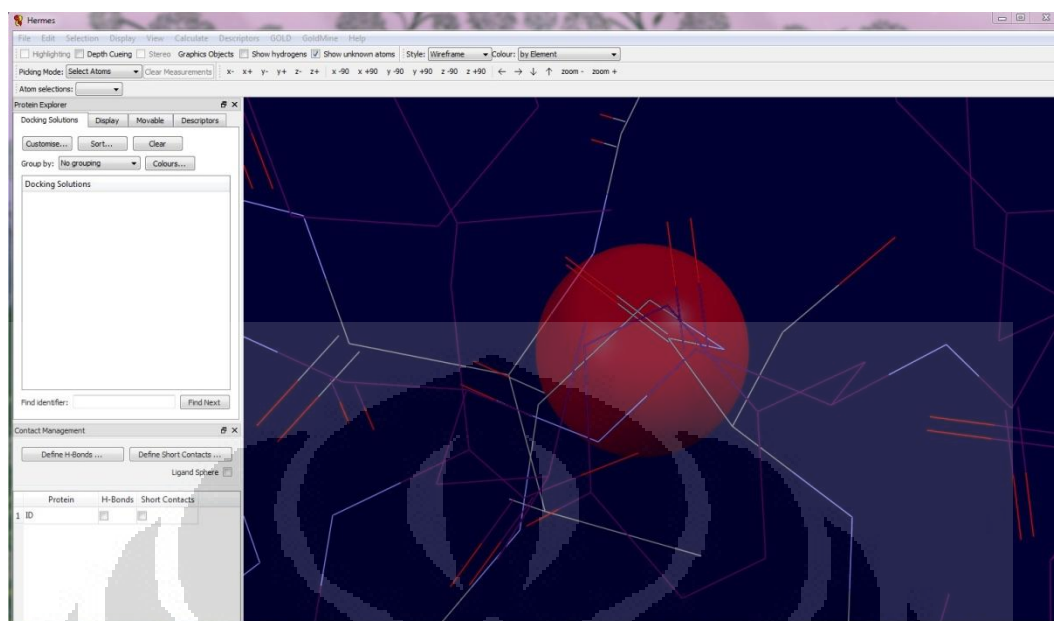
Pilih opsi *Point* → masukkan koordinat → tentukan radius sferis pada opsi → *View*

Ruang penambatan yang digunakan memiliki koordinat $x=31,7977$; $y=33,2087$; $z=12,3365$ dan *Select all atoms within 15 Å*

Klik *Generate a cavity atoms file from the selection* → *Next*.



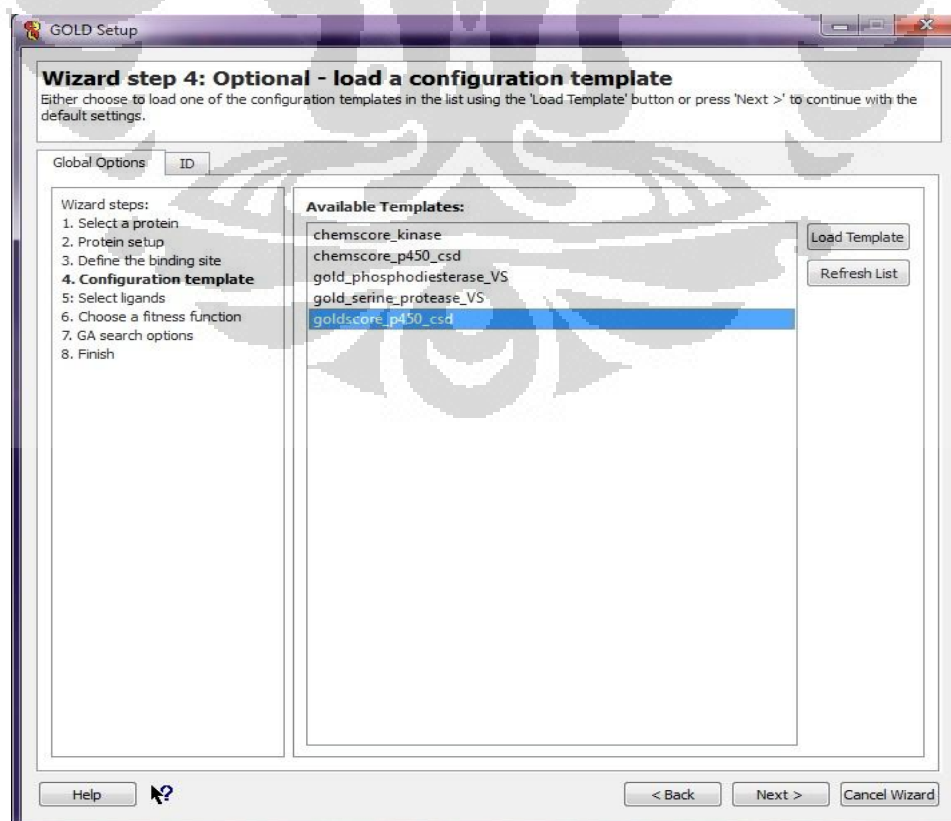
Tampilan daerah penambatan (bola merah)



5. Pemilihan cetakan (*template*)

Muncul tampilan langkah 4: Pemilihan cetakan

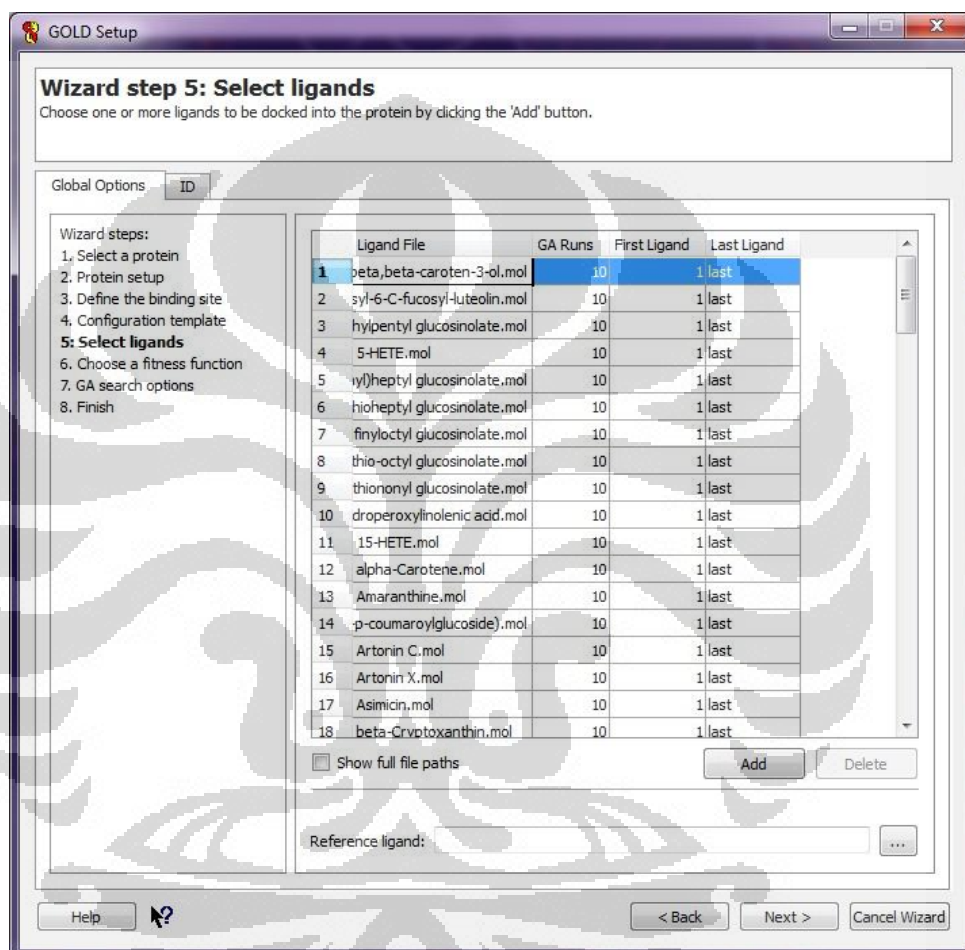
Pilih opsi *goldscore_p450_csd* → Next



6. Pemilihan ligan

Muncul tampilan langkah 5: Pemilihan ligan

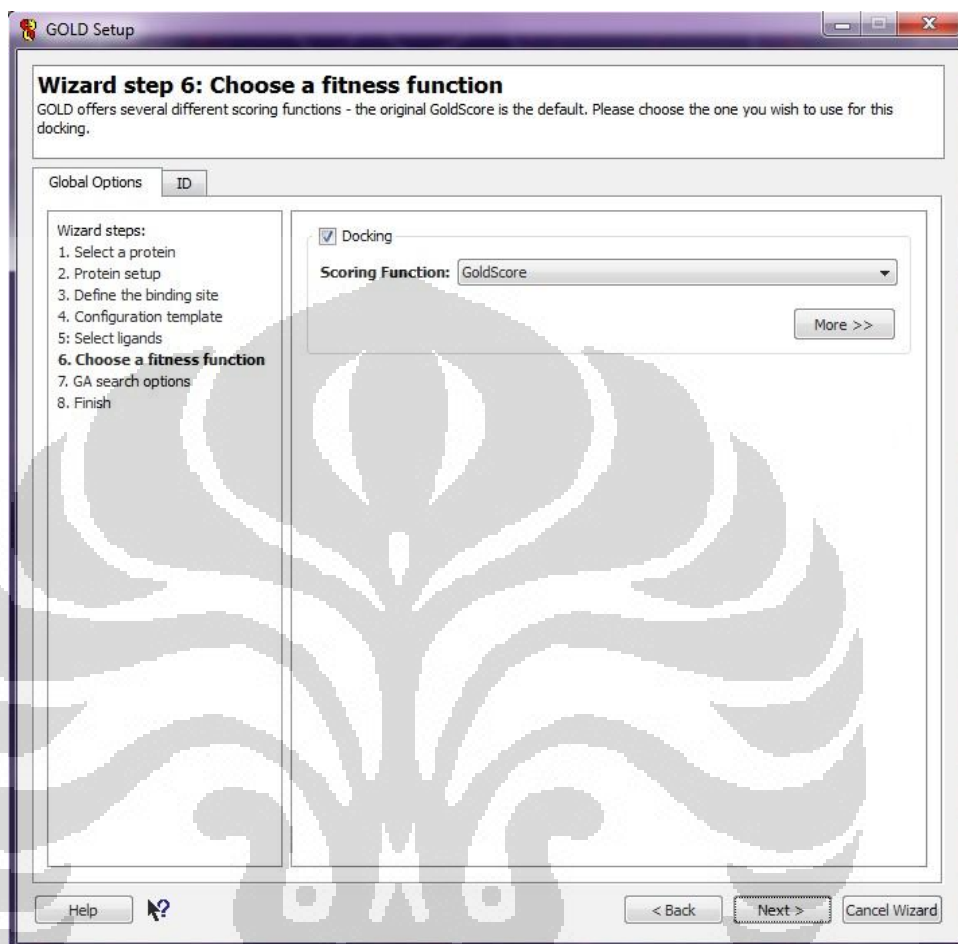
Add → Masukkan ligan yang berasal dari Basis Data Tanaman Obat Indonesia. Selanjutnya, *number of solution* dipilih sebanyak 10 dan *GA Runs* 10 → Next



7. Pemilihan fungsi skor

Muncul tampilan langkah 6: Fungsi skor

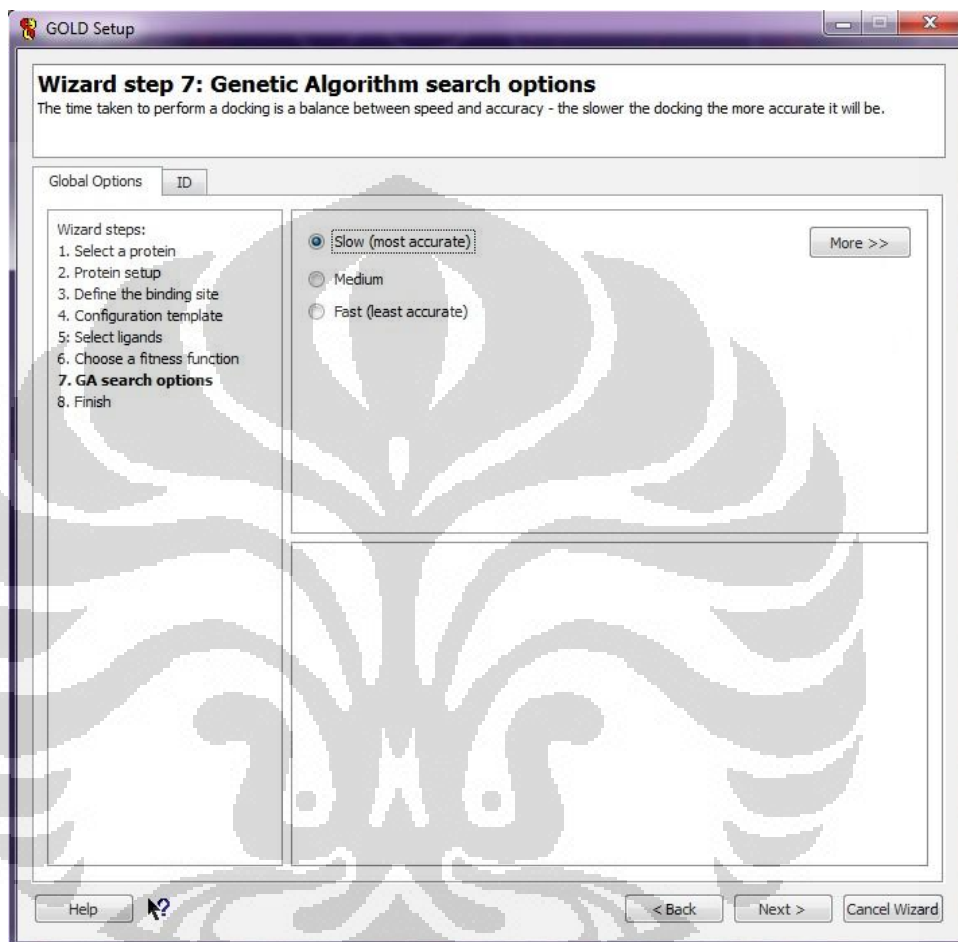
Pilih *GOLD*Score (sesuai *default*) → *Next*



8. Penentuan kecepatan penapisan

Muncul tampilan langkah 7: Pengaturan *Generic Algorithm*

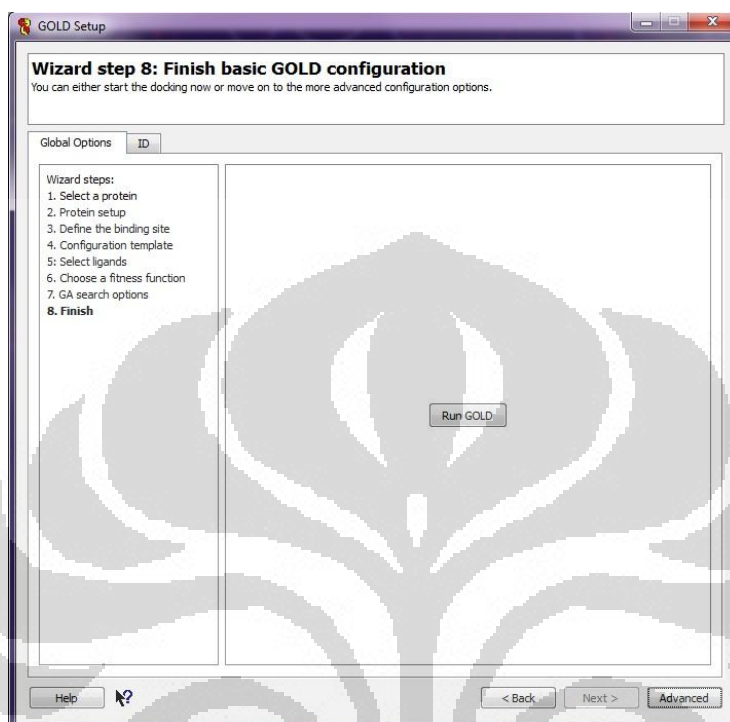
Terdapat 3 variasi kecepatan pada penambatan molekuler menggunakan *GOLD*, yaitu *fast (least accurate)*, *medium*, dan *slow (most accurate)*



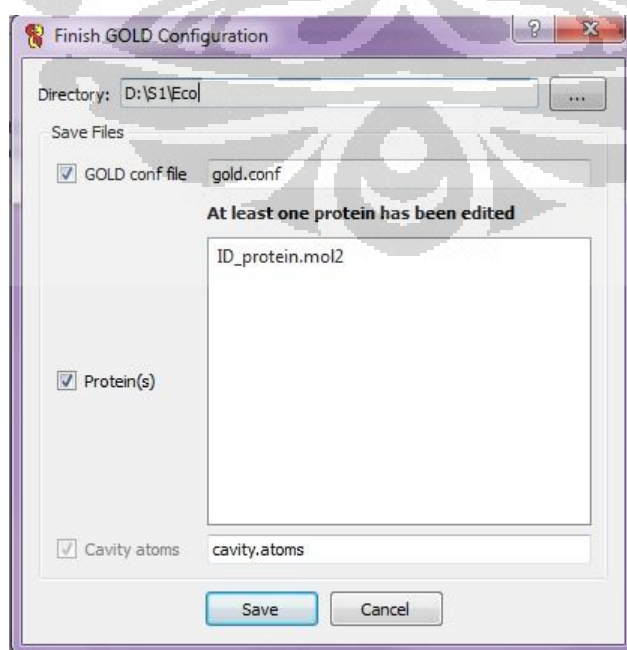
9. Tahap akhir

Muncul tampilan langkah 8: Konfigurasi final

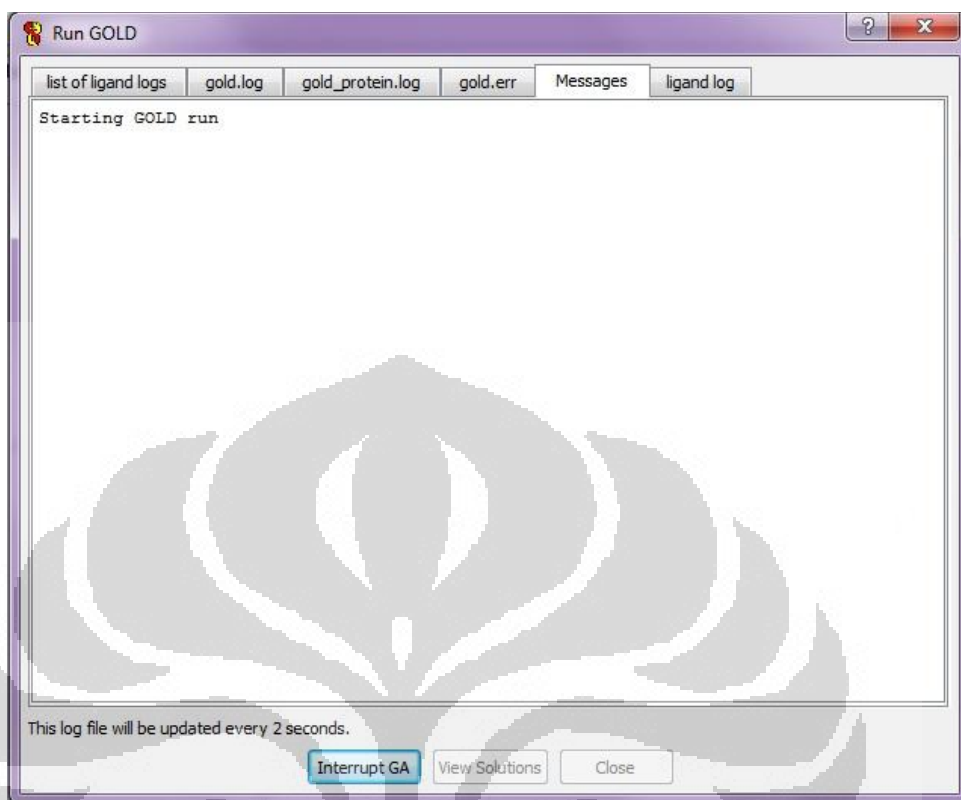
Klik *Run GOLD*



10. 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*

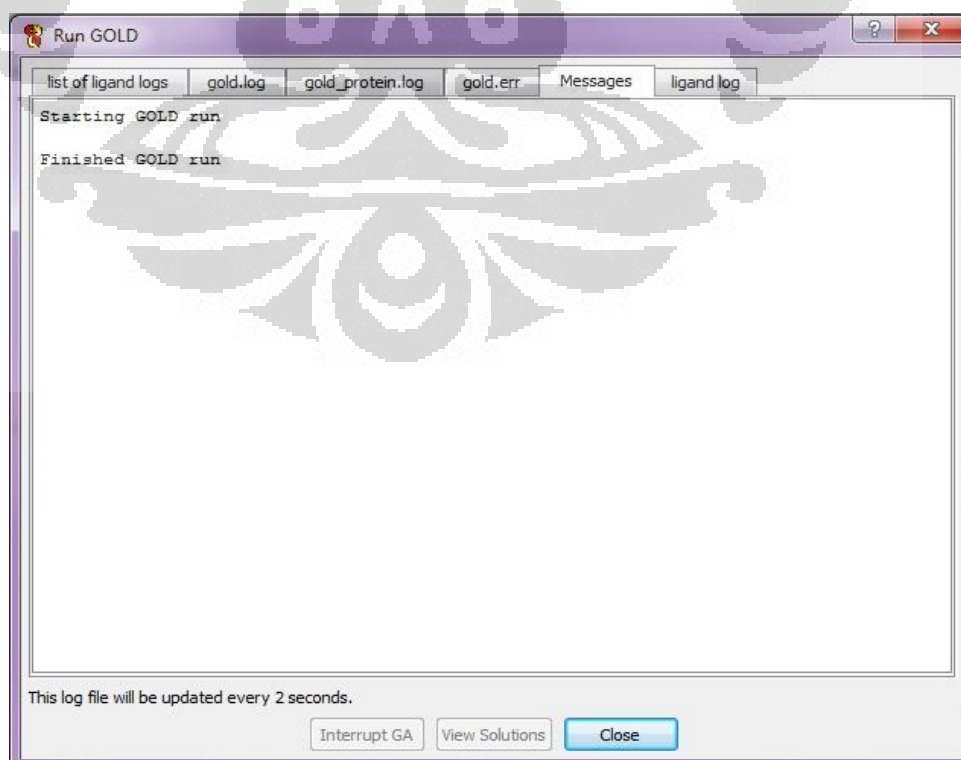


11. Penambatan dimulai



12. Tunggu hingga proses penambatan selesai

13. Penambatan selesai



Lampiran 4. Analisis hasil penambatan dengan perangkat lunak GOLD

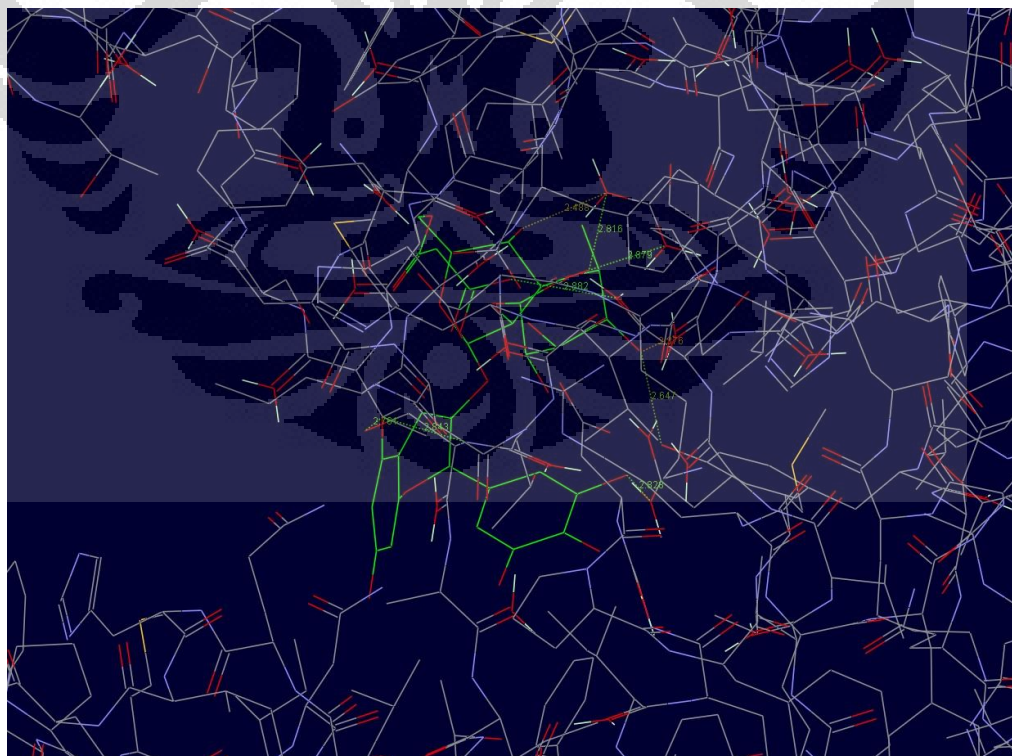
1. Setelah penambatan selesai (Lampiran 3), maka akan muncul **GOLDScore** mulai dari terbesar hingga terkecil

The screenshot displays the GOLD software interface. On the left, a table lists GOLDScore results for various docking solutions. The table has columns for 'Docking Solutions', 'GOLDScore (Fixed)', 'GOLDScore (Elastic)', 'GOLDScore (Elastic)', and 'GOLDScore (Elastic)'. The data rows are sorted in descending order of score.

Docking Solutions	GOLDScore (Fixed)	GOLDScore (Elastic)	GOLDScore (Elastic)	GOLDScore (Elastic)
Dephidrin 3-D(1h...)	62.3481	26.4270	21.4370	51.8483
Cyanidin 3-O-glucoside	60.1797	4.5817	4.5817	60.2622
Cyanidin 3-O-glucoside	60.2263	14.0838	14.0838	60.0794
Myricetin mol solvB	67.2262	0.0000	0.0000	66.9236
Dephidrin 3-O-glucoside	67.1881	7.7819	7.7819	63.4420
Cyanidin 3-O-glucoside	65.9503	5.9521	5.9521	64.9323
Cyanidin 3-O-glucoside	63.6950	9.6053	9.6053	75.4508
Myricetin mol solvA	62.8147	0.0000	0.0000	60.8927
MultiHosside mol...	61.6042	14.6380	14.6380	70.8024
Cyanidin 3-O-glucoside	61.3065	7.6678	7.6678	60.2878
Antoniin C mol solvB	60.6863	3.6238	3.6238	66.5189
Antoniin C mol solvA	60.6944	3.9177	3.9177	62.2383
MultiHosside mol...	60.7667	14.7174	14.7174	70.8183
Myricetin mol solv1	60.3660	2.0000	2.0000	66.1438
Cyanidin 3-O-glucoside	60.3876	15.2272	15.2272	63.3738
Antoniin C mol solvA	79.8666	8.1104	8.1104	77.1289
MultiHosside mol...	79.8245	17.9005	17.9005	67.2887
Resveratrol mol...	78.8109	5.0443	5.0443	77.6362
Isocyanidin 4-O-glucoside	78.7423	11.8908	11.8908	67.4867
Quercetin 3-O-glucoside	78.5063	9.2866	9.2866	60.0967
Quercetin 3-O-glucoside	66.6105	7.1017	7.1017	60.0000

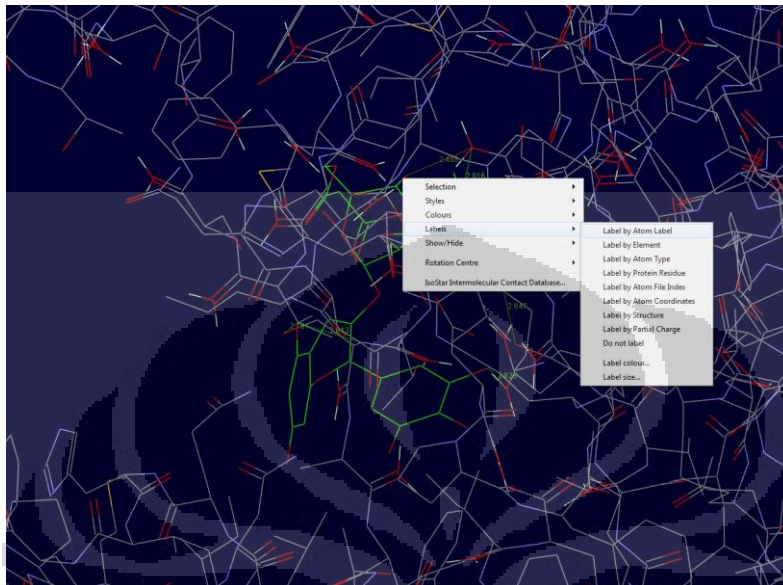
The right side of the interface shows a 3D molecular model with a grid overlay. The bottom status bar indicates the time as 11:07 AM on 11/26/2011.

2. Untuk melihat adanya ikatan hidrogen beserta jarak: *View* → *Contacts*



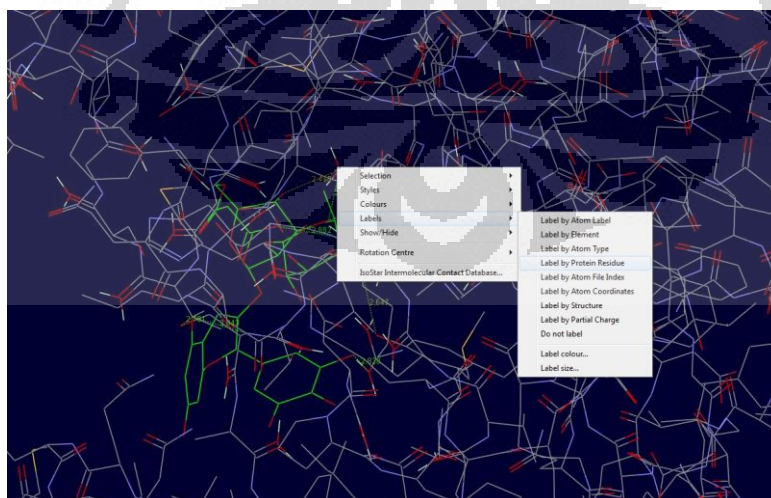
3. Untuk mengetahui gugus dan nomor atom pada ligan yang berikatan pada situs aktif target penambatan:

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

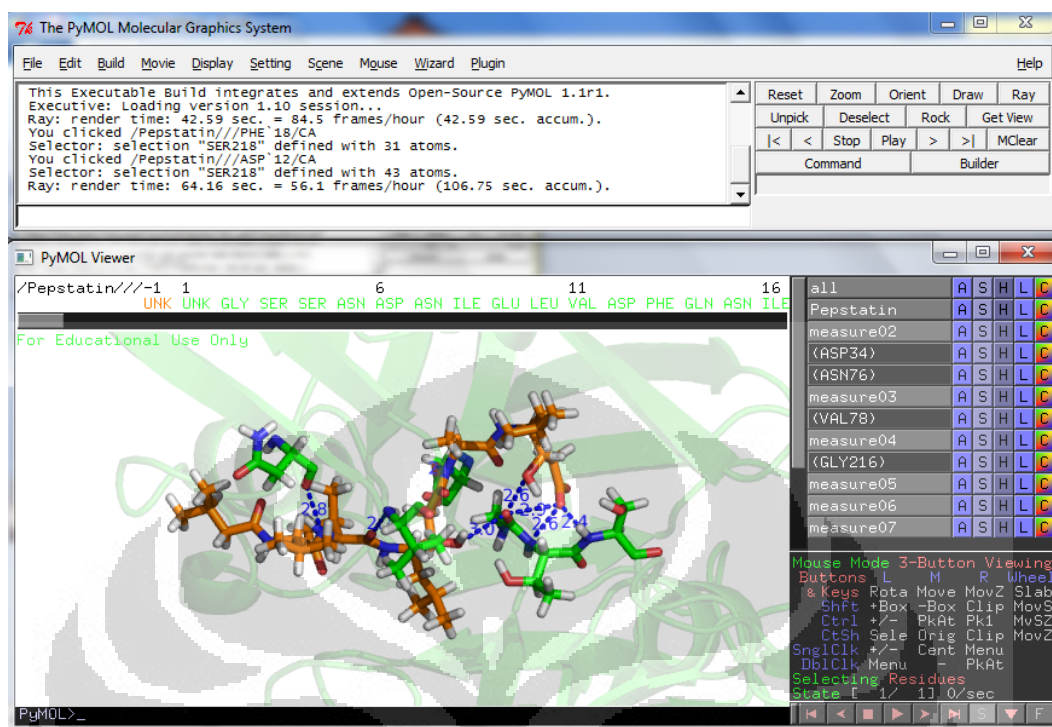


4. Untuk mengetahui gugus residu asam amino pada situs aktif target penambatan yang berikatan dengan ligan:

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



Lampiran 5. Tampilan perangkat lunak *PyMOL*

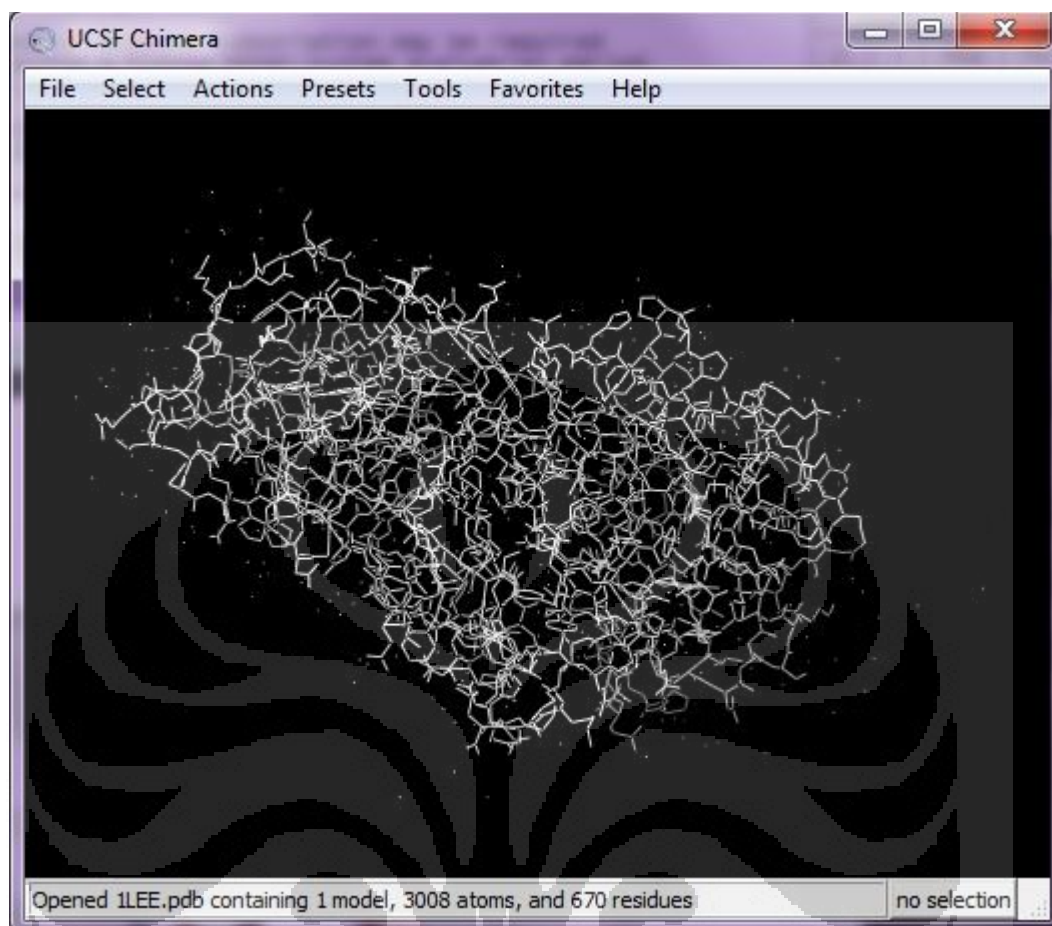


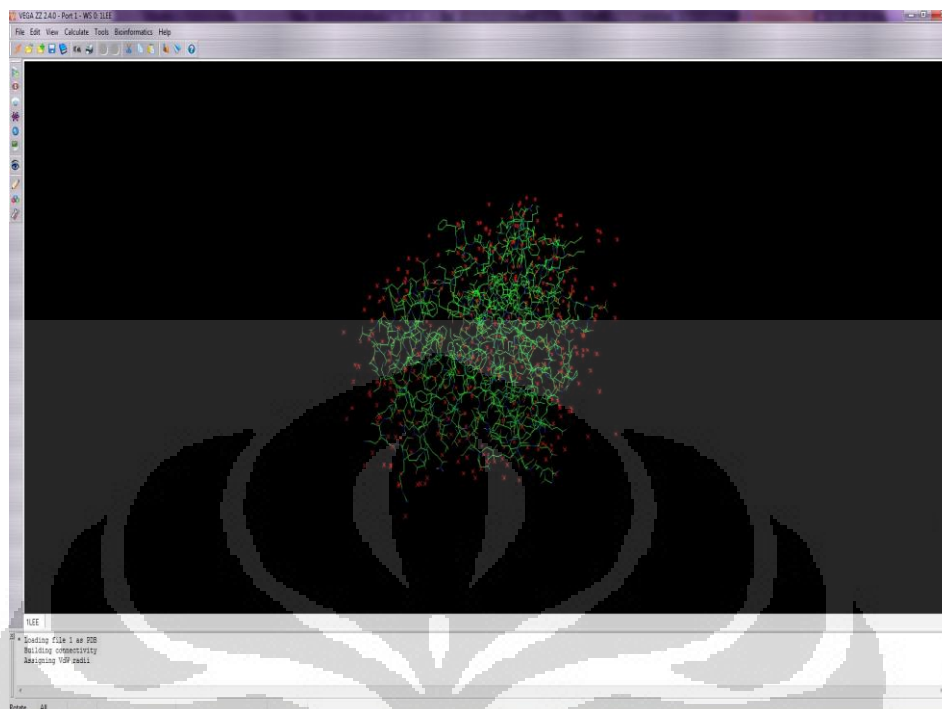
Lampiran 6. Tampilan situs *Protein Data Bank*

The screenshot shows the PDB website interface for entry 1LEE. The main content area includes:

- Primary Citation:** Structures of Ser205 mutant plasmepsin II from *Plasmodium falciparum* at 1.8 Å in complex with the inhibitors rs367 and rs370. Asojo, O.A., Afonina, E., Gulik, S.V., Yu, B., Erickson, J.W., Randa, R., Medjaded, D., Silva, A.M.P., Journal: [2002] Acta Crystallogr., Sect.D 58: 2001-2008. PubMed: 12454457
- PubMed Abstract:** Plasmepsin II is one of the four catalytically active plasmepsins found in the food vacuole of *Plasmodium falciparum*. These enzymes initiate hemoglobin degradation by cleavage at the alpha-chain between Phe33 and Leu34. The crystal structures of Ser205 mutant plasmepsin II. [Read More & Search PubMed Abstracts]
- Molecular Description:**
 - Classification: Hydrolase
 - Structure Weight: 3751.89
 - Molecule: Plasmepsin 2
 - Polymer: 1 Type: protein Length: 331
 - Chains: A
 - EC#: 3.4.23.39
 - Fragment: Residues 123-453
 - UniProtID: P46925

On the right side, there is a 3D molecular structure visualization of the protein complex, labeled 'Biological Assembly 1'. Below the structure, there are options to 'View In Jmol', 'Simple Viewer', and 'Protein Workshop'. A note indicates 'Biological assembly 1 assigned by authors'.

Lampiran 7. Tampilan perangkat lunak *UCSF Chimera*

Lampiran 8. Tampilan perangkat lunak *Vega ZZ*

Lampiran 9. Tampilan situs *PubChem Compound*

The screenshot displays the PubChem Compound website interface for the compound Norstatin deriv. (CID: 498052). The page is organized into several sections:

- Table of Contents:** Includes links for Identification and Related Records, Biological Test Results, Classification, and Chemical and Physical Properties.
- Chemical Structure:** A 2D ball-and-stick model of the molecule is shown, with a 3D view option available.
- Identification and Related Records:** Lists depositor-supplied synonyms (Norstatin deriv., AC1L4G2, CHEMBL342585, CHEBI:328901) and the full IUPAC name: 1-(2R)-2-(11S,14S)-14-(2-Amino-2-propenyl)-13,15-dioxo-3,4,11,12,13,14,15,15-octahydro-2H,10H-6,9-ethenonaphtho[2,3-b][1,5,6]triazolo[4,5-c]pyridin-11-yl)-2-hydroxyethyl-N-tert-butyl-L-proline.
- Compound Information:** Shows the CID (498052), creation date (2005-09-01), and related compound statistics (Same Collection: 2 records, Similar Compounds: 27 records, Similar Conformers: 1 record).
- Properties:** Lists molecular weight (587.7319 g/mol), molecular formula (C₂₇H₄₀N₄O₅), XLogP3-AAK (2.5), H-Bond Donor (5), and H-Bond Acceptor (8).
- BioActivity Data Links:** Provides links to view this compound, similar compounds, and similar conformers.
- Related Compounds:** Lists same collection (2), similar compounds (27), and similar conformers (1).
- Related Substances:** Lists all substances (5).
- Other Links:** Includes a chemical structure search link.
- Chemical Vendors:** Lists AB Chem (SID: 109747518) and External ID: AC1L4G2.