

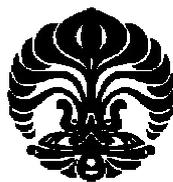
UNIVERSITAS INDONESIA

**ANALISIS DINAMIKA MOLEKULER SENYAWA
KOMPLEKS 12-LIPOKSIGENASE DENGAN KURKUMIN
DAN DUA TURUNANNYA**

SKRIPSI

**ANGGITA PUTRI EDWITA
0606070485**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM S1
DEPOK
JUNI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**ANALISIS DINAMIKA MOLEKULER SENYAWA
KOMPLEKS 12-LIPOKSIGENASE DENGAN KURKUMIN
DAN DUA TURUNANNYA**

SKRIPSI

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

**ANGGITA PUTRI EDWITA
0606070485**

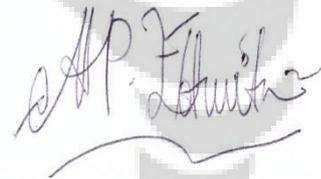
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM S1
DEPOK
JUNI 2012**

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa skripsi ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika dikemudian hari ternyata saya melakukan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, 18 Juli 2012



Anggita Putri Edwita

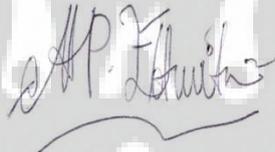
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Anggita Putri Edwita

NPM : 0606070485

Tanda Tangan :



Tanggal : 18 Juli 2012

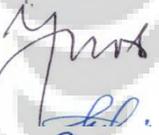
HALAMAN PENGESAHAN

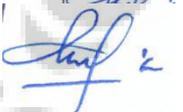
Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Anggita Putri Edwita
NPM : 0606070485
Program Studi : S1 Reguler
Judul Skripsi : Analisis Dinamika Molekuler Senyawa Kompleks
12-Lipoksigenase dengan Kurkumin dan Dua
Turunannya

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

DEWAN PENGUJI

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

Pembimbing II: Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M. S., Apt. ()

Penguji : Dr. Berna Elya, M. Si., Apt. ()

Penguji : Dr. Herman Suryadi, M. S., Apt. ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 18 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Allah Subhanahu Wata'ala, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya 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.

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

1. Bapak Dr. Arry Yanuar, M.Si. dan Prof. Dr. Yahdiana Harahap M. S., Apt., selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan skripsi ini.
2. Koordinator Pendidikan Departemen Farmasi Dr. Berna Elya, M. Si., Apt. dan Koordinator Penelitian Departemen Farmasi Dr. Mahdi Jufri, M. Si., yang telah memberikan kemudahan tak terkira kepada saya untuk menyelesaikan penelitian ini.
3. Rekan-rekan di laboratorium komputasi biomedik yang memberikan banyak bantuan.
4. Orang tua dan keluarga tercinta, atas do'a dan dukungan dalam berbagai bentuk yang tak putus-putus.
5. Para sahabat: Agung, Iko, Kak Happizh, Sonia, Debie, Bugi, Abud, Mbak Upik, Mbak Dewi, Linda, Kak Aci, dan Adri atas dukungan semangat, ide, bantuan, dan kemudahan, serta rekan-rekan lain yang tak bisa disebutkan satu per satu.

Akhir kata, saya berharap Allah Subhanahu Wata'aala berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Penulis

2012

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

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

Nama : Anggita Putri Edwita
NPM : 0606070485
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:

Analisis Dinamika Molekuler Senyawa Kompleks 12-Lipoksigenase dengan Kurkumin dan Dua Turunannya

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di: Depok

Pada tanggal: 14 Juli 2012

Yang menyatakan



(Anggita Putri Edwita)

ABSTRAK

Nama : Anggita Putri Edwita
Program Studi : Farmasi
Judul : Analisis Dinamika Molekuler Senyawa Kompleks 12-Lipoksigenase dengan Kurkumin dan Dua Turunannya

Kurkumin adalah senyawa aktif biologis yang terdapat dalam tumbuhan *Curcuma longa* L. yang tersebar luas di daerah tropis seperti Indonesia. Kurkumin telah lama digunakan sebagai tanaman obat keluarga dan diketahui memiliki aktivitas antiinflamasi, antioksidan, dan antikanker. Salah satu mekanisme kerja kurkumin sebagai antikanker adalah dengan menghambat aktivitas enzim 12-lipoksigenase. Mekanisme tersebut diketahui dari penelitian dengan melakukan penambatan molekuler kurkumin dengan enzim 12-lipoksigenase. Akan tetapi, hasil penambatan molekuler memiliki kelemahan karena dilakukan dalam keadaan senyawa dengan struktur yang kaku (rigid). Pada kenyataannya, makromolekul dan ligan yang ditambatkan memiliki torsi sehingga bergerak dengan dinamis dari waktu ke waktu. Analisis dinamika molekuler senyawa kompleks enzim 12-lipoksigenase dengan kurkumin dan dua turunan alaminya, demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin, dilakukan menggunakan hasil penambatan molekulernya, dan dianalisis dengan mengevaluasi nilai RMSF, energi potensial, dan kondisi ikatan hidrogen. Berdasarkan ketiga parameter tersebut, interaksi enzim 12-lipoksigenase dengan kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin menunjukkan kestabilan selama waktu simulasi 2000 pikodetik (2 nanodetik).

Kata Kunci : 12-lipoksigenase, kurkumin, dinamika molekuler, kanker, bioinformatika, AMBER MD
xiii+71 halaman : 26 gambar; 2 tabel; 15 lampiran
Daftar Pustaka : 27 (1990-2011)

ABSTRACT

Name : Anggita Putri Edwita
Program Study : Pharmacy
Title : Molecular Dynamic Analysis of Complex Compounds
12-Lipoxygenase with Curcumin and Two Derivatives

Curcumin is the biologically active compound contained in the plant *Curcuma longa* L. which is widespread in tropical areas like Indonesia. Curcumin has long been used as plant medicine and is known to have anti-inflammatory activity, antioxidant, and anticancer. One of the mechanism of action as an anticancer activity is to inhibit the activity of 12-lipoxygenase. The mechanism is studied as the result from the molecular docking of curcumin with 12-lipoxygenase. However, the molecular dockings result have a weakness because it is done in a state of compounds with a rigid structure. In fact, macromolecules and the tethered ligand has the torque to move dynamically over time. Molecular dynamics analysis of complex compounds 12-lipoxygenase with curcumin and it's two natural derivatives, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin performed using the results of molecular docking and analyzed by evaluating the value of RMSF, the potential energy, and hydrogen bonding conditions. Based on these three parameters, the interaction of 12-lipoksigenase with curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin showed stability during the 2000 (2 nanosecond) simulation time.

Keyword : 12-lipoxygenase, curcumin, molecular dynamic, bioinformatics, AMBER MD
xiii+71 pages : 26 pictures; 2 tabel; 15 appendixes
Bibliography : 27 (1990-2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIK	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Struktur Protein.....	10
2.2 Inhibisi Enzim.....	11
2.3 Enzim Lipoksigenase.....	14
2.4 Inhibitor Lipoksigenase.....	15
2.5 Kurkumin.....	17
2.6 Bioinformatika.....	17
2.7 Dinamika Molekuler (Molecular Dynamic).....	18
2.8 OpenBabel.....	18
2.9 Amber.....	18
2.10 VMD.....	19
3. METODE PENELITIAN	19
3.1 Lokasi Penelitian.....	19

3.2	Bahan.....	19
3.3	Alat.....	19
3.3.1	Perangkat Keras.....	29
3.3.2	Perangkat Lunak.....	20
3.4	Metode Pelaksanaan.....	20
3.4.1	Simulasi Dinamika Molekuler.....	25
3.4.2	Analisis Hasil Simulasi Dinamika Molekuler.....	27
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	27
4.1	Simulasi Dinamika Molekuler.....	37
4.2	Analisis Hasil Simulasi Dinamika Molekuler.....	50
5.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	50
5.1	Kesimpulan.....	50
5.2	Saran.....	
	DAFTAR PUSTAKA.....	52
	LAMPIRAN.....	55

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	(a) Untai α yang terbentuk dari rantai polipeptida yang melingkar mengelilingi suatu aksis, (b) jika dilihat dari atas, rantai samping R mengarah keluar.....	7
Gambar 2.2	Untai α distabilkan oleh ikatan hidrogen.....	8
Gambar 2.3	Lembar β , struktur sekunder protein.....	9
Gambar 2.4	Contoh struktur tersier protein.....	10
Gambar 2.5	Jalur sintesis yang melibatkan enzim lipoksigenase pada manusia	13
Gambar 2.6	Struktur inhibitor allosterik lipoksigenase oleh Holman dan Mogul (2000).....	15
Gambar 2.7	Struktur Kimia Kurkumin dan Turunannya.....	16
Gambar 4.1	Grafik suhu terhadap waktu untuk ketiga sistem selama ekuilibrasi tahap pertama, waktu simulasi 10 pikodetik.....	32
Gambar 4.2	Grafik suhu terhadap waktu untuk ketiga sistem selama ekuilibrasi tahap kedua, waktu simulasi 10 pikodetik	33
Gambar 4.3	Grafik densitas air terhadap waktu selama ekuilibrasi tahap kedua dalam waktu simulasi 10 pikodetik	33
Gambar 4.4	Grafik suhu terhadap waktu selama ekuilibrasi tahap pertama hingga ketiga dalam waktu simulasi 120 pikodetik.....	34
Gambar 4.5	Grafik densitas air terhadap waktu selama ekuilibrasi tahap pertama hingga ketiga dalam waktu simulasi 120 pikodetik...	35
Gambar 4.6	Grafik energi potensial terhadap waktu selama ekuilibrasi tahap pertama hingga ketiga dalam waktu simulasi 120 pikodetik	35
Gambar 4.7	Grafik nilai RMSD <i>backbone</i> terhadap waktu selama ekuilibrasi tahap pertama hingga ketiga dalam waktu simulasi 120 pikodetik	36
Gambar 4.8	Grafik suhu terhadap waktu dalam waktu simulasi 2000 pikodeik (2 nanodetik).....	38
Gambar 4.9	Grafik densitas air terhadap waktu dalam waktu simulasi 2000 pikodeik (2 nanodetik).....	38
Gambar 4.10	Nilai energi potensial selama waktu simulasi 2000 pikodeik (2 nanodetik).....	39
Gambar 4.11	Grafik nilai RMSD <i>backbone</i> selama waktu simulasi 2000 pikodeik (2 nanodetik).....	40
Gambar 4.12	Grafik nilai RMSF pada masing-masing residu pada waktu simulasi 600-2000 pikodetik.....	41
Gambar 4.13	Ikatan Hidrogen antara donor Cur OAZ dengan akseptor Leu597 <i>Main O</i> , <i>occupancy</i> 78,59%.....	44
Gambar 4.14	Ikatan hidrogen antara akseptor Glu356 OE1 dengan donor CAM (<i>occupancy</i> 64,60%), Cur CAI (<i>occupancy</i> 23,05), dan CAF (<i>occupancy</i> 21,48).....	45
Gambar 4.15	Ikatan hidrogen antara donor Gln590 CA dengan akseptor Cur O	

	(<i>occupancy</i> 61,24%) dan donor Gln590 CG dengan akseptor ' OAA (<i>occupancy</i> 33,55%).....	45
Gambar 4.16	Ikatan hidrogen antara donor Trp176 <i>Main</i> N dan <i>Side</i> CD1 dengan akseptor Des-OAC (<i>occupancy</i> 91,86 dan 54,18%).....	46
Gambar 4.17	Ikatan hidrogen antara donor Trp176 <i>Main</i> N dengan akseptor OAE (<i>occupancy</i> 94,08%).....	47
Gambar 4.18	Ikatan hidrogen donor Glu658 <i>Main</i> N dengan akseptor Bis O (<i>occupancy</i> 83,58%).....	48
Gambar 4.19	Donor Trp176 <i>Main</i> N dengan akseptor Cur CAW (<i>occupancy</i> 24,13%) dan akseptor Cur CAR (<i>occupancy</i> 21,06%).....	49

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1	Jenis-jenis Asam Amino Penyusun Protein.....	5
Tabel 4.1	Nilai <i>occupancy</i> ikatan hidrogen ketiga sistem.....	43

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Berkas <i>input</i> mmpbsa_leap.in untuk pembuatan parameter topologi, koordinat input, penetralan muatan, dan penambahan pelarut.....	55
Lampiran 2.	Berkas <i>input</i> min.in untuk minimisasi tahap pertama.....	55
Lampiran 3.	Berkas <i>input</i> min_all.in untuk minimisasi tahap kedua.....	56
Lampiran 4.	Berkas <i>input</i> eq1.in untuk ekuilibراسi tahap pertama.....	56
Lampiran 5.	Berkas <i>input</i> eq2.in untuk ekuilibراسi tahap kedua.....	56
Lampiran 6.	Berkas <i>input</i> eq3.in untuk ekuilibراسi tahap ketiga.....	57
Lampiran 7.	Berkas <i>input</i> ptraj.in untuk memperoleh data RMSD selama ekuilibراسi.....	57
Lampiran 8.	Berkas <i>input</i> prod_ligan.in untuk produksi.....	57
Lampiran 9.	Berkas run_md.x yang akan menjalankan produksi secara otomatis selama 10 kali.....	58
Lampiran 10.	Berkas do_1.run untuk produksi.....	58
Lampiran 11.	Berkas do.run untuk menjalankan berkas run_md.x.....	58
Lampiran 12.	Berkas <i>input</i> ptraj.in untuk memperoleh data RMSD dari proses produksi.....	59
Lampiran 13.	Berkas <i>input</i> ptraj_rmsf.in untuk memperoleh data RMSF dari proses produksi.....	59
Lampiran 14.	Contoh berkas hasil pengujian parameter dengan format .frcmod	60
Lampiran 15.	Data RMSF masing-masing residu.....	60



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Lipoksigenase adalah enzim yang secara struktural merupakan bagian dari deoksigenase besi nonheme (Holman & Mogul, 2002) yang terdapat secara luas pada tumbuhan, jamur, dan hewan (Brash 1999). Tiga isoform yang terdapat dalam tubuh manusia adalah isoform 5-, 12-, dan 15-lipoksigenase (Brash, 1999). Enzim 5-lipoksigenase merupakan enzim yang terlibat dalam pembentukan leukotrien, suatu mediator inflamasi yang berperan dalam perparahan penyakit inflamasi kronis seperti arthritis rheumatoid, psoriasis, dan asma (Henderson, Jr., 1994), sehingga pengembangan obat-obat inhibitor enzim 5-lipoksigenase penting untuk penanganan penyakit-penyakit tersebut (Müller, Altmann, & Prinz, 2001). Isoform 12-lipoksigenase, yang dalam tubuh manusia dibedakan menjadi tipe leukosit dan tipe platelet, belum banyak diketahui peran dan fungsinya. Akan tetapi, beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa produk dari 12-lipoksigenase dengan asam arakhidonat, asam 12-hidroksieikosatetraenoat (12-HETE), berperan dalam metastasis sel kanker dan penyakit inflamasi seperti psoriasis (Müller, Altmann, & Prinz, 2001). Penelitian lebih lanjut tentang aktivitas enzim 12-lipoksigenase dan inhibitornya, terutama inhibitor selektif, dapat berguna untuk memahami peran dan fungsinya dalam tubuh (Müller, Altmann, & Prinz, 2002).

Penelitian yang dilakukan oleh Chen et al. (1994) menunjukkan bahwa 12(S)-HETE diproduksi oleh sel tumor dan memiliki peran dalam metastasis sel tumor, seperti halnya 12(S)-HETE eksogen. 12-HETE eksogen dapat mengaktifkan protein kinase C, meningkatkan ekspresi integrin pada permukaan sel, meningkatkan adhesi, menginduksi retraksi sel endotel, dan meningkatkan metastasis eskperimental tumor sel (Chen, et al., 1994). Berbagai bukti yang ada menunjukkan peran penting 12-lipoksigenase dalam kanker prostat, dan peningkatan ekspresi tersebut berhubungan dengan perkembangan tahap dan tingkat adenokarsinoma (Jankun, et al., 2006). Jankun, et al. (2006) menyimpulkan, melalui pemodelan homologi dan penambatan molekuler, bahwa

kurkuminoid yang tidak ditambatkan pada sisi aktif tidak menghambat 12-lipoksigenase platelet. Dari penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa enzim 12-lipoksigenase berperan dalam perkembangan sel kanker dengan menghasilkan 12-HETE, dan kurkuminoid sebagai inhibitor kompetitif enzim 12-lipoksigenase dapat menjadi obat yang potensial dalam terapi kanker.

Sebaran geografis kurkumin yang luas di daerah beriklim tropis, penggunaan yang luas di Asia Tenggara seperti Indonesia, dan berkembangnya penelitian tentang efek farmakologi kurkumin, menjadikan kurkumin senyawa yang potensial untuk dikembangkan di Indonesia sebagai salah satu obat dalam terapi kanker.

Penelitian tentang peran dan fungsi enzim lipoksigenase, beserta senyawa-senyawa yang memiliki aktivitas inhibisi terhadapnya, dapat dilakukan dengan metode *in vitro*, *in vivo*, dan *in silico*. Metode *in silico* meliputi teknik penambatan molekuler (*molecular docking*) dan dinamika molekuler (*molecular dynamic*). Metode tersebut, dalam penelitian tentang interaksi makromolekul (enzim atau reseptor) dengan suatu ligan (substrat, senyawa endogen, eksogen, dan berbagai obat), menjadi metode yang lebih efisien dalam rancangan dan pengembangan obat, sehingga dapat dijadikan metode pendahuluan dalam rancangan dan pengembangan obat, sebelum senyawa baru diteliti dengan metode *in vitro* dan *in vivo*.

Interaksi molekuler kurkumin dan dua turunan alaminya, demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin, pada enzim 12-lipoksigenase telah dilakukan oleh Utami (2009) dengan penambatan molekuler, dan Tasbichaty (2010). Tasbichaty (2010) telah menyempurnakan penelitian *in silico* oleh Utami (2009) tentang interaksi kurkuminoid dengan 12-lipoksigenase, dengan melakukan kembali penambatan molekuler untuk dua jenis tautomer kurkuminoid, yaitu tautomer enol dan keto dan kemudian menganalisis dinamika molekulernya. Akan tetapi, berdasarkan perhitungan nilai ΔG hasil penambatan molekuler oleh Tasbichaty (2010), kurkuminoid dengan tautomer enol memiliki nilai ΔG positif, yang menunjukkan tidak adanya interaksi dengan enzim 12-lipoksigenase. Selain itu, hasil penambatan molekuler memiliki kelemahan karena senyawa yang terlibat dalam penambatan dibekukan dalam ruang dan waktu

dengan struktur yang kaku, sehingga tidak menggambarkan kondisi yang sebenarnya, di mana suatu molekul secara dinamis bergerak dari waktu ke waktu. Di dalam tubuh, enzim tidak beku dalam ruang dan waktu, melainkan bergerak dengan dinamis sesuai dengan torsinya. Oleh karena itu, analisis dinamika molekuler dari makromolekul dan ligan, yang dalam penelitian ini adalah enzim 12-lipoksigenase dengan kurkumin dan dua turunannya, menjadi penting untuk dilakukan.

Simulasi dinamika molekuler yang dilakukan oleh Tasbichaty (2010) dilakukan dengan perangkat lunak GROMACS. Hasil simulasi dinamika molekuler dianalisis dengan mengevaluasi beberapa parameter kestabilan seperti nilai energi potensial, RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*), dan kondisi ikatan hidrogen. Nilai energi bebas sistem (ΔG) dihitung berdasarkan hasil penambatan molekuler. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, penelitian kali ini melanjutkan hasil yang telah diperoleh dari penelitian sebelumnya, dengan menganalisis dinamika molekuler kurkuminoid tautomer keto saja menggunakan perangkat lunak AMBER MD.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah memperoleh hasil analisis dinamika molekuler dari senyawa hasil penambatan kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin dengan enzim 12-lipoksigenase, yang memperlihatkan kestabilan interaksi, berdasarkan nilai RMSF, energi potensial, dan kondisi ikatan hidrogen.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Struktur Protein

Protein adalah polimer dari asam amino yang bersama-sama dihubungkan oleh ikatan amida (Bruice, 2004). Para ilmuwan pada awalnya menggunakan pendekatan hubungan struktur-fungsi protein dengan memisahkan protein ke dalam kelompok-kelompok berdasarkan sifat-sifat seperti kelarutan, bentuk, atau keberadaan gugus nonprotein. Misalnya, protein yang dapat diekstrak dari sel menggunakan larutan pada pH fisiologis dan ionik kuat diklasifikasikan sebagai protein yang larut (*soluble*). Ekstraksi protein membran integral membutuhkan disolusi membran tersebut dengan deterjen. Protein globular adalah yang padat, berbentuk sferis kasar atau lonjong, dan punya perbandingan aksial (perbandingan antara dimensi terpendek terhadap dimensi terpanjangnya) tidak lebih dari tiga. Sebagian besar enzim adalah protein globular, yang besar volume internalnya menyediakan ruang yang cukup untuk membuat lubang dengan bentuk dan muatan yang spesifik, serta sifat hidrofobik atau hidrofilik yang dibutuhkan untuk mengikat substat dan menjalankan katalisis. Sebaliknya, banyak protein struktural yang menggunakan konformasi yang diperluas. Protein-protein berserat memiliki perbandingan aksial 10 atau lebih (Rodwell & Kennelly, 2003).

Lipoprotein dan glikoprotein mengandung lipid dan karbohidrat yang terikat secara kovalen. Myoglobin, hemoglobin, sitokrom, dan banyak protein lainnya mengandung ion logam yang terikat secara kuat, dan disebut metaloprotein. Dengan pengembangan dan aplikasi dari teknik untuk memperkirakan sekuens asam amino dari protein, skema klasifikasi yang lebih cermat telah muncul, berdasarkan kemiripan, atau homologi, dari sekuens asam amino dan struktur. Meski demikian, banyak klasifikasi lebih awal yang tetap digunakan (Rodwell & Kennelly, 2003).

Struktur protein dibagi dalam empat tingkatan, yaitu struktur primer, struktur sekunder, struktur tersier, dan struktur kuartener (McMurry, 2004; Rodwell & Kennelly, 2003).

a. Struktur Primer (McMurry, 2004; Rodwell & Kennelly, 2003)

Struktur primer suatu protein adalah sekuens asam amino dalam rantai polipeptida. Asam amino penyusun rantai protein terdiri dari 20 jenis L- α -asam amino. Berdasarkan polaritas masing-masing, asam-asam amino tersebut diklasifikasikan sebagai berikut.

Tabel 2.1. Jenis-jenis Asam Amino Penyusun Protein (sumber: *Harper's Illustrated Biochemistry*).

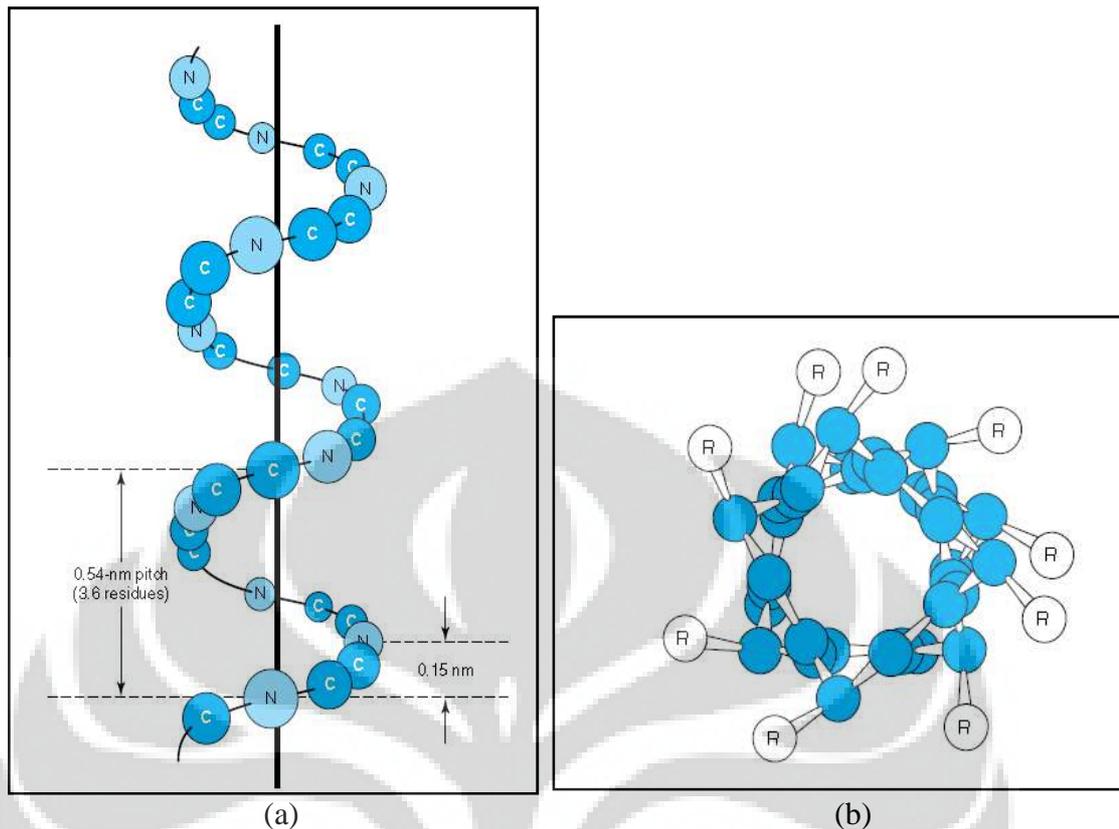
Name	Symbol	Structural Formula	pK ₁	pK ₂	pK ₃
With Aliphatic Side Chains					
Glycine	Gly [G]	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	$\alpha\text{-COOH}$ 2.4	$\alpha\text{-NH}_3^+$ 9.8	R Group
Alanine	Ala [A]	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	2.4	9.9	
Valine	Val [V]	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	2.2	9.7	
Leucine	Leu [L]	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	2.3	9.7	
Isoleucine	Ile [I]	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_3 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	2.3	9.8	
With Side Chains Containing Hydroxylic (OH) Groups					
Serine	Ser [S]	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	2.2	9.2	about 13
Threonine	Thr [T]	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	2.1	9.1	about 13
Tyrosine	Tyr [Y]	See below.			
With Side Chains Containing Sulfur Atoms					
Cysteine	Cys [C]	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{SH} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	1.9	10.8	8.3
Methionine	Met [M]	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{S}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	2.1	9.3	
With Side Chains Containing Acidic Groups or Their Amides					
Aspartic acid	Asp [D]	$\begin{array}{c} ^-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	2.0	9.9	3.9
Asparagine	Asn [N]	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	2.1	8.8	
Glutamic acid	Glu [E]	$\begin{array}{c} ^-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	2.1	9.5	4.1
Glutamine	Gln [Q]	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	2.2	9.1	

With Side Chains Containing Basic Groups			α -COOH	α -NH ₃ ⁺	R Group
Arginine	Arg [R]	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{C}=\text{NH}_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	1.8	9.0	12.5
Lysine	Lys [K]	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	2.2	9.2	10.8
Histidine	His [H]	$\begin{array}{c} \text{HN} \quad \text{N} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	1.8	9.3	6.0
Containing Aromatic Rings					
Histidine	His [H]	See above.			
Phenylalanine	Phe [F]	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	2.2	9.2	
Tyrosine	Tyr [Y]	$\begin{array}{c} \text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	2.2	9.1	10.1
Tryptophan	Trp [W]	$\begin{array}{c} \text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	2.4	9.4	
Imino Acid					
Proline	Pro [P]	$\begin{array}{c} \text{N}^+ \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}^- \end{array}$	2.0	10.6	

b. Struktur Sekunder (Rodwell & Kennelly, 2003)

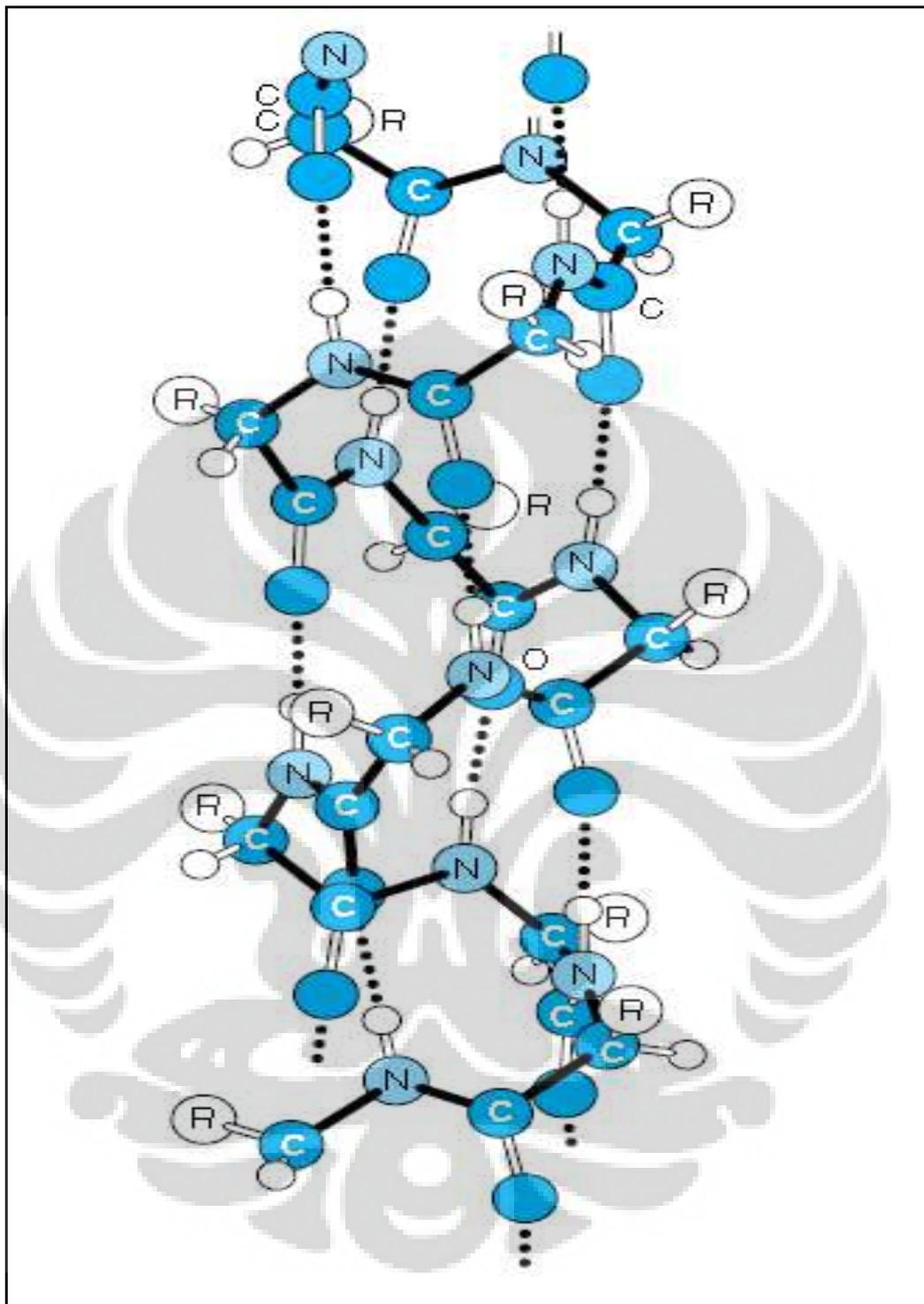
Struktur sekunder protein terdiri dari reguler untai- α (α helix), lembar β (β sheet), gelungan (loop), putaran (turn), tekukan (bend).

Untai α terbentuk dari rantai utama polipeptida yang melingkar membentuk spiral mengelilingi suatu axis, dengan rantai samping menghadap keluar (Gambar 2.1). Konformasi untai α distabilkan oleh suatu ikatan hidrogen antara atom H dan O (Gambar 2.2). Lembar β dibentuk dari residu-residu yang membentuk pola zigzag atau lipatan (*pleated pattern*), di mana rantai samping R dari residu-residu yang berdampingan menghadap ke arah yang berlawanan (Gambar 2.3).

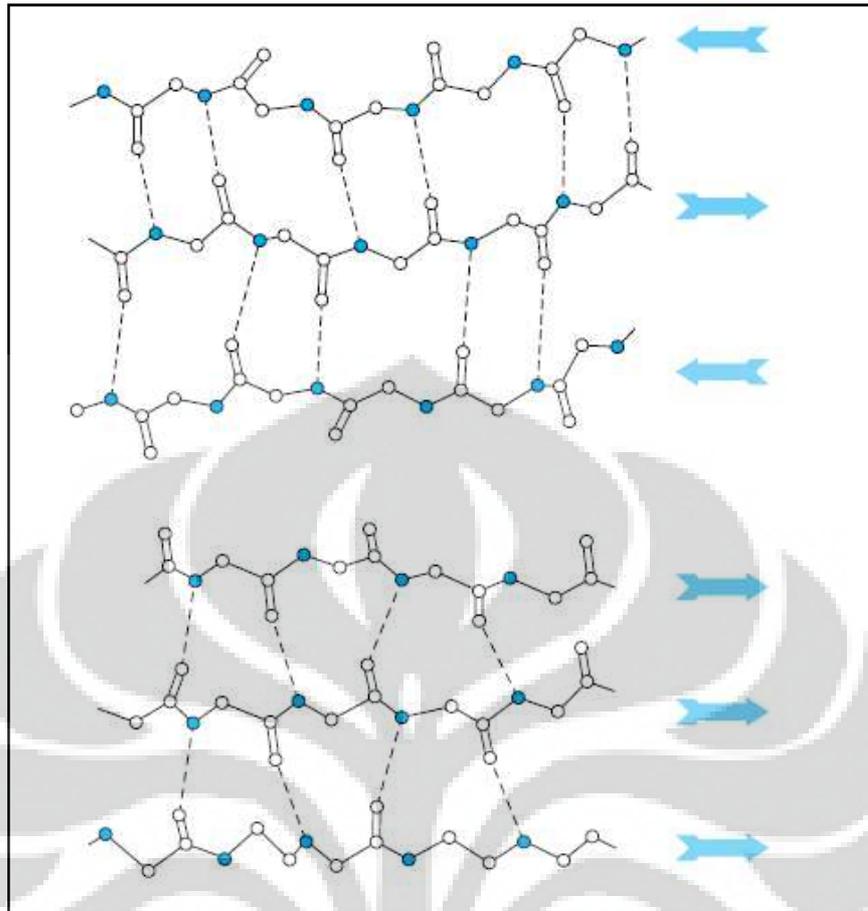


Gambar 2.1. (a) Untai α yang terbentuk dari rantai polipeptida yang melingkar mengelilingi suatu aksis, (b) jika dilihat dari atas, rantai samping R mengarah keluar (sumber: *Harper's Illustrated Biochemistry*).

Secara umum, sebagian dari residu-residu dalam sejenis protein globular tinggal dalam untai α dan lembar β , dan sebagian lagi dalam struktur gelung (*loop*), putaran (*turn*), tekukan (*bend*), dan konformasi lainnya. Putaran dan tekukan mengacu pada bagian-bagian pendek dari asam amino yang menggabungkan dua unit struktur sekunder, seperti dua helai berdampingan dari lembar β antiparalel (Gambar 2.4). Gelungan (*loop*) adalah daerah yang mengandung residu-residu di luar jumlah minimum yang penting untuk menyambungkan daerah-daerah pada struktur sekunder. Meskipun tidak beraturan dalam konformasi, gelungan memainkan peranan penting dalam fungsi biologis. Pada banyak enzim, gelung yang menghubungkan bidang-bidang (*domains*) bertanggung jawab dalam pengikatan substrat, dan sering kali mengandung residu-residu aminoasil yang terlibat dalam katalisis.



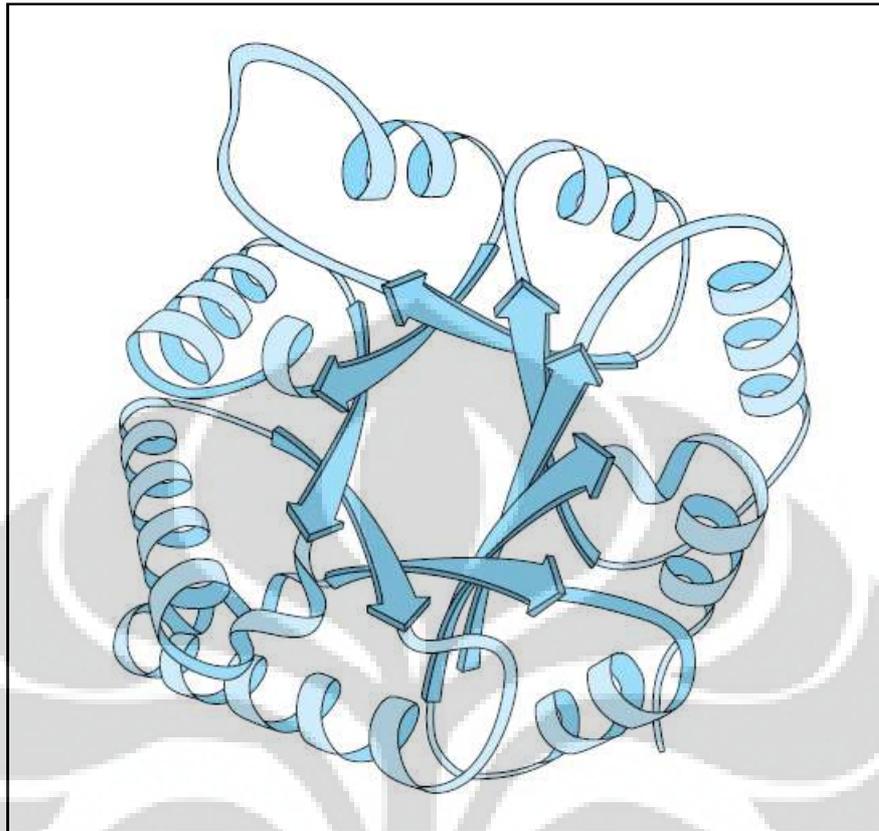
Gambar 2.2. Untai α distabilkan oleh ikatan hidrogen (sumber: *Harper's Illustrated Biochemistry*)



Gambar 2.3. Lembar β , struktur sekunder protein (sumber: *Harper's Illustrated Biochemistry*).

c. Struktur Tersier (Rodwell & Kennelly, 2003)

Terminologi "struktur tersier" mengacu pada keseluruhan konformasi tiga dimensi dari suatu polipeptida. Hal tersebut mengindikasikan, dalam ruang tiga dimensi, bagaimana struktur sekunder (untaian, lembaran, tekukan, putaran, dan gelungan) terjalin membentuk bidang-bidang (*domains*), dan bagaimana bidang-bidang tersebut terkait secara spasial satu dengan lainnya. Suatu bidang (*domain*) adalah bagian dari struktur protein yang cukup untuk melakukan suatu tugas fisik atau kimia, seperti pengikatan substrat atau ligan-ligan lain. Bidang-bidang lainnya dapat menahan protein pada suatu membran atau berinteraksi dengan molekul pengatur yang menentukan fungsinya. Contoh struktur tersier diperlihatkan pada gambar berikut (Gambar 2.4).



Gambar 2.4. Contoh struktur tersier protein (sumber: *Harper's Illustrated Biochemistry*).

d. Struktur Kuartener (Rodwell & Kennelly, 2003)

Dalam beberapa kasus, protein-protein disusun oleh lebih dari satu polipeptida atau protomer. Struktur kuartener menjelaskan komposisi polipeptida dari suatu protein dan, untuk protein oligomer, hubungan spasial antar masing-masing subunit atau protomernya.

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

Inhibisi enzim oleh obat dapat bersifat reversibel atau ireversibel dengan dua tipe inhibisi, yaitu inhibisi kompetitif dan nonkompetitif. Disebut inhibisi kompetitif apabila obat membentuk kompleks dengan enzim, atau enzim-substrat dengan kemudahan yang sama tetapi pada sisi yang berbeda dengan sisi untuk substrat. Inhibisi nonkompetitif dapat dikaitkan dengan inhibisi allosterik.

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

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

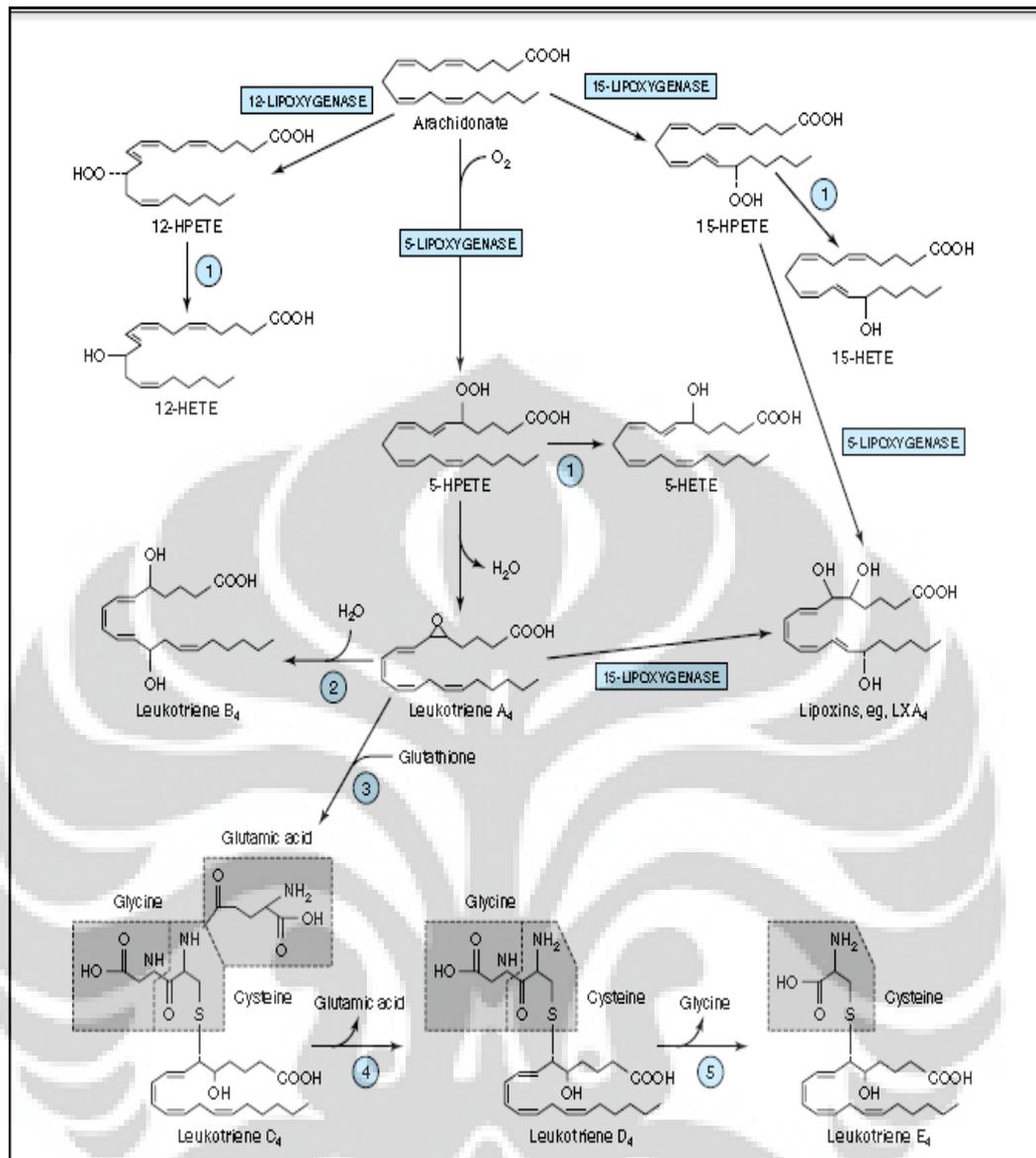
2.3 Enzim Lipoksigenase

Lipoksigenase adalah famili dari enzim deoksigenase Fe nonheme yang berfungsi dalam pembentukan hidroperoksida asam lemak (Holman & Mogul, 2002). Enzim tersebut secara luas ditemukan pada tumbuhan dan hewan. Substrat yang cocok untuk enzim tersebut adalah asam lemak poli-tak jenuh dengan ikatan rangkap cis. Asam-asam lemak jenis tersebut adalah asam-asam lemak yang esensial pada manusia. Substrat-substrat tersebut tidak terdapat dalam sebagian besar bakteri dan jamur. Didasarkan pada bukti tersebut, dapat disimpulkan bahwa enzim lipoksigenase tidak terdapat pada genom ragi dan bakteri. Tidak ada catatan yang jelas terhadap lipoksigenase pada serangga, tetapi produk hasil derivasi lipoksigenase-arakhidonat (hydroxyeicosatetranoic acid) ditemukan pada serangga primitif *Thermobia domestica*. Tumbuhan tingkat tinggi yang mengandung banyak lipoksigenase sedikitnya delapan, ditemukan pada kacang kedelai, *Glycine max*. Pada tikus terdapat tujuh gen yang mengekspresikan protein lipoksigenase, dan lima homolog (serta sebuah pseudogen) ditemukan pada manusia (Brash, 2012).

Dalam tubuh manusia, isozim dari lipoksigenase yang ditemukan adalah 5-lipoksigenase dan 12-lipoksigenase. Penomoran 5 dan 12 adalah untuk nomor

atom karbon yang dioksidasi dari substratnya. Enzim 12-lipoksigenase juga memiliki isomer optik (stereokonfigurasi), yaitu 12S-lipoksigenase dan 12R-lipoksigenase. Pada manusia, aktivasi 5-lipoksigenase dari leukosit menghasilkan berbagai jenis leukotrien, yang bersama dengan senyawa-senyawa dihidroeikosanoid menyebabkan bronkokonstriksi dan inflamasi. Pengobatan asma belakangan ini meliputi inhibitor 5-lipoksigenase dan antagonis reseptor leukotrien. 12S-lipoksigenase pada platelet mensintesis asam 12-hidroksieikosatetranoat (12-HETE), yang berperan sebagai molekul penanda dalam berbagai aktivitas biologis.

Lipoksigenase mengubah asam arakhidonat menjadi leukotrien, yang berperan dalam mengerahkan leukosit dan inflamasi (Duvoix, Blasius, Delhalle, Schnekenburger, Morceau, Henry, Dicato & Diederich, 2004). Leukotrien memainkan peran penting dalam respon inflamasi. Senyawa-senyawa lain seperti prostaglandin, tromboksan, dan lipoksin, bersama leukotrien telah menyebabkan patogenesis beberapa penyakit inflamasi, yang paling umum adalah asma, psoriasis, dan rheumatoid arthritis. Peran leukotrien sebagai mediator inflamasi dari berbagai penyakit telah menjadi target terapi, dan banyak inhibitor, yang ditujukan pada biosintesis atau mekanisme efektor leukotrien, telah dikembangkan (Henderson, 1994).



Gambar 2.5. Jalur sintesis yang melibatkan enzim lipoksigenase pada manusia
(sumber: *Harper's Illustrated Biochemistry*)

12-lipoksigenase tipe platelet diekspresikan secara berlebih pada berbagai jenis kanker yang berbeda, termasuk kanker prostat, dan level ekspresinya berkaitan dengan tingkat kanker tersebut. Pada awalnya, 12-lipoksigenase tipe platelet diyakini terekspresi pada platelet, sel HEL, dan sel endotel vena umbilikal. Meski demikian, ekspresi 12-lipoksigenase tipe platelet telah terdeteksi pada berbagai jalur sel (DU-145, LnCAP, dan PC-3) dan jaringan tumor, termasuk tumor prostat. Telah ditemukan bahwa ekspresi mRNA 12-lipoksigenase tipe platelet secara signifikan lebih tinggi pada adenokarsinoma prostat dibandingkan

terhadap epitel normal kelenjar prostat yang sama, dan peningkatan ekspresi ini berkaitan dengan tahap perkembangan dan tingkat adenokarsinoma (Jankun, et al, 2006).

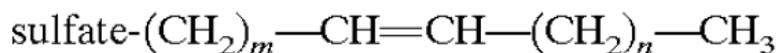
Penelitian yang dilakukan oleh Chen et al (1994) membuktikan bahwa 12(S)-HETE diproduksi oleh sel tumor. 12(S)-HETE dapat mengaktifkan protein kinase C, meningkatkan ekspresi permukaan sel dari integrin, meningkatkan adhesi, menginduksi penarikan sel endotel, dan meningkatkan metastasis sel tumor secara eksperimental.

2.4 Inhibitor Lipoksigenase

Penelitian tentang inhibitor enzim lipoksigenase, terutama yang selektif, penting dalam pengembangan obat-obat dalam terapi penyakit yang berkaitan dengan ekspresi berlebih enzim lipoksigenase. Pada terapi asma, salah satu jenis obat yang dikembangkan adalah inhibitor 5-lipoksigenase. Melihat peran yang signifikan dari 12-lipoksigenase dalam perkembangan dan metastasis sel kanker, pengembangan inhibitor enzim 12-lipoksigenase menjadi penting. Selain itu, inhibitor selektif 12-lipoksigenase terhadap 5-lipoksigenase penting dikembangkan untuk mendalami peran dan fungsi enzim 12-lipoksigenase dalam fungsi biologis (Müller, Altmann, & Prinz, 2001).

Salah satu golongan dari inhibitor enzim 12-lipoksigenase disintesis oleh Müller et al (2001), yaitu golongan antrasenon tersubstitusi 2-arilalkil. Penelitian tersebut mengkaji tentang hubungan struktur-aktivitas terhadap aktivitas inhibisi 12-lipoksigenase, dan selektivitasnya dibandingkan terhadap 5-lipoksigenase.

Inhibitor allosterik untuk enzim lipoksigenase secara umum telah diuraikan oleh Holman dan Mogul (2000). Inhibitor allosterik lipoksigenase secara umum adalah senyawa alkenil rantai panjang tersulfatasi, yaitu senyawa alkenil rantai panjang monosaturasi dengan gugus sulfat tunggal pada posisi 1. Selain itu, senyawa tersebut memiliki kisaran panjang sekitar 14-22 atom karbon, dengan gugus tak jenuh antara posisi 8 hingga 14. Contoh senyawanya antara lain 9-oleilsulfat, 9-palmitoleilsulfat, dan 11-eikosenilsulfat.



Gambar 2.6. Struktur inhibitor allosterik lipoksigenase oleh Holman dan Mogul (2000)

2.5 Kurkumin

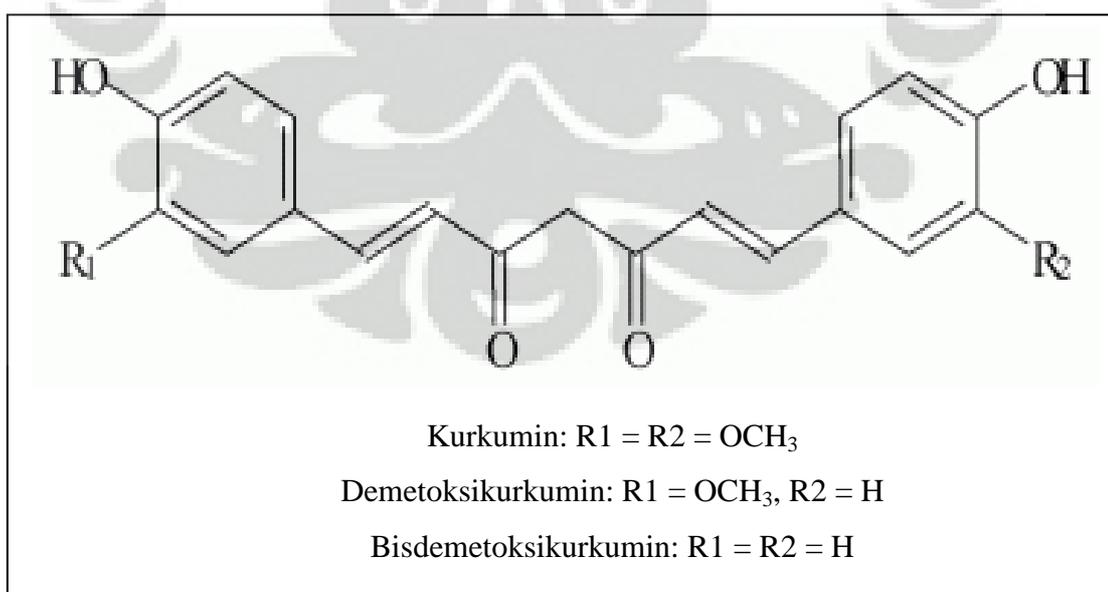
Kurkumin adalah produk yang diperoleh dari ekstraksi kunyit, misalnya rimpang tumbuhan *Curcuma longa* L. (*Curcuma domestica* Valetton), dan pemurnian ekstrak tersebut dengan kristalisasi. Tumbuhan *Curcuma longa* L., yang merupakan famili Zingiberaceae, berasal dari India. Tumbuhan tersebut terdistribusi di daerah tropis dan subtropis, secara luas dibudidayakan di negara-negara Asia Tenggara. Kunyit, seperti rimpang *Curcuma longa* L., telah lama digunakan dalam makanan sebagai bumbu, terutama sebagai campuran dalam berbagai jenis bubuk dan saus kari, di mana kurkumin dalam kunyit merupakan substansi pemberi warna yang utama (Stankovic, 2004).

Dasar pewarnaan tersebut adalah kurkumin sebanyak 3-5 % dalam kunyit. Produk tersebut pada dasarnya mengandung zat warna 1,7-bis-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-dion (juga dikenal sebagai kurkumin) dan turunan demetoksi- dan bis-demetoksinya dalam berbagai perbandingan. Dapat pula mengandung sedikit minyak dan resin yang terdapat secara alami dalam kunyit (Stankovic, 2004).

Kegunaan medis dari tumbuhan ini telah didokumentasikan dalam Ayurveda (cara pengobatan India) selama lebih dari 6000 tahun. Ia biasa digunakan sebagai bumbu, zat pemberi rasa, pengawet makanan, zat pewarna, atau untuk dekorasi (Aggarwal, Kumar, & Bharti, 2003). Kurkumin memiliki berbagai efek farmakologi, di antaranya sebagai antitumor, antiinflamasi, dan antiinfeksi, dan sedang dalam percobaan terkini untuk terapi bagi penderita AIDS (Mazumder, Raghavan, Weinstein, Kohn, & Pommier, 1994). Karena sebagian besar kanker disebabkan oleh disregulasi sebanyak 500 gen berbeda, agen yang menyerang banyak produk gen dibutuhkan dalam pencegahan dan pengobatan kanker. Kurkumin menunjukkan interaksi dengan berbagai jenis protein, dan

memodifikasi ekspresi serta aktivitas protein tersebut. Interaksi tersebut meliputi enzim dan agen inflamasi sitokin, faktor transkripsi, dan produk gen yang terkait dengan pertahanan sel, proliferasi, invasi, dan angiogenesis. Kurkumin telah terbukti menghambat proliferasi dari berbagai jenis sel tumor dalam kultur, mencegah kanker yang diinduksi karsinogen pada hewan pengerat, dan menghambat pertumbuhan tumor manusia dalam model xenotransplantasi atau ortotransplantasi hewan, baik sendiri maupun dalam kombinasi dengan agen kemoterapi atau radiasi (Kunnumakara, Anand, & Aggarwal, 2008).

Efek farmakologi lain yang telah banyak diketahui dari kurkumin adalah sebagai agen antiinflamasi. Banyak laporan telah membuktikan bahwa modulasi respon imun oleh kurkumin memainkan peranan penting dalam pengobatan inflamasi dan penyakit metabolik (Srivastava, Singh, Dubey, Misra, & Khar, 2010). Kurkumin memperlihatkan aktivitas antiinflamasi dan antiproliferasi dengan menurunkan oksigen reaktif (*reactive oxygen species/ROS*) (Ravindran, Subbaraju, Ramani, Sung, & Aggarwal, 2010). Aktivitas antiinflamasinya, seperti yang telah banyak diteliti, dapat diketahui dari aktivitas penghambatan kurkumin terhadap dua jenis enzim pembentuk mediator-mediator inflamasi, yaitu siklooksigenase dan lipoksigenase (Nardo, Andreoni, Bondani, Másson, & Tønnesen, 2009).



Gambar 2.7. Struktur Kimia Kurkumin dan Turunannya

2.6 Bioinformatika

Bioinformatika adalah suatu teknik yang menggabungkan ilmu biologi (ilmu hayati) dengan teknologi informasi. Teknik tersebut memungkinkan analisis dan interpretasi data biologis menggunakan alat komputasi. Perangkat utama dalam teknik ini adalah *software* dan internet (Tasbichaty, 2010). *Software* atau perangkat lunak dibutuhkan untuk pengolahan dan analisis data sesuai dengan kebutuhan dan spesifikasi masing-masing, dan internet dibutuhkan untuk kemudahan akses basis data.

2.7 Dinamika Molekuler (*Molecular Dynamic*) (Gunsteren & Berendsen, 1990)

Selama beberapa dekade terakhir, telah dimungkinkan untuk melakukan simulasi dari dinamika sistem molekuler pada komputer. Metode dinamika molekuler (*molecular dynamics/MD*) menggunakan persamaan Newton untuk pergerakan suatu sistem molekuler, yang menghasilkan lintasan semua atom dalam sistem. Sasaran dari simulasi sistem molekuler dengan komputer adalah untuk mengkomputasikan perilaku makroskopik (*macroscopic behavior*) dari interaksi mikroskopik (*microscopic interactions*). Kontribusi utama yang bisa ditawarkan pertimbangan mikroskopik adalah (1) pemahaman dan (2) interpretasi dari hasil percobaan, (3) perkiraan semikuantitatif dari hasil percobaan, dan (4) kemampuan untuk menginterpolasikan atau mengekstrapolasikan data percobaan ke dalam ranah yang sulit untuk diakses di laboratorium.

Tantangan mendasar bagi komputasi kimia adalah untuk menjelaskan atau bahkan memprediksi:

- a. Struktur dan stabilitas dari suatu sistem molekuler
- b. Energi (bebas) dari tingkatan-tingkatan berbeda pada suatu sistem molekuler
- c. Proses reaksi di antara sistem-sistem molekuler.

Perbedaan mendasar antara dinamika molekuler dengan penambatan molekuler adalah adanya dimensi waktu pada dinamika molekuler. Penambatan molekuler biasa dilakukan untuk memperoleh data yang merupakan parameter kekuatan interaksi atau kestabilan sesaat, seperti nilai energi bebas sistem (ΔG) yang mempengaruhi nilai konstanta inhibisi enzim (K_i). Sedangkan dinamika molekuler dilakukan untuk memperoleh data kestabilan interaksi dari waktu ke

waktu. Dimensi waktu dalam simulasi dinamika molekuler berkisar pada satuan pikodetik, karena fenomena-fenomena molekuler yang mendukung kestabilan sistem idealnya telah dapat diamati dalam waktu sesingkat-singkatnya.

2.8 OpenBabel

OpenBabel adalah perangkat lunak yang dapat digunakan untuk mengubah format suatu berkas menjadi format lainnya yang dibutuhkan dalam pengolahan data komputasi. Selain itu, perangkat lunak ini dapat pula digunakan untuk menambahkan atom hidrogen, membuat struktur tiga dimensi, mengkalkulasikan muatan parsial, dan pemisahan duplikasi senyawa dari suatu kumpulan data.

2.9 Amber

Amber adalah nama kolektif untuk serangkaian program yang memungkinkan pengguna menjalankan simulasi dinamika molekuler, biasanya pada biomolekul. Tidak satu pun program individual yang menggunakan nama ini, tetapi masing-masing bagian bekerja secara baik bersama-sama, dan memberikan kerangka kerja yang berguna untuk berbagai perhitungan. Kata amber juga kadang digunakan untuk mengacu pada *force field* empiris yang digunakan (Case et al, 2010). Pada penelitian kali ini, program dalam Amber yang digunakan adalah antechamber, leap, sander, dan ptraj.

2.10 VMD

VMD adalah perangkat lunak yang biasa digunakan untuk visualisasi hasil dinamika molekuler dengan memasukkan berkas parameter dan koordinat. Selain itu, perangkat lunak ini juga dapat digunakan untuk analisis, seperti analisis ikatan hidrogen dalam penelitian ini.

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Komputasi Biomedik Fakultas Farmasi dan Laboratorium Komputer Fakultas Ilmu Komputer, Universitas Indonesia, Depok.

3.2 Bahan

3.2.1 Ligan (kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin) dan makromolekul (12-lipoksigenase) hasil pemodelan homologi dan penambatan molekuler dari penelitian sebelumnya, yang dilakukan oleh Tasbichaty (2010).

3.3 Alat

3.3.1 Perangkat Keras

3.3.1.1 Komputer dengan spesifikasi RAM (*Random Access Memory*) minimal satu gigabyte, Quad Core processor (Intel® Core™, Amerika), *Graphic Card* NVIDIA Ge Force GTX 295 (Amerika), dan sistem operasi Microsoft Windows 7 Professional 64-bit (Microsoft, Amerika). Komputer terhubung dengan koneksi internet dan UPS (*Uninterrupted Power Supply*).

3.3.1.2 Kelengkapan komputer lainnya, seperti monitor (AOC, China), CPU (*Central Processing Unit*) Asus (Amerika), *mouse* (Simbadda, Indonesia; Logitech, China) dan *keyboard* (Simbadda, Indonesia; Logitech, China).

3.3.2 Perangkat Lunak

3.3.2.1 Open Babel (Hutchison, et al.)

3.3.2.2 UCSF Chimera (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatic, University of California, San Francisco, Amerika)

3.3.2.3 Amber MD (University of California, San Francisco)

3.3.2.4 AmberTools (University of California, San Francisco)

3.3.2.5 VMD (University of Illinois, Amerika)

3.4 Metode Pelaksanaan

3.4.1 Simulasi Dinamika Molekuler

Simulasi dinamika molekuler dilakukan dengan perangkat lunak AMBER MD. Tahapan-tahapan dari simulasi dinamika molekuler adalah sebagai berikut:

3.4.1.1 Persiapan

a. Berkas Ligan dan Makromolekul

Persiapan dilakukan dengan terlebih dahulu menyiapkan ligan (kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin) dan makromolekul (12-lipoksigenase) hasil penambatan molekuler yang dilakukan pada penelitian sebelumnya. Masing-masing ligan dan makromolekul dari hasil penelitian sebelumnya disimpan dengan format *.pdb* dengan *software* UCSF Chimera. Berkas disiapkan dengan penghilangan informasi CONNECT dan menambahkan kata TER (terminal) sebelum END.

b. Penambahan Atom Hidrogen dan Muatan Parsial AM1-BCC

Pada tahap ini dilakukan penambahan atom hidrogen pada ligan dan konversi berkas ke dalam format *.mol2*. Penambahan atom hidrogen dan konversi tersebut dapat dilakukan dengan program Leap yang merupakan salah satu perangkat dari AMBER, atau dengan perangkat lunak Open Babel. Setelah penambahan atom hidrogen dan konversi ke dalam bentuk *mol2*, berkas ligan diberi muatan parsial, dengan perintah:

```
antechamber -i ligan_ob.mol2 -fi mol2 -o ligan_bcc.mol2 -fo mol2 -c bcc
```

-s 2

c. Pengujian Parameter

Perintah yang dijalankan adalah sebagai berikut:

```
parmchk -i ligan_bcc.mol2 -f mol2 -o ligan.frcmod
```

Setelah menjalankan perintah tersebut, akan diperoleh berkas dengan format *.frcmod*, yang merupakan berkas parameter, yang dapat dimuat ke dalam Leap untuk menambahkan parameter yang hilang.

d. Pembuatan Berkas Parameter Topologi dan Koordinat *Input*, Penetralkan Muatan Sistem, dan Penambahan Pelarut

Setelah file *.frcmod* dibuat, berikutnya berkas ligan dan makromolekul dapat dimuat sebagai unit pada Leap. Program Leap dimasuki dengan perintah berikut:

```
$ tleap -f leaprc.ff99SB
```

Tahap berikutnya adalah pembuatan berkas parameter topologi (*.prmtop*) dan koordinat *input* (*.inpcrd*) untuk ligan, makromolekul, dan kombinasi makromolekul-ligan. Kemudian menghitung muatan ligan, penambahan ion untuk menetralkan muatan ligan, penambahan pelarut air kotak oktahedron dengan jarak kotak 12 Å untuk kombinasi makromolekul-ligan, dan membuat berkas parameter topologi (*.prmtop*) serta koordinat *input* (*.inpcrd*) untuk makromolekul-ligan yang telah dilarutkan. Tahap-tahap tersebut dijalankan menggunakan berkas *input* *mmpbsa_leap.in* seperti pada **Lampiran 1**.

3.4.1.2 Minimisasi

a. Minimisasi Tahap Pertama

Minimisasi tahap pertama, yaitu minimisasi pada molekul air, sementara makromolekul dan ion ditahan, dilakukan menggunakan berkas *input* *min.in* seperti pada **Lampiran 2**. Sebelum menjalankan perintah, berkas-berkas yang diperlukan untuk proses minimisasi harus berada dalam satu *folder*, yaitu berkas parameter topologi dan koordinat *input* dari kombinasi makromolekul-ligan yang

dilarutkan (*lox_ligan_solv.prmtop* dan *lox_ligan_solv.inpcrd*), dan berkas *input* *min.in*. Perintah yang dijalankan pada minimisasi tahap pertama adalah:

```
$ sander -O -i min.in -p lox_ligan_solv.prmtop -c lox_ligan_solv.inpcrd -r
lox_ligan_solv_min1.rst -o lox_ligan_solv_min.out -ref
lox_ligan_solv.inpcrd &
```

b. Minimisasi Tahap Kedua

Minimisasi tahap kedua, yaitu untuk keseluruhan sistem (makromolekul, ion, dan air), dilakukan menggunakan berkas *input* *min_all.in* seperti pada **Lampiran 3**. Berkas *.rst* hasil minimisasi tahap sebelumnya digunakan sebagai koordinat *input* untuk minimisasi tahap kedua ini. Dengan mekanisme yang sama, tetapi dengan perbedaan pada beberapa berkas, perintah minimisasi tahap kedua adalah sebagai berikut:

```
$ sander -O -i min_all.in -p lox_ligan_solv.prmtop -c lox_ligan_solv.rst -r
lox_ligan_solv_min_all.rst -o lox_ligan_solv_min_all.out &
```

3.4.1.3 Ekuilibrisasi

a. Ekuilibrisasi Tahap Pertama

Pada ekuilibrisasi tahap pertama, suhu sistem dinaikkan dari 0 perlahan-lahan hingga mencapai 300 K dalam waktu simulasi 10 pikodetik. Berkas *input* yang digunakan adalah *eq1.in* **Lampiran 4**. Tahap ini dapat dikatakan kelanjutan dari tahap minimisasi, sehingga berkas-berkas yang diperlukan relatif sama, seperti berkas parameter topologi (*lox_ligan_solv.prmtop*), dan koordinat *input* yang digunakan adalah berkas *.rst* dari minimisasi tahap kedua (*lox_ligan_solv_min_all.rst*). Serupa dengan tahap minimisasi, berkas-berkas

tersebut harus berada dalam satu *folder* sebelum perintah dijalankan. Perintah yang dijalankan adalah sebagai berikut:

```
$ sander -O -i eq1.in -p lox_ligan_solv.prmtop -c
lox_ligan_solv_min_all.rst -r lox_ligan_solv_eq1.rst -x
lox_ligan_solv_eq1.mdcrd -o lox_ligan_solv_eq1.out &
```

Setelah selesai, dibuat kurva suhu VS waktu yang diekstrak dari berkas *output* dengan format *.out*, yang kemudian disimpan dalam berkas dengan nama *temp.dat*. Data suhu terhadap waktu diekstrak dengan perintah:

```
$ grep TEMP namaberkaskeluaran.out | awk '{print $6, $9}' > temp.dat
```

Kurva suhu VS waktu hasil ekuilibrasi tahap pertama dapat dibuat dengan Microsoft Excel. Hasil yang sesuai adalah ketika suhu sistem mencapai yang diharapkan, yaitu 300 K, dengan tidak memasukkan dua data terakhir yang merupakan penyimpangan RMS dan rata-rata.

b. Ekuilibrasi Tahap Kedua

Tahap kedua, sistem diekuilibrasi dengan kontrol tekanan dan suhu untuk menyesuaikan densitas air menjadi nilai percobaan. Berkas *input* yang digunakan adalah *eq2.in* (**Lampiran 5**). Ekuilibrasi tahap kedua ini menggunakan koordinat *input* hasil ekuilibrasi tahap pertama (*lox_ligan_solv_eq1.rst*). Perintah yang dijalankan adalah sebagai berikut:

```
$ sander -O -i eq2.in -p lox_ligan_solv.prmtop -c lox_ligan_solv_eq1.rst -r
lox_ligan_solv_eq2.rst -x lox_ligan_solv_eq2.mdcrd -o
lox_ligan_solv_eq2.out &
```

Setelah proses selesai, data suhu dan densitas air kembali diekstraksi dengan cara yang sama dengan tahap pertama. Perintah untuk mengekstrak data suhu terhadap waktu, kemudian disimpan dalam berkas dengan nama *temp.dat*, adalah sebagai berikut:

```
$ grep TEMP namaberkaskeluaran.out | awk '{print $6, $9}' > temp.dat
```

Perintah untuk mengekstrak data densitas air, kemudian disimpan dalam berkas dengan nama `dens.dat` adalah sebagai berikut:

```
$ grep Density namaberkaskeluaran.out | awk '{print $3}' > dens.dat
```

Setelah itu, seperti tahap sebelumnya, data dibuat dalam bentuk kurva menggunakan Microsoft Excel. Pada tahap ini, suhu seharusnya telah mencapai kestabilan pada nilai 300 K, dan densitas air telah mencapai 1,0 g/mL.

c. Ekuilibrasi Tahap Ketiga

Tahap ketiga, untuk memastikan, ekuilibrasi kembali dilakukan dalam rentang waktu yang sedikit lebih panjang pada suhu dan tekanan konstan. Berkas *input* yang digunakan adalah `eq3.in` (**Lampiran 6**).

Setelah selesai, data suhu dan densitas air kembali diekstrak dengan perintah yang sama dengan tahap sebelumnya, dan dibuat kurvanya. Pada tahap ini, energi potensial juga dievaluasi untuk melihat stabilitas sistem selama proses ekuilibrasi. Perintah untuk mengekstrak data energi potensial dari berkas keluaran adalah sebagai berikut.

```
$ grep EPtot namaberkaskeluaran.out | awk '{print $9}' > EPtot.dat
```

Setelah itu, kurva energi potensial terhadap waktu dibuat dengan Microcoft Excel dan dievaluasi.

3.4.1.4 RMSD (*Root Mean Square Deviation*)

Tahap berikutnya sebelum produksi data, adalah membuat kurva RMSD VS waktu untuk memastikan struktur telah mencapai fase stasioner. Plot RMSD terhadap waktu diekstrak menggunakan `ptraj`, dengan berkas *input* `ptraj.in` (**Lampiran 7**). Perintah yang digunakan adalah:

```
$ ptraj lox_ligan_solv.prmtop ptraj.in
```

Pada dasarnya, perintah tersebut menyebabkan `ptraj` dibaca dalam berkas trajektori asal yang dibuat oleh `sander`, menengahkan kembali koordinat ke pusat massa protein dan mencitrakan kembali kotak periodik sehingga terlihat bagus dan tepat.

Jika kurva RMSD VS waktu menunjukkan bahwa sistem telah berada dalam fase stasioner, maka langkah produksi dapat dilakukan.

3.4.1.5 Produksi

Pada tahap ini, protokol yang digunakan sama dengan ekuilibrasi tahap akhir dan simulasi dengan mudah dilanjutkan hingga waktu yang ditentukan untuk mendapatkan gambaran dinamika molekuler sebaik-baiknya.

Dalam penelitian ini, produksi dilakukan dalam waktu 2 nanodetik, yang terbagi dalam 10 tahap, masing-masing tahap untuk waktu simulasi 200 pikodetik memerlukan waktu kurang lebih 72 jam. Berkas input yang digunakan adalah `prod_ligan.in` (**Lampiran 8**). Berkas lain yang diperlukan untuk produksi adalah `run_md.x` (**Lampiran 9**) yang akan menjalankan produksi secara otomatis selama 10 kali, `do_1.run` (**Lampiran 10**), `do.run` (**Lampiran 11**) untuk menjalankan berkas `run_md.x` dan membuat *log file* produksi. Perintah yang dijalankan adalah:

```
chmod 755 do_1.run
```

```
chmod 755 run_md.x
```

```
. do_1.run
```

3.4.2 Analisis Hasil Simulasi Dinamika Molekuler

Setelah diperoleh hasil simulasi dinamika molekuler senyawa kompleks 12-lipoksigenase dengan kurkumin (`cur`), demetoksikurkumin (`des`), dan bisdemetoksikurkumin (`bis`), dilakukan analisis terhadap:

3.4.2.1 Suhu Sistem dan Densitas Air

Data suhu sistem dan densitas air selama waktu simulasi diekstrak untuk memastikan selama simulasi berlangsung suhu telah mencapai yang diharapkan dan densitas air telah sesuai dengan harga percobaan.

3.4.2.2 Energi Potensial

Energi potensial dievaluasi untuk menentukan waktu untuk mengevaluasi RMSF. Data energi potensial diperoleh dari berkas *output* masing-masing untuk setiap tahap simulasi, yang diekstrak dengan perintah yang sama dengan tahap ekuilibrasi.

3.4.2.3 RMSD (*Root Mean Square Deviation*)

Data RMSD sistem diperoleh dengan cara yang sama seperti perolehan data RMSD pada ekuilibrasi tahap 1-3, menggunakan berkas *input* ptraj.in (**Lampiran 12**), dengan memasukkan semua berkas *snapshot* dengan format .mdcrd yang dihasilkan dari masing-masing tahap simulasi. Perintah yang dijalankan, sama dengan sebelumnya, adalah:

```
$ ptraj lox_ligan_solv.prmtop ptraj.in
```

RMSD dianalisis untuk melihat konformasi struktur selama simulasi dibandingkan terhadap konformasi awal.

3.4.2.4 RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*)

Data RMSF diperoleh dengan cara yang sama dengan memperoleh data RMSD. Berkas input yang digunakan adalah ptraj_rmsf.in (**Lampiran 13**), dengan memasukkan semua berkas *snapshot* dengan format .mdcrd yang dihasilkan dari masing-masing tahap simulasi. Perintah yang dijalankan, sama dengan perintah untuk perolehan data RMSD, adalah:

```
$ ptraj lox_ligan_solv.prmtop ptraj_rmsf.in
```

RMSF dianalisis untuk melihat fleksibilitas residu selama simulasi berlangsung. Setelah perintah dijalankan dan diperoleh hasil, kurva nilai RMSF

masing-masing residu dibuat dengan Microsoft Excel dari berkas keluaran dengan format .apf.

3.4.2.5 Kondisi Ikatan Hidrogen

Data ikatan hidrogen diperoleh dari perangkat lunak VMD. Pada tampilan utama VMD, setelah memasukkan berkas parameter topologi dengan format .prmtop, berkas nice.out hasil ptraj, pilih menu *Extension-Analysis-Hydrogen Bond*. Jarak antara donor dan akseptor katan hidrogen diatur sejauh 3,5 Å, dan angle cutoff diatur pada 60°. Setelah itu, dipilih ikatan hidrogen dengan *occupancy* lebih dari 50%, atau yang lebih dari 25%.



BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk menganalisis interaksi kurkumin dan dua turunan alaminya, yaitu demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin, dengan enzim 12-lipoksigenase. Interaksi yang diamati adalah kestabilan berdasarkan nilai energi potensial sistem, nilai RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*), dan kondisi ikatan hidrogen.

Analisis simulasi dinamika molekuler dimulai dari persiapan bahan, yaitu makromolekul berupa enzim 12-lipoksigenase, dan ligan berupa kurkumin dan dua turunan alaminya, yaitu demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin. Bahan-bahan tersebut diperoleh dari hasil pemodelan homologi dan penambatan molekuler yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya oleh Tasbichaty (2010).

4.1 Simulasi Dinamika Molekuler

4.1.1 Persiapan

4.1.1.1 Berkas Ligan dan Makromolekul

Persiapan dilakukan dengan terlebih dahulu menyiapkan berkas kurkumin (cur), demetoksikurkumin (des), dan bisdemetoksikurkumin (bis) serta 12-lipoksigenase (lox) yang disimpan dalam format .pdb. Berkas ligan diberi nama cur.pdb, des.pdb, bis.pdb. Berkas makromolekul diberi nama 12-LOX_e.pdb. Berkas ligan yang merupakan hasil penambatan molekuler penelitian sebelumnya, 12-LOX.pdb, diedit menggunakan Wordpad, dengan menghilangkan informasi CONNECT, dan menambahkan kata TER sebelum END. Hasil edit tersebut diberi nama 12-LOX_e.pdb.

4.1.1.2 Menambahkan Atom Hidrogen dan Muatan Parsial AM1-BCC

Penambahan hidrogen dan konversi berkas menjadi format .mol2 dilakukan dengan *software* OpenBabel, sehingga berkas hasil diberi nama

cur_ob.mol2, des_ob.mol2, dan bis_ob.mol2, di mana “ob” menunjukkan bahwa berkas tersebut adalah hasil dari OpenBabel.

Setelah diperoleh berkas .mol2, dilakukan penambagan *charge* AM1-BCC. Hasil yang diperoleh setelah menjalankan perintah tersebut adalah berkas keluaran dengan format yang sama, tetapi telah diberikan muatan, diberi nama cur_bcc.mol2, des_bcc.mol2, dan bis_bcc.mol2.

4.1.1.3 Pengujian Parameter

Ketika kombinasi-kombinasi parameter ikatan (*bond*), sudut (*angle*), dan dihedral didefinisikan dalam berkas parameter, mungkin saja molekul yang digunakan memiliki kombinasi tipe atom untuk ikatan, sudut, atau dihedral yang belum memiliki parameter. Jika demikian, maka parameter-parameter yang belum ditentukan tersebut harus ditentukan terlebih dahulu sebelum membuat berkas topologi dan koordinat dalam Leap. Untuk keperluan tersebut, dapat digunakan *parmchk* untuk menguji apakah parameter-parameter yang dibutuhkan tersedia.

Perintah yang dijalankan untuk menguji parameter adalah:

```
parmchk -i ligan_bcc.mol2 -f mol2 -o ligan.frcmod
```

Setelah menjalankan perintah tersebut, akan diperoleh berkas parameter dengan format .frcmod (**Lampiran 14**), yang dapat dimuat ke dalam Leap untuk menambahkan parameter yang hilang. Berkas-berkas tersebut, untuk masing-masing ligan, adalah cur.frcmod, des.frcmod, bis.frcmod.

4.1.1.4 Pembuatan Berkas Parameter Topologi dan Koordinat *Input*, Penetralkan Muatan, dan Penambahan Pelarut

Tahap ini dijalankan dengan Leap. Berkas parameter topologi dibuat untuk masing-masing ligan, makromolekul, dan kombinasi makromolekul-ligan. Berkas parameter topologi untuk masing-masing ligan adalah cur.prmtop, des.prmtop, dan bis.prmtop. Berkas parameter topologi untuk makromolekul adalah

lox.prmtop. Sedangkan berkas parameter topologi untuk kombinasi makromolekul-ligan adalah lox_cur.prmtop, lox_des.prmtop, lox_bis.prmtop.

Berkas koordinat *input* juga dibuat untuk masing-masing ligan, makromolekul, dan kombinasi makromolekul-ligan. Berkas koordinat *input* yang dihasilkan, untuk masing-masing ligan, adalah cur.inpcrd, des.inpcrd, dan bis.inpcrd. Berkas koordinat *input* untuk makromolekul adalah lox.inpcrd. Sedangkan berkas koordinat *input* untuk kombinasi makromolekul-ligan adalah lox_cur.inpcrd, lox_des.inpcrd, lox_bis.inpcrd.

Setelah itu, makromolekul dan kombinasi makromolekul-ligan dihitung muatannya. Jika sistem bermuatan negatif, akan dilakukan penambahan ion Na^+ untuk menetralkan muatan. Jika sistem bermuatan positif, akan dilakukan penambahan ion Cl^- untuk menetralkan muatan. Dalam penelitian ini, sistem yang terdiri dari makromolekul memiliki muatan negatif, demikian pula dengan sistem yang merupakan kombinasi makromolekul-ligan, sehingga perintah yang dijalankan dalam Leap adalah penambahan ion Na^+ untuk menetralkan muatan menjadi 0.

Berikutnya, sistem ditambahkan pelarut air kotak oktahedron dengan jarak kotak 12\AA . Penambahan pelarut dilakukan pada kombinasi makromolekul-ligan. Berikutnya, dibuat berkas parameter topologi dan koordinat *input* untuk sistem makromolekul-ligan yang telah ditambahkan pelarut. Berkas parameter topologi untuk kombinasi yang telah ditambahkan pelarut, diberi nama lox_cur_sol.prmtop, lox_des_solv.prmtop, dan lox_bis_solv.prmtop. Berkas-berkas parameter topologi yang terakhir inilah yang akan digunakan untuk tahap-tahap selanjutnya, yaitu minimisasi, ekuilibrasi, dan produksi. Berkas koordinat *input* untuk sistem makromolekul-ligan yang telah ditambahkan pelarut diberi nama lox_cur_solv.inpcrd, lox_des_solv.inpcrd, dan lox_bis_solv.inpcrd. Berkas-berkas koordinat *input* yang terakhir ini akan digunakan sebagai koordinat *input* awal pada minimisasi tahap pertama. Tahap-tahap selanjutnya akan

menggunakan koordinat *input* dari berkas hasil tahap sebelumnya, dalam format *.rst*.

4.1.2 Minimisasi

Minimisasi energi dilakukan untuk menghilangkan gugus atau atom yang menyebabkan kontak buruk. Jika simulasi dinamika molekuler dilakukan tanpa menghilangkan gugus atau atom yang menyebabkan kontak yang buruk, maka energi di daerah tersebut akan sangat tinggi dengan tidak wajar dan dapat merusak simulasi atau menyebabkan trajektori berproses di arah yang tidak wajar. Sekalipun tidak ada daerah yang menyebabkan kontak buruk, minimisasi energi sebaiknya tetap dilakukan untuk sedikit merelaksasi struktur.

Minimisasi dilakukan dalam dua tahap. Tahap pertama, minimisasi dilakukan pada molekul air, sedangkan makromolekul dan ion ditahan. Pada tahap kedua, minimisasi dilakukan untuk keseluruhan sistem, yang meliputi pelarut (air), makromolekul, dan ion Na⁺. Akan lebih baik jika minimisasi dilakukan dalam tiga tahap, yaitu minimisasi molekul pelarut (air) dengan menahan makromolekul dan ion, kemudian minimisasi makromolekul dan ion dengan menahan molekul pelarut (air), kemudian minimisasi keseluruhan sistem yang terdiri dari makromolekul, ion, dan air. Akan tetapi, pada penelitian kali ini, minimisasi dilakukan hanya dalam dua tahap.

4.1.2.1 Minimisasi Tahap Pertama

Minimisasi pada tahap pertama dilakukan pada molekul air, sedangkan makromolekul dan ion ditahan. Berkas-berkas yang dihasilkan dari proses ini adalah berkas *restart* dengan format *.rst*, yang akan menjadi koordinat *input* untuk minimisasi tahap kedua, dan berkas *output* dengan format *.out*. Berkas *restart* untuk masing-masing sistem adalah *lox_cur_solv_min1.rst*, *lox_des_solv_min1.rst*, dan *lox_bis_solv_min1.rst*. Sedangkan berkas *output*

untuk masing-masing sistem adalah `lox_cur_solv_min1.out`, `lox_des_solv_min1.out`, dan `lox_bis_solv_min1.out`.

4.1.2.2 Minimisasi Tahap Kedua

Minimisasi tahap kedua ini dilakukan untuk keseluruhan sistem, yang meliputi air, makromolekul, dan ion. Berkas *output* yang dihasilkan dari proses ini adalah `lox_cur_solv_min_all.out`, `lox_des_solv_min_all.out`, dan `lox_bis_solv_min_all.out`. Sedangkan berkas *restart* yang dihasilkan adalah `lox_cur_solv_min_all.rst`, `lox_des_solv_min_all.rst`, dan `lox_bis_solv_min_all.rst`. Berkas *restart* dari minimisasi tahap kedua ini akan digunakan sebagai koordinat *input* untuk tahap selanjutnya, yaitu ekuilibrisasi tahap pertama.

4.1.3 Ekuilibrisasi

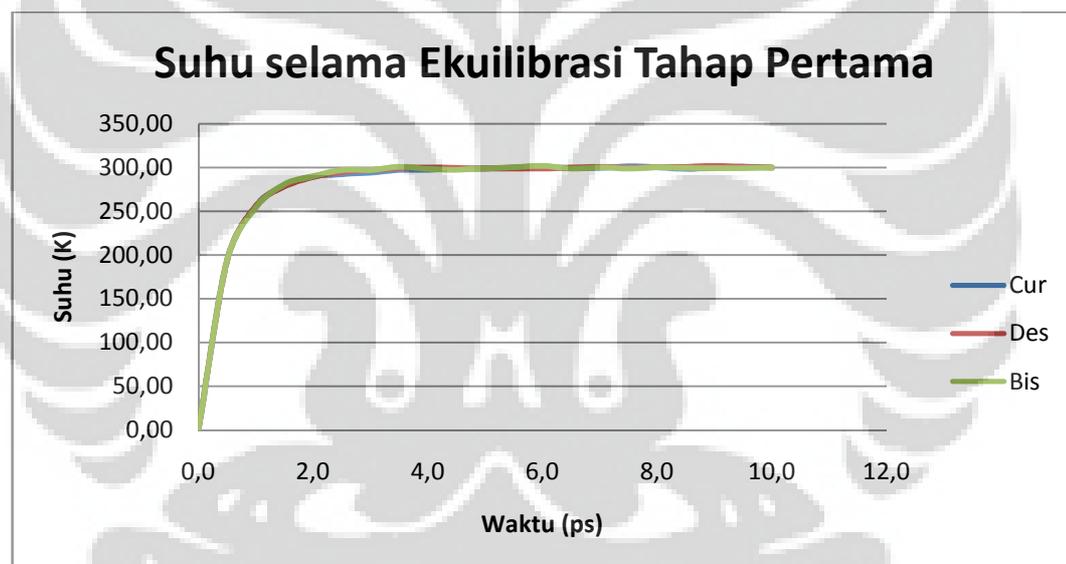
Dalam simulasi dinamika molekuler, makromolekul dan pelarut melangsungkan relaksasi selama sekitar 10 hingga ratusan pikodetik hingga sistem mencapai fase stasioner. Inisial segmen nonstasioner dari trajektori yang disimulasikan dihilangkan dengan kalkulasi perangkat ekuilibrium. Tahap ini disebut ekuilibrisasi.

4.1.3.1 Ekuilibrisasi Tahap Pertama

Pada ekuilibrisasi tahap pertama ini, suhu sistem dinaikkan dari 0 hingga 300 K perlahan-lahan. Ada tiga jenis berkas yang dihasilkan dari proses ekuilibrisasi, yaitu berkas *restart* dengan format `.rst` yang akan digunakan sebagai koordinat *input* untuk tahap selanjutnya, berkas *snapshot* dengan format `.mdcrd` yang menyimpan *frame* yang dihasilkan selama proses, dan berkas *output* dengan format `.out` yang berisi kumpulan data. Berkas *restart* untuk masing-masing

sistem adalah `lox_cur_solv_eq1.rst`, `lox_des_solv_eq1.rst`, dan `lox_bis_solv_eq1.rst`. Berkas *snapshot* untuk masing-masing sistem adalah `lox_cur_solv_eq1.mdcrd`, `lox_des_solv_eq1.mdcrd`, dan `lox_bis_solv_eq1.mdcrd`. Berkas *output* untuk masing-masing sistem adalah `lox_cur_solv_eq1.out`, `lox_des_solv_eq1.out`, dan `lox_bis_solv_eq1.out`.

Untuk melihat dinamika suhu selama proses ekuilibrasi tahap pertama ini, data suhu terhadap waktu dapat diekstrak dari berkas *output* masing-masing. Data suhu untuk masing-masing sistem diperlihatkan pada Lampiran. Berikut adalah kurva suhu terhadap waktu untuk masing-masing sistem.



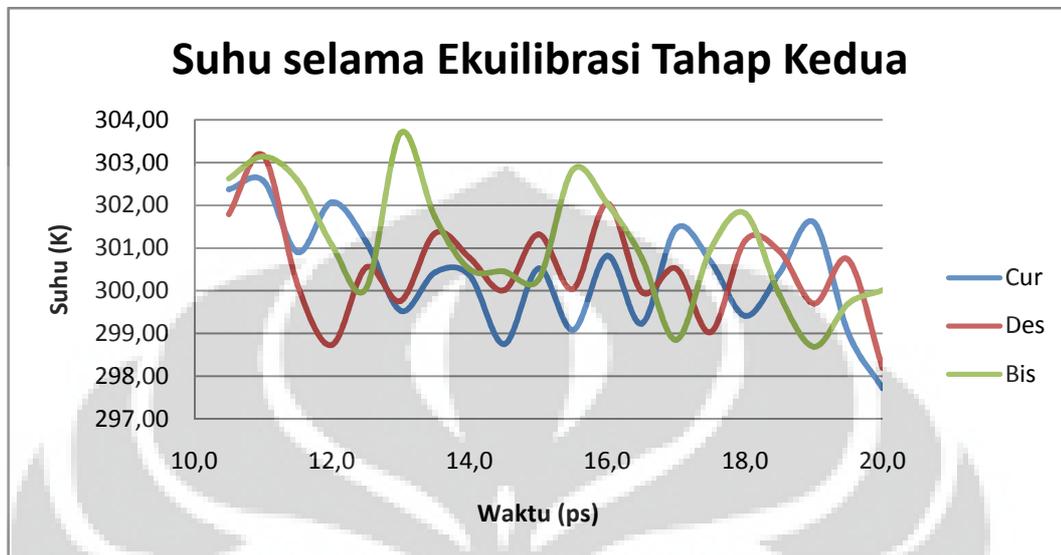
Gambar 4.1. Grafik suhu terhadap waktu untuk ketiga sistem selama ekuilibrasi tahap pertama dalam waktu simulasi 10 pikodetik.

Pada kurva, dapat dilihat bahwa suhu sistem telah berhasil dinaikkan dari 0 hingga 300 K dalam waktu simulasi 10 pikodetik.

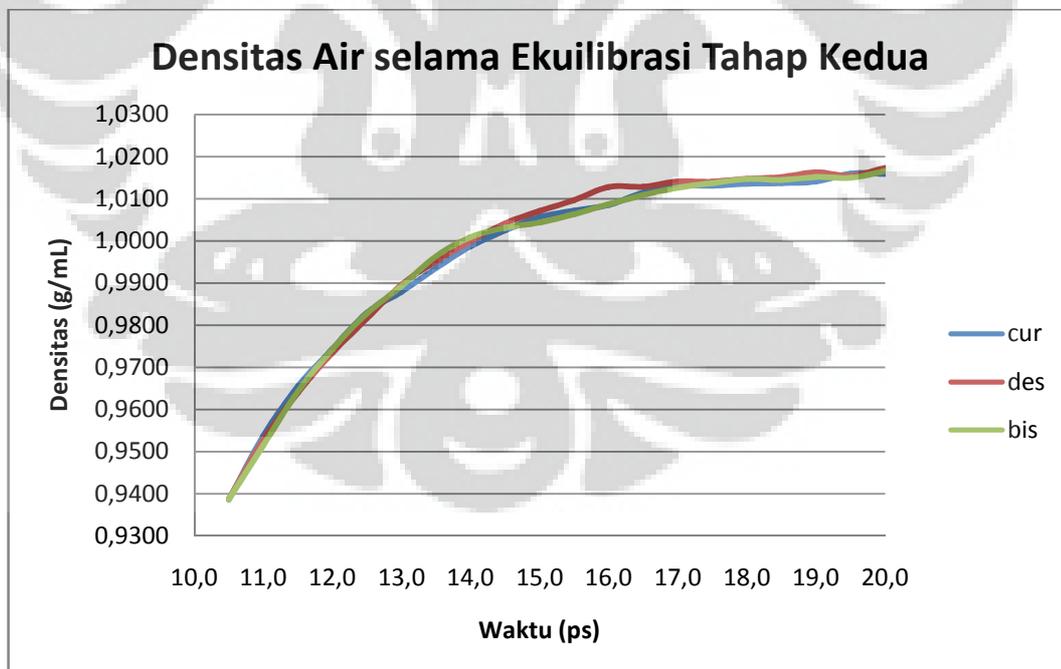
4.1.3.2 Ekuilibrasi Tahap Kedua

Pada ekuilibrasi tahap kedua, tekanan dan suhu dikontrol dan densitas air disesuaikan menjadi nilai percobaan, yaitu 1 g/mL. Ekuilibrasi tahap kedua ini

menggunakan berkas koordinat *input* hasil ekuilibrasi tahap pertama (lox_ligan_solv_eq1.rst). Setelah proses selesai, data suhu dan densitas air kembali diekstrak dan dibuat kurvanya.



Gambar 4.2. Grafik suhu terhadap waktu untuk ketiga sistem selama ekuilibrasi tahap kedua dalam waktu simulasi 10 pikodetik.

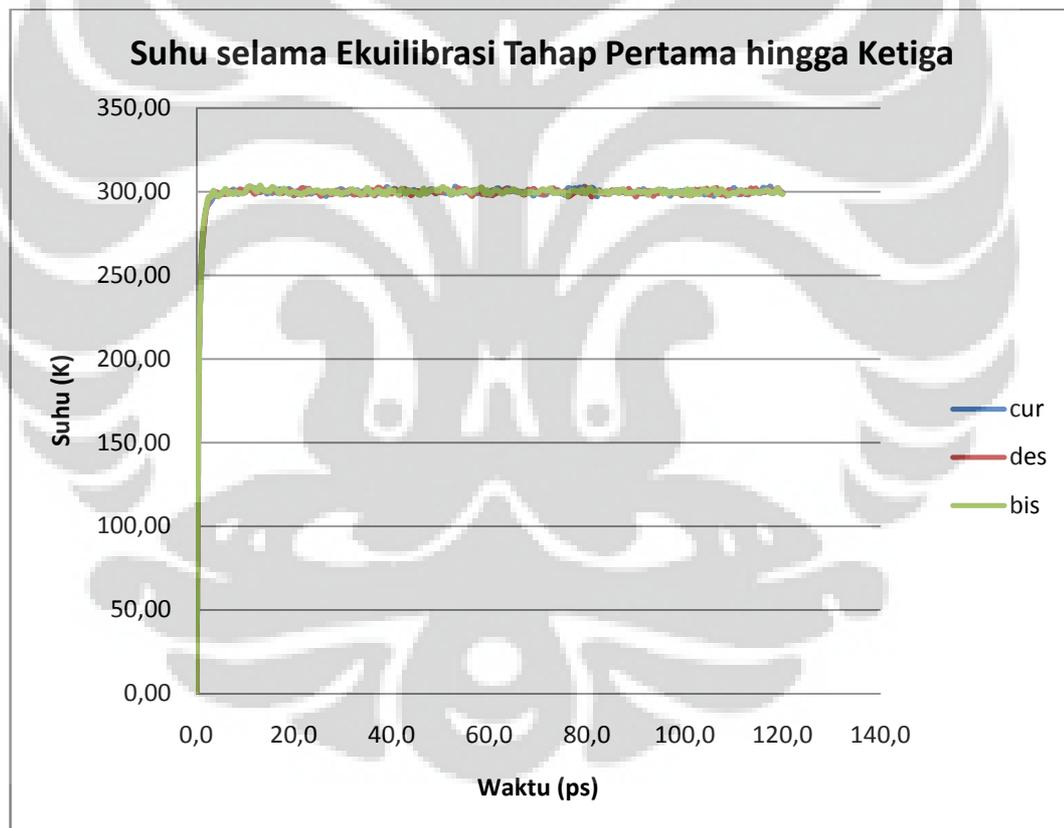


Gambar 4.3. Grafik densitas air terhadap waktu selama ekuilibrasi tahap kedua dalam waktu simulasi 10 pikodetik.

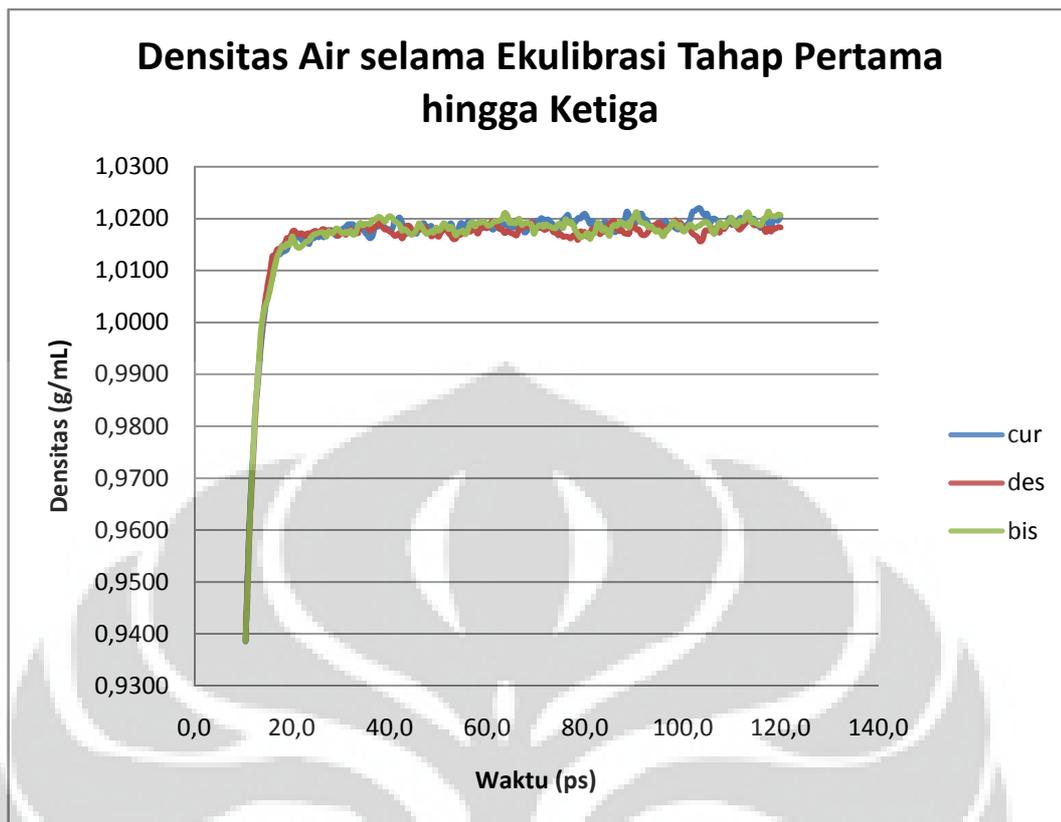
Kurva menunjukkan fluktuasi suhu di sekitar 300 K selama ekuilibrasi tahap kedua. Densitas air telah mencapai harga yang diinginkan, yaitu pada kisaran 1,0 g/mL.

4.1.3.3 Ekuilibrasi Tahap Ketiga

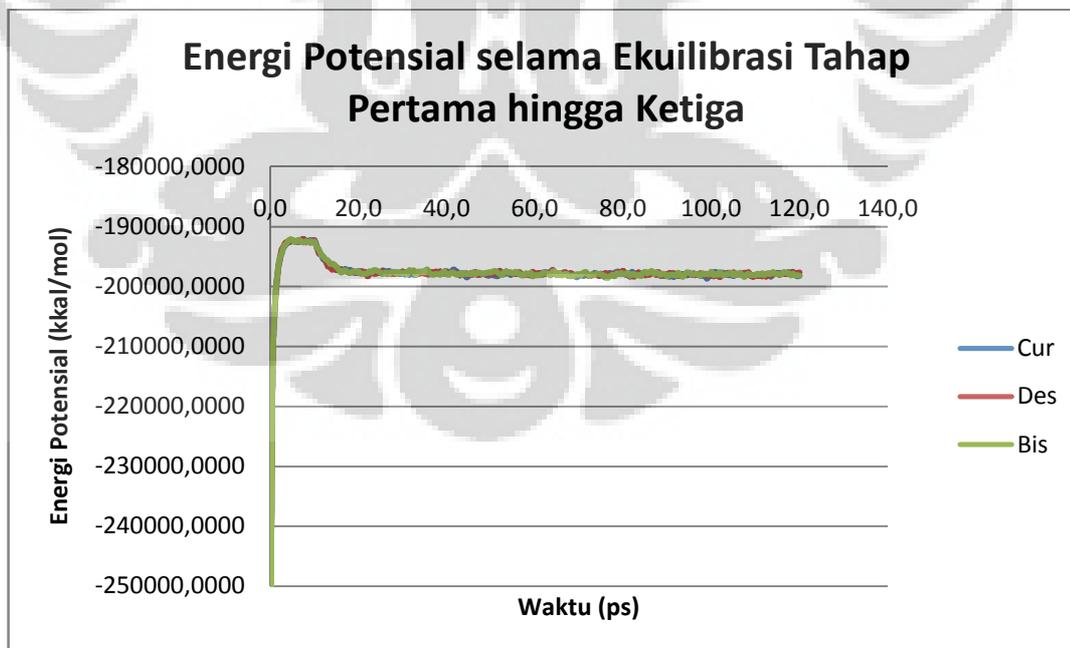
Ekuilibrasi tahap ketiga ini adalah kelanjutan dari ekuilibrasi tahap pertama dan kedua, dengan waktu simulasi yang sedikit lebih panjang. Tahap ini dilakukan untuk kembali mengevaluasi suhu dan densitas air, dan untuk memperoleh data energi potensial serta RMSD, yang akan menentukan kapan langkah produksi dapat dilakukan. Data suhu dan densitas air yang diperoleh selama proses ekuilibrasi (tahap pertama hingga ketiga), adalah sebagai berikut.



Gambar 4.4. Grafik suhu terhadap waktu selama ekuilibrasi tahap pertama hingga ketiga dalam waktu simulasi 120 pikodetik.



Gambar 4.5. Grafik densitas air terhadap waktu selama ekuilibrasi tahap pertama hingga ketiga dalam waktu simulasi 120 pikodetik.

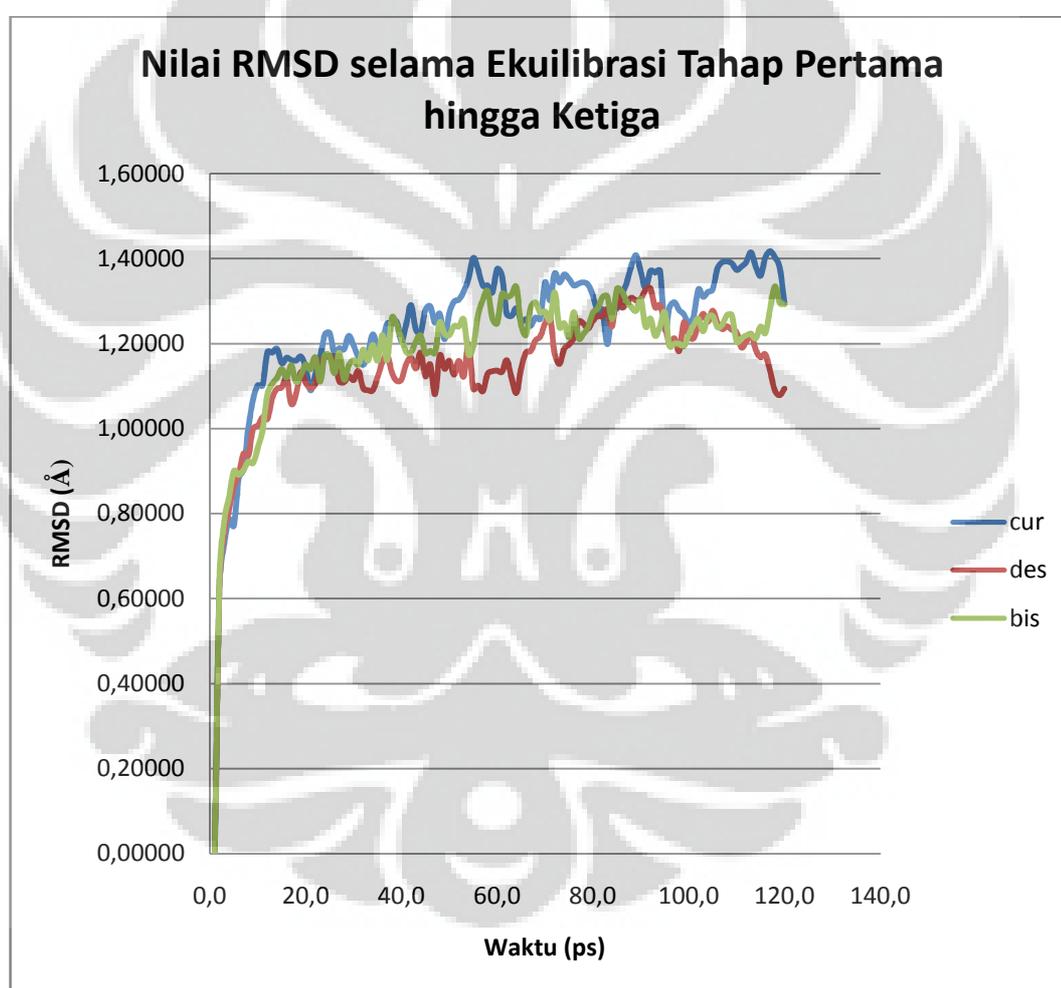


Gambar 4.6. Grafik energi potensial terhadap waktu selama ekuilibrasi tahap pertama hingga ketiga dalam waktu simulasi 120 pikodetik.

Nilai suhu dan densitas air telah mencapai nilai percobaan secara dinamis selama ekuilibrasi, yaitu pada kisaran 300 K dan 1,0 g/mL. Energi potensial juga telah menunjukkan nilai yang relatif konstan selama ekuilibrasi. Sebelum melakukan tahap produksi, struktur harus telah mencapai fase stasionernya, yang dievaluasi menggunakan data RMSD *backbone*.

4.1.4 RMSD (*Root Mean Square Deviation*)

Data RMSD diekstrak dengan ptraj, dan diperoleh hasil sebagai berikut.



Gambar 4.7. Grafik nilai RMSD *backbone* terhadap waktu selama ekuilibrasi tahap pertama hingga ketiga dalam waktu simulasi 120 pikodetik.

Evaluasi nilai RMSD dilakukan untuk melihat apakah sistem telah mencapai fase stasioner selama ekuilibrasi. Nilai RMSD dihitung dengan

membandingkan konformasi sistem dari waktu ke waktu terhadap konformasi awal. Peningkatan nilai RMSD pada tahap awal ekuilibrasi menunjukkan bahwa makromolekul mulai membuka pada daerah ikatan dengan ligan. Nilai RMSD yang kemudian mulai konstan menunjukkan bahwa sistem makromolekul-ligan telah mencapai fase stasioner. Setelah nilai RMSD dan energi potensial menunjukkan nilai konstan, langkah produksi dapat dilakukan.

4.1.5 Produksi

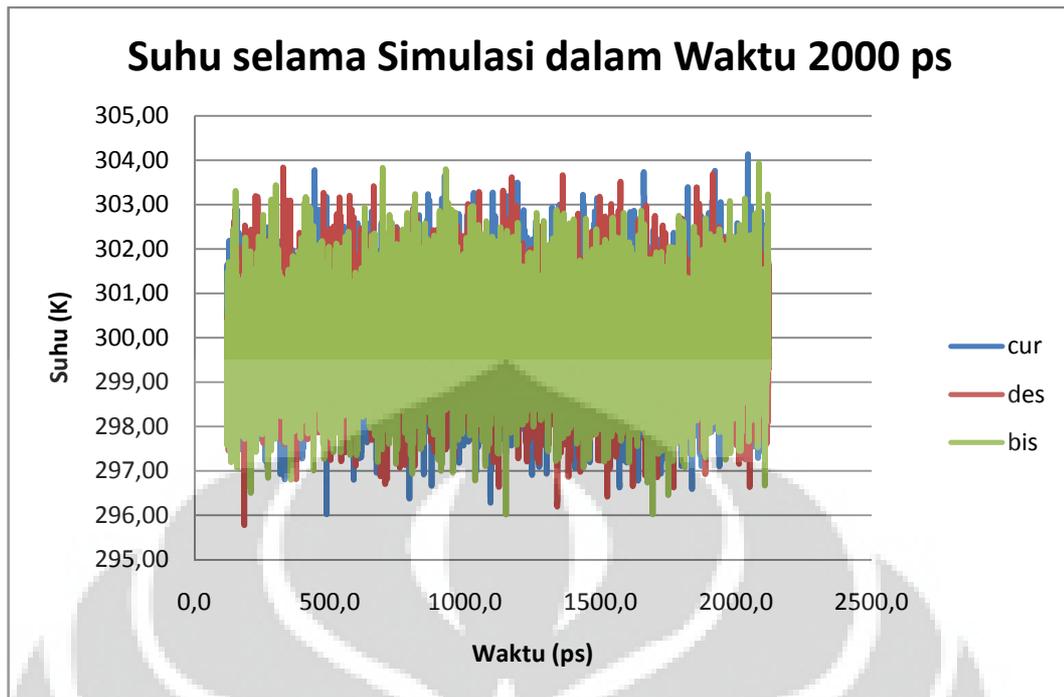
Langkah produksi dilakukan dalam waktu simulasi 2 nanodetik, terbagi menjadi 10 tahap, masing-masing tahap berlangsung dalam waktu simulasi 200 pikodetik, dan menghasilkan 200. Masing-masing tahap menghasilkan berkas keluaran dalam format *.out*, berkas *snapshot* yang disimpan dalam format *.mdcrd*, dan berkas *.rst*. Berkas *.out* dapat diekstrak untuk menghasilkan data suhu, densitas air, dan energi potensial. Masing-masing tahap tersebut dijalankan dalam waktu sekitar 72 jam, sehingga secara keseluruhan, langkah produksi selama 2 nanodetik (2000 pikodetik) berlangsung dalam waktu sekitar 720 jam.

Untuk menyempurnakan pengamatan kestabilan sistem dari waktu ke waktu, waktu simulasi dapat diperpanjang sesuai dengan kebutuhan.

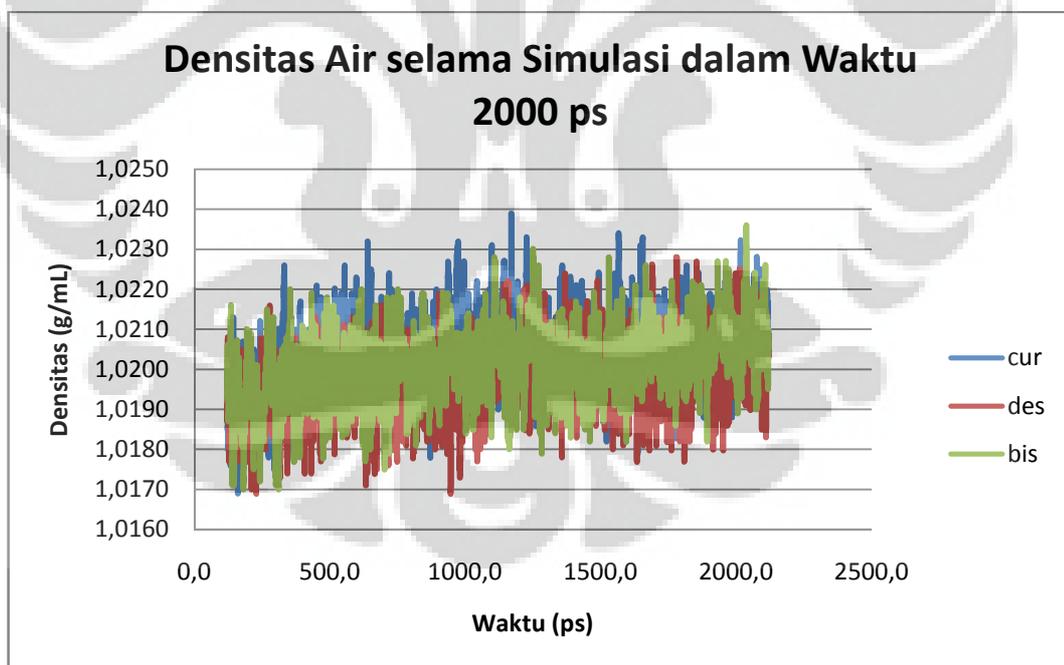
4.2 Analisis Hasil Simulasi Dinamika Molekuler

4.2.1 Suhu Sistem dan Densitas Air

Suhu dan densitas air selama berlangsungnya tahap produksi diperlihatkan pada gambar berikut.



Gambar 4.8. Grafik suhu terhadap waktu dalam waktu simulasi 2000 pikodeik (2 nanodetik).

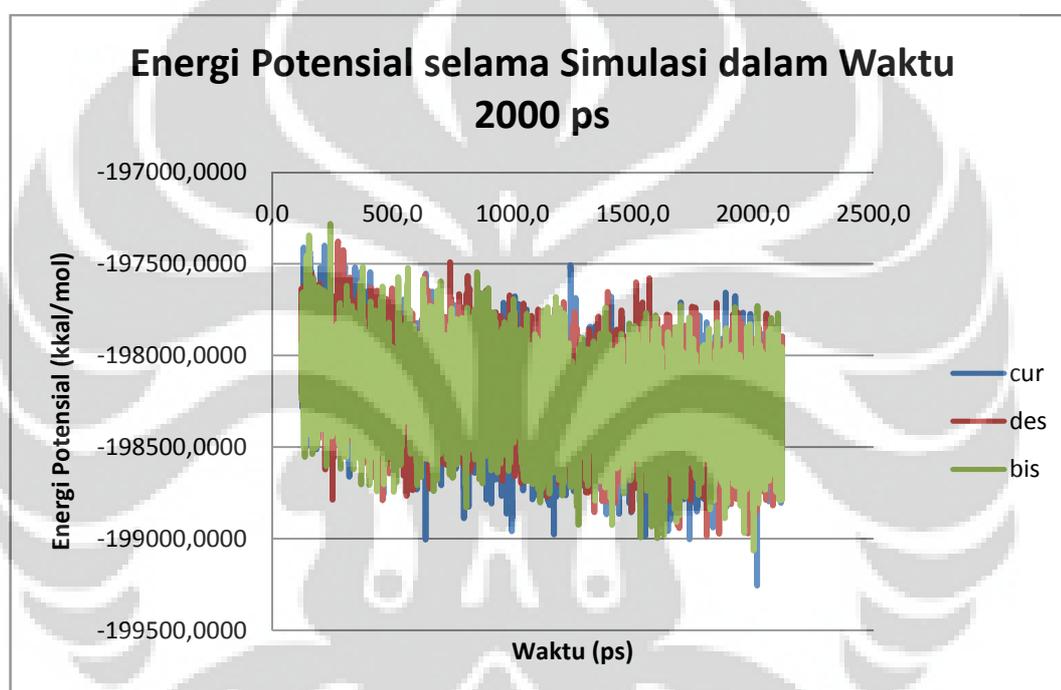


Gambar 4.9. Grafik densitas air terhadap waktu dalam waktu simulasi 2000 pikodeik (2 nanodetik).

Grafik suhu terhadap waktu menunjukkan bahwa suhu selama simulasi 2 nanodetik berfluktuasi dalam kisaran nilai yang diharapkan, yaitu 300 K. Grafik densitas air terhadap waktu menunjukkan bahwa nilai densitas air selama simulasi 2 nanodetik berfluktuasi dalam kisaran nilai yang diharapkan, yaitu 1,0 g/mL.

4.2.2 Energi Potensial

Energi potensial selama simulasi hingga tahap ketujuh diperlihatkan pada gambar berikut.



Gambar 4.10. Nilai energi potensial selama waktu simulasi 2000 pikodeik (2 nanodetik).

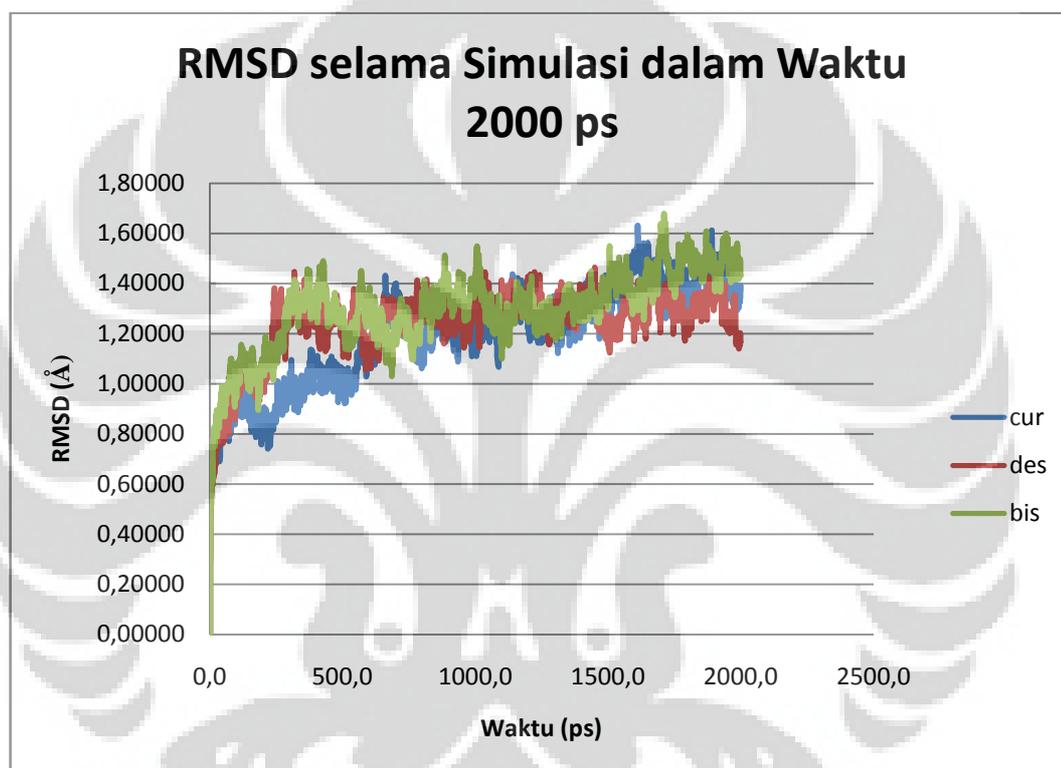
Energi potensial untuk ketiga sistem memperlihatkan kestabilan mulai waktu simulasi 600 pikodetik, di mana sistem berusaha mencapai kestabilan. Berdasarkan data tersebut, evaluasi RMSF dan kondisi ikatan hidrogen dilakukan mulai waktu 600 pikodetik.

Ketiga sistem memiliki energi potensial pada kisaran yang sama. Oleh karena itu, dapat ditarik kesimpulan bahwa perbedaan gugus fungsi ligan yang

berikatan dengan makromolekul tidak memberikan perbedaan pada nilai energi potensial.

4.2.3 RMSD (*Root Mean Square Deviation*)

Evaluasi nilai RMSD backbone dilakukan untuk melihat perbandingan konformasi sistem dari waktu ke waktu terhadap konformasi awal. Data RMSD pada grafik diperlihatkan pada gambar berikut.



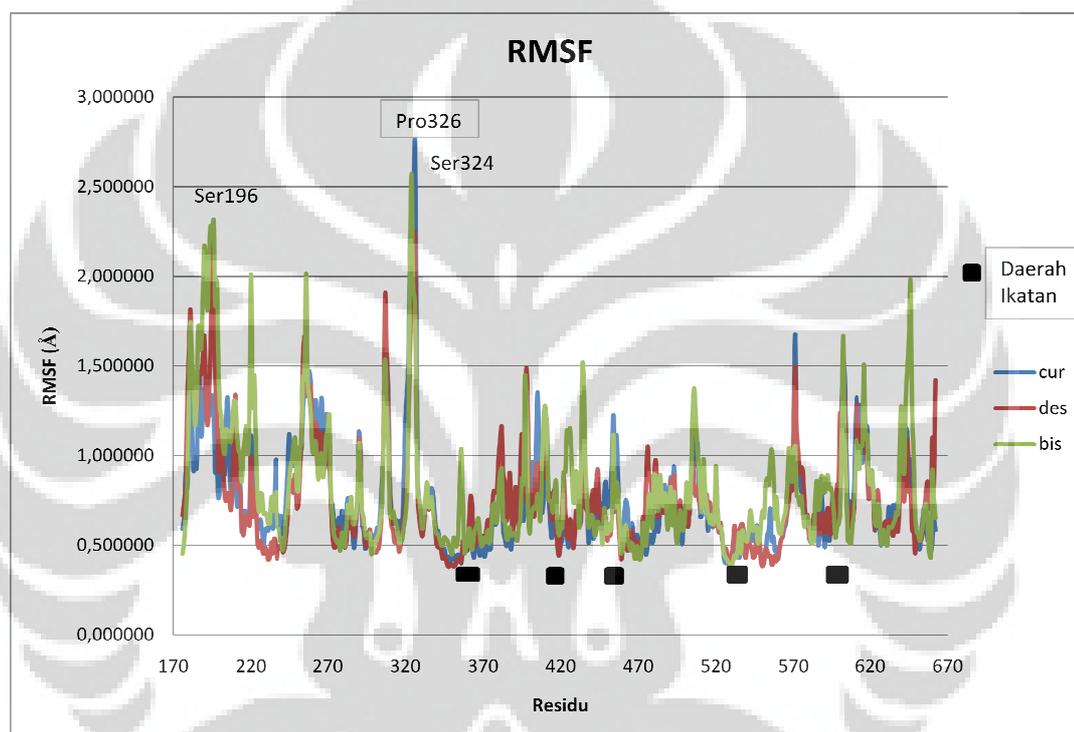
Gambar 4.11. Grafik nilai RMSD *backbone* selama waktu simulasi 2000 pikodetik (2 nanodetik).

Pada gambar, terlihat bahwa nilai RMSD kurkumin baru mencapai kestabilan pada waktu sekitar 600 pikodetik, demetoksikurkumin pada waktu 200 nanodetik, dan bisdemetoksikurkumin pada waktu sekitar 250 pikodetik. Perbedaan nilai ini dapat disebabkan interaksi yang berbeda antara ligan dengan makromolekul karena adanya perbedaan gugus fungsi. Secara keseluruhan, ketiga sistem telah mencapai kestabilan konformasi mulai 600 pikodetik. Peningkatan

nilai RMSD pada awal simulasi menunjukkan struktur enzim yang mulai terbuka (*unfold*).

4.2.4 RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*)

Nilai RMSF dievaluasi untuk melihat fluktuasi pada masing-masing residu enzim selama simulasi berlangsung, yang menggambarkan fleksibilitas residu. Data RMSF ditunjukkan pada grafik berikut.



Gambar 4.12. Grafik nilai RMSF pada masing-masing residu pada waktu simulasi 600-2000 pikodetik.

Pada grafik, terlihat fleksibilitas yang bervariasi pada masing-masing residu. Enzim 12-lipoksigenase dengan ligan kurkumin menunjukkan nilai fluktuasi terbesar pada residu Pro326, ligan demetoksikurkumin pada Ser196, dan bisdemetoksikurkumin pada Ser324. Residu lain yang memiliki fluktuasi tinggi pada interaksi 12-lipoksigenase dengan kurkumin adalah Ala180, Gly181, Ala182, Leu187, Arg189, dan Val190. Residu dengan fluktuasi tinggi pada interaksi 12-lipoksigenase dengan demetoksikurkumin adalah Ala180, Gly181, Ala182, Leu187, Arg189, Val190, Leu194, dan Ser195. Sedangkan pada interaksi

12-lipoksigenase dengan bisdemetoksikurkumin, residu yang memiliki fluktuasi tinggi adalah Ala180, Gly181, Ala182, Leu187, Arg189, Val190, Leu193, Leu194, Ser195, dan Ser196. Dari residu-residu tersebut, beberapa di antaranya adalah residu yang memiliki fluktuasi cenderung tinggi pada ketiga sistem, dengan nilai fluktuasi yang tidak jauh berbeda. Secara keseluruhan, dapat dilihat bahwa nilai fluktuasi antara ketiga sistem tidak jauh berbeda, sehingga dapat disimpulkan bahwa 12-lipoksigenase berinteraksi dengan intensitas yang mirip dengan ketiga ligan. Tabel nilai fluktuasi untuk masing-masing residu dari ketiga sistem dapat dilihat pada **Lampiran 15**.

Residu dengan fluktuasi tinggi menunjukkan fleksibilitas yang tinggi, yang menunjukkan interaksi atau ikatan yang tidak stabil. Pada 15-lipoksigenase, residu Ile418, Phe 353, dan Ile593 dipostulasikan berinteraksi dengan ujung metil dari asam arakhidonat (Toledo, Masgrau, Marechal, Lluch, & Lafont, 2010). Jika disetarakan dengan 12-lipoksigenase, residu-residu tersebut ekuivalen dengan Val418, Phe352, dan kemungkinan antara Ile593 dan Ser594. Keempat residu tersebut membentuk suatu kantung (*pocket*) hidrofobik pada 12-lipoksigenase yang menjadi target penambatan ligan (Tasbichaty, 2010). Berdasarkan data RMSF, keempat residu yang penting dalam pengikatan dengan ligan tersebut memiliki fleksibilitas yang rendah pada ketiga sistem. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin terikat dengan stabil pada daerah hidrofobik tersebut.

Situs aktif 12-lipoksigenase terbentuk oleh atom Fe non heme yang dibatasi untai α_1 . Residu asam amino yang penting diantaranya His360, His365, His453, dan His540 yang berperan penting sebagai agen pengkhelat besi (Utami 2009). Berdasarkan data RMSF, keempat residu tersebut memiliki fleksibilitas yang rendah pada ketiga sistem, sehingga dapat disimpulkan bahwa kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin berinteraksi dengan stabil pada situs aktif tersebut.

4.3.5. Kondisi Ikatan Hidrogen

Ikatan hidrogen dibagi menjadi tiga jenis berdasarkan jumlah persentase *occupancy*, yaitu ikatan hidrogen sangat lemah (25-50%), ikatan hidrogen kuat (50-75%), dan ikatan hidrogen sangat kuat (75-100%) (Kastner, Loeffler, Roberts, Fernandez, & Winn, 2009).

Evaluasi kondisi ikatan hidrogen dilakukan mulai dari waktu simulasi 600 pikodetik, di mana nilai energi potensial dan nilai RMSD memiliki fluktuasi terkecil. *Occupancy* ikatan hidrogen antara kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin dilihat dengan perangkat lunak VMD. Ikatan hidrogen yang diamati dihitung pada jarak donor dengan akseptor sebesar 3,5 Å dan *angle cutoff* 60°. Hasil yang diperoleh diperlihatkan pada tabel berikut.

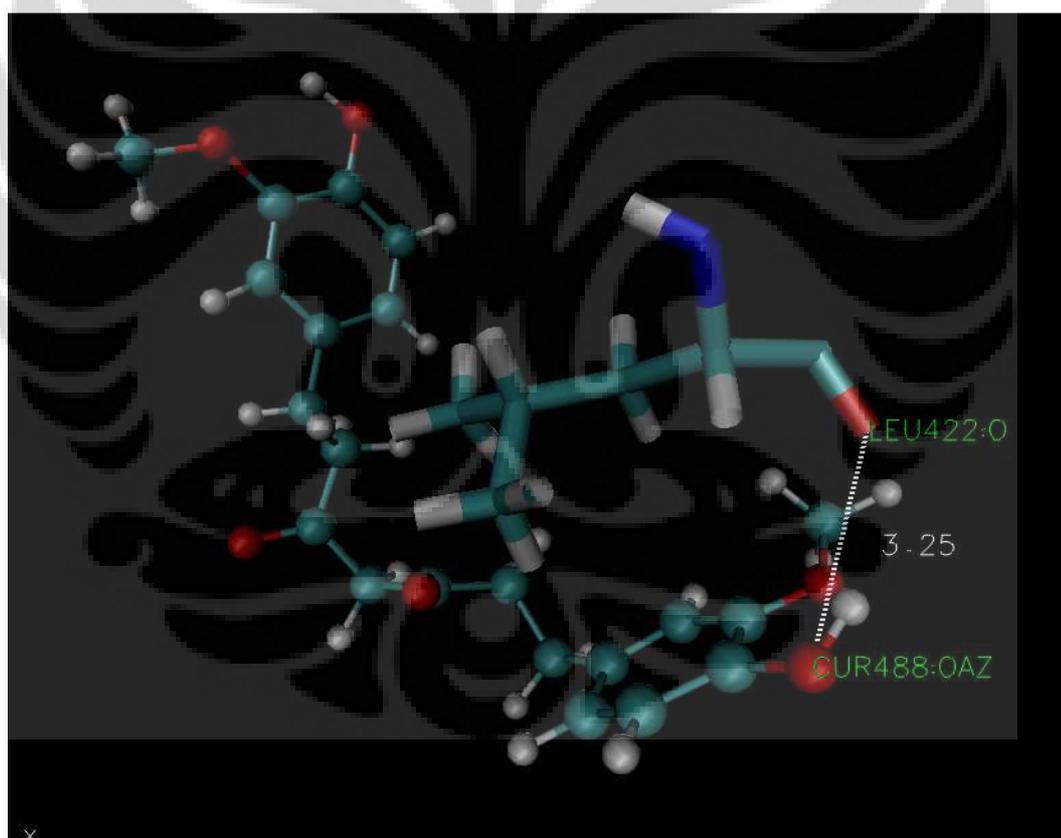
Tabel 4.1. Nilai *occupancy* ikatan hidrogen ketiga sistem

Donor	Akseptor	Occupancy
cur		
CUR-Side-OAZ	LEU597-Main-O	78.59%
CUR-Side-CAM	GLU356-Side-OE1	64.60%
GLN590-Main-CA	CUR-Side-OAA	61.24%
SER594-Side-CB	CUR-Side-OBA	43.47%
ILE413-Side-CB	CUR-Side-OAL	42.26%
GLN590-Side-CG	CUR-Side-OAA	33.55%
CUR-Side-CAV	THR177-Main-O	30.26%
TRP176-Main-N	CUR488-Side-CAW	24.13%
des		
TRP176-Main-N	DES-Side-OAP	91.86%
TRP176-Side-CD1	DES-Side-OAP	54.18%
DES-Side-CAJ	GLN547-Side-OE1	34.19%
ARG599-Main-N	DES-Side-OAW	33.33%
bis		
TRP176-Main-N	BIS-Side-OAE	94.08%
GLU658-Main-N	BIS-Side-OAU	83.58%
HIE365-Side-CE1	BIS-Side-OAA	43.40%
BIS-Side-CAQ	ARG599-Main-O	37.12%
BIS-Side-CAP	LEU597-Main-O	29.84%
HIE540-Side-CB	BIS-Side-OAA	25.55%
ASN544-Side-CB	BIS-Side-OAA	25.05%

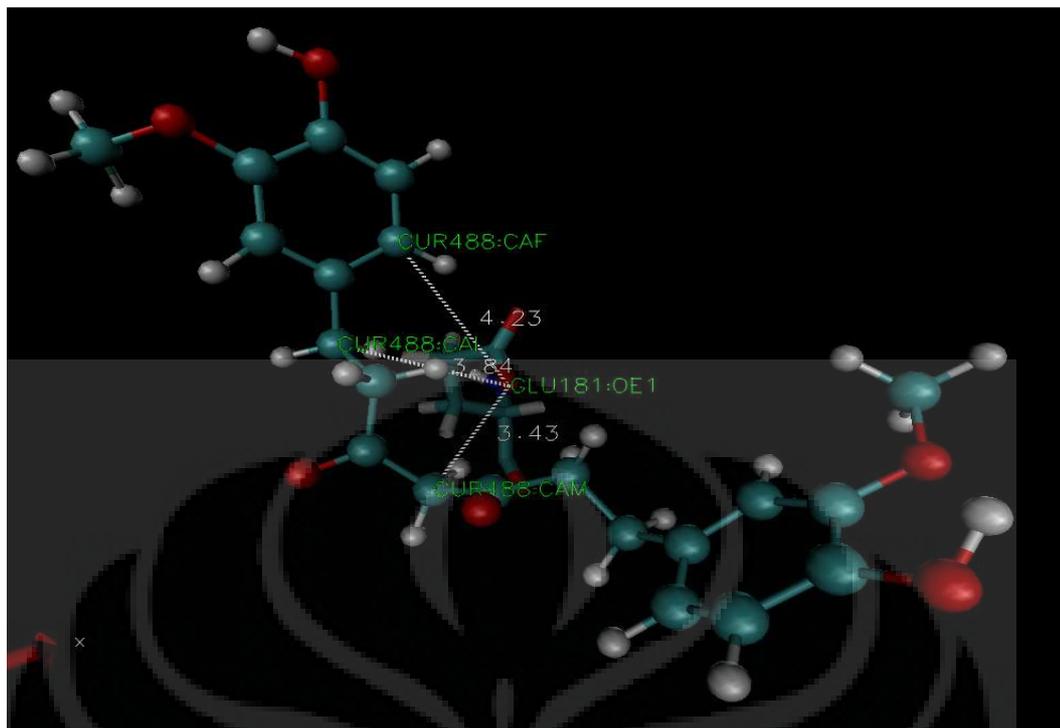
Keterangan:

	: Ikatan hidrogen sangat kuat (<i>Occupancy</i> >75%)
	: Ikatan hidrogen kuat (<i>Occupancy</i> 50-75%)
	: Ikatan hidrogen lemah (<i>Occupancy</i> 25-50%)
	: residu yang terlibat pada ikatan hidrogen dengan ketiga ligan

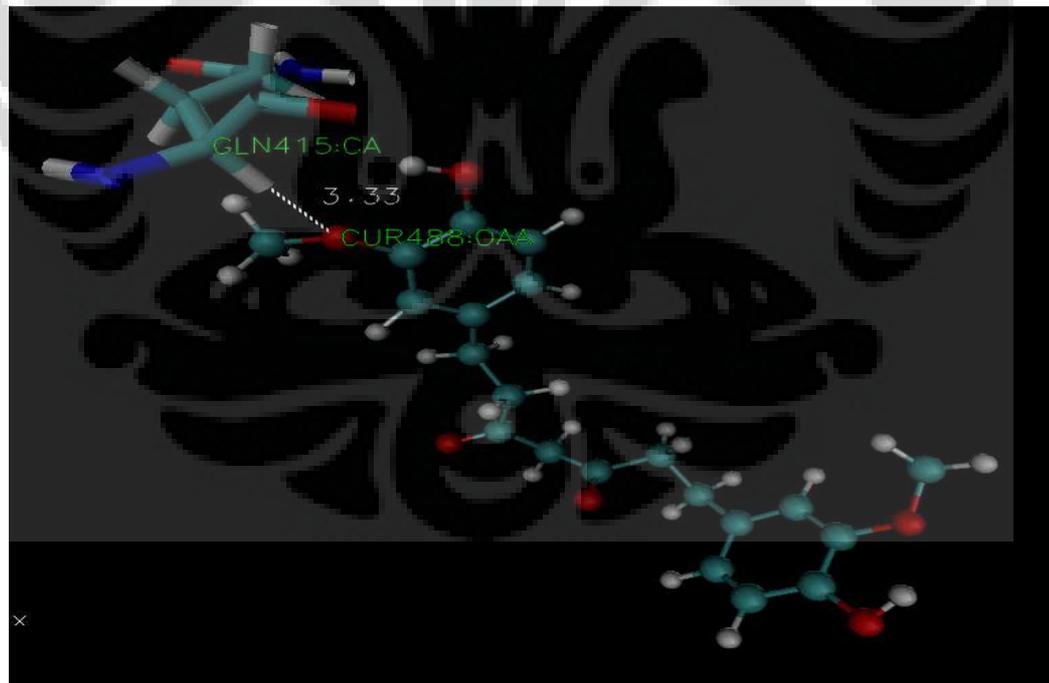
Tabel di atas menampilkan ikatan hidrogen dalam ketiga sistem dengan *occupancy* di atas 25%. Berdasarkan data di atas, pada interaksi kurkumin dengan 12-lipoksigenase terdapat satu ikatan hidrogen yang tergolong sangat kuat, yaitu dengan kurkumin sebagai donor dan atom O dari Leu597 sebagai akseptor, dengan *occupancy* 78,59% (Gambar 4.13). Terdapat juga dua ikatan hidrogen kuat dengan *occupancy* 64,60 dan 61,24%, yaitu donor kurkumin dengan akseptor Glu356 (Gambar 4.14) dan donor Gln590 (Gambar 4.15) dengan akseptor kurkumin. Ikatan hidrogen lainnya tergolong lemah dan sangat lemah, dengan *occupancy* di bawah 50%.



Gambar 4.13. Ikatan Hidrogen antara donor Cur OAZ dengan akseptor Leu597
Main O, *occupancy* 78,59%.

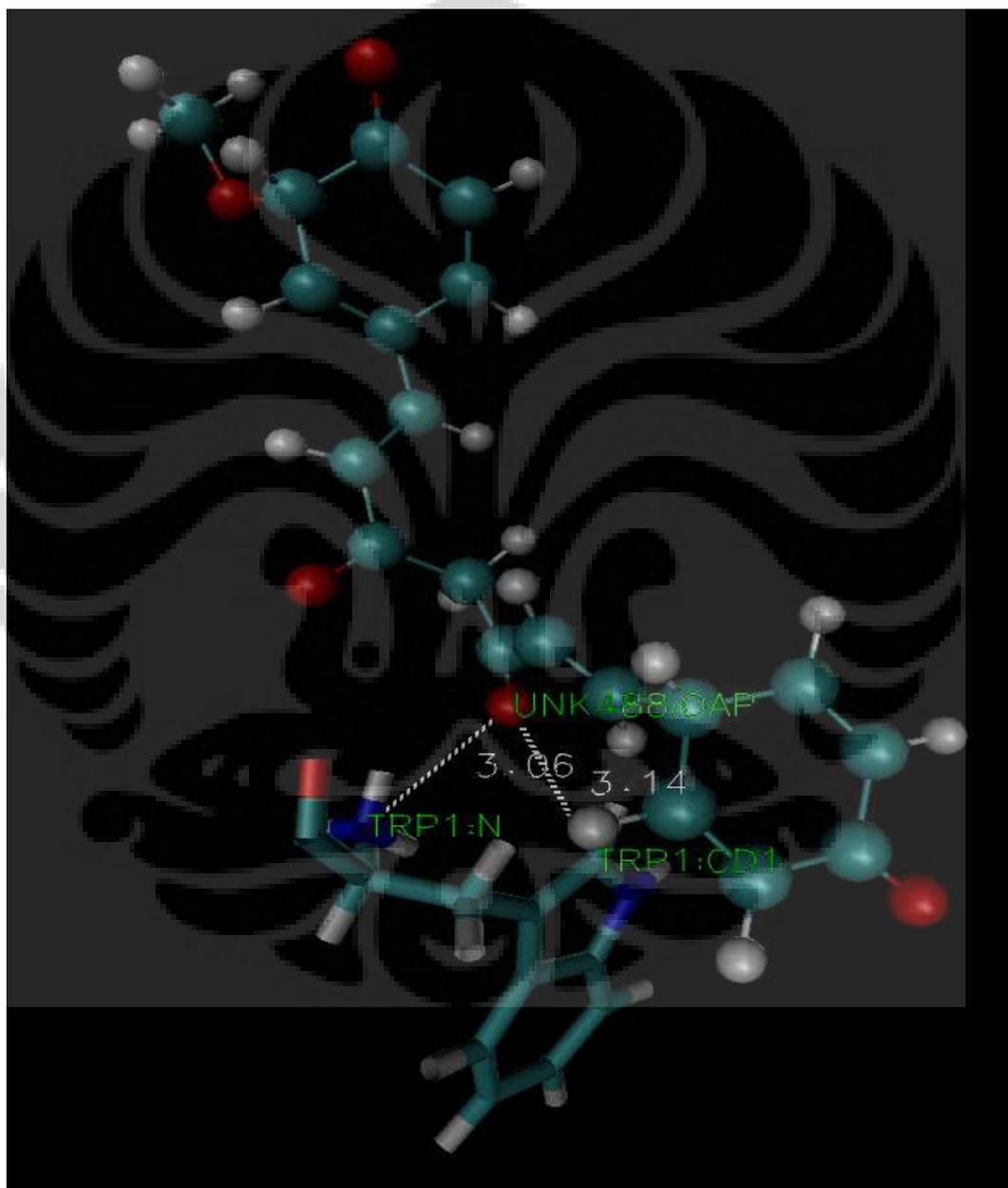


Gambar 4.14. Ikatan hidrogen antara akseptor Glu356 OE1 dengan donor Cur CAM (*occupancy* 64,60%), Cur CAI (*occupancy* 23,05), dan Cur CAF (*occupancy* 21,48).



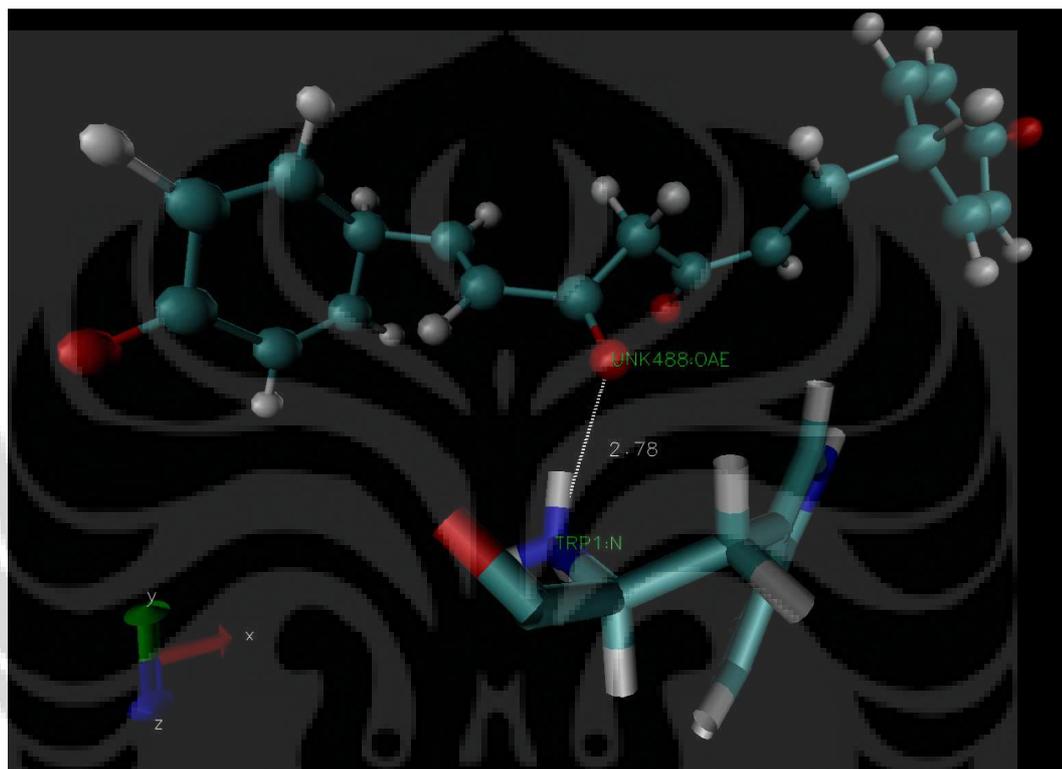
Gambar 4.15. Ikatan hidrogen antara donor Gln590 CA dengan akseptor Cur OAA (*occupancy* 61,24%) dan donor Gln590 CG dengan akseptor Cur OAA (*occupancy* 33,55%)

Pada interaksi demetoksikurkumin dengan 12-lipoksigenase, ada satu ikatan hidrogen yang sangat kuat, dengan *occupancy* sebesar 89,18%, yaitu donor Trp176 *Main* N dengan akseptor demetoksikurkumin (Gambar 4.16). Satu ikatan hidrogen tergolong kuat dengan *occupancy* 54,18%, yaitu pada donor Trp176 *Side* CD1 dengan akseptor demetoksikurkumin (Gambar 4.16). Sisanya adalah ikatan hidrogen lemah dan sangat lemah, dengan *occupancy* di bawah 50%.

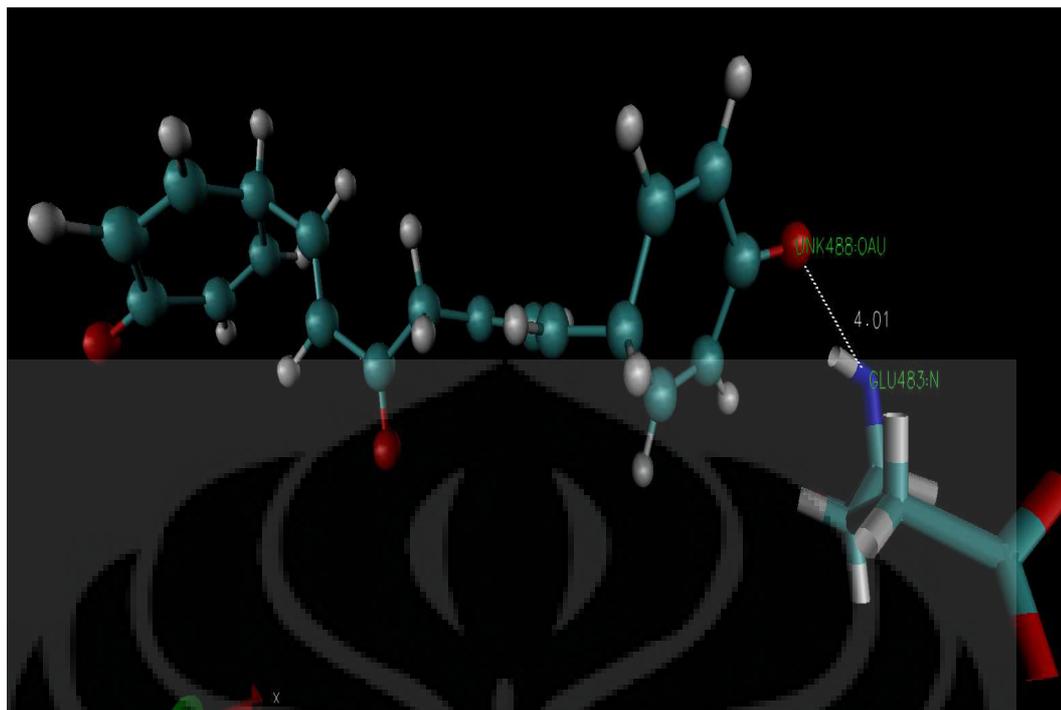


Gambar 4.16. Ikatan hidrogen antara donor Trp176 *Main* N dan *Side* CD1 dengan akseptor Des-OAC (*occupancy* 91,86 dan 54,18%)

Pada interaksi bisdemetoksikurkumin dengan 12-lipoksigenase, terdapat dua ikatan hidrogen sangat kuat dengan *occupancy* 94,08 dan 83,58%, yaitu donor Trp176 dengan akseptor bisdemetoksikurkumin (Gambar 4.17) dan donor Glu658 dengan akseptor bisdemetoksikurkumin (Gambar 4.18). Sisanya adalah ikatan hidrogen lemah dan sangat lemah dengan *occupancy* di bawah 50%.



Gambar 4.17. Ikatan hidrogen antara donor Trp176 *Main* N dengan akseptor Bis OAE (*occupancy* 94,08%).

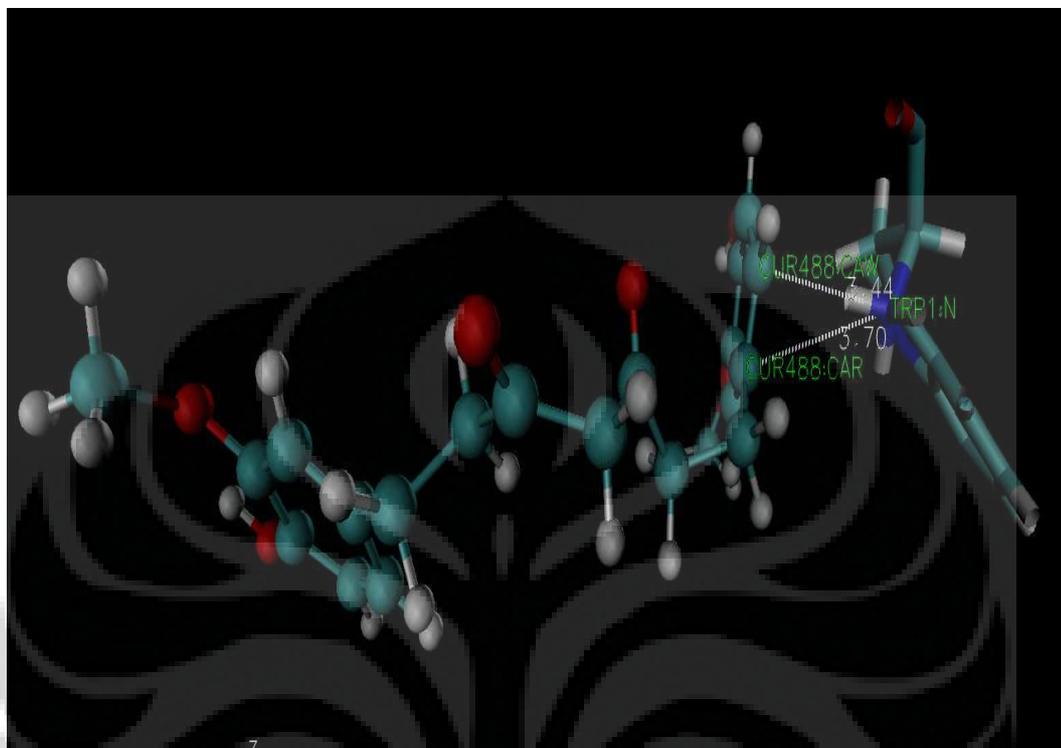


Gambar 4.18. Ikatan hidrogen donor Glu658 *Main N* dengan akseptor Bis OAU (*occupancy* 83,58%).

Ada satu residu yang terlibat sebagai donor dalam ikatan hidrogen dengan ketiga ligan, yaitu Trp176. Pada interaksi dengan ligan kurkumin, residu Trp176 memiliki *occupancy* 24,13%, yang tergolong ikatan hidrogen sangat lemah (Gambar 4.19). Akan tetapi, pada interaksi dengan ligan demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin, residu Trp176 memiliki nilai *occupancy* 91,86 dan 94,08%, yang tergolong ikatan hidrogen sangat kuat. Perbedaan nilai *occupancy* ini dapat disebabkan oleh perbedaan gugus yang bereaksi dengan residu Trp176. Pada ligan demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin, residu Trp176 berinteraksi dengan gugus keto pada kedua ligan. Sedangkan pada ligan kurkumin, residu TRP176 berinteraksi dengan rantai salah satu gugus aromatik kurkumin.

Perbedaan lokasi interaksi dengan Trp76 pada ketiga ligan memperlihatkan bahwa perbedaan konfigurasi ligan (bentuk geometri *cis*- dan *trans*-) memberikan interaksi yang berbeda dengan enzim atau reseptor. Pada ligan kurkumin, dengan konfigurasi yang berbeda dengan kedua turunannya, gugus keto yang dapat berinteraksi dengan Trp176 terhalang oleh gugus aromatik kurkumin, sehingga interaksi Trp176 yang muncul adalah dengan gugus aromatic

kurkumin. Nilai *occupancy* yang menunjukkan interaksi yang lemah dapat dikarenakan residu Trp176 berinteraksi dengan atom hidrogen gugus aromatik, yang cenderung bersifat hidrofobik.



Gambar 4.19. Donor Trp176 Main N dengan akseptor Cur CAW (*occupancy* 24,13%) dan akseptor Cur CAR (*occupancy* 21,06%).

Hasil analisis kondisi ikatan hidrogen ini memberikan hasil yang sama dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Tasbichaty (2010), dalam hal residu Trp176 yang terlibat dalam ikatan hidrogen dengan ketiga ligan.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil beberapa kesimpulan sebagai berikut:

- a. Interaksi enzim 12-lipoksigenase dengan kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin memperlihatkan kestabilan selama waktu simulasi 2000 pikodetik atau 2 nanodetik, berdasarkan nilai RMSF, energi potensial, dan kondisi ikatan hidrogen.
- b. Energi potensial pada ketiga sistem menunjukkan fluktuasi pada kisaran nilai yang hampir tidak berbeda, sehingga dapat disimpulkan bahwa perbedaan gugus fungsi pada ketiga jenis ligan tidak mempengaruhi besarnya energi potensial.
- c. Nilai RMSF menunjukkan fleksibilitas yang rendah pada daerah kantung (*pocket*) hidrofobik yang berinteraksi dengan ujung metal dari asam arakhidonat, yang merupakan target penambatan ligan, sehingga dapat disimpulkan bahwa kurkumin dan dua turunan alaminya (demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin) terikat secara stabil pada daerah tersebut.

5.2 Saran

Simulasi dinamika molekuler dapat memberikan hasil yang lebih memuaskan, dengan data yang lebih banyak dan analisis yang lebih jauh, apabila waktu simulasi diperpanjang. Selain itu, parameter-parameter yang menggambarkan kestabilan ikatan juga dapat ditambah, seperti memasukkan perhitungan nilai energi bebas sistem (ΔG), dan interaksi antara ligan dengan residu-residu yang terlibat dalam sisi aktif enzim juga dapat lebih diperkaya, tidak hanya interaksi ikatan hidrogen, tetapi juga jenis-jenis interaksi kimia lainnya.

Agar penarikan kesimpulan tidak terbatas pada analisis deskriptif dari parameter-parameter yang ada, data sebaiknya ditambah dengan membandingkan parameter-parameter yang sama pada interaksi 12-lipoksigenase dengan inhibitor kompetitif lainnya, seperti pada tinjauan pustaka, agar efektivitas terapeutik

kurkumin sebagai antikanker, dengan mekanisme inhibisi enzim 12-lipoksigenase, dapat diamati. Selain itu, data juga dapat ditambah dengan melihat interaksi 12-lipoksigenase dengan analog dan turunan kurkumin lainnya.

Simulasi juga akan lebih baik jika dilakukan pada konfigurasi yang berbeda dari kurkumin dan dua turunannya, sehingga dapat memperlihatkan perbedaan konfigurasi pada interaksi makromolekul-ligan.



DAFTAR PUSTAKA

- Aggarwal, B. B., Kumar, A., & Bharti, A. C. (2003). Anticancer Potential of Curcumin: Preclinical and Clinical Studies. *Anticancer Research*, 23, 363-398.
- Brash, Alan R. (1999). Lipoxygenases: Occurrence, Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate. *The Journal of Biological Chemistry*, 34, 23679-23682.
- Bruice, P. Y. (2004). *Organic Chemistry* (4th ed.).
- Case, D. A., et al. (2010). *Amber 11 User's Manual*. <http://ambermd.org>.
- Chen, Yong Q., et al. (1994). Endogenous 12(S)-HETE Production by Tumor Cells and Its Role in Metastasis. *Cancer Research*, 54, 1574-1579.
- Duvoix, A., et al. (2004). Chemopreventive and Therapeutic Effects of Curcumin. *Cancer Letters*, 223, 181-190.
- Henderson, Jr., William R. (1994). The Role of Leukotrienes in Inflammation. *Annals of Internal Medicine*, 121, 684-697.
- Holman, Theodore Russel dan Mogul, Rakesh. (2002). Allosteric Inhibitors of Lipoxygenase. *United States Patent*, 18, 179-193.
- Jankun, Jerzy, et al. (2006). Synthetic Curcuminoids Modulate The Arachidonic Acid Metabolism of Human Platelet 12-Lipoxygenase and Reduce Sprout Formation of Human Endothelial Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5, 1371-1382.
- Kästner, J., Loeffler, H. H., Roberts S. K., Fernandez, M. L. M., & Winn, M. D. (2009). Ectodomain Orientation, Conformational Plasticity and Oligomerization of ErbB1 Receptors Investigated by Molecular Dynamics. *Journal of Structural Biology*, 167, 117-128.
- Kunnumakkara, A. B., Anand, P., & Aggarwal, B. B. (2008). Curcumin Inhibits Proliferation, Invasion, Angiogenesis and Metastasis of Different Cancers Through Interaction with Multiple Cell Signaling Proteins. *Cancer Letters*, 269, 199-225.

- Lee, Matt. Loop Dynamics of the HIV-1 Integrase Core Domain. *AMBER Advanced Workshop Tutorial* A8.
<http://ambermd.org/tutorials/advanced/tutorial8/loop1.htm>
- Mazumder, A., Raghavan, K., Weinstein, J., Kohn, K. W., dan Pommier, Y. (1994). Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Integrase By Curcumin. *Biochemical Pharmacology*, 49, 1165-1170.
- McMurry, J. (2008). *Organic Chemistry* (7th ed.). USA: Brooks/Cole Publishing Company.
- Müller, K., Altmann, R., dan Prinz, H. (2001). 2-Arylalkyl-substituted Anthracenones as Inhibitors of 12-Lipoxygenase Enzymes. 1. Structure-Activity Relationships of The Terminal Aryl Ring. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 36, 569-575.
- Müller, Klaus, Altmann, Reinhold, dan Prinz, Helge. (2002). 2-Arylalkyl-substituted Anthracenones as Inhibitors of 12-Lipoxygenase Enzymes. 2. Structure-Activity Relationships of The Linker Chain. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 37, 83-89.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., & Rodwell, V. W. (2003). *Harper's Illustrated Biochemistry* (26th ed.). USA: McGraw-Hill.
- Nardo, L., Andreoni, A., Bondani, M., Måsson, M., & Tønnesen, H. H. (2009). Studies on Curcumin and Curcuminoids. XXXIV. Photophysical Properties of a Symmetrical, Non-substituted Curcumin Analogue. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 97, 77-85.
- Ravindran, J., Subbaraju, G. V., Ramani, M. V., Sung, B., & Aggarwal, B. B. (2010). Bisdemethylcurcumin and Structurally Related Hispolon Analogues of Curcumin Exhibit Enhanced Prooxidant, Anti-proliferative and Anti-inflammatory Activities in Vitro. *Biochemical Pharmacology*, 79, 1658-1666.
- Srivastava, R. M., Singh, S., Dubey, S. K., Misra, K., & Khar, A. (2011). Immunomodulatory and Therapeutic Activity of Curcumin. *International Immunopharmacology*, 11, 331-341.
- Stankovic, Ivan. (2004). Curcumin: Chemical and Technical Assessment (CTA). 61st JECFA, FAO.

- Tasbichaty, F. T. (2010). Analisis Simulasi Dinamika Molekuler Kompleks 12-Lipoksigenase dengan Beberapa Senyawa Antiinflamasi Golongan Kurkumin Hasil Penambatan Molekuler. *Skripsi Sarjana Farmasi*. Depok: Departemen Farmasi, FMIPA UI.
- Toledo, L., Masgrau, L., Marechal, J.-D., Lluch, J. M., & Lafont, A. G. (2010). Insights into the mechanism of binding of arachidonic acid to mammalian. *J. Phys. Chem. B*, XXXX, xxx, 000, A-I.
- Utami, C. A. (2009). Screening Aktivitas Antiinflamasi Senyawa Aktif yang Terkandung pada Beberapa Tanaman Obat Indonesia melalui Penambatan Enzim 12-lipoksigenase secara in silico. *Skripsi Sarjana Farmasi*. Depok: FMIPA UI.
- Van Gunsteren, W. F., & Berendsen, H. J. C. (1990). *Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications, and Perspective in Chemistry*. <http://nook.cs.ucdavis.edu>.
- Walker, Ross, dan Tang, Sishi. Using Antechamber to Create Leap Input Files for Simulating Sustiva (efavirenz)-RT complex using the General Amber Force Field. *Antechamber Tutorial*. <http://ambermd.org/tutorials/basic/tutorial4b>
- Walker, Ross. Using VMD with AMBER. *Amber Tutorials*. <http://ambermd.org/tutorials/basic/tutorial2/>

Lampiran 1. Berkas *input* mmpbsa_leap.in untuk pembuatan parameter topologi, koordinat input, penetralan muatan, dan penambahan pelarut

```

source leaprc.ff99SB
source leaprc.gaff
loadamberparams curcumin.frcmod
cur = loadmol2 curcumin_bcc.mol2
lox = loadpdb 12LOX_e.pdb
lox_cur = combine {lox cur}

saveamberparm cur cur.prmtop cur.inpcrd

charge lox
charge lox_cur

addIons2 lox Na+ 0
addIons2 lox_cur Na+ 0

charge lox
charge lox_cur

saveamberparm lox lox.prmtop lox.inpcrd
saveamberparm lox_cur lox_cur.prmtop lox_cur.inpcrd

solvateOct lox_cur TIP3PBOX 12.0

saveamberparm lox_cur lox_cur_solv.prmtop lox_cur_solv.inpcrd

charge lox
charge lox_cur
quit

```

Lampiran 2. Berkas *input* min.in untuk minimisasi tahap pertama

```

-lox_cur_solv: initial minimisation solvent + ions
&cntrl
  imin = 1,
  maxcyc = 1000,
  ncyc = 500,
  ntb = 1,
  ntr = 1,
  cut = 12
/
Hold the Protein and Ligand fixed
500.0
RES 176 662
END
END

```

Lampiran 3. Berkas *input* min_all.in untuk minimisasi tahap kedua

```
-lox_cur_solv_all: minimization of the entire molecular system
&cntrl
  imin   = 1,
  maxcyc = 1000,
  ncyc   = 500,
  ntb    = 1,
  cut    = 12
/
&END
```

Lampiran 4. Berkas *input* eq1.in untuk ekuilibراسi tahap pertama

```
Heating up the system equilibration stage 1, eq1
&cntrl
  nstlim=5000, dt=0.002, ntx=1, irest=0, ntp=250, ntwr=5000, ntwx=500,
  tempi =0, temp0=300.0, ntt=3, gamma_ln=2.0, cut=12, tautp=2.0, ig=-1,
  ntb=1, ntp=0,
  ntc=2, ntf=2,
  nrespa=2,
&end
```

Lampiran 5. Berkas *input* eq2.in untuk ekuilibراسi tahap kedua

```
Constant pressure constant temperature equilibration stage 2, eq2
&cntrl
  nstlim=5000, dt=0.002, ntx=5, irest=1, ntp=250, ntwr=5000, ntwx=500,
  temp0=300.0, ntt=3, gamma_ln=2.0, cut=12, tautp=2.0, ig=-1,
  ntb=2, ntp=1,
  ntc=2, ntf=2,
  nrespa=1,
&end
```

Lampiran 6. Berkas *input* eq3.in untuk ekuilibrasi tahap ketiga

```

Constant pressure constant temperature equilibration stage 3, eq3
&cntrl
  nstlim=50000, dt=0.002, ntx=5, irect=1, ntpr=250, ntwr=5000, ntwx=500,

  temp0=300.0, ntt=3, gamma_ln=2.0, cut=12, tautp=2.0, ig=-1,

  ntb=2, ntp=1,

  ntc=2, ntf=2,

  nrespa=1,
&end

```

Lampiran 7. Berkas *input* ptraj.in untuk memperoleh data RMSD selama ekuilibrasi

```

trajin lox_cur_solv_eq1.mdcrd
trajin lox_cur_solv_eq2.mdcrd
trajin lox_cur_solv_eq3.mdcrd
center :176-662
image center familiar
rms first out lox_cur_rms.out :178-664@CA
trajout lox_cur_nice.crd nobox

```

Lampiran 8. Berkas *input* prod_ligan.in untuk produksi

```

lox_cur in water and ion : 200ps of MD
&cntrl
  imin = 0, irect = 1, ntx = 5,
  ntb = 2, pres0 = 1.0, ntp = 1,
  taup = 2.0, ig=-1,
  ntr = 0,
  ntc = 2, ntf = 2,
  tempi = 300.0, temp0 = 300.0,
  ntt = 3, gamma_ln=2.0, cut=12,
  nstlim = 100000, dt = 0.002,
  ntpr = 250, ntwx = 500, ntwr = 5000
/

```

Lampiran 9. Berkas run_md.x yang akan menjalankan produksi secara otomatis

selama 10 kali

```
#!/bin/csh
set AMBERHOME="/home/arryy/amber11"
set MDSTARTJOB=2
set MDENDJOB=11
set MDCURRENTJOB=$MDSTARTJOB
set MDINPUT=0

echo -n "Starting Script at: "
date
echo ""

while ( $MDCURRENTJOB <= $MDENDJOB )
  echo -n "Job $MDCURRENTJOB started at: "
  date
  @ MDINPUT = $MDCURRENTJOB - 1
  sander -O -i prod_cur.in \
        -o lox_cur_solv_md$MDCURRENTJOB.out \
        -p lox_cur_solv.prmtop \
        -c lox_cur_solv_md$MDINPUT.rst \
        -r lox_cur_solv_md$MDCURRENTJOB.rst \
        -x lox_cur_solv_md$MDCURRENTJOB.mdcrd
  gzip -9 -v lox_cur_solv_md$MDCURRENTJOB.mdcrd
  echo -n "Job $MDCURRENTJOB finished at: "
  date
  @ MDCURRENTJOB = $MDCURRENTJOB + 1
end
echo "ALL DONE"
```

Lampiran 10. Berkas do_1.run untuk produksi

```
nohup ./run_md.x >& run.log &
```

Lampiran 11. Berkas do.run untuk menjalankan berkas run_md.x

```
nohup sander -O -i prod_cur.in -p lox_cur_solv.prmtop -c
lox_cur_solv_md1.rst -r lox_cur_solv_md2.rst -x lox_cur_solv_md2.mdcrd -o
lox_cur_solv_md2.out &
```

Lampiran 12. Berkas *input* ptraj.in untuk memperoleh data RMSD dari proses

produksi

```
trajin lox_cur_solv_md2.mdcrd
trajin lox_cur_solv_md3.mdcrd
trajin lox_cur_solv_md4.mdcrd
trajin lox_cur_solv_md5.mdcrd
trajin lox_cur_solv_md6.mdcrd
trajin lox_cur_solv_md7.mdcrd
trajin lox_cur_solv_md8.mdcrd
trajin lox_cur_solv_md9.mdcrd
trajin lox_cur_solv_md10.mdcrd
trajin lox_cur_solv_md11.mdcrd

center :176-662
image center familiar
rms first out lox_cur_md2-11_rms.out :178-660@CA
trajout lox_cur_md2-11_nice.crd nobox
```

Lampiran 13. Berkas *input* ptraj_rmsf.in untuk memperoleh data RMSF dari

proses produksi

```
trajin lox_cur_solv_md2.mdcrd
trajin lox_cur_solv_md3.mdcrd
trajin lox_cur_solv_md4.mdcrd
trajin lox_cur_solv_md5.mdcrd
trajin lox_cur_solv_md6.mdcrd
trajin lox_cur_solv_md7.mdcrd
trajin lox_cur_solv_md8.mdcrd
trajin lox_cur_solv_md9.mdcrd
trajin lox_cur_solv_md10.mdcrd
trajin lox_cur_solv_md11.mdcrd

rms first out lox_cur_solv_md2-11_byres_rmsf.out :176-662@CA
atomicfluct out lox_cur_solv_md2-11_byres_rmsf_nice.apf @CA byres
go
```

Lampiran 14. Contoh berkas hasil pengujian parameter dengan format .frcmo

remark goes here

MASS

BOND

ANGLE

DIHE

IMPROPER

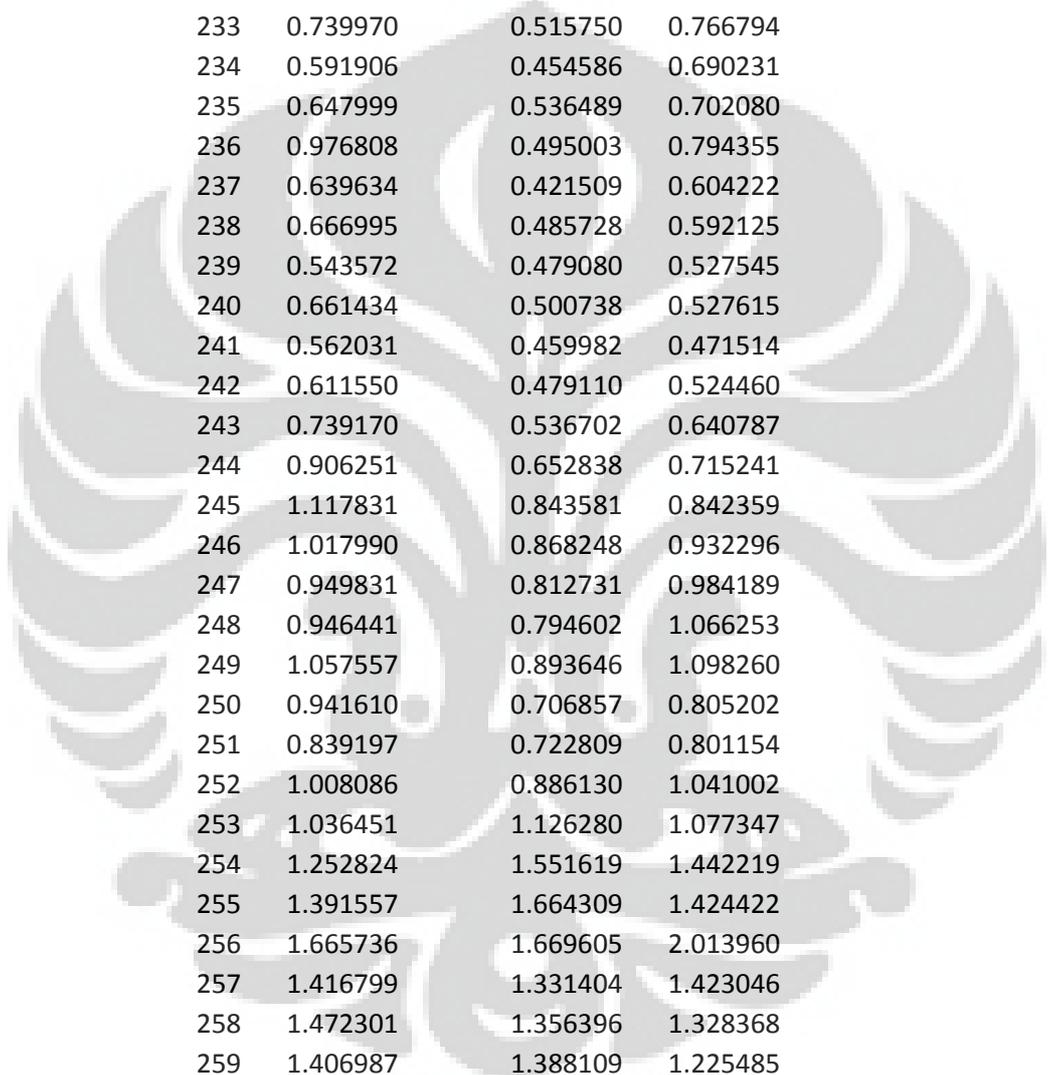
ca-ca-ca-os	1.1	180.0	2.0	Using default value
ca-ca-ca-ha	1.1	180.0	2.0	General improper torsional angle (2 general atom types)
ca-ca-ca-oh	1.1	180.0	2.0	Using default value
c3-c3-c -o	10.5	180.0	2.0	General improper torsional angle (2 general atom types)

NONBON

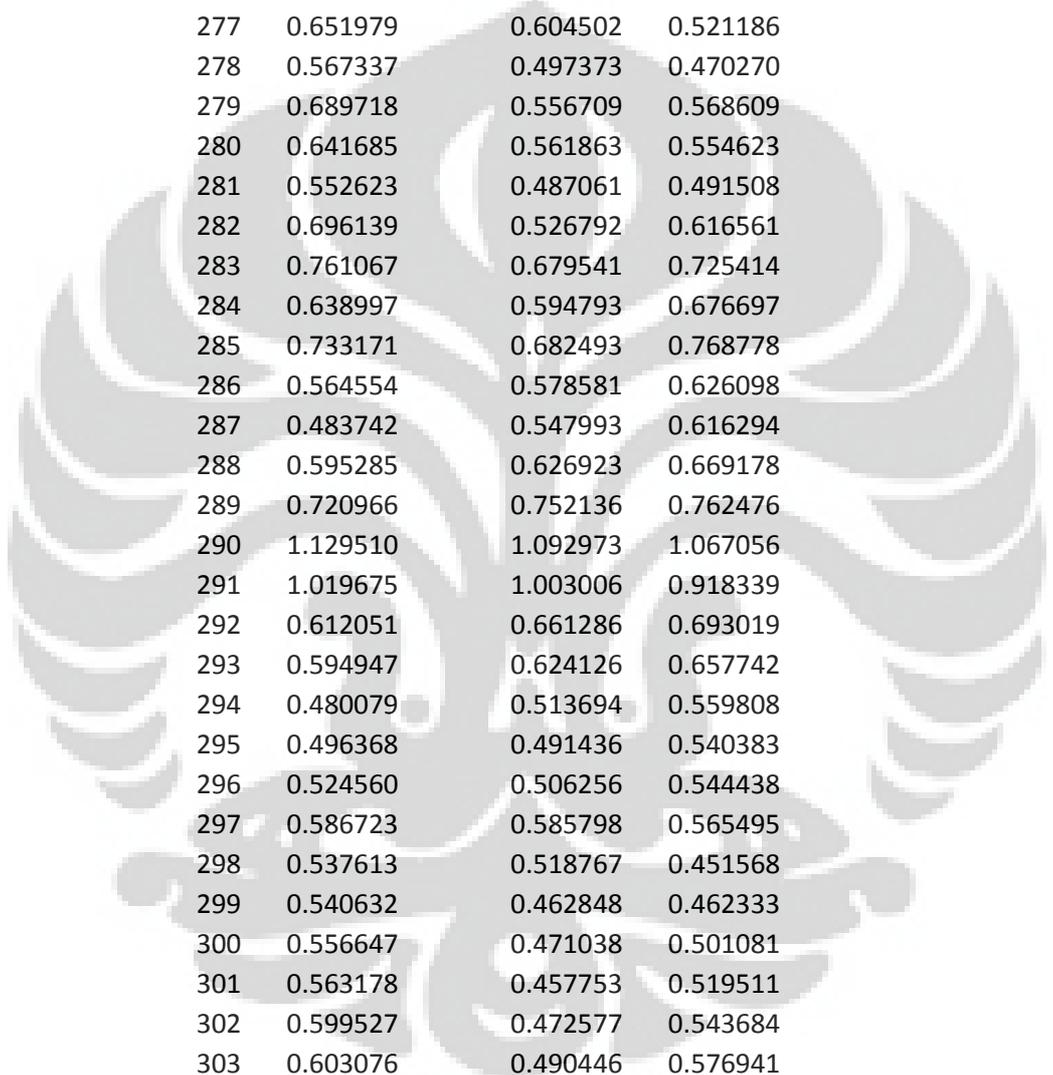
Lampiran 15. Nilai RMSF untuk masing-masing residu.

Residu	cur	des	bis
176	0.590026	0.666600	0.452785
177	0.668119	0.744945	0.525845
178	0.903194	0.852938	0.662658
179	0.812400	1.295097	0.849813

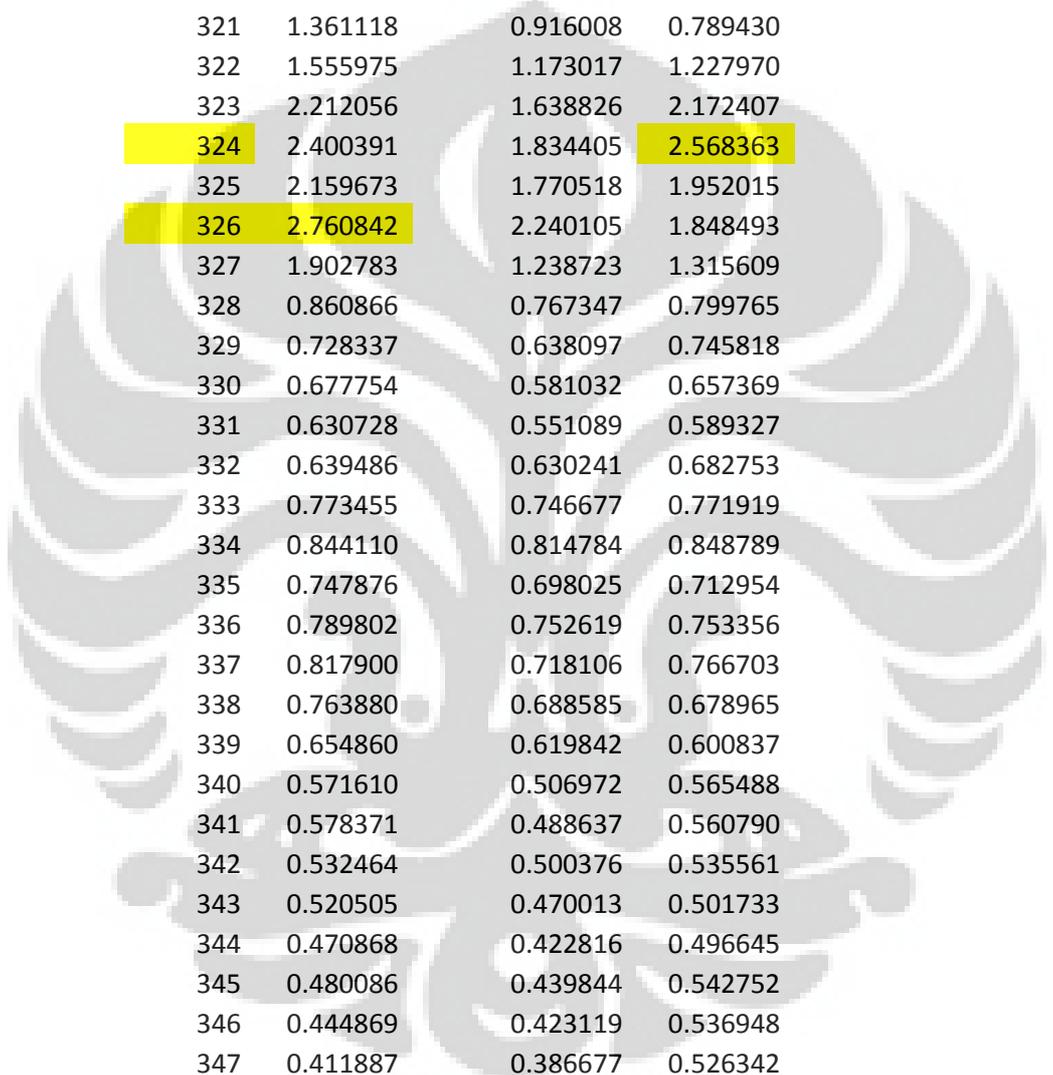
180	1.097042	1.576845	1.300915
181	1.420819	1.814823	1.735283
182	1.201561	1.520318	1.548607
183	0.913369	1.440025	1.381884
184	0.933798	1.393952	1.167658
185	0.925956	1.244730	1.275065
186	1.327766	1.367040	1.714761
187	1.466710	1.461460	1.589526
188	1.113928	1.453742	1.595250
189	1.229911	1.554812	1.902525
190	1.374616	1.662394	2.171109
191	1.334980	1.300115	1.991282
192	1.221591	1.169412	1.810848
193	1.219105	1.330150	2.114229
194	1.258124	1.608389	2.279591
195	1.333364	2.039332	2.257816
196	1.231399	2.268286	2.312738
197	0.905181	1.465910	1.843255
198	0.927831	1.214445	1.970856
199	0.764563	0.918993	1.522237
200	0.808537	0.985695	1.267820
201	1.016938	1.148157	1.207040
202	0.896970	0.947392	1.048847
203	0.894189	0.773072	1.008225
204	1.214590	0.743768	1.145562
205	1.318123	0.790973	1.136003
206	0.942155	0.761203	1.079537
207	0.793637	0.694534	1.078428
208	0.954357	0.818964	1.187780
209	1.080679	1.135665	1.304535
210	0.881239	1.333280	1.298130
211	0.716967	0.933568	1.118988
212	0.729017	0.807987	1.022835
213	0.842450	0.815931	1.012119
214	0.572697	0.615306	0.854799
215	0.575661	0.555528	1.023092
216	0.692311	0.617768	1.094843
217	0.622979	0.666985	1.162237
218	0.650111	0.626888	1.008432
219	0.698805	0.608943	1.301376
220	1.108783	0.997370	2.009956
221	0.854583	0.661620	1.280083
222	0.683273	0.671881	1.448858
223	0.680115	0.813011	1.118751



224	0.619895	0.511331	0.790798
225	0.591375	0.484413	0.687248
226	0.643873	0.522375	0.789320
227	0.573220	0.476185	0.783599
228	0.501022	0.451500	0.674613
229	0.576148	0.484867	0.682119
230	0.595818	0.463180	0.664691
231	0.582256	0.417874	0.621339
232	0.633889	0.430625	0.621735
233	0.739970	0.515750	0.766794
234	0.591906	0.454586	0.690231
235	0.647999	0.536489	0.702080
236	0.976808	0.495003	0.794355
237	0.639634	0.421509	0.604222
238	0.666995	0.485728	0.592125
239	0.543572	0.479080	0.527545
240	0.661434	0.500738	0.527615
241	0.562031	0.459982	0.471514
242	0.611550	0.479110	0.524460
243	0.739170	0.536702	0.640787
244	0.906251	0.652838	0.715241
245	1.117831	0.843581	0.842359
246	1.017990	0.868248	0.932296
247	0.949831	0.812731	0.984189
248	0.946441	0.794602	1.066253
249	1.057557	0.893646	1.098260
250	0.941610	0.706857	0.805202
251	0.839197	0.722809	0.801154
252	1.008086	0.886130	1.041002
253	1.036451	1.126280	1.077347
254	1.252824	1.551619	1.442219
255	1.391557	1.664309	1.424422
256	1.665736	1.669605	2.013960
257	1.416799	1.331404	1.423046
258	1.472301	1.356396	1.328368
259	1.406987	1.388109	1.225485
260	1.112355	1.093220	1.023686
261	1.146387	1.010510	1.012495
262	1.310699	1.185932	1.082220
263	1.192167	1.129396	0.980878
264	0.976605	0.882134	0.867116
265	1.186867	0.986783	0.977088
266	1.321815	1.125825	1.010270
267	1.168427	1.027658	0.878747

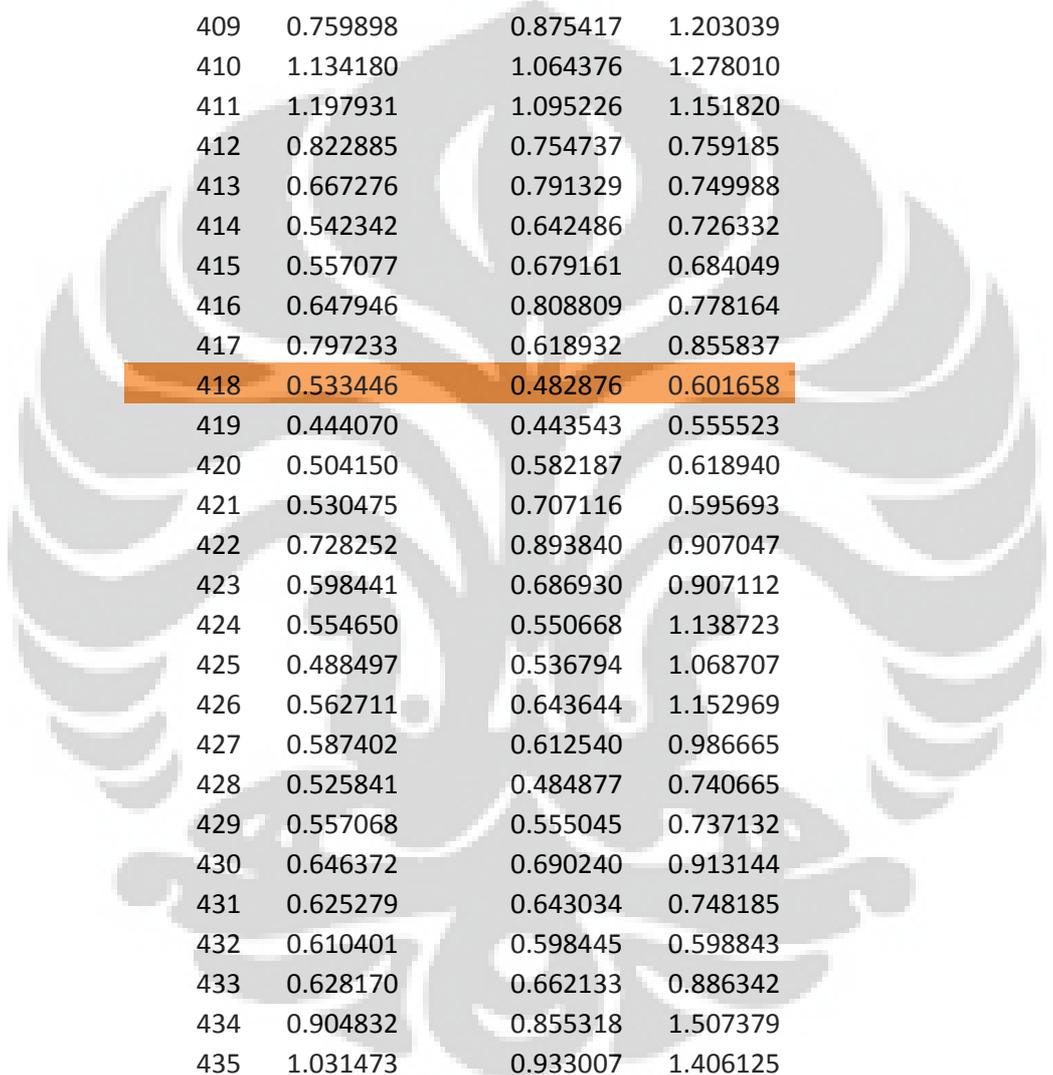


268	1.117109	0.929631	0.959839
269	1.229045	1.115333	1.108207
270	1.007091	1.092062	1.138400
271	1.169298	0.978439	1.221804
272	0.783253	0.740569	0.800144
273	0.723418	0.563689	0.657570
274	0.629597	0.488457	0.554742
275	0.618604	0.488971	0.536602
276	0.604708	0.528408	0.511868
277	0.651979	0.604502	0.521186
278	0.567337	0.497373	0.470270
279	0.689718	0.556709	0.568609
280	0.641685	0.561863	0.554623
281	0.552623	0.487061	0.491508
282	0.696139	0.526792	0.616561
283	0.761067	0.679541	0.725414
284	0.638997	0.594793	0.676697
285	0.733171	0.682493	0.768778
286	0.564554	0.578581	0.626098
287	0.483742	0.547993	0.616294
288	0.595285	0.626923	0.669178
289	0.720966	0.752136	0.762476
290	1.129510	1.092973	1.067056
291	1.019675	1.003006	0.918339
292	0.612051	0.661286	0.693019
293	0.594947	0.624126	0.657742
294	0.480079	0.513694	0.559808
295	0.496368	0.491436	0.540383
296	0.524560	0.506256	0.544438
297	0.586723	0.585798	0.565495
298	0.537613	0.518767	0.451568
299	0.540632	0.462848	0.462333
300	0.556647	0.471038	0.501081
301	0.563178	0.457753	0.519511
302	0.599527	0.472577	0.543684
303	0.603076	0.490446	0.576941
304	0.716140	0.592015	0.646435
305	0.867671	0.751558	0.744329
306	1.132136	1.218752	1.154047
307	1.665753	1.901606	1.535246
308	1.555830	1.568671	1.257678
309	1.333604	1.188581	1.024198
310	0.858149	0.775090	0.675406
311	0.698816	0.611177	0.653689

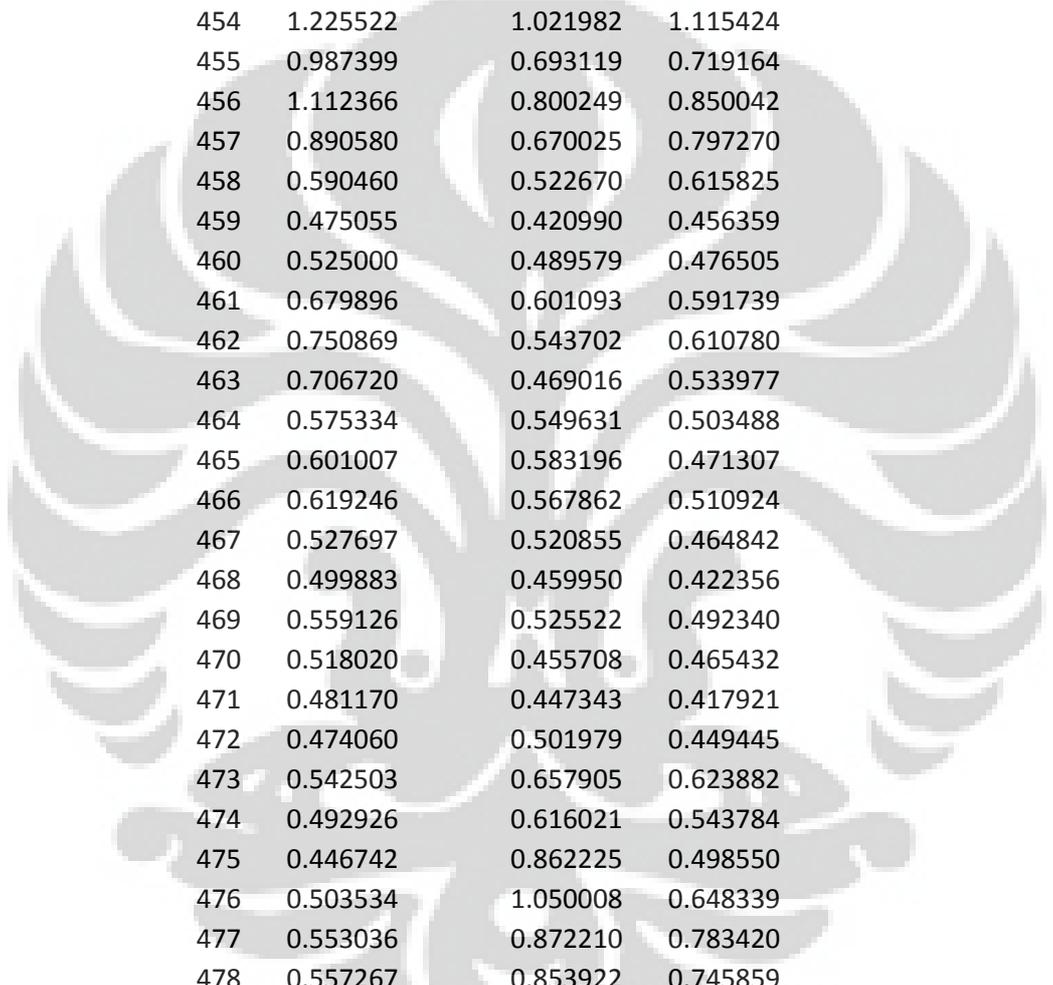


312	0.649264	0.582528	0.689061
313	0.618588	0.514675	0.649185
314	0.639474	0.541049	0.616435
315	0.583866	0.519723	0.572350
316	0.561016	0.462979	0.512129
317	0.639389	0.518174	0.515749
318	0.605022	0.589911	0.537848
319	0.862830	0.638654	0.603787
320	1.215565	0.734392	0.665269
321	1.361118	0.916008	0.789430
322	1.555975	1.173017	1.227970
323	2.212056	1.638826	2.172407
324	2.400391	1.834405	2.568363
325	2.159673	1.770518	1.952015
326	2.760842	2.240105	1.848493
327	1.902783	1.238723	1.315609
328	0.860866	0.767347	0.799765
329	0.728337	0.638097	0.745818
330	0.677754	0.581032	0.657369
331	0.630728	0.551089	0.589327
332	0.639486	0.630241	0.682753
333	0.773455	0.746677	0.771919
334	0.844110	0.814784	0.848789
335	0.747876	0.698025	0.712954
336	0.789802	0.752619	0.753356
337	0.817900	0.718106	0.766703
338	0.763880	0.688585	0.678965
339	0.654860	0.619842	0.600837
340	0.571610	0.506972	0.565488
341	0.578371	0.488637	0.560790
342	0.532464	0.500376	0.535561
343	0.520505	0.470013	0.501733
344	0.470868	0.422816	0.496645
345	0.480086	0.439844	0.542752
346	0.444869	0.423119	0.536948
347	0.411887	0.386677	0.526342
348	0.434121	0.377565	0.494842
349	0.413319	0.394268	0.471192
350	0.423861	0.391676	0.449952
351	0.445261	0.379591	0.540876
352	0.409273	0.385920	0.514609
353	0.435241	0.407002	0.494129
354	0.447573	0.422765	0.555962
355	0.442370	0.405384	0.860666

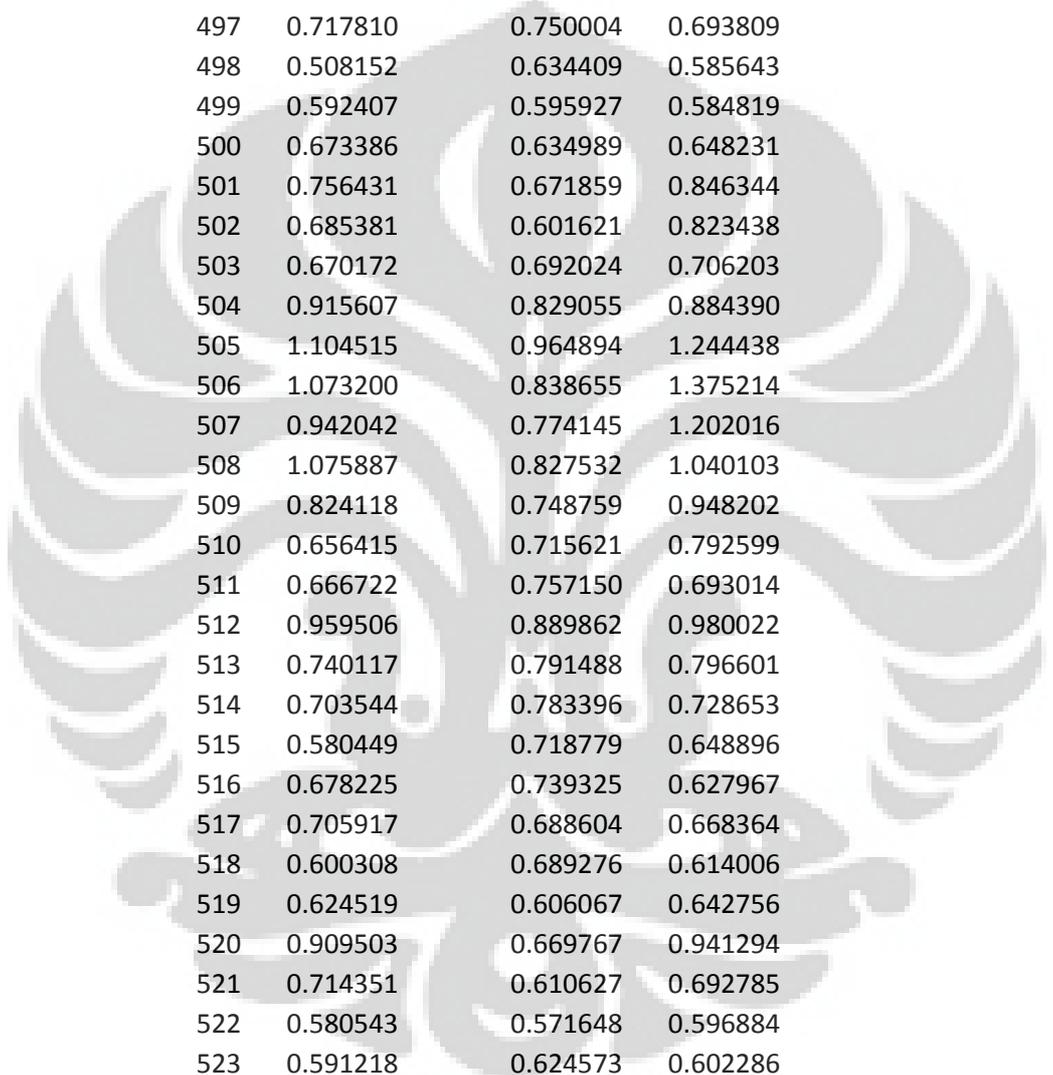
356	0.399736	0.406870	1.036457
357	0.483730	0.523094	0.768000
358	0.461525	0.530458	0.456211
359	0.469507	0.484938	0.489589
360	0.470437	0.481526	0.495629
361	0.538067	0.643383	0.595164
362	0.487300	0.775437	0.544186
363	0.484386	0.723570	0.475657
364	0.430494	0.490610	0.556597
365	0.482483	0.500281	0.587812
366	0.534783	0.575139	0.614399
367	0.480466	0.585073	0.648866
368	0.441657	0.515498	0.565106
369	0.488191	0.505440	0.493111
370	0.476762	0.551637	0.539399
371	0.435116	0.529377	0.513056
372	0.474043	0.574289	0.540712
373	0.522325	0.640147	0.581890
374	0.472019	0.606803	0.509372
375	0.482355	0.618427	0.526201
376	0.663510	0.730130	0.711411
377	0.702615	0.802257	0.733151
378	0.615794	0.792764	0.628914
379	0.636500	0.812535	0.631203
380	0.762500	0.984585	0.787452
381	0.857531	1.075946	0.902791
382	0.885830	1.158416	0.927949
383	0.581370	0.896824	0.640338
384	0.542315	0.852558	0.637368
385	0.494485	0.639278	0.539770
386	0.520829	0.670266	0.532199
387	0.542511	0.902154	0.600151
388	0.475820	0.786250	0.555262
389	0.569033	0.569604	0.554625
390	0.715927	0.663791	0.567651
391	0.702901	0.826212	0.564362
392	0.638760	0.702477	0.523535
393	0.712644	0.612218	0.609887
394	0.675209	0.914346	0.642447
395	0.644868	1.115964	0.874781
396	0.637031	0.751904	0.841867
397	0.848630	1.212062	1.441378
398	0.767800	1.488121	1.308571
399	0.669521	1.149393	0.668507



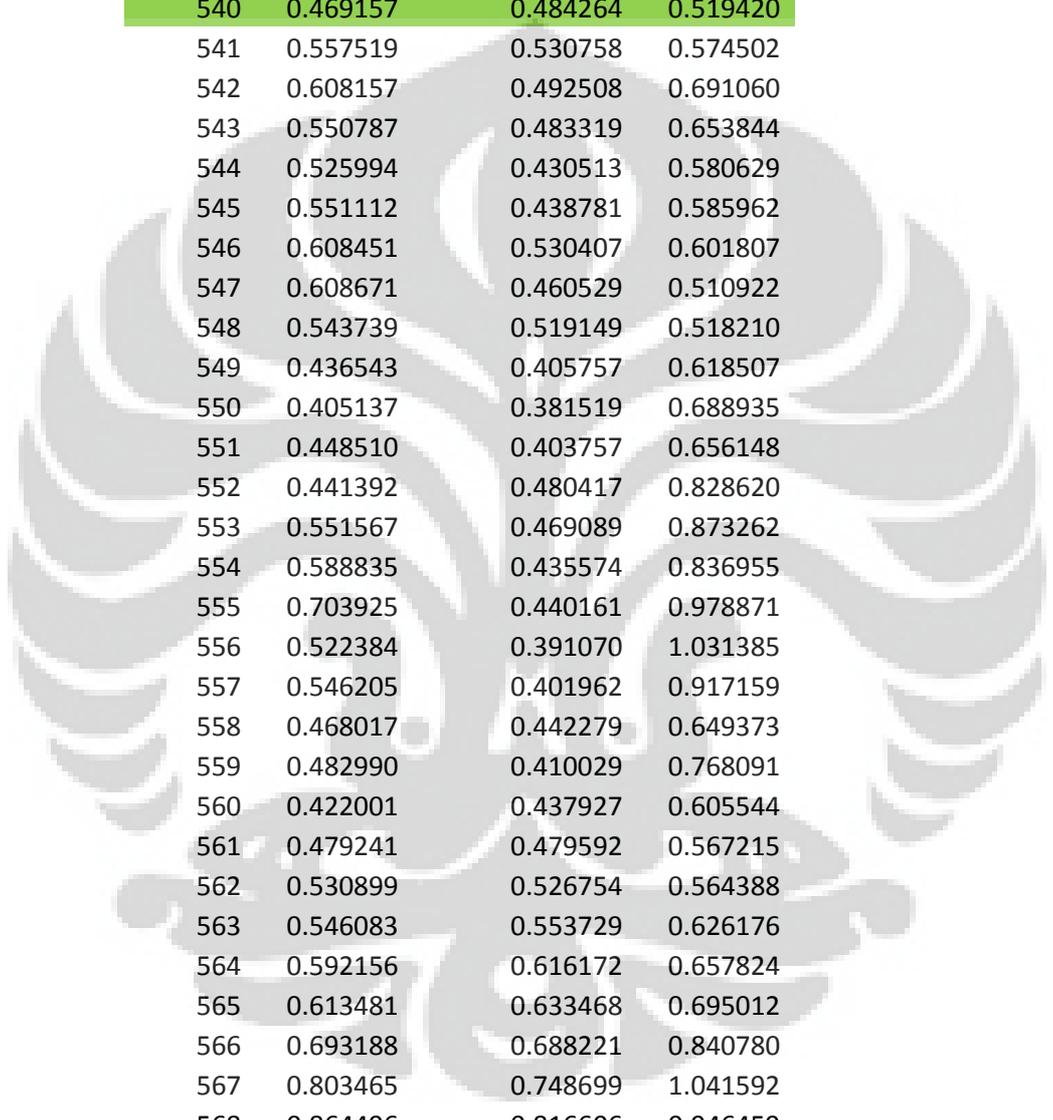
400	0.741785	0.653244	0.564167
401	0.923697	0.697127	0.665727
402	0.963564	0.803804	0.699943
403	0.804778	0.661992	0.711801
404	0.999971	0.912005	0.706908
405	1.350340	0.958789	0.784372
406	1.088606	0.786745	0.715471
407	0.770888	0.845096	0.642508
408	0.678897	0.902794	0.963416
409	0.759898	0.875417	1.203039
410	1.134180	1.064376	1.278010
411	1.197931	1.095226	1.151820
412	0.822885	0.754737	0.759185
413	0.667276	0.791329	0.749988
414	0.542342	0.642486	0.726332
415	0.557077	0.679161	0.684049
416	0.647946	0.808809	0.778164
417	0.797233	0.618932	0.855837
418	0.533446	0.482876	0.601658
419	0.444070	0.443543	0.555523
420	0.504150	0.582187	0.618940
421	0.530475	0.707116	0.595693
422	0.728252	0.893840	0.907047
423	0.598441	0.686930	0.907112
424	0.554650	0.550668	1.138723
425	0.488497	0.536794	1.068707
426	0.562711	0.643644	1.152969
427	0.587402	0.612540	0.986665
428	0.525841	0.484877	0.740665
429	0.557068	0.555045	0.737132
430	0.646372	0.690240	0.913144
431	0.625279	0.643034	0.748185
432	0.610401	0.598445	0.598843
433	0.628170	0.662133	0.886342
434	0.904832	0.855318	1.507379
435	1.031473	0.933007	1.406125
436	0.750155	0.716854	0.958663
437	0.699391	0.686742	0.715686
438	0.511593	0.641187	0.597102
439	0.647335	0.705535	0.660326
440	0.707443	0.770406	0.666322
441	0.539443	0.801934	0.640507
442	0.563576	0.681529	0.555346
443	0.648952	0.862216	0.585249



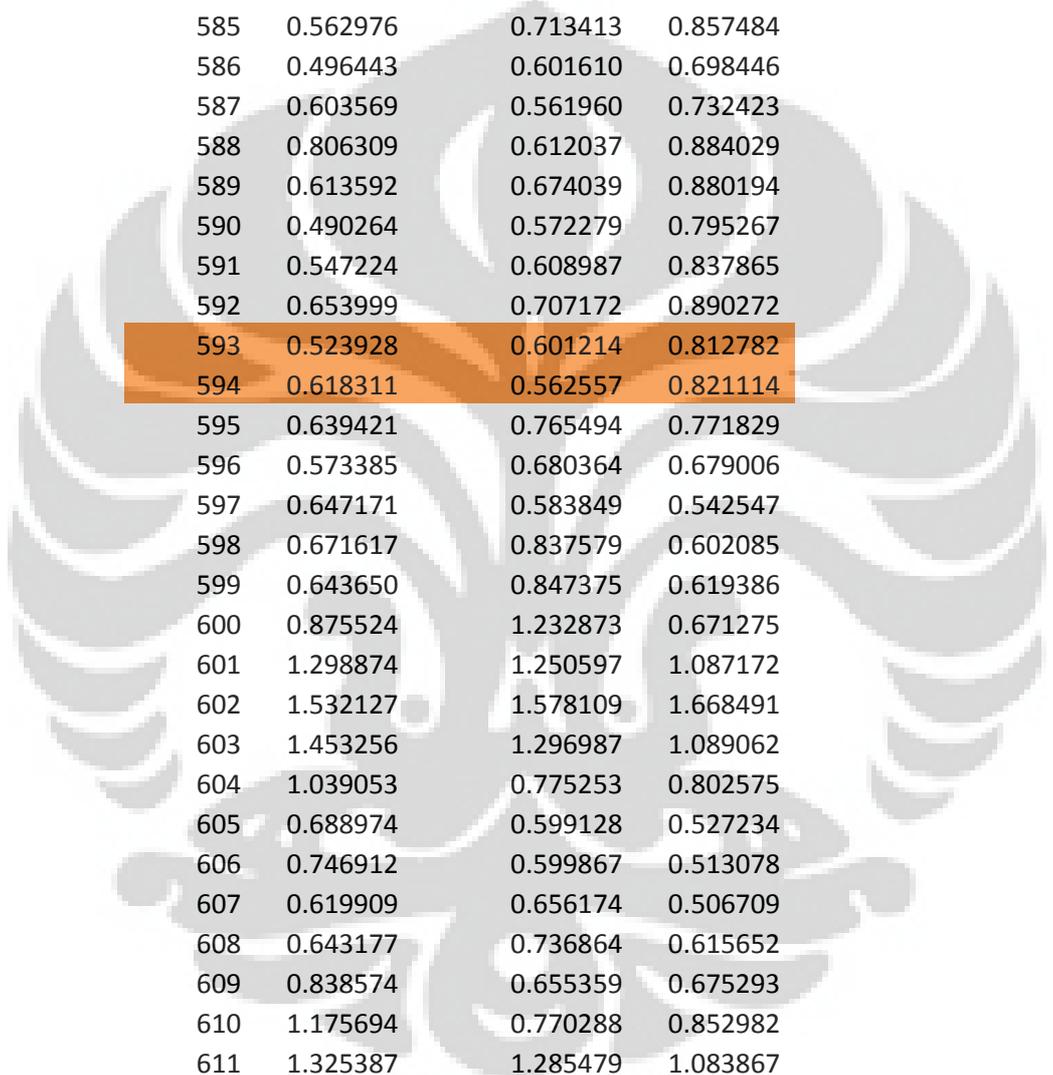
444	0.744523	0.918652	0.631361
445	0.738613	0.678215	0.604834
446	0.646861	0.584093	0.588756
447	0.637630	0.551140	0.505593
448	0.777807	0.657162	0.701362
449	0.853640	0.659600	0.645711
450	0.711329	0.528005	0.562460
451	0.801426	0.598249	0.617587
452	0.767521	0.555628	0.580084
453	0.982375	0.655533	0.641038
454	1.225522	1.021982	1.115424
455	0.987399	0.693119	0.719164
456	1.112366	0.800249	0.850042
457	0.890580	0.670025	0.797270
458	0.590460	0.522670	0.615825
459	0.475055	0.420990	0.456359
460	0.525000	0.489579	0.476505
461	0.679896	0.601093	0.591739
462	0.750869	0.543702	0.610780
463	0.706720	0.469016	0.533977
464	0.575334	0.549631	0.503488
465	0.601007	0.583196	0.471307
466	0.619246	0.567862	0.510924
467	0.527697	0.520855	0.464842
468	0.499883	0.459950	0.422356
469	0.559126	0.525522	0.492340
470	0.518020	0.455708	0.465432
471	0.481170	0.447343	0.417921
472	0.474060	0.501979	0.449445
473	0.542503	0.657905	0.623882
474	0.492926	0.616021	0.543784
475	0.446742	0.862225	0.498550
476	0.503534	1.050008	0.648339
477	0.553036	0.872210	0.783420
478	0.557267	0.853922	0.745859
479	0.511218	0.700001	0.596929
480	0.544950	0.831714	0.891662
481	0.661487	0.975180	0.890082
482	0.622814	0.869345	0.725889
483	0.577788	0.653259	0.693296
484	0.692434	0.781904	0.890355
485	0.751967	0.761768	0.784077
486	0.747471	0.680827	0.720073
487	0.836107	0.745215	0.790870



488	0.741692	0.700524	0.711594
489	0.663974	0.607737	0.585817
490	0.783762	0.723988	0.737136
491	0.880331	0.865818	0.822609
492	0.809373	0.738695	0.609537
493	0.937975	0.890888	0.796271
494	0.718527	0.725586	0.595754
495	0.538656	0.613999	0.508390
496	0.738576	0.675138	0.605977
497	0.717810	0.750004	0.693809
498	0.508152	0.634409	0.585643
499	0.592407	0.595927	0.584819
500	0.673386	0.634989	0.648231
501	0.756431	0.671859	0.846344
502	0.685381	0.601621	0.823438
503	0.670172	0.692024	0.706203
504	0.915607	0.829055	0.884390
505	1.104515	0.964894	1.244438
506	1.073200	0.838655	1.375214
507	0.942042	0.774145	1.202016
508	1.075887	0.827532	1.040103
509	0.824118	0.748759	0.948202
510	0.656415	0.715621	0.792599
511	0.666722	0.757150	0.693014
512	0.959506	0.889862	0.980022
513	0.740117	0.791488	0.796601
514	0.703544	0.783396	0.728653
515	0.580449	0.718779	0.648896
516	0.678225	0.739325	0.627967
517	0.705917	0.688604	0.668364
518	0.600308	0.689276	0.614006
519	0.624519	0.606067	0.642756
520	0.909503	0.669767	0.941294
521	0.714351	0.610627	0.692785
522	0.580543	0.571648	0.596884
523	0.591218	0.624573	0.602286
524	0.567024	0.534315	0.558257
525	0.433282	0.462784	0.460859
526	0.399873	0.483072	0.436156
527	0.431971	0.468828	0.423477
528	0.395322	0.404659	0.405928
529	0.348790	0.384421	0.394774
530	0.422675	0.415908	0.375070
531	0.499678	0.509984	0.413001



532	0.503666	0.609451	0.442914
533	0.468752	0.539248	0.429018
534	0.450654	0.490621	0.475530
535	0.429875	0.563857	0.568734
536	0.471369	0.612465	0.455465
537	0.610356	0.618200	0.579650
538	0.564155	0.522266	0.540951
539	0.462898	0.429486	0.532033
540	0.469157	0.484264	0.519420
541	0.557519	0.530758	0.574502
542	0.608157	0.492508	0.691060
543	0.550787	0.483319	0.653844
544	0.525994	0.430513	0.580629
545	0.551112	0.438781	0.585962
546	0.608451	0.530407	0.601807
547	0.608671	0.460529	0.510922
548	0.543739	0.519149	0.518210
549	0.436543	0.405757	0.618507
550	0.405137	0.381519	0.688935
551	0.448510	0.403757	0.656148
552	0.441392	0.480417	0.828620
553	0.551567	0.469089	0.873262
554	0.588835	0.435574	0.836955
555	0.703925	0.440161	0.978871
556	0.522384	0.391070	1.031385
557	0.546205	0.401962	0.917159
558	0.468017	0.442279	0.649373
559	0.482990	0.410029	0.768091
560	0.422001	0.437927	0.605544
561	0.479241	0.479592	0.567215
562	0.530899	0.526754	0.564388
563	0.546083	0.553729	0.626176
564	0.592156	0.616172	0.657824
565	0.613481	0.633468	0.695012
566	0.693188	0.688221	0.840780
567	0.803465	0.748699	1.041592
568	0.864496	0.816606	0.946459
569	0.814859	0.805479	0.855445
570	1.146517	1.141926	1.018766
571	1.676671	1.496162	1.051470
572	1.116960	1.143649	0.776809
573	0.998380	1.023748	0.767642
574	0.901521	0.904597	0.722869
575	0.798230	0.936325	0.774029



576	0.812100	0.918430	0.682947
577	0.709628	0.742116	0.601030
578	0.609467	0.630910	0.650642
579	0.597033	0.666365	0.661198
580	0.571658	0.535510	0.620232
581	0.514126	0.533289	0.531644
582	0.568357	0.557619	0.507941
583	0.615706	0.665240	0.531675
584	0.575462	0.682824	0.757025
585	0.562976	0.713413	0.857484
586	0.496443	0.601610	0.698446
587	0.603569	0.561960	0.732423
588	0.806309	0.612037	0.884029
589	0.613592	0.674039	0.880194
590	0.490264	0.572279	0.795267
591	0.547224	0.608987	0.837865
592	0.653999	0.707172	0.890272
593	0.523928	0.601214	0.812782
594	0.618311	0.562557	0.821114
595	0.639421	0.765494	0.771829
596	0.573385	0.680364	0.679006
597	0.647171	0.583849	0.542547
598	0.671617	0.837579	0.602085
599	0.643650	0.847375	0.619386
600	0.875524	1.232873	0.671275
601	1.298874	1.250597	1.087172
602	1.532127	1.578109	1.668491
603	1.453256	1.296987	1.089062
604	1.039053	0.775253	0.802575
605	0.688974	0.599128	0.527234
606	0.746912	0.599867	0.513078
607	0.619909	0.656174	0.506709
608	0.643177	0.736864	0.615652
609	0.838574	0.655359	0.675293
610	1.175694	0.770288	0.852982
611	1.325387	1.285479	1.083867
612	1.199736	0.971912	0.973157
613	1.277664	1.149905	0.926171
614	1.005897	1.047724	1.054183
615	0.965209	1.197647	1.053102
616	1.393857	1.387432	1.507759
617	1.164392	1.085959	1.094375
618	1.162385	0.953006	1.116456
619	0.905319	0.761592	0.866283

620	0.778650	0.824761	0.840648
621	0.901085	0.893596	0.918361
622	0.811738	0.770410	0.812215
623	0.586067	0.593016	0.636938
624	0.625873	0.740203	0.605760
625	0.692567	0.803967	0.728970
626	0.615889	0.662447	0.701171
627	0.499461	0.546361	0.506723
628	0.572729	0.610670	0.535623
629	0.605447	0.617621	0.583127
630	0.512614	0.631228	0.522423
631	0.537174	0.578318	0.498598
632	0.709716	0.631119	0.602762
633	0.690374	0.640149	0.598304
634	0.636982	0.566693	0.597561
635	0.722478	0.553215	0.619925
636	0.705497	0.635960	0.644915
637	0.727456	0.623091	0.686886
638	0.610853	0.579292	0.672429
639	0.819566	0.757635	1.028819
640	1.043677	0.916318	1.273991
641	0.949599	0.796717	0.959817
642	0.838702	0.748292	0.903637
643	1.150444	0.992053	1.317943
644	1.118827	1.087343	1.482395
645	0.867264	0.797927	1.660340
646	0.974431	0.811310	1.973848
647	0.693003	0.581170	1.239180
648	0.659887	0.582924	0.998927
649	0.575122	0.454458	0.679419
650	0.530833	0.562308	0.570943
651	0.503119	0.533079	0.558586
652	0.478685	0.524587	0.524333
653	0.590070	0.533591	0.568214
654	0.655560	0.606446	0.622484
655	0.707143	0.688801	0.703319
656	0.605230	0.805615	0.727978
657	0.530135	0.854667	0.608923
658	0.515676	0.766237	0.463207
659	0.459685	0.707675	0.432552
660	0.515200	1.099425	0.911235
661	0.638134	0.819490	0.768321
662	0.583969	1.420444	0.651265

Residu pada sisi ikatan *pocket*Residu asam amino sisi Fe³⁺

Val418
Phe352
Ile593
Ser594

His360
His365
His453
His540

