



TESIS — SB185401

***SIMULASI DINAMIKA MOLEKULER SENYAWA
TRISINDOLINA TERHADAP MEKANISME ANTIKANKER
MELALUI JALUR APOPTOSIS***

**ANDIS RIHANDOKO
01311850010002**

**DOSEN PEMBIMBING:
Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, M.Si.
Dr. Sc. Arif Fadlan, S.Si., M.Si.**

**PROGRAM MAGISTER
BIDANG KEAHLIAN BIOTEKNOLOGI
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2020**



TESIS — SB185401

**SIMULASI DINAMIKA MOLEKULER SENYAWA
TRISINDOLINA TERHADAP MEKANISME
ANTIKANKER MELALUI JALUR APOPTOSIS**

ANDIS RIHANDOKO

01311850010002

DOSEN PEMBIMBING:

Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, M.Si.

Dr. Sc. Arif Fadlan, S.Si., M.Si.

PROGRAM MAGISTER

BIDANG KEAHLIAN BIOTEKNOLOGI

DEPARTEMEN BIOLOGI

FAKULTAS SAINS DAN ANALITIKA DATA

INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER

SURABAYA

2020



THESIS — SB185401

**MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS OF
TRISINDOLINE COMPOUNDS ON ANTICANCER
MECHANISM THROUGH THE APOPTOSIS PATHWAY**

ANDIS RIHANDOKO

01311850010002

SUPERVISOR:

Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, M.Si.

Dr. Sc. Arif Fadlan, S.Si., M.Si.

PROGRAMME OF MAGISTER

BIDANG KEAHLIAN BIOTEKNOLOGI

DEPARTEMENT OF BIOLOGY

FACULTY OF SCIENCE AND DATA ANALYSIS

INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER

SURABAYA

2020

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

Tesis disusun untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar

Magister Sains (M.Si.)

di

Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh:

ANDIS RIHANDOKO

NRP: 01311850010002

Tanggal Ujian: 28 Juli 2020

Periode Wisuda: September 2020


Disetujui oleh:

Pembimbing:

1. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, M.Si.
NIP. 19700621 199802 2 001

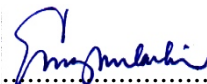

.....

2. Dr.Sc. Arif Fadlan, S.Si., M.Si.
NIP. 19810809 200812 1 001


.....

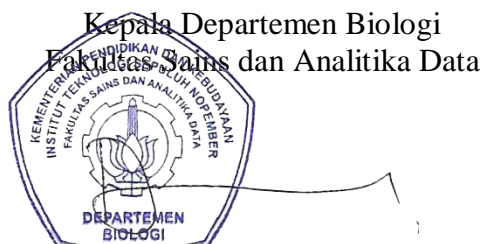
Penguji:

1. Dr. Enny Zulaika. MP.
NIP. 19600109 198803 2 001


.....

2. Dr.rer.nat. Edwin Setiawan, S.Si., M.Sc.
NIP.19771224 200801 1 006


.....



Dr. Dewi Hidayati, S.Si., M.Si

NIP. 19691121 199802 2 001

**SIMULASI DINAMIKA MOLEKULER SENYAWA TRISINDOLINA
TERHADAP MEKANISME ANTIKANKER MELALUI JALUR
APOPTOSIS**

Nama Mahasiswa : Andis Rihandoko
NRP : 01311850010002
Dosen Pembimbing : Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si.
Dr. Sc. Arif Fadlan, S.Si., M.Si.

ABSTRAK

Kanker merupakan salah satu penyebab kematian tertinggi di dunia. Salah satu penyebab umum kanker adalah akibat dari terganggunya proses apoptosis pada jalur instrinsik maupun ekstrinsik yang umumnya juga mematikan sel normal. Berdasarkan hal tersebut maka penelitian obat kanker melalui jalur apoptosis diperlukan untuk meminimalkan efek samping terhadap organ atau sel yang normal. Salah satu kandidat obat antikanker yang sedang dikembangkan adalah Trisindolina. Berdasarkan hal tersebut maka penelitian ini dimaksudkan untuk melakukan uji pendahuluan mekanisme antikanker dari empat senyawa Trisindolina (Trisindolina 1,2,3 dan 4) melalui jalur apoptosis secara in-silico menggunakan metode docking molecular dengan perangkat lunak Autodock Vina yang dilanjutkan dengan metode Molecular Dynamics (MD) Simulation dengan metode QM/MM dengan AMBER. Protein target yang digunakan adalah cdk2, p53 dan caspase-9. Nilai binding affinity dari molecular docking tertinggi antara protein target Cdk-2 dengan ligan Trisindolina 1, sebesar -7.3 kcal/mol, 2 sebesar -7.0 kcal/mol, 3 sebesar -7.7 kcal/mol dan 4 sebesar -6.6 kcal/mol. p-53 dengan ligan Trisindolina 1, sebesar -7.5 kcal/mol, 2 sebesar -7.9 kcal/mol, 3 sebesar -7.4 kcal/mol dan 4 sebesar -7.5 kcal/mol. caspase-9 dengan ligan Trisindolina 1 dan 2 sebesar -7.5 kcal/mol, 3 sebesar -7.1 kcal/mol dan 4 sebesar -7.2 kcal/mol. Hasil dari RMSD, RMSF, dan ikatan hidrogen pada Molecular Dynamics (MD) Simulation menunjukkan protein Cdk-2 membentuk kompleks protein paling stabil dengan Trisindolina 3, p-53 dengan Trisindolina 1 dan Caspase 9 dengan Trisindolina 1. Sehingga, ligan yang berpotensi untuk menjadi antikanker adalah Trisindolina 1 dan Trisindolina 3

Kata kunci : caspase-9, cdk2, MD Simulation, p53, Trisindolina

**MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS OF TRISINDOLINE
COMPOUNDS ON ANTICANCER MECHANISM THROUGH THE
APOPTOSIS PATHWAY**

Name : Andis Rihandoko
Student Identity Number : 01311850010002
Supervisor : Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si.
Dr. Sc. Arif Fadlan, S.Si., M.Si.

ABSTRACT

Cancer is one of the highest causes of death in the world. One of the most common causes of cancer is the disruption of the apoptosis process in the intrinsic and extrinsic pathways which generally also kill normal cells cancer drug research through apoptosis is needed to minimize side effects on normal organs or cells. One of the candidates for anticancer drugs that is being developed is trisindoline. Based on that problem, this research is intended to conduct a preliminary test of the anticancer mechanism of four trisindoline compounds (trisindoline 1,2,3 and 4) through the apoptosis pathway in silico using the docking molecular method with Autodock Vina software followed by the Molecular Dynamics method (Molecular Dynamics method) MD) Simulation using the QM / MM method with AMBER. The target proteins used are cdk2, p53 and caspase-9. The binding affinity value of the highest molecular docking between the target protein Cdk-2 with ligand Trisindolina 1 is -7.3 kcal / mol, 2 is -7.0 kcal / mol, 3 is -7.7 kcal / mol and 4 is -6.6 kcal / mol. p-53 with Trisindolina 1 ligand, amounting to -7.5 kcal / mol, 2 of -7.9 kcal / mol, 3 of -7.4 kcal / mol and 4 of -7.5 kcal / mol. caspase-9 with Trisindolina 1 and 2 ligands of -7.5 kcal / mol, 3 of -7.1 kcal / mol and 4 of -7.2 kcal / mol. The results of RMSD, RMSF, and hydrogen bonding on Molecular Dynamics (MD) Simulation showed that Cdk-2 protein formed the most stable protein complex with Trisindolina 3, p-53 with Trisindolina 1 and Caspase 9 with Trisindolina 1. Thus, ligands that have the potential to become anti-cancer are Trisindolina 1 and Trisindolina 3

Keywords: caspase-9, cdk2, MD Simulation, p53, Trisindolina

KATA PENGANTAR

Puji syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan Thesis dengan judul **Simulasi Dinamika Molekuler Senyawa Trisindolina terhadap Mekanisme Antikanker melalui Jalur Apoptosis**. Penyusunan Thesis ini merupakan salah satu syarat kelulusan S2 tahap Magister Departemen Biologi, Fakultas Sains, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya

Penyusunan Thesis ini tidak lepas dari bimbingan berbagai pihak, sehingga penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Allah Subhanahu wa Ta'ala; Ibu Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, M. Si. dan Bapak Dr. Sc. Arif Fadlan, S.Si., M.Si. selaku dosen pembimbing; Ibu Dr. Enny Zulaika, M. P. selaku dosen penguji I; dan Bapak Dr. rer. nat. Edwin Setiawan, M. Sc. selaku dosen penguji II; serta kepada Assistant Professor, Thanyada Rungrotmongkol, Ph.D. yang telah bersedia menjadi konsultan dan memberikan ijin menggunakan server di *Structural and Computational Biology Research, Departement of Biochemistry, Chulalongkorn University*. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada kedua orangtua saya, saudara, dan teman-teman seperjuangan menempuh program S2 angkatan 2018 yang telah memberikan dukungan baik moril maupun materil.

Penulis menyadari bahwa penulisan Thesis ini masih memiliki banyak kekurangan. Oleh sebab itu, penulis terbuka atas segala kritik dan saran yang membangun untuk menyempurnakan di masa yang akan datang. besar harapan penulis agar laporan ini dapat bermanfaat.

Surabaya, Juli 2020

Penulis

DAFTAR ISI

halaman

| | |
|--|------|
| HALAMAN JUDUL | ii |
| HALAMAN PENGESAHAN | iv |
| ABSTRAK | v |
| ABSTRACT | vi |
| KATA PENGANTAR | vii |
| DAFTAR ISI | ix |
| DAFTAR GAMBAR | xi |
| DAFTAR TABEL | xiii |
| BAB I PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1. Latar Belakang | 1 |
| 1.2. Rumusan Permasalahan | 3 |
| 1.3. Tujuan | 4 |
| 1.4. Batasan Masalah | 4 |
| 1.5. Manfaat | 4 |
| BAB II KAJIAN PUSTAKA | 5 |
| 2.1. <i>Molecular Docking</i> dan <i>Molecular Dynamics Simulation</i> | 5 |
| 2.2. Siklus Sel | 8 |
| 2.2.1. Fase siklus sel | 9 |
| 2.2.2. Apoptosis | 11 |
| 2.2.3. Cyclin-dependent kinase | 14 |
| 2.2.4. Tumor Protein | 17 |
| 2.2.5. Caspase | 19 |
| 2.3. Kanker | 21 |
| 2.4. Trisindolina | 23 |
| BAB III METODE PENELITIAN | 25 |
| 3.1. Waktu dan Tempat Pelaksanaan | 25 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2. Metode Penelitian | 25 |
| 3.2.1. Preparasi protein | 25 |
| 3.2.2. Preparasi ligan | 25 |
| 3.2.3. <i>Molecular Docking</i> | 25 |
| 3.2.4. <i>Molecular Dynamics Simulation</i> | 26 |
| 3.2.5. Perhitungan dan visualisasi hasil simulasi | 26 |
| 3.3. Rancangan Penelitian dan Analisa Data | 27 |
| BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN | 31 |
| 4.1. Hasil dan Visualisasi <i>Molecular Docking</i> | 31 |
| 4.1.1. Visualisasi <i>moleculer docking</i> senyawa Trisindolina dengan Cdk-2 | 33 |
| 4.1.2. Visualisasi <i>moleculer docking</i> senyawa Trisindolina dengan p-53 . | 35 |
| 4.1.3. Visualisasi <i>moleculer docking</i> senyawa Trisindolina dengan caspase-9 | 38 |
| 4.2. Hasil <i>Molecular Dynamics Simulation</i> | 40 |
| 4.2.1. <i>Molecular Dynamics Simulation</i> kompleks protein Cdk-2 | 41 |
| 4.2.2. <i>Molecular Dynamics Simulation</i> kompleks protein p-53 | 43 |
| 4.2.3. <i>Molecular Dynamics Simulation</i> kompleks protein Caspase-9 | 46 |
| 4.2.4. Trisindolina Potensial | 47 |
| BAB V KESIMPULAN DAN SARAN | 51 |
| 5.1. Kesimpulan | 51 |
| 5.2. Saran | 51 |
| DAFTAR PUSTAKA | 53 |
| LAMPIRAN | 59 |

DAFTAR GAMBAR

| | halaman |
|---|---------|
| Gambar 2.1. Ilustrasi Penambatan Molekul | 7 |
| Gambar 2.2. Fase-Siklus Sel | 10 |
| Gambar 2.3. Jalur apoptosis melalui jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik | 13 |
| Gambar 2.4. Jenis-jenis Cyclin dan CDK pada Siklus Sel. | 15 |
| Gambar 2.5. Degradasi Cylin | 16 |
| Gambar 2.6. Aktivasi dan Inaktivasi <i>Cyclin</i> | 17 |
| Gambar 2.7. Urutan spesifik (<i>sequence-specific</i>) protein p53 | 18 |
| Gambar 2.8. Diagram caspase-9 pada manusia..... | 20 |
| Gambar 2.9. Respons terhadap Aktivasi dan Fosforilasi p53 | 22 |
| Gambar 2.10. Struktur dasar senyawa kimia Trisindolina | 23 |
| Gambar 2.11. Struktur kimia senyawa Trisindolina 1, 2, 3, dan 4 | 24 |
| Gambar 3.1. Contoh hasil visualisasi docking dengan software VMD. | 29 |
| Gambar 3.2. Contoh plotting RMSD dari β -CD (abu-abu) dan α -MGS (hitam) | 29 |
| Gambar 4.1. Visualisasi hasil moleculer docking Cdk-2 dengan Trisindolina 1 (a) dan ikatan hidrogen yang terbentuk (b) | 33 |
| Gambar 4.2. Visualisasi hasil moleculer docking Cdk-2 dengan Trisindolina 2 (a) dan ikatan hidrogen yang terbentuk (b) | 34 |
| Gambar 4.3. Visualisasi hasil moleculer docking Cdk-2 dengan Trisindolina 3 (a) dan ikatan hidrogen yang terbentuk (b) | 34 |
| Gambar 4.4. Visualisasi hasil moleculer docking Cdk-2 dengan Trisindolina 4 (a) dan ikatan hidrogen yang terbentuk (b) | 35 |
| Gambar 4.5. Visualisasi hasil moleculer docking p-53 dengan Trisindolina 1 (a) dan ikatan hidrogen yang terbentuk (b) | 36 |
| Gambar 4.6. Visualisasi hasil moleculer docking p-53 dengan Trisindolina 1 (a) dan ikatan hidrogen yang terbentuk (b) | 36 |
| Gambar 4.7. Visualisasi hasil moleculer docking p-53 dengan Trisindolina 3 (a) dan ikatan hidrogen yang terbentuk (b) | 37 |
| Gambar 4.8. Visualisasi hasil moleculer docking p-53 dengan Trisindolina 3 (a) dan ikatan hidrogen yang terbentuk (b) | 37 |

| | |
|--|----|
| Gambar 4.9. Visualisasi hasil molecular docking caspase-9 dengan Trisindolina 1 (a) dan ikatan hidrogen yang terbentuk (b) | 38 |
| Gambar 4.10. Visualisasi hasil molecular docking caspase-9 dengan Trisindolina 2 (a) dan ikatan hidrogen yang terbentuk (b) | 39 |
| Gambar 4.11. Visualisasi hasil molecular docking caspase-9 dengan Trisindolina 3 (a) dan ikatan hidrogen yang terbentuk (b) | 39 |
| Gambar 4.12. Visualisasi hasil molecular docking caspase-9 dengan Trisindolina 4 (a) dan ikatan hidrogen yang terbentuk (b) | 40 |
| Gambar 4.13. RMSD kompleks protein Cdk-2 | 41 |
| Gambar 4.14. RMSF kompleks protein Cdk-2 | 42 |
| Gambar 4.15 Ikatan Hidrogen intermolekuler kompleks protein Cdk-2 dengan trisindolina 3 | 42 |
| Gambar 4.16. RMSD kompleks protein p-53 dengan senyawa trisindolina (tris) | 44 |
| Gambar 4.17. RMSF kompleks protein p-53 | 44 |
| Gambar 4.18 Ikatan Hidrogen intermolekuler kompleks protein p-53 dengan Trisindolina 1 | 45 |
| Gambar 4.19. RMSD kompleks protein Caspase-9 | 46 |
| Gambar 4.20. RMSF kompleks protein Caspase-9 | 46 |
| Gambar 4.21 ikatan Hidrogen intermolekuler kompleks protein Caspase-9 | 47 |
| Gambar 4.22. Jalur apoptosis melalui jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik | 48 |

DAFTAR TABEL

| | halaman |
|---|---------|
| Tabel 2.1. Kompleks <i>cyclin</i> -CDK pada Vertebrata..... | 15 |
| Tabel 3.1. Nilai dari Skor <i>molecular docking</i> | 27 |
| Tabel 4.1. Nilai dari Skor <i>molecular docking cdk2</i> | 31 |
| Tabel 4.2. Nilai dari Skor <i>molecular docking p-53</i> | 32 |
| Tabel 4.3. Nilai dari Skor <i>molecular docking caspase 9</i> | 32 |

BAB I

PENDAHULUAN

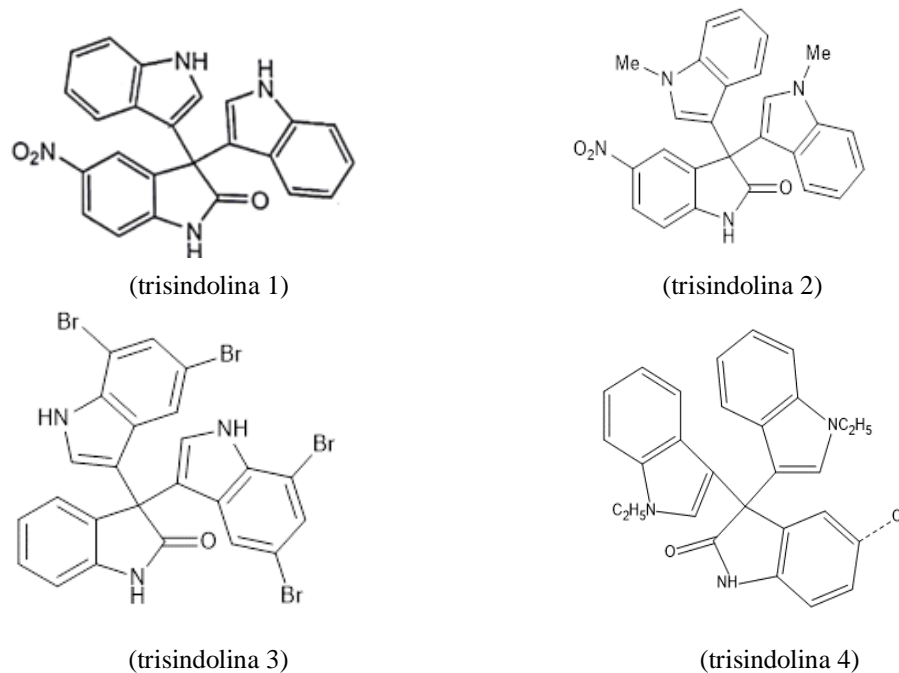
1.1. Latar Belakang

World Health Organization (WHO) melaporkan bahwa kanker merupakan salah satu penyebab kematian tertinggi di dunia dengan jumlah penderita kanker mencapai 18.1 juta kasus pada tahun 2018 dimana 9.6 juta diantaranya meninggal dunia (Bray *et al.*, 2018). Kanker dapat diakibatkan oleh terganggunya proses apoptosis yang dapat terjadi melalui jalur intrinsik dan ekstrinsik, bersifat aktif, membutuhkan energi dan tidak disertai dengan inflamasi (Pollard *et al.*, 2007).

Jalur ekstrinsik dalam apoptosis terjadi melalui induksi gen yang mengkode protein transmembran, yaitu: Tumor Necrosis Factor receptor (TNF) dan Fas. Protein ini akan mengaktifkan sinyal transduser yang akan mengaktifkan caspase. p53 menginduksi protein Fas melalui ikatan elemen pada promotor dan intron, sedangkan p53 akan mengaktifkan TNF dalam merespon kerusakan DNA dan melalui kompleks caspase yang akan memicu kematian sel. Sedangkan jalur intrinsik terjadi melalui protein pro-apoptosis, salah satunya *cyclin-dependent kinase 2* (CDK2) memicu pengeluaran sitokrom C dari mitokondria dan akan mengaktifkan caspase 9 yang berperan sebagai inhibitor apoptosis (Khan, Blanco- Codesido dan Molife, 2014).

Pengembangan obat-obatan anti kanker dapat dilakukan dengan memanfaatkan jalur intrinsik maupun ekstrinsik pada apoptosis. Obat kanker umumnya berfungsi menghambat proliferasi sel tanpa mematikan sel normal dan bersifat *multi drug resistance* (MDR) atau tahan terhadap berbagai obat kanker (Mansoori *et al.*, 2017). Riset untuk mendapatkan kandidat obat antikanker sangat diperlukan untuk menjawab permasalahan tersebut. Salah satu kandidat obat antikanker yang sedang dikembangkan adalah Trisindolina. Trisindolina pertama kali diperoleh dari bakteri *Vibrio* sp. yang bersimbiosis dengan spons laut *Hertius altum* di perairan Okinawa, Jepang.

Trisindolina telah banyak dikembangkan dalam penelitian anti kanker terbaru karena keberhasilan metode sintesis serta tingginya potensi sitotoksitasnya. Santoso & Mursyidah (2010) mensintesis senyawa Trisindolina menjadi 4 (gambar 1.1.).



Gambar 1.1. Senyawa Trisindolina 1, 2, 3, dan 4

Uji sitotoksik Trisindolina 1, 2, 3, dan 4 terhadap MCF *cell line*, menunjukkan aktifitas sitotoksik dari Trisindolina 1 yang yaitu 2,059 μM ; 0, 3,9759 μM , dan 15,46 μM (Nurhayati *et al*, 2017). aktivitas terhadap sel kanker liver HepG2 dengan IC₅₀ 20,3 μM , sel kanker paru A549 dengan IC₅₀ 8,6 μM , sel kanker otak SK-N-SH dengan IC₅₀ 11,3 μM , sel kanker payudara MCF-7 dengan IC₅₀ 49,8 μM , sel kanker prostat DU-145 dengan IC₅₀ 8,7 μM (Kamal, 2010). Pada sel kanker uterus memberikan nilai IC₅₀ sebesar 3,51 μM ; sel kanker kolon 6,63 μM (Yoo *et al.*, 2008), sel kanker payudara MCF-7 IC₅₀ 2,059 μM (Nurhayati *et al.*, 2017).

Pengujian Trisindolina secara *in vitro* membutuhkan waktu dan biaya yang besar. Biologi komputasi dan bioinformatika merupakan metode baru yang mampu mengurangi kelemahan ini. Metode ini berpotensi untuk mempermudah proses penemuan obat menggunakan metode yang bervariasi untuk identifikasi komponen

obat. Salah satu metode yang digunakan adalah docking molekul obat dengan reseptor (target), dimana dua molekul dicocokkan dengan memperhatikan sifat keduanya melalui penambatan dalam ruang 3D (Lyskov *et al.*, 2008; Jensen, 2007; Sri *et al.*, 2011). Penambatan ini dapat memperlihatkan area *binding site* antara residu-residu asam amino yang berperan penting pada pengikatan dengan obat atau ligan yang dapat menimbulkan respon yang diwakili oleh nilai *binding affinity* (Arwansyah *et al.*, 2014). Pada penelitian sebelumnya oleh Sukma (2019) menunjukkan bahwa *binding affinity* p53 yang termutasi pada residu 273 dengan Trisindolina 1, Trisindolina 2, Trisindolina 3, dan Trisindolina 4 berturut-turut adalah -5,5; -8,3; -9,0; -8,1; dan -8,1 *kcal/mol*. Hasil yang diperoleh masih berupa molekul statik sehingga perlu dilanjutkan dengan metode Simulasi Dinamika Molekuler atau *Molecular Dynamics (MD) Simulation* yang menggambarkan kondisi dimana suhu, tekanan dan pelarut sesuai dengan sistem biologis di dalam tubuh manusia.

Salah satu metode MD adalah metode *Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM)* dengan menggunakan perangkat lunak *Assisted Model Building with Energy Refinement (AMBER)*. Metode hybrid mekanika kuantum - mekanika molekuler (QM/MM) adalah metode simulasi molekuler yang menggabungkan pendekatan QM (akurasi) dan MM (kecepatan), sehingga dimungkinkan untuk mempelajari proses kimia dalam suatu reaksi kimia dalam suatu sistem. Metode Konvensional ("pencampuran energi") QM/MM (convQM/MM) mendefinisikan fungsi energi total untuk seluruh sistem yang terdiri dari tiga komponen, antara lain a) energi dari model QM diterapkan pada atom pada suatu area, b) model MM energi diterapkan pada atom yang memiliki kecepatan, dan c) adanya interaksi energi antara keduanya (Case *et al.*, 2018).

1.2. Rumusan Permasalahan

Obat-obatan antikanker dapat dikembangkan melalui jalur apoptosis secara intrinsik maupun ekstrinsik. Trisindolina merupakan salah satu kandidat obat yang sedang dikembangkan untuk tujuan ini. Trisindolina dilaporkan mempunyai aktivitas sitotoksik yang luas terhadap berbagai sel kanker, misalnya MCF, Hep62, A549, SK-N-SH, MCF-7, DU-145, HCT15, dan MES-SA. Akan

tetapi pengujian secara *in vitro* membutuhkan waktu dan biaya yang besar. Pada penelitian ini, untuk mempersingkat waktu pengujian dan menekan biaya pengujian secara *in vitro*, maka akan digunakan metode komputasi biologi. Metode ini menggunakan penambatan molekul obat pada reseptor protein secara 3D dengan memperhatikan area binding site. Penambatan ini masih menghasilkan molekul statik dalam area reseptor protein. Sehingga pada penelitian ini akan dilakukan metode simulasi dinamika molekuler (MD Simulation) yang dapat menggambarkan kondisi sebagaimana sistem biologis tubuh manusia. MD Simulation Trisindolina akan dilakukan dengan metode QM/MM dengan perangkat lunak AMBER pada protein target cdk2, p53 dan caspase-9.

1.3. Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan simulasi dinamika molekuler Trisindolina pada protein target cdk2, p53 dan caspase-9 menggunakan metode QM/MM dengan perangkat lunak AMBER.

1.4. Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Senyawa Trisindolina yang digunakan terdiri dari empat jenis senyawa turunan Trisindolina yaitu Trisindolina 1, Trisindolina 2, Trisindolina 3, dan Trisindolina 4
- b. Protein target yang digunakan adalah *cdk2*, *p53* dan *caspase-9*
- c. Proses *Molecular Docking* menggunakan perangkat lunak Autodock Vina dengan pengulangan 100x
- d. Proses *Molecular Dynamics Simulations* dilakukan dengan perangkat lunak AMBER selama 20ns

1.5. Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi dan rekomendasi terhadap uji *invitro* Trisindolina 1,2,3 dan 4 melalui jalur apoptosis menggunakan protein target cdk2, p53 dan caspase-9.

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1. Molecular Docking dan Molecular Dynamics Simulation

Proses *docking* melibatkan prediksi konformasi dan orientasi ligan (atau berpose) di dalam situs pengikatan yang ditargetkan. Secara umum, ada dua tujuan studi docking: pemodelan struktural yang akurat dan prediksi aktivitas yang benar dengan mengidentifikasi fitur molekuler yang bertanggung jawab untuk pengakuan biologis spesifik, atau prediksi modifikasi senyawa yang meningkatkan potensi. Perhitungan docking telah diterapkan dalam penelitian farmasi selama hampir dua dekade. Pendekatan komputasi yang 'memasukkan' molekul kecil ke dalam struktur target makromolekul dan 'memberi skor' komplementaritas potensial mereka ke situs pengikatan banyak digunakan dalam identifikasi hit dan optimalisasi timbal. Ada sejumlah obat yang perkembangannya sangat dipengaruhi oleh/atau berbasis tentang desain dan strategi penyaringan berbasis struktur (Balunas dan Kinghorn, 2005)

Molecular docking adalah proses dimana dua molekul dicocokkan antara ligan yang merupakan molekul kecil ke dalam reseptor yang merupakan molekul protein yang besar dengan memperhatikan sifat keduanya, melalui penambatan dalam ruang 3D (Jensen, 2007; Sri, *et al.*, 2011). *Molecular docking* banyak digunakan untuk memberikan gambaran tentang interaksi, ikatan, maupun afinitas suatu ligan (obat) dengan reseptornya, maupun enzim dengan substrat atau inhibitorynya. Interaksi ligan dan protein dalam *molecular docking* dapat terjadi apabila terdapat kecocokan bentuk dan volume di antara molekul ligan dan situs tambat (*binding site*) protein tersebut (Motiejunas & Wade, 2006). Selain itu, gugus-gugus fungsional pada molekul ligan harus berada pada posisi yang memadai dari asam-asam amino yang menjadi pasangannya pada *binding site* tersebut (Schneider & Baringhaus, 2008). Selanjutnya, *binding site* dari reseptor yang telah mengikat ligan dengan spesifitas yang tinggi akan memicu proses biokimia di dalam sel yang akhirnya menimbulkan efek (Ikawati, 2016).

Ikatan antara reseptor dengan ligan tersebut akan meneruskan sinyal ke dalam sel melalui beberapa cara yaitu:

1. Perubahan permeabilitas membran

Adanya ikatan ligan dengan reseptor dapat menyebabkan membran menjadi lebih permeabel dengan adanya pembukaan kanal tertentu sehingga ion-ion tertentu dapat mengalir melintasi membran (Ikawati, 2016).

2. Pembentukan *second messenger*

Ikatan obat dengan ligan akan memicu rangkaian peristiwa biokimia yang menghasilkan berbagai molekul intrasel (*second messenger*) yang berperan dalam penghantaran sinyal (Ikawati, 2016).

3. Mempengaruhi transkripsi gen

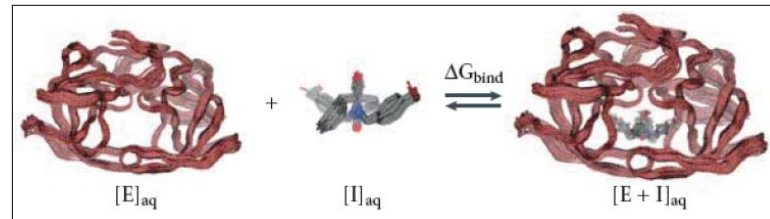
Ikatan ligan dengan reseptor dapat mempengaruhi transkripsi gen, baik secara langsung maupun tidak langsung sehingga dapat menentukan macam protein yang disintesis yang memberi efek farmakologis tertentu (Ikawati, 2016).

Molecular docking dapat digunakan untuk memprediksi apakah suatu senyawa memiliki aktivitas atau tidak, serta dapat berguna dalam pengembangan senyawa dengan aktivitas yang lebih baik. Pengembangan tersebut diantaranya mencakup desain senyawa dan interaksi senyawa tersebut dengan enzim atau reseptor (Agistia *et al.*, 2013). *Docking* molekuler bermanfaat karena digunakan untuk penemuan obat dimana satu target protein dapat memungkinkan untuk diteliti dengan jutaan obat. Keuntungan *docking* adalah menghemat waktu, biaya, dan dapat digunakan untuk memprediksi aktivitas senyawa untuk pengobatan (Knapp, 2012).

Program *docking* terdiri atas dua bagian yaitu *docking algorithms* dan *scoring function*. *Docking algorithms* berfungsi untuk mencari orientasi/konformasi ligan dan reseptor sehingga didapatkan konformasi yang paling stabil. Gugus fungsional ligan akan berinteraksi dengan residu asam amino reseptor dan membentuk ikatan. Ikatan ini akan dihitung dan diranking dengan *scoring function* (Tegar & Purnomo, 2013).

Docking terdiri atas dua jenis yaitu *blind docking* dan *oriented docking*. *Blind docking* merupakan proses *docking* tanpa mengetahui sisi aktif enzim

kemudian pada *grid box* yang ditentukan tidak spesifik tetapi diaplikasikan ke area enzim. *Oriented docking* merupakan jenis *docking* dengan target sisi aktif enzim dan *grid box* yang ditentukan spesifik. Parameter *grid box* dibutuhkan untuk mendeskripsikan area proses *docking* (Tambunan *et al.*, 2011).



Gambar 2.1. Ilustrasi Penambatan Molekul dimana $[E]_{aq}$ merupakan enzim atau protein target sedangkan $[I]_{aq}$ merupakan inhibitor atau ligan (obat) (Knapp, 2012)

Salah satu perangkat lunak yang dapat digunakan dalam metode *molecular docking* adalah AutoDock Vina adalah program open-source untuk melakukan docking molekuler. Itu dirancang dan diimplementasikan oleh Dr. Oleg Trott di Lab. Molecular Graphics di The Scripps Research Institute. Keunggulan dari Autodock Vina dalam melakukan *molecular docking* yaitu cepat dan akurat jika dibandingkan dengan program gratis lainnya (Trott dan Olson 2010).

Hasil yang diperoleh dari *molecular docking* masih berupa bentuk molekul statik sehingga dilanjutkan dengan metode *Molecular Dynamics (MD) Simulation* yang menggambarkan kondisi dimana suhu, tekanan dan pelarut sesuai dengan sistem biologis di dalam tubuh manusia.

Molecular Dynamics (MD) Simulation adalah metode simulasi komputer untuk menganalisis gerakan fisik atom dan molekul. Atom dan molekul yang berinteraksi selama periode waktu tertentu, memberikan gambaran tentang perubahan sistem yang dinamis. Lintasan atom dan molekul ditentukan dengan persamaan gerak Newton secara numerik untuk sistem partikel yang berinteraksi, di mana gaya antara partikel dan energi potensial diperhitungkan menggunakan potensial interatomik atau medan gaya mekanika molekul (Cruz *et al.*, 2006)

Metode hybrid mekanika kuantum-mekanika molekuler (QM/MM) adalah metode simulasi molekuler yang menggabungkan pendekatan QM (akurasi) dan

MM (kecepatan), sehingga dimungkinkan untuk mempelajari proses kimia dalam suatu reaksi kimia dalam suatu sistem. Metode Konvensional ("pencampuran energi") QM/MM (convQM/MM) mendefinisikan fungsi energi total untuk seluruh sistem yang terdiri dari tiga komponen, antara lain:

- a. energi dari model QM diterapkan pada atom pada suatu area
- b. model MM energi diterapkan pada atom yang memiliki kecepatan, dan
- c. adanya interaksi energi antara keduanya

(Case *et al.*, 2018)

Energi pada sebuah sistem dapat dihitung menggunakan persamaan medan gaya mekanika molekuler, kemudian ditambahkan energi sistem QM (dihitung menggunakan metode QM), akhirnya energi MM dari dikurangi sistem QM. Maka

$$E = E^{QM}(QM) + E^{MM}(QM + MM) - E^{MM}(QM)$$

dimana energi wilayah QM yang dihitung menggunakan mekanika molekuler. Dalam persamaan tersebut interaksi antara kedua wilayah hanya akan dipertimbangkan pada teori MM saja. Sehingga pendekatan yang lebih sering digunakan adalah metode aditif yang lebih akurat. Persamaan untuk ini terdiri dari 3 ketentuan:

$$E = E(QM) + E(MM) + E(QM/MM)$$

dimana $E(QM)$ adalah nilai energi QM pada area QM, $E(MM)$ adalah energi pada area MM dan $E(QM/MM)$ interaksi energi antara kedua sistem (Allen, 2017).

2.2.Siklus Sel

Siklus sel merupakan proses perkembangbiakan sel yang memperantarai pertumbuhan dan perkembangan makhluk hidup. Setiap sel baik normal maupun kanker mengalami siklus sel. Siklus sel memiliki dua fase utama, yakni fase S (sintesis) dan fase M (mitosis). Fase S merupakan fase terjadinya replikasi DNA kromosom dalam sel, sedangkan pada fase M terjadi pemisahan 2 set DNA kromosom tersebut menjadi 2 sel (Nurse, 2000). Fase yang membatasi kedua fase utama tersebut yang dinamakan *Gap*. G_1 (*Gap-1*) terdapat sebelum fase S dan setelah fase S dinamakan G_2 (*Gap2*). Pada fase G_1 , sel melakukan persiapan untuk sintesis DNA yang merupakan fase awal siklus sel. Pendana fase ini adalah adanya ekspresi dan sintesis protein sebagai persiapan memasuki fase S. Pada fase G_2 , sel

melakukan sintesis lebih lanjut untuk proses pembelahan pada fase M (Ruddon, 2007).

Siklus sel dikontrol oleh beberapa protein yang bertindak sebagai regulator positif dan negatif. Kelompok *cyclin* bersama dengan kelompok *cyclin dependent kinase* (CDK), bertindak sebagai regulator positif yang memacu terjadinya siklus sel. Namun, Aktivasi CDK dapat dihambat oleh regulator negatif siklus sel, yakni CDK inhibitor (CKI), yang terdiri dari Cip/Kip protein (meliputi p21, p27, p57) dan keluarga INK4 (meliputi p16, p18, p19). Selain itu *tumor suppressor protein* (p53 dan pRb) juga bertindak sebagai protein regulator negatif (Foster, *et al.*, 2001).

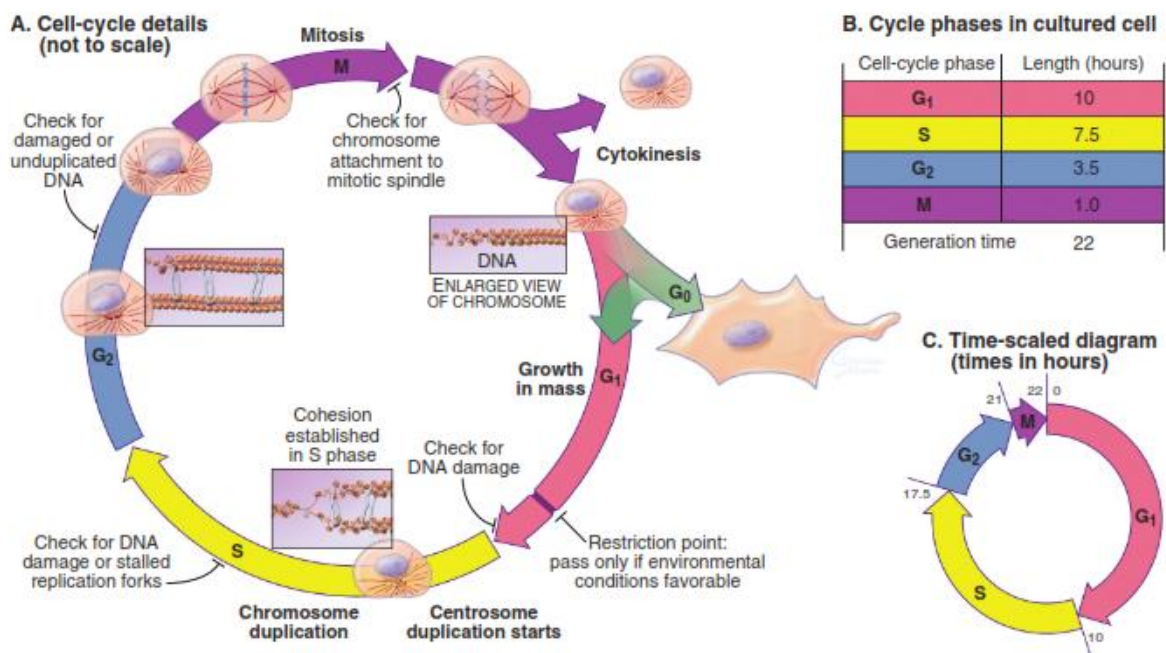
Faktor-faktor yang memicu sel memasuki siklus sel, antara lain: kerusakan pada jaringan, dan kematian sel. Seluruh faktor-faktor tersebut mengakibatkan pelepasan ligan oleh sel-sel *signaling* pada jaringan yang terlibat. Seringkali ligan ini adalah *growth factor* yang secara tidak langsung menginduksi protooncogen, yaitu suatu gen yang berperan dalam mengatur proliferasi sel (Gartner dan Hiatt, 2007).

Ligan yang menginduksi proliferasi berikatan dengan *cell surface receptor protein* dari sel target dan mengaktifasi salah satu jalur transduksi signal. Umumnya, signal terbanyak yang diterima pada permukaan sel adalah protein kinase sitoplasma. Protein ini mengaktifasi serangkaian faktor transkripsi yang mengendalikan ekspresi protooncogenes dan akhirnya menghasilkan pembelahan sel (Gartner dan Hiatt, 2007)

2.2.1. Fase siklus sel

Siklus sel dapat digambarkan sebagai siklus hidup suatu sel (Manson *et al.*, 2006). Siklus ini terjadi pada seluruh jaringan yang memiliki pergantian sel. Siklus sel dibagi menjadi 2 peristiwa besar, yaitu: mitosis (pembelahan sel) dan interphase. Pada fase mitosis yang berlangsung lebih singkat daripada interphase, terjadi pembagian nucleus dan cytoplasma sel. Akibatnya terbentuk 2 sel anak (Manson *et al.*, 2006; Gartner dan Hiatt, 2007). Sementara interphase merupakan interval antara pembelahan selama sel menjalankan fungsinya dan mempersiapkan mitosis (Manson *et al.*, 2006). Karena itu, selain terjadi replikasi materi genetik, ukuran dan isi sel juga bertambah (Gartner dan Hiatt, 2007).

Interphase dibagi menjadi 3 fase, yaitu: fase G₁ (presintesis), S (sintesis DNA) dan G₂ (post duplikasi DNA) (Junqueira dan Carneiro, 2003). Namun sel-sel yang tidak membelah terus menerus (sel neuron dan sel otot), aktivitas sel (sementara ataupun tetap) tidak melalui siklus ini dan tetap dalam fase istirahat, yaitu fase G₀ (Junqueira dan Carneiro 2003; Manson *et al.*, 2006). Tahapan tiap fase dapat dilihat pada gambar 2.1 berikut ini.



Gambar 2.1. Fase-Siklus Sel. A. Diagram morfologi seluler dan struktur kromosom di seluruh siklus sel, B. Panjang fase siklus sel dalam sel yang dikultur. C, skala waktu fase siklus sel (Thomas *et al.*, 2017).

Fase G₁

Pada fase G₁ terjadi tahapan sebagai berikut: Transkripsi RNA, sintesis protein yang bermanfaat untuk memacu pembelahan nucleus, produksi enzim yang diperlukan untuk replikasi DNA, produksi tubulin dan protein yang akan membentuk benang spindle, serta mulai terjadi duplikasi centrioles. Proses duplikasi centrioles ini baru sempurna pada fase G₂. Periode untuk fase G₁ membutuhkan waktu yang berbeda – beda antar individu. Adakalanya G₁ membutuhkan waktu 3 – 4 jam, namun ada juga yang tidak mengalami fase G₁ ini, hal ini terjadi pada beberapa sel ragi. Beberapa ahli lebih suka menggunakan istilah

G0 untuk situasi tersebut. Tahap G1 merupakan selang antara tahapan M dengan S. Pada tahap ini sel terus tumbuh dan melakukan persiapan untuk sintesis DNA.

Sel anak yang terbentuk selama mitosis kemudian akan memasuki fase G1. Untuk sel-sel yang cepat membelah (sel-sel embrionik), G1 berlangsung sangat cepat sedangkan untuk sel-sel lain (fibroblast, spermatogonia prepubertal), fase G1 berlangsung sangat lama sehingga diperkirakan berada dalam fase G0 (Henrikson *et al.*, 1997).

Fase S

Selama fase S (fase sintesis) siklus sel, terjadi sintesis dan replikasi centriole (Junqueira dan Carneiro, 2003) serta duplikasi genome/Kromosom (Gartner dan Hiatt, 2007) sehingga pada akhir dari fase ini terbentuk *sister chromatids* yang memiliki sentromer bersama. Semua yang diperlukan oleh nucleoprotein, termasuk protein histon digabungkan ke dalam molekul DNA, membentuk materi chromatin. Lamanya waktu yang dibutuhkan pada fase ini kurang lebih 7.5 jam (Thomas *et al.*, 2017).

Fase G2

Pada fase G2, mRNA dan protein yang penting untuk pembelahan sel akan disintesis seperti sub unit benang gelendong, pertumbuhan organel – organel dan makromolekul lainnya (mitokondria, ribosom dan lain-lain) (Hardin *et al.*, 2012), terjadi penyimpanan energi yang diperlukan untuk mitosis, sintesis tubulin dalam microtubule yang diperlukan untuk mitosis, replikasi DNA dianalisa dan kesalahan yang terjadi akan diperbaiki (Gartner dan Hiatt, 2007). Fase ini membutuhkan waktu 3.5 jam. Pada tahap G2, sel yang telah mereplikasi kromosom akan menduplikasi keseluruhan komponen seluler lainnya (Hardin *et al.*, 2012).

2.2.2. Apoptosis

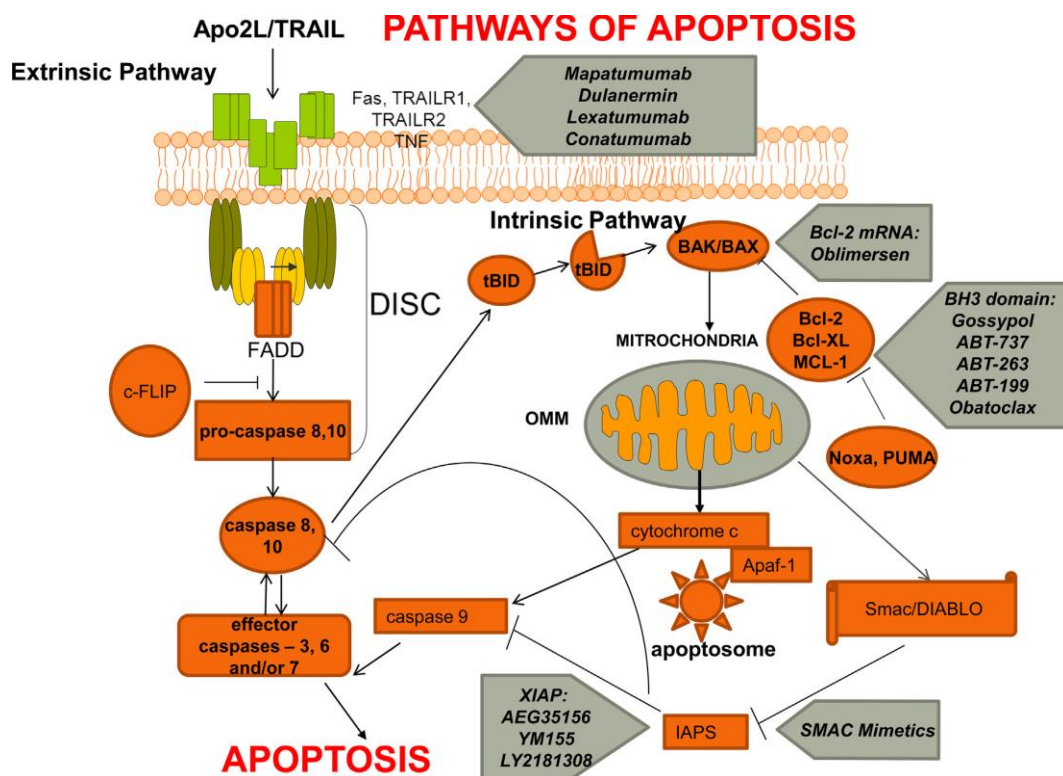
Apoptosis dimediasi oleh dua jalur apoptosis utama, yaitu jalur ekstrinsik dan intrinsik. Apapun jalur aktivasi yang diinduksi, masing-masing jalur tersebut menimbulkan aktivasi protease selektif yang disebut sebagai caspase. Caspase dikenal sebagai eksekutor apoptosis, merupakan cysteine protease selektif yang

mengontrol semua tahap apoptosis. Caspase terdapat di setiap sel sebagai prekursor tidak aktif yang disebut procaspase. Jalur ekstrinsik dikenal sebagai death receptor pathway dan jalur intrinsik sebagai mitochondrial pathway. Jalur ekstrinsik dan intrinsik diaktifkan oleh tumor suppressor protein p53 (Miettinen, 2009). Pada jalur ekstrinsik terjadi aktivasi caspase 8 untuk menginduksi apoptosis, sedangkan pada jalur intrinsik terdapat peran protein mitokondria dalam aktivasi caspase 9 untuk menginduksi apoptosis. Selain itu, protein p53 dapat mengaktifkan Apaf-1 secara langsung untuk menginduksi apoptosis (Maximov, 2008).

p53 merupakan protein supresor tumor yang mampu mengaktifasi apoptosis, melalui dua jalur:

1. Jalur ekstrinsik, melalui induksi gen yang mengkode 3 protein transmembran, yaitu: Tumor Necrosis Factor receptor 1 (TNFR1), Fas, dan Death Receptor-5 (DR-5). Protein ini akan mengaktifkan sinyal transduser yang akan mengaktifkan caspase. p53 menginduksi protein Fas melalui ikatan elemen pada promotor dan intron, sedangkan p53 akan mengaktifkan DR-5 dan TNFR1 dalam merespon kerusakan DNA dan melalui caspase 8 akan memicu kematian sel.
2. Jalur intrinsik, melalui protein pro-apoptosis: Bax, Noxa, Puma, Bid dan protein anti-apoptosis: Bcl-XL, Bcl2 yang berfungsi untuk pengeluaran sitokrom C dari mitokondria (Elmore, 2007).

Mekanisme terjadinya apoptosis ketika terjadi kerusakan DNA adalah induksi pro-apoptosis, dengan membentuk lubang di mitokondria melalui pengeluaran sitokrom C dan protein pro-apoptosis dari permukaan intermembran. Keluarnya sitokrom C dari mitokondria merupakan mekanisme yang penting dalam induksi apoptosis sehingga mampu berinteraksi dengan protein Apoptotic protease activating Factor 1 (Apaf 1). Kompleks multiprotein antara Apaf 1 dan sitokrom C akan membentuk apoptosom. Pembentukan apoptosom akan mengaktifkan caspase 9 dan menginduksi apoptosis (Elmore, 2007)



Gambar 2.2. Jalur apoptosis melalui jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik (Khan, Blanco-Codesido dan Molife, 2014).

Reseptor ekstrinsik pada proses apoptosis adalah Apo2L/TRAIL (gambar 2.2.) berikatan dengan reseptor kematian seperti Fas, *tumor necrosis factor* (TNF) receptor atau TRAIL receptor (TRAILR1, TRAILR2) mengarah pada trimerisasi ke domain kematian (DD) yang mengandung protein adaptor (diwakili oleh protein adaptor) *Fas-related death domain protein* (FADD) dan *procaspases* dengan *death effector domain* (DED), khususnya *procaspase-8* dan *procaspase-10*. Kompleks yang dihasilkan dikenal sebagai *death inducing signaling complex* (DISC). Level tinggi dari *caspase-8* yang aktif akan mengarah pada aktivasi caspases efektor, termasuk *caspase-3*, dan induksi apoptosis. Aktivasi *caspase-8* juga dapat mengakibatkan pembelahan BID ke bentuk terpotongnya (tBID), yang kemudian mempromosikan perakitan oligomer BAK-BAX dan mentransmisikan sinyal kematian dari sinyal ekstrinsik ke intrinsik, memungkinkan konvergensi dari dua jalur pada titik ini. Setelah jalur diaktifkan, BAK dan BAX *homo-oligomerisasi* dan membentuk pori-pori di membran mitokondria luar (OMM), yang mengarah ke

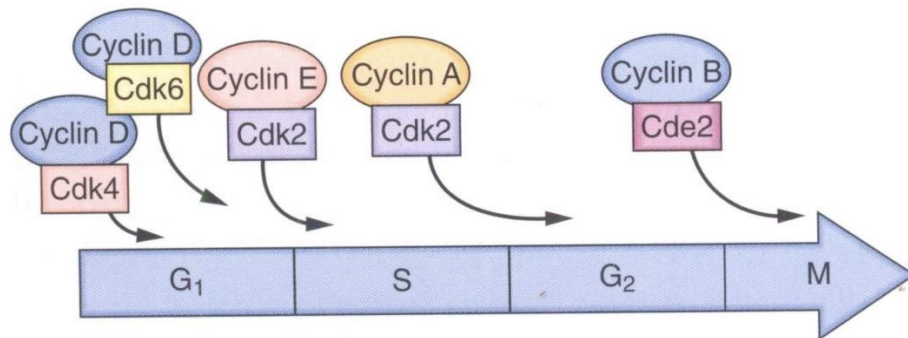
pelepasan sitokrom c dan faktor-faktor apoptogenik lainnya dari mitokondria ke dalam sitosol yang menghasilkan pembentukan apoptosom, yang kemudian pada aktivasi oleh caspase-9, memicu aktivasi kaskade penginduksi apoptosis. Sitokrom c membentuk kompleks dengan APAF-1 dan pro-caspase 9, dengan aktivasi caspase efektor dan kejadian selanjutnya yang memicu apoptosis. Ligan yang menginduksi faktor nekrosis terkait nekrosis (TRAIL / Apo2L), interleukin-1-beta konversi enzim (FLICE) -seperti FADD-protein penghambat (c-FLIP); Reseptor ligan yang menginduksi apoptosis terkait TNF (TRAILR1) terkait; Reseptor ligan yang menginduksi apoptosis terkait TNF (TRAILR2) terkait; Isoform panjang yang berhubungan dengan Bcl-2 (Bcl-XL), MCL-1 (leukemia sel myeloid 1); Smac / DIABLO (aktivator kedua yang diturunkan dari mitokondria / penghambat langsung protein pengikat protein apoptosis dengan lowpI); PUMA (p53 diatur modulator dari apoptosis) (Khan, Blanco-Codesido dan Molife, 2014).

2.2.3. Cyclin-dependent kinase

Kemampuan sel untuk memulai siklus sel tergantung dari adanya protein *cyclin* dan *cyclin-dependent kinase* (CDKs) (Gartner dan Hiatt, 2007). *Cyclin* mengontrol siklus sel dengan mengatur *cyclin dependent kinases* (CDKs). CDKs merupakan treonin atau serin protein kinase yang harus berikatan dengan *cyclin* untuk aktivasinya. Konsentrasi Cdk relatif konstan selama siklus sel berlangsung. Cdk dalam keadaan bebas (tak berikatan) adalah inaktif karena catalytic site, tempat ATP dan substrat berikatan diblok oleh ujung C-terminal dari CKIs. *Cyclin* akan menghilangkan pengeblokan tersebut. CDKs menjadi aktif ketika berikatan dan membentuk kompleks dengan protein *cyclin* (Manson *et al*, 2006). Ketika diaktifkan, Cdk akan memacu proses downstream dengan cara memfosforilasi protein spesifik.

CDKs yang aktif akan menstimulasi siklus sel terus menerus dengan memfosforilasi (dan karena itu mengaktifasi) protein spesifik dalam sel yang diperlukan untuk transisi ke tahap yang selanjutnya. Misalnya: pada awal *prophase* mitosis, pemecahan membran nucleus diinisiasi oleh fosforilasi lamins, yang membentuk bagian dari kerangka nucleus. Demikian pula ketika *chromosome* berkondensasi di awal mitosis akan diinisiasi oleh fosforilasi histon

H1, yaitu suatu *nuclear-associated protein*. Contoh yang lain adalah: perpindahan fase G1 menjadi S diinisiasi oleh fosforilasi Rb protein (pRb) oleh CDKs (pRb yang tidak terfosforilasi berikatan dengan faktor transkripsi E2F). Akibatnya, pRb yang terfosforilasi ini akan melepaskan ikatannya dengan E2F sehingga E2F dapat mengaktifkan gen-gen transkripsi yang diperlukan untuk transisi fase G1 menjadi S (Manson *et al*, 2006).



Gambar 2.3. Jenis-jenis *Cyclin* dan CDK pada Siklus Sel (Goodman, 2008).

Cyclin pada manusia dapat dibagi menjadi *Cyclin A, B, D* dan *E* (gambar 2.3). Masing- masing *cyclin* ini akan berperan dalam siklus sel di tempat-tempat yang berbeda (Manson *et al*, 2006). *Cyclin D* disintesis pada awal fase G₁, berikatan dengan CDK4 dan CDK 6. Di akhir fase G₁, *cyclin E* disintesis dan berikatan dengan CDK2. Setelah terbentuk 3 kompleks dari ikatan tersebut, sel dapat memasuki fase S (Gartner dan Hiatt, 2007).

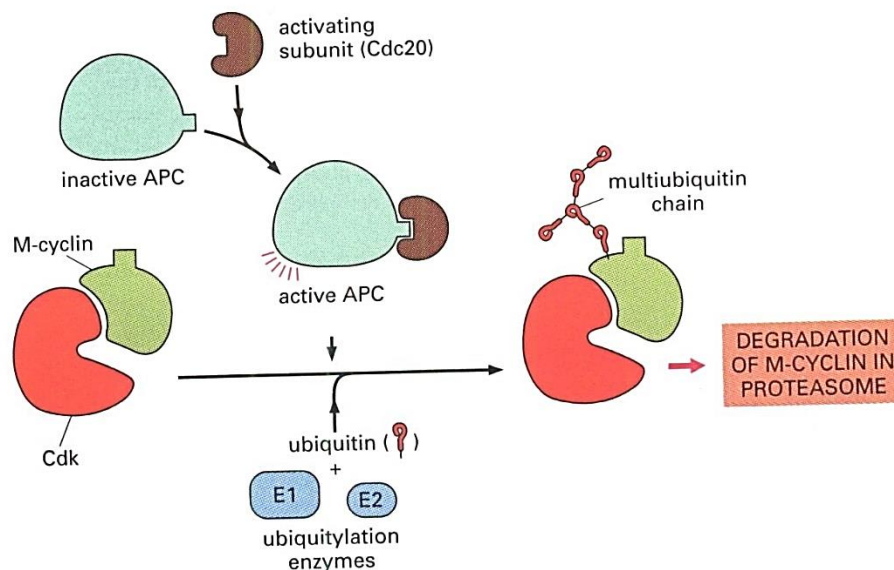
Tabel 2.1. Kompleks *cyclin*-CDK pada Vertebrata (Albert, 2002)

| Cyclin-CDK Complex | Vertebrates | |
|--------------------------|-------------|----------------|
| | Cyclin | CDK Partner |
| G ₁ - Cdk | Cyclin D* | Cdk4, Cyclin 6 |
| G ₁ / S - Cdk | Cyclin E | Cyclin2 |
| S - Cdk | Cyclin A | Cyclin2 |
| M - Cdk | Cyclin B | Cyclin1** |

Sel akan meninggalkan fase S dan memasuki fase G₂, bila telah terbentuk kompleks dari ikatan *cyclin A* dengan CDK2 dan CDK1 (tabel 2.1.). Terbentuknya

ikatan antara *cyclin B* dengan CDK1 akan mengakibatkan sel memasuki fase mitosis (M) dan meninggalkan fase G2 (Gartner dan Hiatt, 2007). Peningkatan kadar *cyclin* sampai melewati ambang akan menyebabkan CDKs inhibitor tidak dapat lagi menghambat CDKs sehingga CDKs menjadi aktif dan berikatan dengan *cyclin* untuk membentuk kompleks *cyclin*-CDKs. Kompleks MPF yang dibentuk oleh *cyclin B*-CDKs akan memicu transisi fase G2 memasuki fase M. Peningkatan kecil kadar *cyclin* akan memproduksi peningkatan aktivitas MPF kinase yang besar sehingga terjadi kondensasi chromosome. Aktivitas ini bahkan dapat memicu mitosis pada sel-sel yang tidak membelah. Sementara untuk memasuki fase S, dikontrol oleh faktor transkripsi E2F.

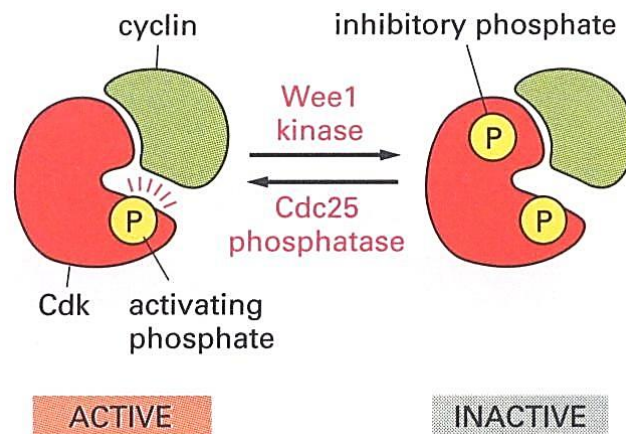
Aktivitas *cyclin* juga dipengaruhi oleh beberapa jalur extracellular signaling yang memfasilitasi koordinasi pembelahan sel pada organism multiselular (Manson *et al*, 2006). Setelah membentuk fungsi spesifiknya, *cyclin* akan didegradasi melalui jalur ubiquitin-proteasome (gambar 2.4.) (Gartner dan Hiatt, 2007).



Gambar 2.4. Degradasi Cylin (Albert, 2002).

Phosphatase yang berpartisipasi dalam pengaturan siklus sel adalah Cdc25 Phosphatase yang memiliki fungsi utama mendefosforilasi berbagai CDKs yang terfosforilasi sehingga siklus sel dapat berjalan. Misalnya, CDK2 terfosforilasi pada threonin 14 dan tyrosine 15 akibatnya sel tidak dapat berpindah dari fase G1

menuju ke S. Ketika Cdc25A mendefosforilasi CDK2 pada phosphotyrosine 15, sel akan memasuki fase S. Demikian pula pada CDK1 yang terfosforilasi pada residu yang sama oleh kinase yang spesifik, yaitu wee1 dan CDK-activating kinase. Setelah CDK1 mengalami defosforilasi oleh Cdc25C Phosphatase pada tyrosine 15 (gambar 2.5.), sel dapat berpindah dari fase G2 ke M (Goodman, 2008).



Gambar 2.5. Aktivasi dan Inaktivasi *Cyclin* (Albert, 2002).

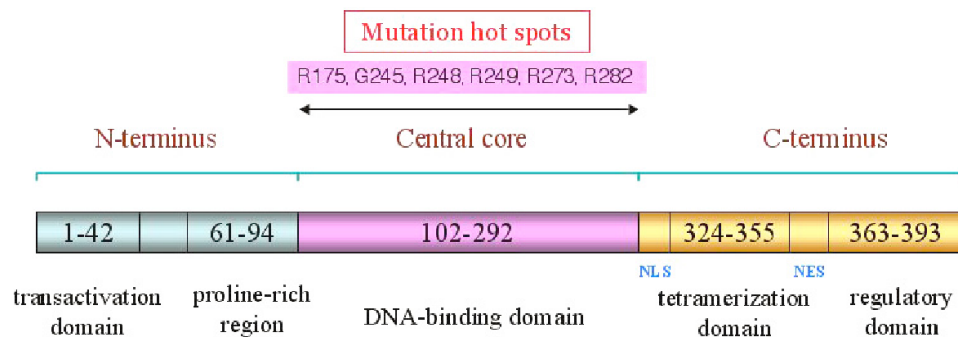
2.2.4. Tumor Protein

Tumor protein / TP53 / p53 merupakan Salah satu *tumor suppressor gene* yang penting. p53 disebut pula sebagai penjaga gen (*guardian of the genome*). Gen p53 tersebut meregulasi G1/S dan G2/M *checkpoint*. Fungsi utama gen p53, yaitu: sebagai *transcription activator* sehingga meregulasi gen-gen tertentu yang terlibat dalam pembelahan sel, sebagai *restriction point* pada fase G1 (Goodman, 2008).

Lokasi gen p53 ini ialah pada *chromosome* manusia 17p13.1, terdiri dari 393 asam amino, 11 ekson dan mengkode *nuclear phosphoprotein* sebesar 53 kD (Manson *et al*, 2006). Protein p53 mengaktifasi transkripsi sejumlah gen yang berpartisipasi dalam mengontrol siklus sel, termasuk gen yang mengkode p21^{waf/cip1}, GADD45 (suatu gen yang menahan pertumbuhan bila diinduksi oleh kerusakan DNA) dan MDM2 (negative regulator p53) (Goodman, 2008).

Aktivitas transkripsi dari p53 bergantung pada pembentukan tetramer dari protein tersebut yang berinteraksi dengan DNA dengan urutan yang spesifik (*sequence-specific*). Tiap subunit p53 terdiri dari 4 domain yang berbeda fungsinya.

Residu 1-44 merupakan ujung N yang sedikit terlipat sebagai domain pengaktif transkripsi. Domain inti merupakan bagian yang berinteraksi dengan DNA dan berawal dari residu 102 sampai residu 292 (gambar 2.6). Residu 320–356 bertanggung jawab atas pembentukan tetramer, sedangkan residu 356–393 merupakan domain regulator (Zhao *et al.*, 2001).



Gambar 2.6. Urutan spesifik (*sequence-specific*) protein p53. Domain inti (*central core*) merupakan bagian yang berhubungan langsung dengan DNA. Pada sebagian kanker manusia mengalami mutasi di bagian inti (Bai & Zhu, 2006).

Protein p53 melakukan modulasi pada sebagian besar proses perbaikan DNA melalui jalur transaktivasi dependen maupun independen, sehingga protein p53 berfungsi sebagai *molecular node* yang terletak pada persimpangan *upstream signaling cascade* dan *downstream DNA-repair*. Akumulasi protein p53 menghasilkan *transient arrest* pada siklus sel di G1, sesaat sebelum replikasi DNA, atau di G2, sesaat sebelum mitosis. Berhentinya pembelahan sel ini memberikan kesempatan pada sel mengaktifasi sistem *perbaikan DNA* enzimatik untuk memperbaiki lesi yang terjadi. Dengan kata lain, pada sel yang mengekspresikan mutasi p53, pembelahan sel tidak berhenti walaupun telah terjadi kerusakan DNA (Duffy, Synnott dan Crown, 2016).

Salah satu peranan p53 adalah untuk memonitor stress selular dan menginduksi apoptosis apabila lesi DNA *irreversible* atau tidak dapat diperbaiki. Apoptosis merupakan proses bertingkat yang diregulasi dengan ketat, ditandai dengan penyusutan sel, kondensasi kromatin, serta fragmentasi sel dan inti. Dalam perkembangannya apoptosis juga sering disebut dengan *programmed cell death*, yang berlangsung terus selama proses kehidupan dengan maksud untuk menjaga

homeostasis jaringan, yaitu keseimbangan antara proliferasi dengan kematian sel (Bai & Zhu, 2006; Miettinen, 2009).

2.2.5. Caspase

Caspases adalah keluarga enzim protease yang memainkan peran kunci dalam proses seluler seperti apoptosis dan inflamasi (Mace, Riedl dan Salvesen, 2014). Sinyal apoptosis jalur caspase dependen bisa terjadi secara intraseluler dan ekstraseluler. Jalur ekstrinsik (ekstraseluler) diinisiasi stimulasi reseptor kematian sedangkan jalur intrinsik diinisiasi oleh pelepasan faktor sinyal dari mitokondria dalam sel. Apoptosis jalur ekstrinsik dimulai dari adanya pelepasan molekul sinyal disebut ligan, oleh sel lain bukan berasal dari sel yang akan mengalami apoptosis. Ligan tersebut berikatan dengan reseptor kematian yang terletak pada transmembran sel target yang menginduksi apoptosis (Kuntz *et al.*, 1999).

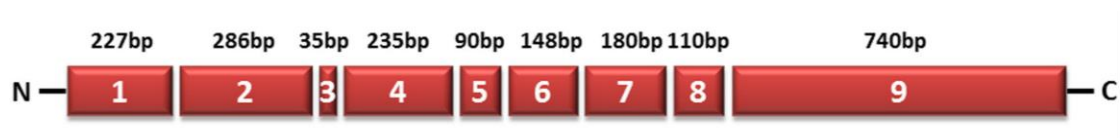
Reseptor kematian yang terletak di permukaan sel adalah famili reseptor *Tumor Necrosis Factor (TNF)*, yang meliputi TNF-R1, CD 95 (*Fas*), dan *TNF-Related apoptosis inducing ligand (TRAIL)-R1* dan *R2*. Ligan yang berikatan dengan reseptor tersebut mengakibatkan caspase inisiator 8 membentuk trimer dengan adaptor protein *FADD*. Reseptor CD 95, *TRAIL-R1* dan *R2* terikat dengan *FADD*, sedangkan *TNF-R1* terikat secara tidak langsung dengan molekul adaptor lain, yaitu *TNF-Receptor Associated Death Domain (TRADD)*. Kompleks yang terbentuk antara ligan-reseptor dan reseptor kematian *FADD* disebut *DISC*. Kompleks ini akan menginisiasi pro caspase-8 yang mengaktifkan caspase eksekutor (Kuntz *et al.*, 1999).

Caspase-8 bekerja dengan cara memotong anggota famili Bcl-2 yaitu Bid (Wong, 2011 & Fulda *et al.*, 2000). Bid yang terpotong pada bagian ujungnya akan menginduksi insersi Bax ke dalam membran mitokondria dan melepaskan molekul proapoptotik seperti sitokrom c, *Samc/Diablo*, *Apoptotic Inducing Factor (AIF)*, dan *omi/Htr2*. Adanya dATP akan terbentuk kompleks antara sitokrom c, *Apaf-1*, dan caspase-9 yang disebut apoptosom. Caspase-9 akan mengaktifkan aliran procaspase-3. Protein caspase-3 yang aktif memecah berbagai macam substrat, diantaranya enzim perbaikan DNA seperti *poly-ADP Ribose Polymerase (PARP)*, dan DNA protein kinase yaitu protein struktural seluler dan nukleus, termasuk

aparatus mitotik inti, lamina nukleus, dan aktin serta endonuklease, seperti *Inhibitor Caspase-Activated Deoxyribonuklease (ICAD)* dan skonstituen seluler lainnya (Wong, 2011).

Caspase-3 juga mempunyai kemampuan untuk mengaktifkan caspase lainnya, seperti pro-caspase-6 dan 7 yang memberikan amplifikasi terhadap kerusakan seluler. Adanya stres seluler meningkatkan ekspresi dari protein p53 yang mengakibatkan terjadinya *G1 arrest* atau apoptosis. Anggota dari *Apoptosis Stimulating Protein p53 (ASPP)* yaitu *ASPP 1* dan *ASPP 2* secara spesifik menstimulasi fungsi transaktivasi p53 pada promotor gen pro-apoptotik seperti *Bax* dan *p53 inducible gene 3 (PIG 3)*, tapi tidak pada promotor gen yang menyebabkan hambatan siklus sel, yaitu p21 dan MDM2 (Rastogi *et al.*, 2009).

Stres mitokondria yang menginduksi apoptosis jalur intrinsik disebabkan oleh senyawa kimia atau kehilangan faktor pertumbuhan, sehingga menyebabkan gangguan pada mitokondria dan terjadi pelepasan sitokrom c dari intermembran mitokondria (Wong, 2011). Sitokrom c adalah suatu heme protein yang bertindak sebagai suatu pembawa elektron dalam fosforilasi oksidasi mitokondria, pemberhenti elektron sitokrom c oksidase, keluar intermembran dan mengikat protein sitoplasmik yang disebut *Apaf-1* (Rastogi *et al.*, 2009). Sitokrom c yang keluar ke sitoplasma kemudian berikatan dengan *Apaf-1* membentuk *Caspase Recruitment Domain (CARD)*. Beberapa *CARD* bergabung membentuk kompleks apoptosom kemudian mengikat procaspase-9 dan mengaktifkannya menjadi caspase-9 (*caspase inisiator*) (gambar 2.7.). Caspase-9 ini akan mengaktifkan procaspase-3 menjadi caspase-3 yang merupakan caspase efektor yang melaksanakan apoptosis (Wong, 2011).



Gambar 2.7. Diagram caspase-9 pada manusia (Li *et al.*, 2017)

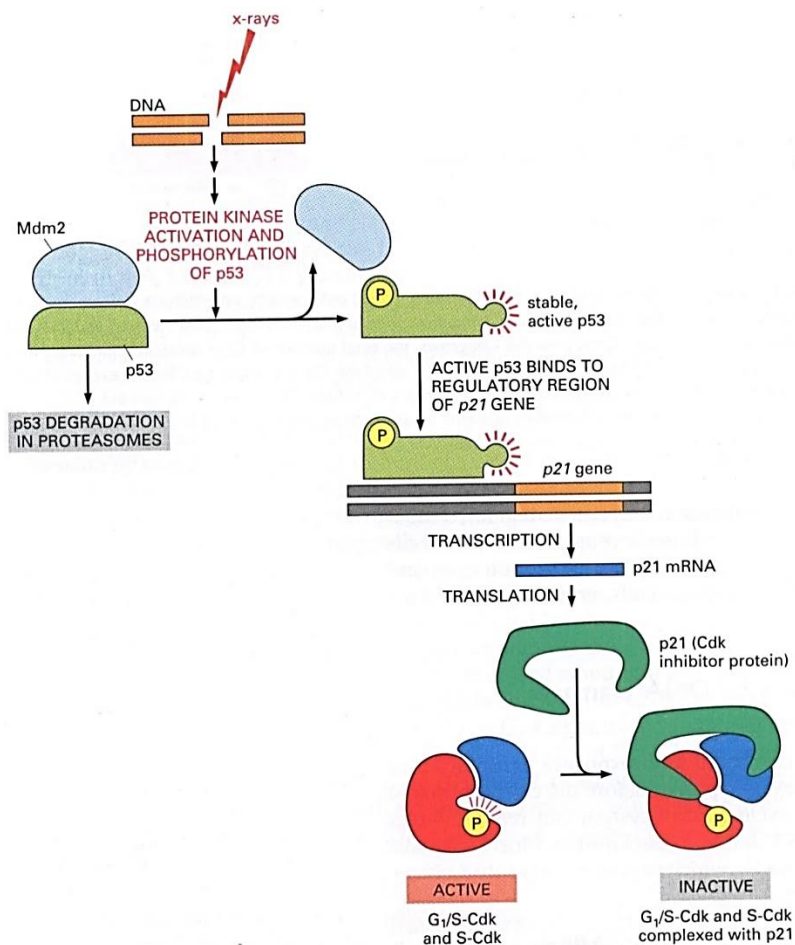
2.3.Kanker

Normalnya sel berada dalam keseimbangan antara proliferasi, tidak aktif dan kematian (apoptosis). Kanker ditandai dengan adanya pertumbuhan dan pembelahan sel yang tidak terkontrol. Hal ini dikarenakan oleh adanya mutasi DNA sehingga terjadi perubahan ekspresi gen-gen (meningkat maupun menurun) yang berhubungan dengan kontrol siklus sel. Perubahan ini umumnya diakibatkan oleh: bahan-bahan kimia (*benzene, nitrosamine*), radiasi (ultraviolet), infeksi virus dan kelainan genetik. Mutasi gen-gen dihubungkan dengan kanker dapat dikelompokkan menjadi: *oncogenes* (Ras, Fos, Myc) dan *tumor suppressor gene* (p53, pRb, GAP). *Oncogenes* merupakan hasil mutasi *protooncogenes* yang menginduksi pertumbuhan sel sehingga sel berproliferasi terus menerus. Sementara itu, *tumor suppressor gene* adalah gen yang normal terdapat dalam sel dan berperan menghambat pertumbuhan sel. Mutasi gen ini mengakibatkan hambatan terhadap pertumbuhan sel menghilang. Banyak dari gen-gen ini yang normalnya terlibat dalam regulasi pembelahan dan diferensiasi sel (Manson *et al*, 2006).

Gen p53 merestriksi masuknya sel yang memiliki kerusakan DNA untuk menuju fase S (setiap saat meregulasi siklus sel melewati *restriction point*). Sebanyak 50% kanker terjadi karena mutasi p53. Sel dengan mutasi p53, tidak tertahan pada fase G1 dan akan terus melanjutkan siklus serta pembelahan sel dengan kesalahan DNA (Manson *et al*, 2006). Saat terdapat kesalahan DNA sehingga menghambat pembelahan sel (memungkinkan perbaikan DNA sebelum replikasi DNA dan pembelahan sel terjadi). Selain itu, berpartisipasi pula dalam menginisiasi apoptosis bila kerusakan DNA terlalu berat dan tidak dapat diperbaiki (Manson *et al*, 2006; Goodman, 2008). Mutasi p53 akan menyebabkan sel tidak dapat diperbaiki, siklus berlanjut terus walaupun terdapat DNA yang rusak dan apoptosis tidak terjadi.

Protein p53 yang terfosforilasi akan aktif dan berfungsi sebagai faktor transkripsi yang mengaktifasi banyak target gen. Salah satu gen yang penting adalah p21^{waf/cip1}. Setelah kerusakan DNA, p53 diaktifkan oleh fosforilasi pada asam amino spesifik dan kemudian menginduksi transkripsi p21^{waf/cip1}. Ini akan

meningkatkan kadar mRNA p21 dan protein. Selanjutnya, p21 akan berikatan dengan kompleks *cyclin E/CDK2* dan *cyclin D/CDK4* atau *cyclin D/CDK6* dan menghambat aktivitas kinase CDKs. Salah satu target CDK2 adalah pRb, yaitu suatu *tumor suppressor gene* yang lain. Fosforilasi pRb oleh CDK diperlukan untuk meneruskan fase G1 menuju S (gambar 2.8.). Namun dengan pengikatan kompleks CDK/*cyclin*, maka p21^{waf/cip1} menghambat fosforilasi pRb dan menahan siklus sel pada fase G1 (Goodman, 2008).



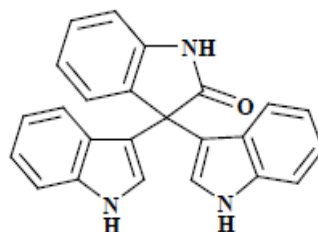
Gambar 2.8. Respons terhadap Aktivasi dan Fosforilasi p53 (Albert *et al*, 2002).

Asal nama protein *Retinoblastoma* (pRb) diambil dari tumor *retinoblastoma*. Protein ini memiliki fungsi yang bermacam-macam dan bervariasi dalam siklus sel, antara lain sebagai pengatur untuk melanjutkan fase G1 menuju S. Awalnya pRb berada dalam keadaan hipofosforilasi dan berikatan dengan kompleks *cyclin D/CDK4* dan *cyclin E/CDK2*. Hipofosforilasi pRb juga

berikatan dan menginaktivasi faktor transkripsi E2F yang mengontrol transkripsi gen-gen yang menghasilkan produk penting bagi transisi fase G1 ke S. Akibatnya, hipofosforilasi pRb akan menghambat transisi dari fase G1. Pada awal sampai pertengahan fase G1, pRb akan terfosforilasi oleh *cyclin* D/CDK4 dan oleh *cyclin* E/CDK2 di akhir fase G1. Protein Rb yang terfosforilasi akan melepaskan ikatannya dengan E2F sehingga dapat berperan sebagai faktor transkripsi sehingga transisi dari fase G1 dapat terjadi (Goodman, 2008). Bila terjadi mutasi pRb, maka pRb akan terfosforilasi terus sehingga tidak berikatan dengan E2F. Akibatnya sel terus menerus mengadakan pembelahan dan terjadilah kanker.

2.4. Trisindolina

Trisindolina merupakan senyawa yang berhasil diisolasi pertama kali dari bakteri *Vibrio* sp. yang bersimbiosis dengan spons laut *Hertius altum* di perairan Okinawa, Jepang. Senyawa Trisindolina (gambar 2.9.) berhasil disintesis pertama kali oleh Kobayashi *et al* (1994). Perkembangan penelitian, menunjukkan potensi Trisindolina sebagai antifungi, aktivitas spermisidal, antidiabetik.

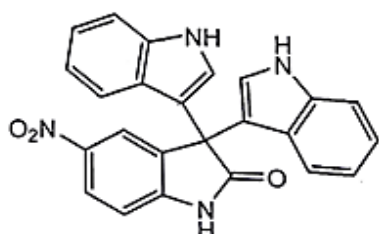


Trisindoline

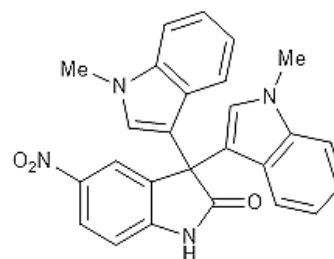
Gambar 2.9. Struktur dasar senyawa kimia Trisindolina (Kobayashi *et al.*, 1994)

Kelompok Trisindolina telah banyak dikembangkan dalam penelitian anti kanker terbaru karena keberhasilan metode sintesis serta tingginya potensi sitotoksiknya. Santoso dan Mursyidah (2010) mensintesis senyawa Trisindolina menjadi 4 (Gambar 2.10), yaitu senyawa 1 (S1) : 5'-nitro-[3,3':3',3''-terindolin]-2'-one, hasil sintesis Trisindolina dengan penambahan gugus nitro, senyawa 2 (S2) yaitu 1,1''-dimethyl-5'-nitro-[3,3':3',3''-terindoline]-2'-one yang merupakan hasil Trisindolina dengan penambahan gugus dimetil, senyawa 3 (S3) 5,5'',7,7''-tetrabromo-[3,3':3',3''-terindolin]-2'-one yang merupakan hasil Trisindolina

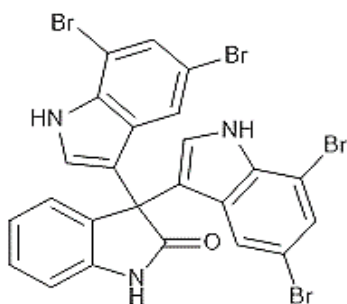
dengan penambahan gugus bromo, dan senyawa 4 (S4) dan 5'-chloro-1,1''-diethyl-1*H*,1''*H*-[3,3':3',3''-terindol]-2'(1'*H*)-one yang merupakan hasil Trisindolina dengan penambahan gugus kloro.



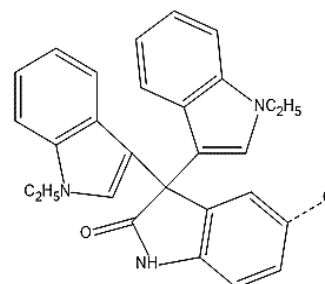
5'-nitro-[3,3':3',3''-terindolin]-2'-one
(trisindolina 1)



1,1''-dimethyl-5'-nitro-[3,3':3',3''-terindoline]-2'-one
(trisindolina 2)



5,5'',7,7''-tetrabromo-[3,3':3',3''-terindolin]-2'-one
(trisindolina 3)



5'-chloro-1,1''-diethyl-1*H*,1''*H*-[3,3':3',3''-terindol]-2'(1'*H*)-one
(trisindolina 4)

Gambar 2.10. Struktur kimia senyawa Trisindolina 1, 2, 3, dan 4

(Santoso & Mursyidah, 2010)

Pada penelitian sebelumnya didapatkan hasil bahwa nilai IC_{50} senyawa Trisindolina 1, 3, dan 4 terhadap MCF-7 cell line adalah sebagai berikut: 2,059 μ M, 3,9759 μ M, dan 15,46 μ M. Senyawa Trisindolina 1 menunjukkan aktivitas sitotoksitas yang paling tinggi dari kedua Senyawa Trisindolina yang lain tinggi. Hal ini dapat dikarenakan penambahan group nitro menurunkan ekspresi cyclin E1 yang merupakan aktivator cdk 2 (enzim regulator pada checkpoint fase G1 ke sehingga kompleks cyclin E-cdk 2 tidak terbentuk dan pertumbuhan selnya terhenti (Nurhayati *et al*, 2017).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2019 sampai Juni 2020 di Laboratorium Zoologi dan Rekayasa Hewan, Departemen Biologi, Fakultas Sains, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya, Indonesia dan *Structural and Computational Biology Research Unit, Department of Biochemistry, Chulalongkorn University*, Bangkok, Thailand.

3.2. Metode Penelitian

3.2.1. Preparasi protein

Struktur protein diambil dari database RCSB *Protein Data Bank* (Stephen, 2019) dengan PDB ID: **2UZE** untuk cdk-2 (Richardson *et al.*, 2007), **1TUP** untuk p53 (Cho, 1994), dan **1NW9** untuk caspase-9 (Shiozaki, 2003). Struktur yang didapatkan dibersihkan dari ligan, ion, air yang terbawa menggunakan VMD dan disimpan dalam format *.pdb* file.

3.2.2. Preparasi ligan

Keempat ligan Trisindolina digambar menggunakan perangkat lunak MarvinSketch untuk mendapatkan molekul 3D dari gambar 2D dan di simpan dalam format *.pdb* file. Perangkat lunak ini mendukung pemeriksaan valensi, kueri atom dan ikatan, stereokimia, dan templat yang ditentukan pengguna. Pengguna perangkat ini berfokus pada penggunaan interaksi aktif inti portabilitas. MarvinSketch digunakan pada lintas platform untuk kimia modern dan interaksi kimia (ChemAxon, 2019).

3.2.3. Molecular Docking

Molecular Docking menggunakan metode *blind docking* sehingga ligan dapat menempel pada semua sisi aktif protein. Software yang digunakan Autodock

Vina. AutoDock Vina adalah program open-source untuk melakukan docking molekuler dari Lab. Molecular Graphics di The Scripps Research Institute. Input dan output Vina menggunakan format file struktur molekul PDBQT yang sama yang digunakan pada AutoDock (Trott dan Olson 2010). File PDBQT dapat dihasilkan (secara interaktif atau dalam mode batch) dan dilihat menggunakan MGLTools. Pengulangan dalam penelitian sebanyak 100 kali dan dipilih kompleks protein-ligan yang mempunyai nilai *Binding Affinity* (Kcal/mol) terbaik.

3.2.4. Molecular Dynamics Simulation

Ligan Trisindolina dioptimalisasi menggunakan AMBER Tools 18 yang molekul hidrogen telah dihilangkan terlebih dahulu dengan GaussView dan disimpan dengan format *.gjf* file. Selanjutnya hidrogen ditambahkan dan dioptimalisasi dengan perangkat lunak AMBER Tools (Case *et al.*, 2018).

Kompleks protein-ligan yang terbaik dihilangkan molekul hidrogennya dengan GaussView dan disimpan dengan format *.gjf* file. Selanjutnya hidrogen ditambahkan dan dioptimalisasi dengan AMBER Tools (Case *et al.*, 2018). Simulasi MD dijalankan menggunakan AMBER selama 20 ns (Rungnim *et al.*, 2015)

3.2.5. Perhitungan dan visualisasi hasil simulasi

Visualisasi jarak ikatan hidrogen dengan Discovery Studio 2019 dan VMD. Kalkulasi yang didapatkan dari simulasi dari AMBER, ditampilkan berupa grafik menggunakan OriginLab. Data tersebut meliputi RMSD, RMSF, ikatan hidrogen inter dan intramolekuler.

Root mean square deviation (RMSD) dapat didefinisikan untuk dua struktur yang mengandung jumlah dan jenis atom yang identik. Bila dua koordinat atom menjadi r_i dan r'_i ($i = 1, 2, \dots, n$), maka

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{n=1}^n |r_i - r'_i|^2}$$

Dimana:

$$|r_i - r'_i|^2 = (r_{i,x} - r'_{i,x})^2 + (r_{i,y} - r'_{i,y})^2 + (r_{i,z} - r'_{i,z})^2$$

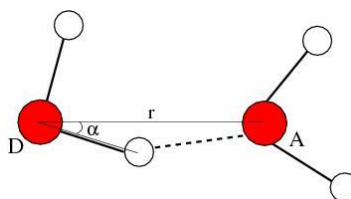
\mathbf{r}_i dan \mathbf{r}'_i dapat merujuk pada subset dari seluruh molekul, seperti atom C_α , atom backbone atau atom berat. Nilai RMSD tergantung pada definisi yang tepat dari \mathbf{r}_i (Kovács dan Péter, 2016)

Root mean square fluctuation RMSF merupakan deviasi antara posisi partikel i dan beberapa posisi referensi. Bila dua koordinat atom menjadi r_i dan r'_i ($i = 1, 2, \dots, n$), maka $RMSF = \sqrt{\frac{1}{t} \sum_{t=1}^t |r_i - r'_i|^2}$. Dimana t adalah waktu di mana salah satu rata-rata dan r_i adalah posisi referensi dari partikel i . Biasanya posisi referensi ini akan menjadi posisi rata-rata waktu dari partikel yang sama i (Bolwell, 2001).

Ikatan Hidrogen (*H-bond*) merupakan jenis ikatan polar antara atom hidrogen yang terikat ke atom lain dengan elektronegativitas besar. Hal ini kemudian membentuk interaksi elektrostatis dengan akseptor ikatan hidrogen. Penentuan apakah ada ikatan-H antara donor D dan akseptor A, kriteria geometri digunakan:

$$r \leq r_{HB} = 0.35 \text{ nm}$$

$$\alpha \leq \alpha_{HB} = 30^\circ$$



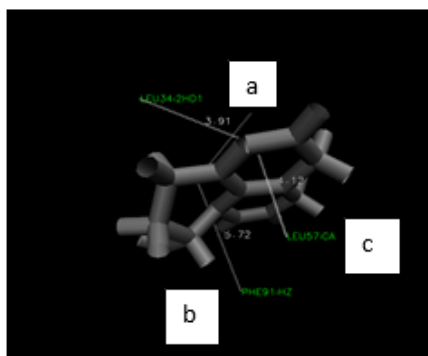
Waktu terjadinya ikatan hidrogen dapat dihitung dari fungsi autokorelasi, dengan persamaan sebagai berikut: $C(T) = \langle s_i(t)s_i(t + T) \rangle$. di mana $s(t) = \{0,1\}$ adalah fungsi keberadaan ikatan-H i pada waktu t . Integral dari $C(\tau)$ memberikan perkiraan waktu terjadinya ikatan hidrogen $T_{HB} = \int_0^\infty C(\tau) dT$. Pada MD menunjukkan letak ikatan hidrogen intra dan intermolecular pada kompleks ikatan COX dengan IBP (Appignanesi, 2016)

3.3. Rancangan Penelitian dan Analisa Data

Penelitian ini merupakan penelitian dengan pendekatan bioinformatika yaitu analisis docking molekuler ligan terhadap protein menggunakan protokol docking Autodock Vina. Penelitian bersifat deskriptif kuantitatif. Data yang dianalisis merupakan hasil nilai dari skor *molecular docking*. Molekul dengan nilai skor *molecular docking* terendah (nilai yang semakin minus) menunjukkan afinitas kestabilan yang baik.

Visualisasi jarak ikatan hidrogen dengan Discovery Studio 2019 dan VMD. Selanjutnya visualisasi interaksi menggunakan Discovery Studio 2019 dan VMD (*Visual Molecular Dynamic*). Discovery Studio 2019 merupakan program yang dipilih untuk menunjukkan bagaimana struktur hasil simulasi docking molekuler dan simulasi dinamika molekul (Dassault Systèmes BIOVIA, 2019) sedangkan *software* VMD merupakan program yang menganalisis hasil *docking* dengan menunjukkan jarak antar ligan dan protein. Visualisasi interaksi dengan *software* Discovery Studio 2019 dilakukan untuk mengetahui asam amino di sekitar ligan yang telah melalui proses *molecular docking*. Visualisasi interaksi dengan VMD dilakukan untuk mengetahui jarak ikatan ligan dan protein dengan satuan yang digunakan adalah Å (Angstrom).

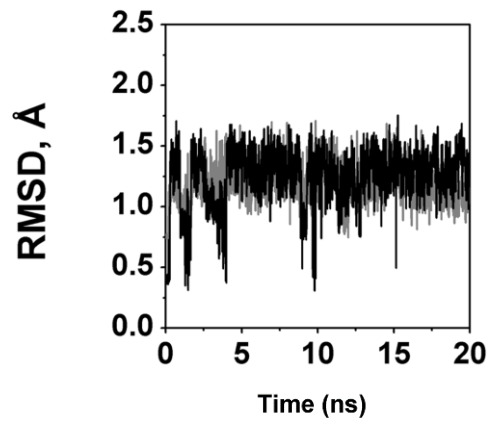
Hasil visualisasi *docking* menggunakan VMD akan ditunjukkan melalui besarnya jarak asam amino yang berperan pada ikatan antara ligan dan protein target (Gambar 3.1.).



Gambar 3.1. Contoh hasil visualisasi *docking* dengan *software* VMD. (a) Leusin 34 dengan jarak 3,91 Å, (b) Fenilalanin 91 dengan jarak 5,72 Å, dan (c) Leusin 57 dengan jarak 4,12 Å (Nurhayati *et al.*, 2017)

Kalkulasi yang didapatkan dari simulasi dari AMBER, ditampilkan berupa grafik menggunakan OriginLab. Data tersebut meliputi RMSD, RMSF, ikatan hidrogen inter dan intramolekuler. Semakin rendah fluktuasi dari RMSD menunjukkan kestabilan ikatan yang terbentuk antara ligan dengan protein target.

Fluktuasi pada RMSF menunjukkan tingkat fluktuasi dari ikatan kompleks protein (Rungnim *et al.*, 2015)



Gambar 3.2. Contoh ploting RMSD dari β -CD (abu-abu) dan α -MGS (hitam) (Rungnim *et al.*, 2015)

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil dan Visualisasi *Molecular Docking*

Molecular docking dapat digunakan untuk memprediksi apakah suatu senyawa memiliki aktivitas atau tidak, serta dapat berguna dalam pengembangan senyawa dengan aktivitas yang lebih baik. Pengembangan tersebut diantaranya mencakup desain senyawa dan interaksi senyawa tersebut dengan enzim atau reseptor (Agistia *et al.*, 2013).

Molecular docking merupakan salah satu metode untuk memprediksi kemungkinan aktivitas yang terjadi antara ligan dengan protein target. Penelitian ini menggunakan metode *molecular docking* menggunakan perangkat lunak Autodock (Trott dan Olson 2010). Hasil dari *molecular docking* menunjukkan perbandingan skor suatu senyawa dengan senyawa lainnya, sehingga dapat menjelaskan suatu senyawa bersifat poten atau tidak. Molekul dengan nilai skor *molecular docking* terendah (nilai minus) menunjukkan afinitas kestabilan yang baik (Purnomo, 2011).

RMSD merupakan pengukuran dua pose dengan membandingkan posisi atom antara struktur eksperimental dengan struktur yang di docking atau yang diprediksi (Hawkins *et al.*, 2008) nilai RMSD $< 2,0 \text{ \AA}$ biasanya digunakan sebagai kriteria kesuksesan metode docking (Jain and Nicholls, 2008; Moitessier *et al.*, 2008). Semakin nilai RMSD mendekati nol maka pose salinan ligan asli dengan copy ligand semakin mirip. Nilai skor tertinggi *molecular docking* dicantumkan dalam tabel 4.1 hingga tabel 4.3.

Tabel 4.1. Nilai dari Skor *molecular docking cdk2*

| Model | Tris 1 | | Tris 2 | | Tris 3 | | Tris 4 | |
|-------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|
| | <i>aff</i> | <i>dist</i> | <i>aff</i> | <i>dist</i> | <i>aff</i> | <i>dist</i> | <i>aff</i> | <i>dist</i> |
| 1 | -7.4 | 0.00 | -7.2 | 0.00 | -8.0 | 0.00 | -6.9 | 0.00 |
| 2 | -7.3 | 29.54 | -7.0 | 1.30 | -7.7 | 31.04 | -6.6 | 30.31 |
| 3 | -7.2 | 2.66 | -7.0 | 29.85 | -7.5 | 5.73 | -6.5 | 8.79 |
| 4 | -7.2 | 2.39 | -6.8 | 2.23 | -7.4 | 22.34 | -6.4 | 15.07 |
| 5 | -7.2 | 2.25 | -6.7 | 40.24 | -7.3 | 4.70 | -6.3 | 1.04 |

Keterangan: Tris: Trisindolina; *aff*: Binding Affinity (kcal/mol); *dist*: distribusi RMSD

Tabel 4.2. Nilai dari Skor *molecular docking p-53*

| Model | Tris 1 | | Tris 2 | | Tris 3 | | Tris 4 | |
|-------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|
| | <i>aff</i> | <i>dist</i> | <i>aff</i> | <i>dist</i> | <i>aff</i> | <i>dist</i> | <i>aff</i> | <i>dist</i> |
| 1 | -8.3 | 0.00 | -7.9 | 0.00 | -8.1 | 0.00 | -7.5 | 0.00 |
| 2 | -7.8 | 2.76 | -7.5 | 2.11 | -7.9 | 23.96 | -7.4 | 19.12 |
| 3 | -7.5 | 2.37 | -7.3 | 2.65 | -7.8 | 25.21 | -7.4 | 2.50 |
| 4 | -7.5 | 1.50 | -7.3 | 2.59 | -7.8 | 3.38 | -7.4 | 23.75 |
| 5 | -7.5 | 2.10 | -7.3 | 25.27 | -7.8 | 22.79 | -7.3 | 1.07 |

Keterangan: Tris: Trisindolina; *aff*: Binding Affinity (kcal/mol); *dist*: distribusi RMSD

Tabel 4.3. Nilai dari Skor *molecular docking caspase 9*

| Model | Tris 1 | | Tris 2 | | Tris 3 | | Tris 4 | |
|-------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|
| | <i>aff</i> | <i>dist</i> | <i>aff</i> | <i>dist</i> | <i>aff</i> | <i>dist</i> | <i>aff</i> | <i>dist</i> |
| 1 | -7.3 | 0.00 | -7.7 | 0.00 | -7.9 | 0.00 | -7.4 | 0.00 |
| 2 | -7.3 | 36.58 | -7.5 | 36.22 | -7.5 | 2.35 | -7.1 | 1.95 |
| 3 | -7.2 | 8.05 | -7.4 | 33.19 | -7.5 | 10.70 | -7.1 | 1.26 |
| 4 | -7.2 | 39.66 | -7.4 | 35.40 | -7.4 | 10.55 | -6.9 | 35.55 |
| 5 | -7.2 | 40.11 | -7.4 | 2.13 | -7.4 | 34.58 | -6.9 | 1.11 |

Keterangan: Tris: Trisindolina; *aff*: Binding Affinity (kcal/mol); *dist*: distribusi RMSD

Evaluasi validasi, parameter yang dilihat adalah RMSD dan pose secara visual (Moitessier et al., 2008). Hal ini menunjukkan protokol yang dikembangkan

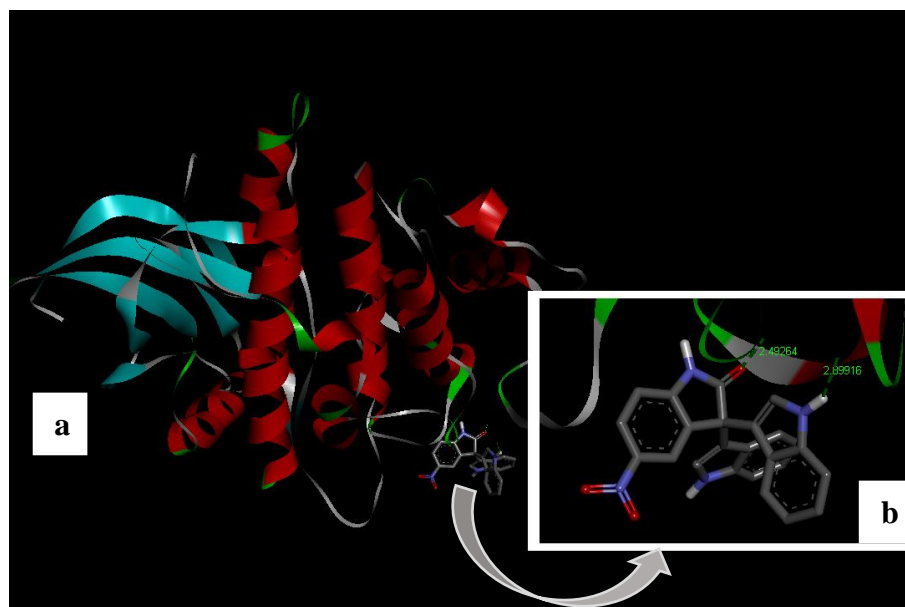
diterima dan dapat dikembangkan lebih lanjut untuk skrining virtual dalam usaha penemuan senyawa baru (Purnomo, 2011).

Visualisasi *molecular docking* dibutuhkan untuk mengetahui asam amino yang berperan dalam menjaga stabilitas senyawa tersebut pada reseptornya (Purnomo, 2011). Visualisasi pose validasi antara ligan asli dengan ligand salinan menunjukkan bahwa struktur dua molekul memiliki kemiripan posisi dan sudut dari setiap atomnya. Pada RMSD $>2,0 \text{ \AA}$ akan terlihat dua molekul yang berbeda secara signifikan jika dilihat dari sudut dan posisinya, meskipun memiliki jumlah atom yang sama.

Kompleks protein yang diperoleh dari proses *molecular docking* selanjutnya digunakan dalam metode *molecular dynamics simulation*.

4.1.1. Visualisasi *molecular docking* senyawa Trisindolina dengan Cdk-2

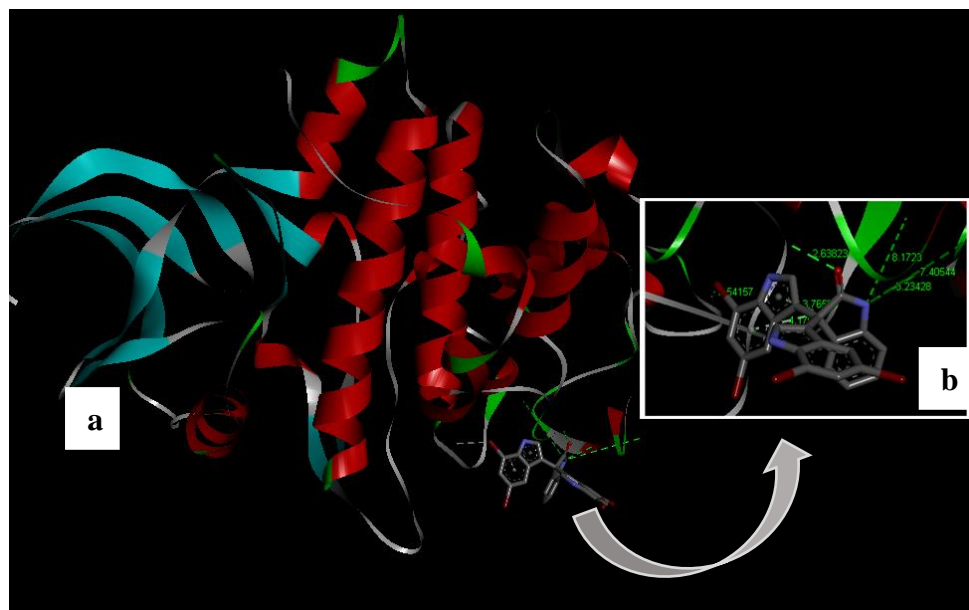
Nilai *binding affinity* dari *molecular docking* tertinggi antara protein target Cdk-2 dengan ligan Trisindolina 1, sebesar -7.3 kcal/mol , 2 sebesar -7.0 kcal/mol , 3 sebesar -7.7 kcal/mol dan 4 sebesar -6.6 kcal/mol . Pada visualisasi hasil kompleks protein yang terbentuk pada *molecular docking* dapat dilihat pada tabel 4.1. ditandai dengan cetakan tebal dan ditunjukkan pada gambar 4.1. hingga 4.4. berikut ini.



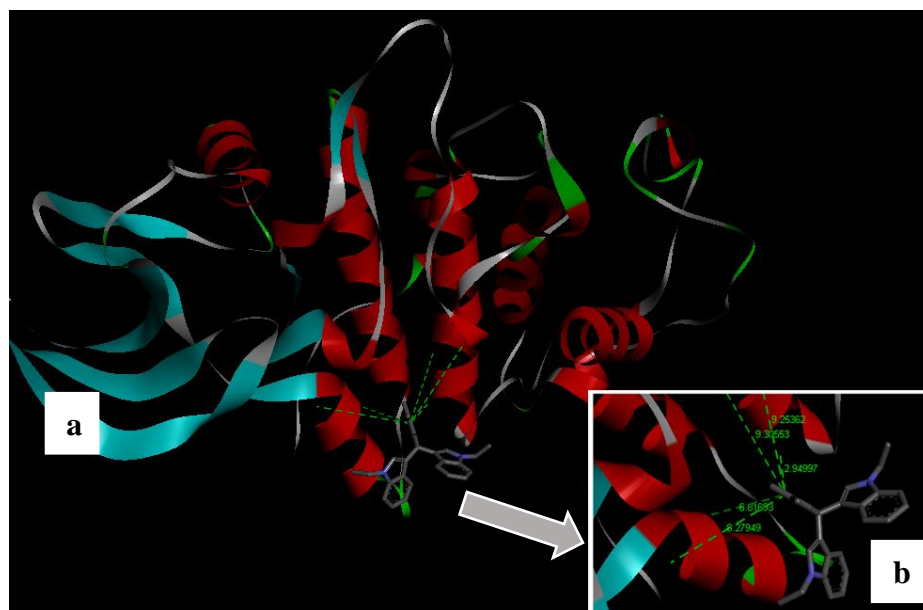
Gambar 4.1. Visualisasi hasil *molecular docking* Cdk-2 dengan Trisindolina 1 (a) dan ikatan hidrogen yang terbentuk (b).



Gambar 4.2. Visualisasi hasil *molecular docking* Cdk-2 dengan Trisindolina 2 (a) dan ikatan hidrogen yang terbentuk (b).



Gambar 4.3. Visualisasi hasil *molecular docking* Cdk-2 dengan Trisindolina 3 (a) dan ikatan hidrogen yang terbentuk (b).

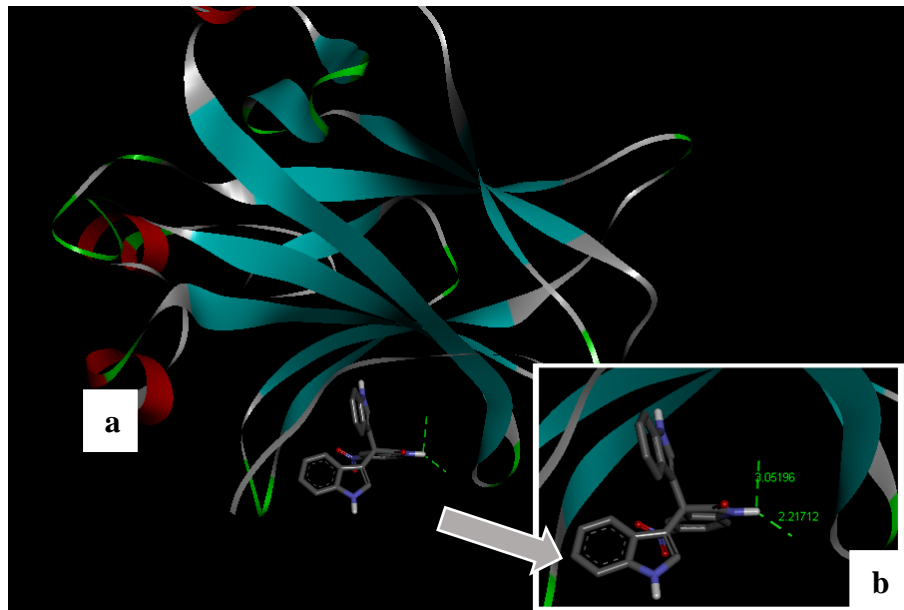


Gambar 4.4. Visualisasi hasil *molecular docking* Cdk-2 dengan Trisindolina 4 (a) dan ikatan hidrogen yang terbentuk (b).

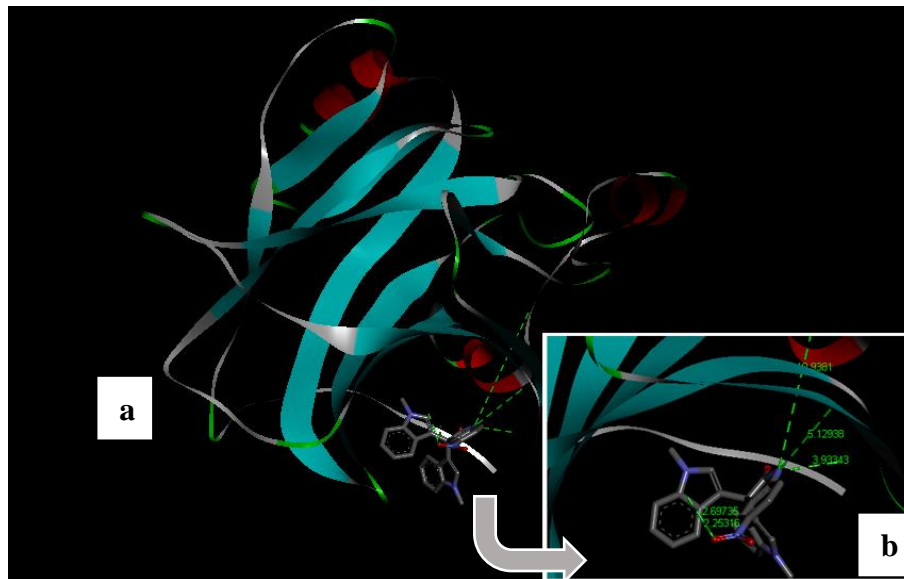
Berdasarkan hasil visualisasi dan validasi dari *molecular docking* Cdk-2 dengan keempat senyawa Trisindolina, senyawa yang mempunyai potensi terbaik untuk membentuk kompleks protein dengan Cdk-2 adalah Trisindolina 2 dengan nilai *Binding Affinity* sebesar -7.0 kcal/mol dengan jarak ikatan terbanyak dan jarak ikatan antara 2 hingga 10 \AA . Kompleks protein Cdk-2 dengan Trisindolina 2 yang terbentuk mempunyai nilai RMSD sebesar 1.30 \AA . Nilai RMSD $< 2,0 \text{ \AA}$ biasanya digunakan sebagai salah satu kriteria kesuksesan metode docking (Jain and Nicholls, 2008; Moitessier et al., 2008).

4.1.2. Visualisasi *molecular docking* senyawa Trisindolina dengan p-53

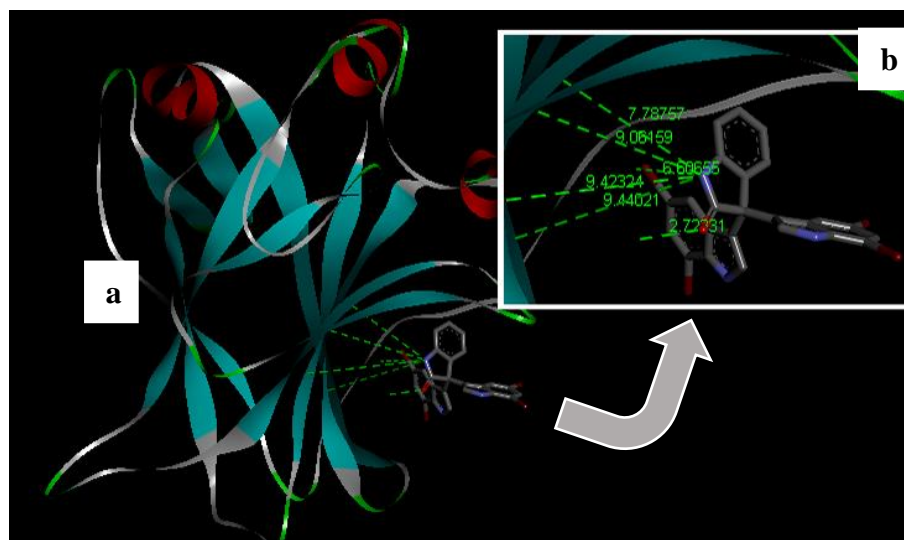
Nilai *binding affinity* dari *molecular docking* tertinggi antara protein target p-53 dengan ligan Trisindolina 1, sebesar -7.5 kcal/mol, 2 sebesar -7.9 kcal/mol, 3 sebesar -7.4 kcal/mol dan 4 sebesar -7.5 kcal/mol. Pada visualisasi hasil kompleks protein yang terbentuk pada *molecular docking* dapat dilihat pada tabel 4.2. ditandai dengan cetakan tebal dan ditunjukkan pada gambar 4.5. hingga 4.8. berikut ini.



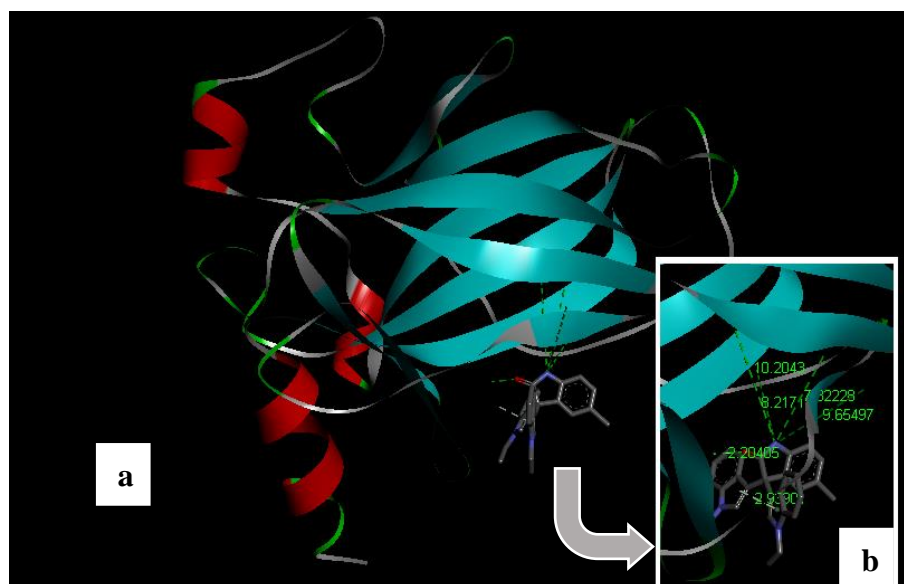
Gambar 4.5. Visualisasi hasil *molecular docking* p-53 dengan Trisindolina 1 (a) dan ikatan hidrogen yang terbentuk (b).



Gambar 4.6. Visualisasi hasil *molecular docking* p-53 dengan Trisindolina 1 (a) dan ikatan hidrogen yang terbentuk (b).



Gambar 4.7. Visualisasi hasil *moleculer docking* p-53 dengan Trisindolina 3 (a) dan ikatan hidrogen yang terbentuk (b).



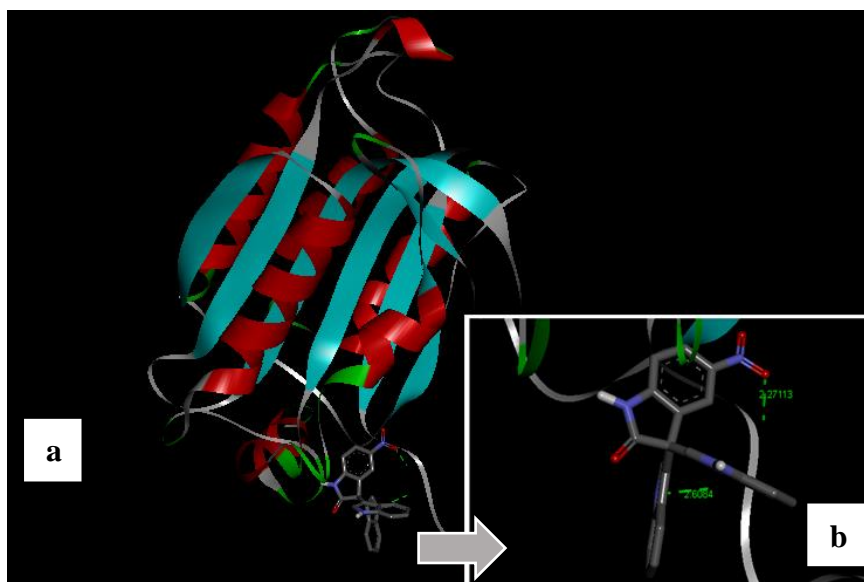
Gambar 4.8. Visualisasi hasil *moleculer docking* p-53 dengan Trisindolina 3 (a) dan ikatan hidrogen yang terbentuk (b).

Berdasarkan hasil visualisasi dan validasi dari *moleculer docking* p-53 dengan keempat senyawa Trisindolina, senyawa yang mempunyai potensi terbaik untuk membentuk kompleks protein dengan p-53 adalah Trisindolina 1 dengan nilai *Binding Affinity* sebesar -7.5 kcal/mol dengan jarak ikatan antara 2 hingga 3 Å. Kompleks protein p-53 dengan Trisindolina 1 yang terbentuk mempunyai nilai

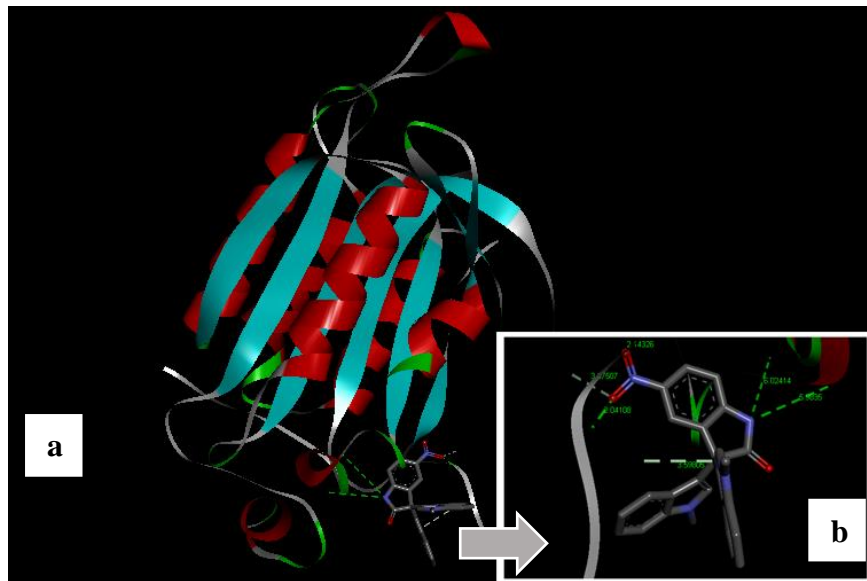
RMSD sebesar 1.50 Å dan kurang dari 2 Å, sehingga dapat digunakan sebagai salah satu kriteria kesuksesan metode docking (Jain and Nicholls, 2008; Moitessier et al., 2008).

4.1.3. Visualisasi *molecular docking* senyawa Trisindolina dengan caspase-9

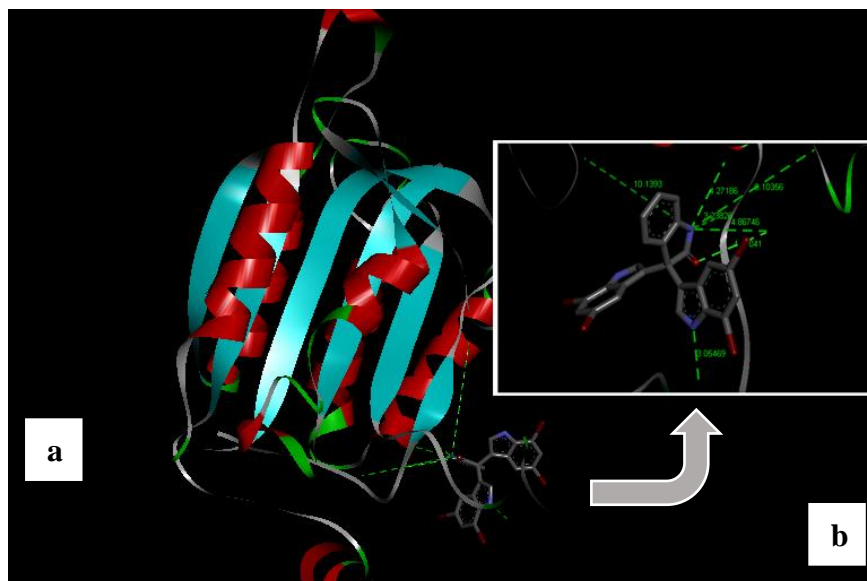
Nilai binding affinity dari *molecular docking* tertinggi antara protein target caspase-9 dengan ligan Trisindolina 1 dan 2 sebesar -7.5 kcal/mol, 3 sebesar -7.1 kcal/mol dan 4 sebesar -7.2 kcal/mol. Pada visualisasi hasil kompleks protein yang terbentuk pada *molecular docking* dapat dilihat pada tabel 4.3. ditandai dengan cetakan tebal dan ditunjukkan pada gambar 4.9. hingga 4.12. berikut ini.



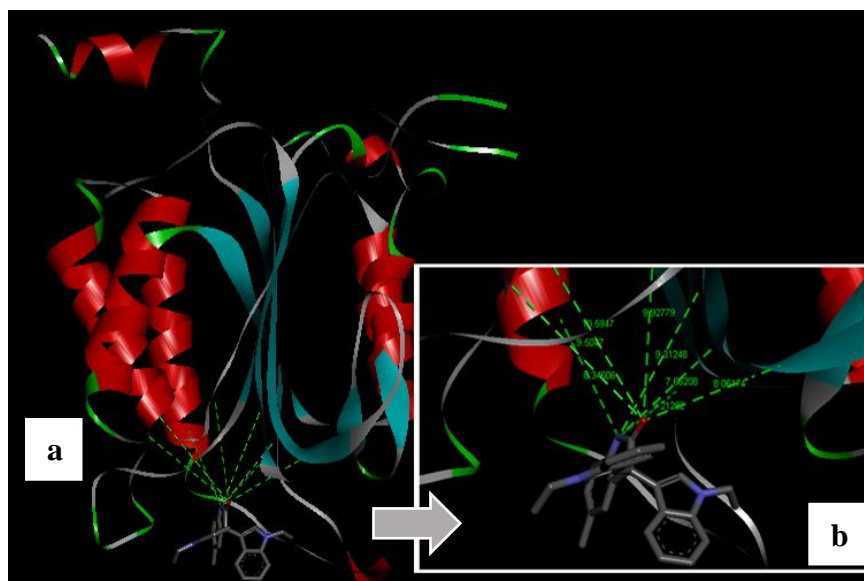
Gambar 4.9. Visualisasi hasil *molecular docking* caspase-9 dengan Trisindolina 1 (a) dan ikatan hidrogen yang terbentuk (b).



Gambar 4.10. Visualisasi hasil *molecular docking* caspase-9 dengan Trisindolina 2 (a) dan ikatan hidrogen yang terbentuk (b).



Gambar 4.11. Visualisasi hasil *molecular docking* caspase-9 dengan Trisindolina 3 (a) dan ikatan hidrogen yang terbentuk (b).



Gambar 4.12. Visualisasi hasil *molecular docking* caspase-9 dengan Trisindolina 4 (a) dan ikatan hidrogen yang terbentuk (b).

Berdasarkan hasil visualisasi dan validasi dari *molecular docking* caspase-9 dengan keempat senyawa Trisindolina, senyawa yang mempunyai potensi terbaik untuk membentuk kompleks protein dengan caspase-9 adalah Trisindolina 1 dengan nilai *Binding Affinity* sebesar -7.5 kcal/mol dengan jumlah ikatan terbanyak jarak ikatan antara 3 hingga 10 Å. Kompleks protein caspase-9 dengan Trisindolina 4 yang terbentuk mempunyai nilai RMSD sebesar 1.90 Å dan kurang dari 2 Å, sehingga dapat digunakan sebagai salah satu kriteria kesuksesan metode docking (Jain and Nicholls, 2008; Moitessier et al., 2008).

4.2. Hasil *Molecular Dynamics Simulation*

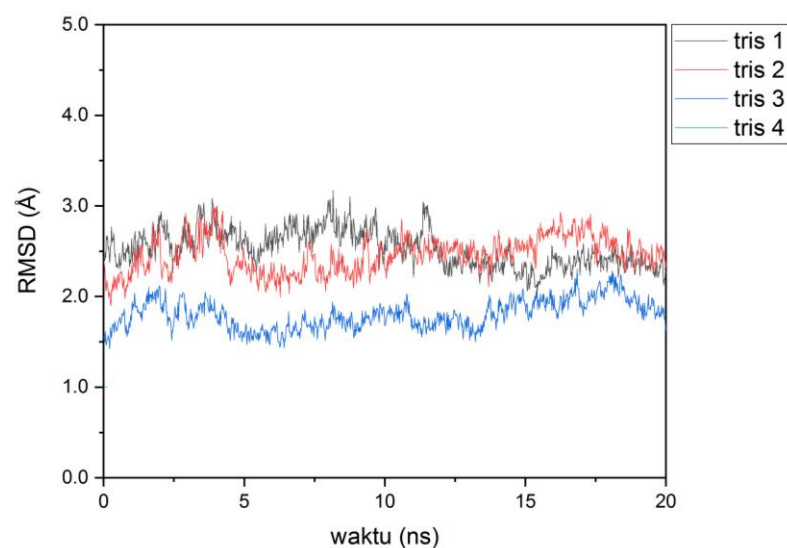
Molecular docking dapat memberikan gambaran tentang interaksi, ikatan, maupun afinitas suatu ligan (obat) dengan reseptornya, maupun enzim dengan substrat atau inhibitornya. Interaksi ligan dan protein dalam *molecular docking* dapat terjadi apabila terdapat kecocokan bentuk dan volume di antara molekul ligan dan situsambat (*binding site*) protein tersebut (Motiejunas & Wade, 2006)

Hasil yang diperoleh dari *molecular docking* masih berupa bentuk molekul statik sehingga dilanjutkan dengan metode *Molecular Dynamics (MD) Simulation* yang menggambarkan kondisi dimana suhu, tekanan dan pelarut sesuai dengan

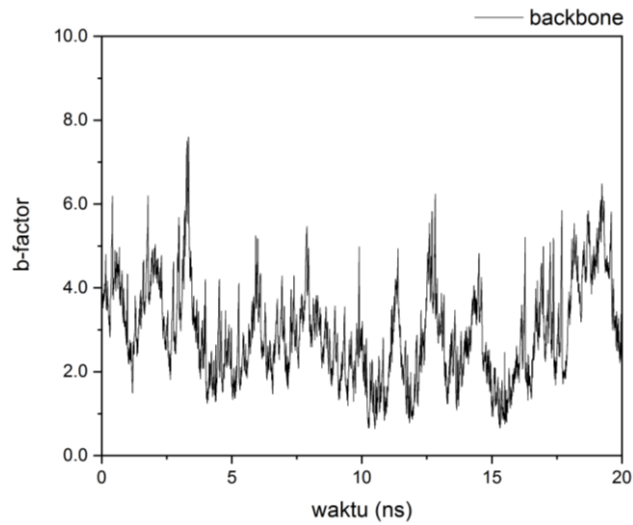
sistem biologis di dalam tubuh manusia. *Molecular Dynamics (MD) Simulation* adalah metode simulasi komputer untuk menganalisis gerakan fisik atom dan molekul. Atom dan molekul yang berinteraksi selama periode waktu tertentu, memberikan gambaran tentang perubahan sistem yang dinamis. Lintasan atom dan molekul ditentukan dengan persamaan gerak Newton secara numerik untuk sistem partikel yang berinteraksi, di mana gaya antara partikel dan energi potensial diperhitungkan menggunakan potensial interatomik atau medan gaya mekanika molekul (Cruz *et al*, 2006)

4.2.1. *Molecular Dynamics Simulation* kompleks protein Cdk-2

Konsentrasi Cdks relatif konstan selama siklus sel berlangsung. Cdks dalam keadaan bebas (tak berikatan) adalah inaktif karena *catalytic site*, tempat ATP dan substrat berikatan diblok oleh ujung C-terminal dari CKIs. Cyclin akan menghilangkan pengeblokan tersebut. CDKs menjadi aktif ketika berikatan dan membentuk kompleks dengan protein *cyclin* (Manson *et al*, 2006).

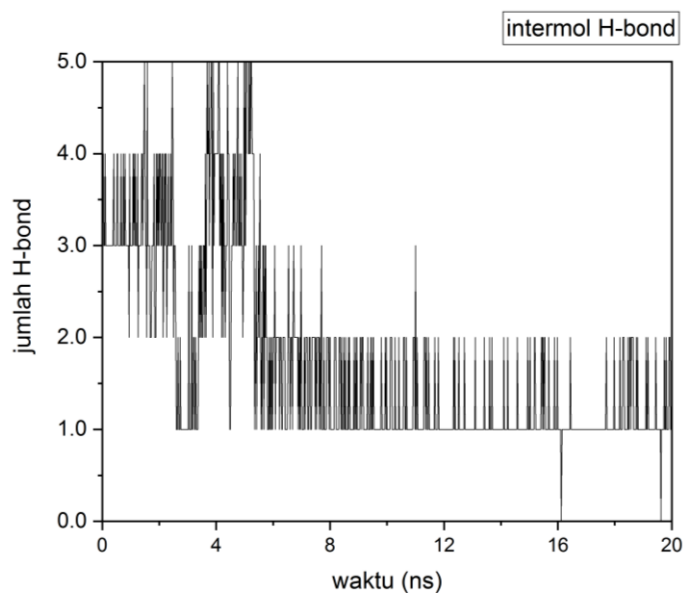


Gambar 4.13. RMSD kompleks protein Cdk-2



Gambar 4.14. RMSF kompleks protein Cdk-2

Berdasarkan tingkat hasil fluktuasi RMSD pada gambar 4.13 terlihat bahwa kompleks protein Cdk-2 yang mampu berikatan secara stabil adalah Trisindolina 3 (warna biru), ditunjukkan dengan rendahnya puncak dan lembah (*peaks and valleys*) dibandingkan dengan Trisindolina 1 (warna hitam) dan Trisindolina 2 (warna merah). Sedangkan RMSF pada gambar 4.14, Cdk-2 memperlihatkan tingkat fleksibilitas dari Cdk-2 cukup tinggi (Roe dan Cheatham, 2013). Saat Cdk-2 membentuk kompleks protein dengan Trisindolina 3, terbentuklah ikatan Hidrogen sehingga membuat Cdk-2 menjadi aktif.



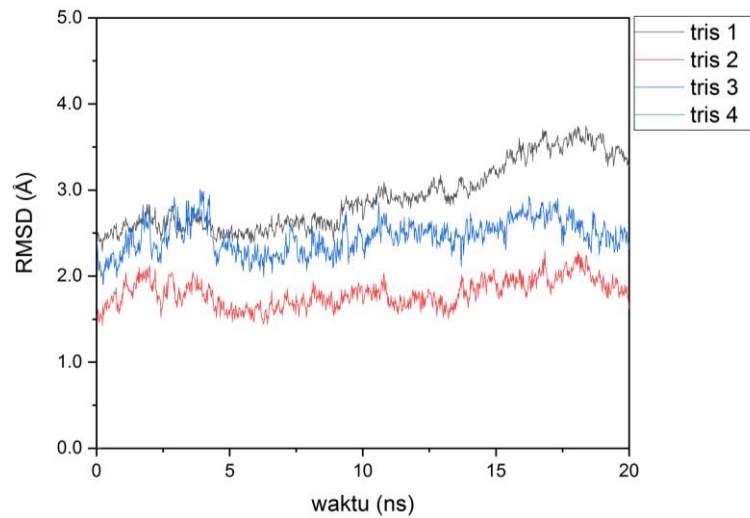
Gambar 4.15 ikatan Hidrogen intermolekuler kompleks protein Cdk-2 dengan Trisindolina 3

Ikatan hidrogen merupakan ikatan dari atom Hidrogen yang menjembatani dua atom yang memiliki keelektronegatifan besar. Ikatan hidrogen yang terbentuk sebelum proses *MD Simulation* kompleks protein Cdk-2 dengan Trisindolina 3 adalah SER_231@H13 (Serine231 dengan Hidrogen13), SER_180@O1 (Serine 180 dengan Oksigen1), SER_180@H13 (Serine180 dengan Hidrogen13), ASN_271 @H1 (Asparagin271 dengan Hidrogen1). Setelah 20 ns hanya terjadi 1 ikatan saja yaitu TYR_178@ H13 (Tyrosine178 dengan Hidrogen13). Perubahan dari ikatan Hidrogen yang terbentuk dapat dilihat dari gambar 4.15. (Roe dan Cheatham, 2013).

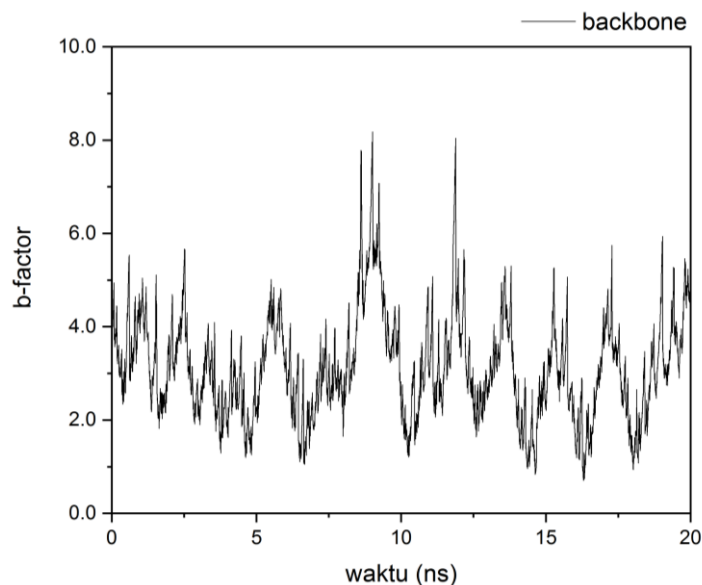
Ketika Cdk-2 yang aktif, akan memacu proses downstream dengan cara memfosforilasi protein spesifik. Cdk-2 yang aktif menstimulasi siklus sel secara terus menerus dengan cara memfosforilasi (dan karena itu mengaktivasi) protein spesifik dalam sel yang diperlukan untuk transisi ke tahap yang selanjutnya. Misalnya: pada awal *prophase* mitosis, pemecahan membran nucleus diinisiasi oleh fosforilasi lamins, yang membentuk bagian dari kerangka nucleus.

4.2.2. *Molecular Dynamics Simulation* kompleks protein p-53

Salah satu peranan p53 adalah untuk memonitor stress selular dan menginduksi apoptosis apabila lesi DNA *irreversible* atau tidak dapat diperbaiki. Apoptosis merupakan proses bertingkat yang diregulasi dengan ketat, ditandai dengan penyusutan sel, kondensasi kromatin, serta fragmentasi sel dan inti. Dalam perkembangannya apoptosis juga sering disebut dengan *programmed cell death*, yang berlangsung terus selama proses kehidupan dengan maksud untuk menjaga homeostasis jaringan, yaitu keseimbangan antara proliferasi dengan kematian sel (Bai & Zhu, 2006; Miettinen, 2009).



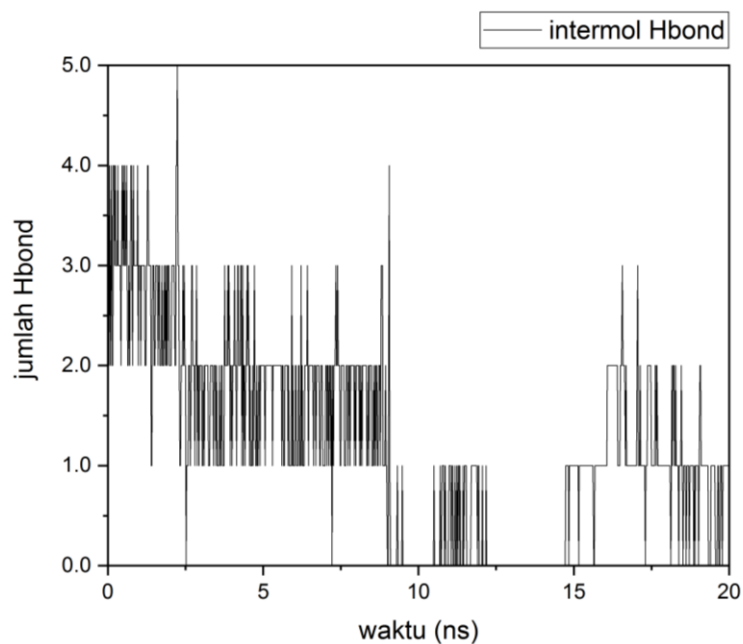
Gambar 4.16. RMSD kompleks protein p-53 dengan senyawa Trisindolina (tris)



Gambar 4.17. RMSF kompleks protein p-53

Hasil RMSD pada gambar 4.16 menunjukkan tingkat fluktuasi terendah pada kompleks protein p-53 dengan Trisindolina 1 (tris 1). Sedangkan pada tris 2 mendekati stabil dan Trisindolina 3 mengalami fluktuasi yang tinggi pada awal simulasi. Pada tris 4 tidak keluar hasil dikarenakan muatan ion dari kompleks protein yang terbentuk tidak dapat dinetralkan (muatan 0). Pada gambar 4.17 menunjukkan RMSF dari protein p-53 mempunyai fleksibilitas dan fluktuasi (*b-factor*) yang tinggi (Roe dan Cheatham, 2013). Berdasarkan hasil hasil fluktuasi

RMSD pada gambar 4.16 dan RMSF pada gambar 4.17, p-53 dapat membentuk kompleks protein dengan Trisindolina 1 secara stabil



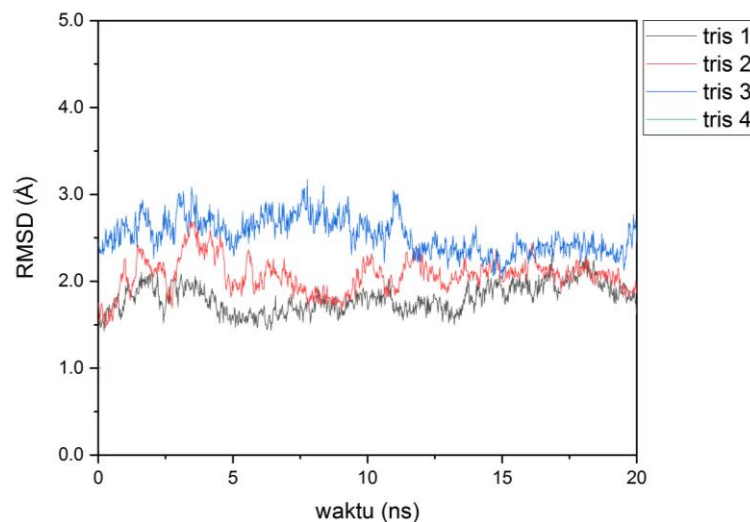
Gambar 4.18 ikatan Hidrogen intermolekuler kompleks protein p-53 dengan Trisindolina 1

Ikatan hidrogen merupakan ikatan dari atom Hidrogen yang menjembatani dua atom yang keelektronegatifannya besar. Ikatan hidrogen yang terbentuk sebelum proses *MD Simulation* kompleks protein p-53 dengan Trisindolina 1 adalah ASN_115@H13 (Asparagin115 dengan Hidrogen13), SER_1@N1 (Serine1 dengan Nitrogen1), ARG_114@H1 (Arginine114 dengan Hidrogen1), ARG_63@N2 (Arginine63 dengan Nitrogen). Setelah 20 ns ikatan Hidrogen yang terbentuk tinggal ASP_113@H13 (Aspartic Acid113 dengan Hidrogen13). Perubahan ikatan Hidrogen yang terbentuk dapat dilihat dari gambar 4.18 (Roe dan Cheatham, 2013)

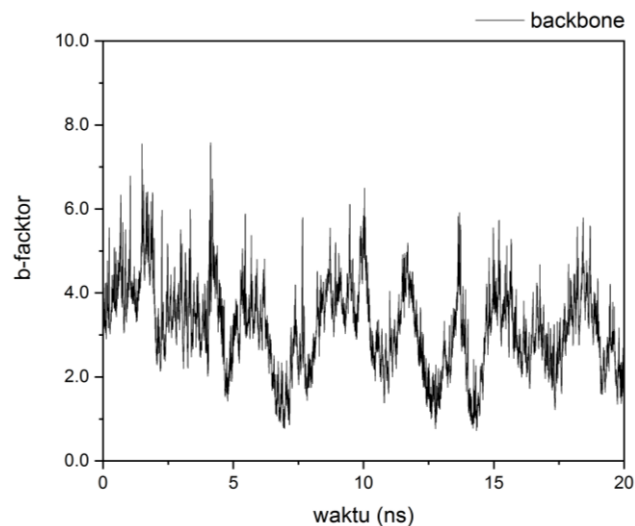
Ketika p53 yang merupakan protein supresor tumor sebagai master regulator pada jalur sinyal yang bervariasi tersebut aktif. Peran protein p53 sebagai supresor tumor termasuk kemampuan untuk menahan siklus sel, perbaikan DNA, dan apoptosis akan berjalan. Aktivitas protein p53 dapat distabilkan melalui penghambatan interaksi antara p53 dengan ligan (Leao, *et al.*, 2013).

4.2.3. *Molecular Dynamics Simulation* kompleks protein Caspase-9

Caspase adalah keluarga enzim protease yang memainkan peran kunci dalam proses seluler seperti apoptosis dan inflamasi (Mace, Riedl dan Salvesen, 2014). Caspase dikenal sebagai eksekutor apoptosis, merupakan cysteine protease selektif yang mengontrol semua tahap apoptosis. Saat Caspase-9 dalam kondisi nonaktif, disebut procaspase-9 dan aktif menjadi caspase-9 (caspase inisiator) (Wong, 2011).



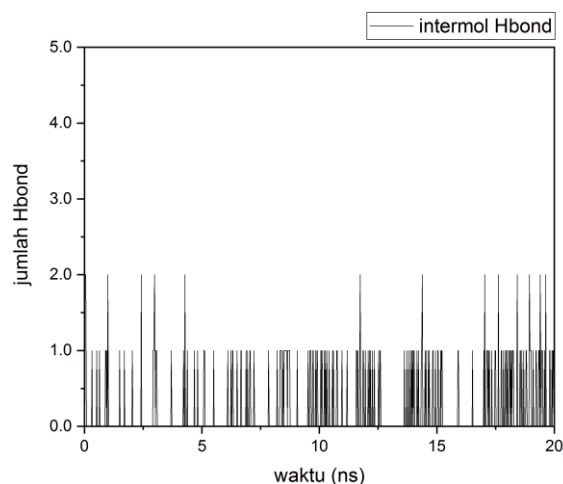
Gambar 4.19. RMSD kompleks protein Caspase-9



Gambar 4.20. RMSF kompleks protein Caspase-9

Berdasarkan hasil hasil fluktuasi RMSD pada gambar 4.19 Caspase-9 dapat membentuk kompleks protein dengan Trisindolina 1 (warna hitam) secara

stabil dan membentuk ikatan hidrogen yang dapat dilihat pada gambar 4.21. RMSF pada gambar 4.20. menunjukkan tingkat fluktuasi dan fleksibilitas dari protein Caspase-9 yang tinggi.



Gambar 4.21 ikatan Hidrogen intermolekuler kompleks protein Caspase-9

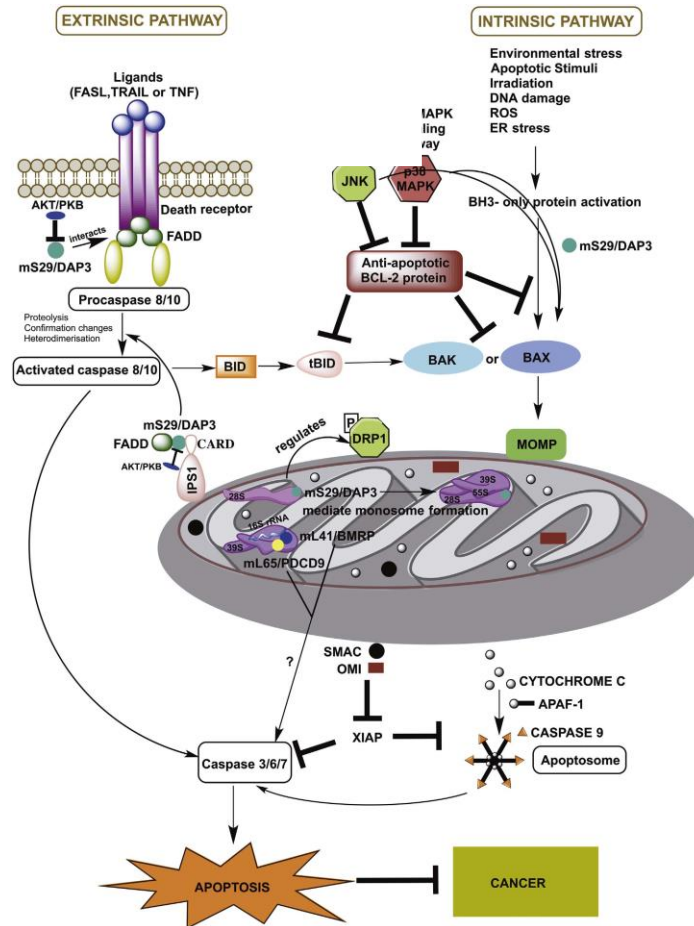
Ikatan hidrogen merupakan ikatan dari atom Hidrogen yang menjembatani dua atom yang keelektronegatifannya besar. Ikatan hidrogen yang terbentuk sebelum proses *MD Simulation* kompleks protein Caspase-9 dengan Trisindolina 1 adalah THR_337@O2 (Threonine337 dengan Oksigen2), PRO_336@H1 (Proline336 dengan Hidrogen1). Setelah 20 ns hanya terjadi 1 ikatan saja yaitu PRO_336@H1 (Proline336 dengan Hidrogen1). Jumlah penurunan dari ikatan Hidrogen yang terbentuk dapat dilihat dari gambar 4.15. (Roe dan Cheatham 2013).

Pada proses *Molecular Dynamics (MD) Simulation*, diperoleh hasil: protein Cdk-2 membentuk ikatan stabil dengan Trisindolina 3, p53 dengan Trisindolina 1, dan Caspase-9 dengan Trisindolina 1.

4.2.4. Trisindolina Potensial

Molecular Dynamics (MD) Simulation yang menggambarkan kondisi dimana suhu, tekanan dan pelarut sesuai dengan sistem biologis di dalam tubuh manusia. Sehingga setelah dilakukan proses MD pada keempat Trisindolina didapatkan ligan yang berpotensi untuk menjadi antikanker adalah Trisindolina 1 dan Trisindolina 3. Kedua kandidat tersebut mampu memicu terjadinya proses

apoptosis. Dimana apoptosis dipicu oleh berbagai jalur sinyal dan diatur oleh ligan ekstrinsik dan intrinsik yang kompleks, terlihat pada gambar 4.22. dibawah ini.



Gambar 4.22. Jalur apoptosis melalui jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik (Kim, 2017)

Ketika Cdk-2 membentuk kompleks protein dengan Trisindolina 3 dan aktif, akan membuat Cdk-2 menginduksi apoptosis melalui jalur intrinsik. Dimana Cdk-2 yang berperan sebagai *apoptotic stimuly* akan menginduksi aktifnya BH-3 dan berlanjut hingga aktifnya BAX dan membran luar mitokondria (MOMP/ *mitochondrial outer membrane permeability*). MOMP menginduksi pelepasan sitokrom c dari ruang mitokondria intermembran (IMS) ke sitosol yang mengaktifkan aktivasi caspase dan apoptosis (Kim *et al*, 2017).

Sedangkan Trisindolina 1 yang membentuk kompleks protein dengan p53 dan mengaktifkan apoptosis melalui jalur ekstrinsik, dimana p53 yang aktif akan menginduksi gen yang mengkode 3 protein transmembran, yaitu: Tumor Necrosis Factor receptor 1 (TNFR1), Fas, dan Death Receptor-5 (DR-5). Protein ini akan mengaktifkan sinyal transduser yang akan mengaktifkan caspase. p53 menginduksi protein Fas melalui ikatan elemen pada promotor dan intron, sedangkan p53 akan mengaktifkan DR-5 dan TNFR1 dalam merespon kerusakan DNA dan melalui caspase 8 akan memicu kematian sel (Elmore, 2007).

Selain dengan p-53, Trisindolina 1 juga mampu membentuk ikatan dengan Caspase-9. Dimana ikatan yang terbentuk tepat di bagian *catalytic domain* yang membuat procaspase-9 aktif menjadi caspase-9. Caspase-9 yang aktif akan menginduksi aktivasi aliran procaspase-3. Protein caspase-3 yang aktif memecah berbagai macam substrat, diantaranya enzim perbaikan DNA seperti poly-ADP Ribose Polymerase (PARP), dan DNA protein kinase yaitu protein struktural seluler dan nukleus, termasuk aparatus mitotik inti, lamina nukleus, dan aktin serta endonuklease, seperti Inhibitor Caspase-Activated Deoxyribonuklease (ICAD) dan skonstituen seluler lainnya (Wong, 2011). Caspase-3 merupakan caspase efektor yang melaksanakan proses apoptosis (Wong, 2011).

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian simulasi dinamika molekuler senyawa Trisindolina 1, 2, 3 dan 4 terhadap mekanisme antikanker melalui jalur apoptosis, dapat disimpulkan bahwa:

1. RMSD kompleks Cdk-2 dengan Trisindolina 3 adalah terbaik, ditunjukkan dengan tingkat fluktuasi nilai yang paling rendah, RMSF menunjukkan Cdk-2 mempunyai tingkat fleksibilitas yang tinggi. Jumlah ikatan Hidrogen intramolekuler berkisar 1 hingga 5
2. RMSD kompleks p-53 dengan Trisindolina 1 adalah terbaik, RMSF menunjukkan p-53 mempunyai tingkat fleksibilitas yang tinggi. Jumlah ikatan Hidrogen intramolekuler berkisar 1 hingga 5
3. RMSD kompleks Caspase-9 dengan Trisindolina 1 adalah terbaik ditunjukkan dengan tingkat fluktuasi nilai yang paling rendah, RMSF menunjukkan Caspase mempunyai tingkat fleksibilitas yang tinggi. Jumlah ikatan Hidrogen intramolekuler berkisar 1 hingga 2
4. ligan yang berpotensi sebagai kandidat antikanker adalah Trisindolina 1 dan Trisindolina 3. Kedua kandidat tersebut mampu memicu terjadinya proses apoptosis

5.2. Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diajukan saran untuk penelitian selanjutnya sebagai berikut:

1. perlu adanya penyelesaian masalah (*troubleshooting*) terhadap beberapa parameter struktur ligan (PDB) file yang bermasalah dikarenakan merupakan struktur ligan yang tergolong baru,
2. dapat dilakukan pengujian secara in-vitro terhadap ligan/obat yang direkomendasikan dari pengujian *Molecular Dynamics Simulation* yang telah dilakukan.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”.

DAFTAR PUSTAKA

- Allen MP, Tildesley DJ (2017). 'Computer Simulation of Liquids (2nd ed.)'.
Oxford: Oxford University Press
- Amber, C. (2016) 'Amber 2016 Reference Manual'.
- Amber, C. (2018) 'Amber 2018 Reference Manual'.
- Agistia, D. D., Purnomo, H., Tegar, M., dan Nugroho, A. E. (2013). Interaksi Senyawa Aktif dari *Aegle marmelos* Correa sebagai Anti Inflamasi dengan Reseptor COX-1 dan COX-2. 'Traditional Medicine Journal'. Vol. 18 (2), 80-87
- Alberts, B. (2002). 'Molecular Biology of The Cell'. 4th. Ed. USA: Garland Science. p. 983-1025
- Appignanesi, A. (2016) 'Hydrogen Bond Dynamic Propensity Studies for Protein Binding dan Drug Design', pp. 1–12
- Arwansyah, Ambarsari, L., dan Sumaryada, T. I. (2014). Simulasi Docking Senyawa Kurkumin dan Analognya Sebagai Inhibitor Reseptor Danrogen pada Kanker Prostat. 'Jurnal Current Biochemistry'. Vol. 1 (1), 11-19
- Bai, L. dan Zhu, W. (2006). p53: Structure, Function dan Therapeutic Applications. *Journal of Cancer Molecules*. Vol. 2 (4), 141-153
- Balunas, M. J. dan Kinghorn, A. D. (2005). Drug discovery from medicinal plants, 'Journal in *Life Sciences*'.
- Bolwell, G. P. (2001). Biochemistry & Molecular Biology of Plants, 'Journal of *Phytochemistry*'. Vol 58(1): 185
- Bray, F. Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R, Torre L dan Jemal A (2018) 'Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence dan mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), pp. 394–424.
- Case, D.A., I.Y. Ben-Shalom, S.R. Brozell, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, V.W.D. Cruzeiro, T.A. Darden, R.E. Duke, D. Ghoreishi, M.K. Gilson, H. Gohlke, A.W. Goetz, D. Greene, R Harris, N. Homeyer, S. Izadi, A. Kovalenko, T. Kurtzman, T.S. Lee, S. LeGrdan, P. Li, C. Lin, J. Liu, T.

- Luchko, R. Luo, D.J. Mermelstein, K.M. Merz, Y. Miao, G. Monard, C. Nguyen, H. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, F. Pan, R. Qi, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, S. Schott-Verdugo, J. Shen, C.L. Simmerling, J. Smith, R. Salomon-Ferrer, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, H. Wei, R.M. Wolf, X. Wu, L. Xiao, D.M. York dan P.A. Kollman (2018), AMBER 2018, University of California, San Francisco.
- ChemAxon. (2019). 'Marvin was used for drawing, displaying and characterizing chemical structures, substructures and reactions, Marvin 19.25.0, 2019. ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>)'
- Cho, Y., S.Gorina, P.D.Jeffrey, N.P.Pavletich. (1994). 'Crystal Structure of A P53 Tumor Suppressor-DNA Complex: Understanding Tumorigenic Mutations'. *Science*. Vol.265(1994)pp:346
- Cruz, F.J.A.L.; Canongia Lopes, J.N.; Calado, J.C.G. (2006). 'Molecular dynamics simulations of molten calcium hydroxyapatite'. *Fluid Phase Eq.* 241 (1–2): 51–58
- Dassault Systèmes BIOVIA. (2019), Discovery studio 2019, San Diego: Dassault Systèmes
- Duffy, M. J., Synnott, N. C. dan Crown, J. (2016) 'p53 in cancer: Ready for therapeutic targeting?', *Translational Cancer Research*, 5(6), pp. 627–631
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, 'Journal of *Toxicologic Pathology*', 35(4), pp. 495–516
- Foster, J.S., Henley, D.C., Ahamed, S., dan Wimalasena, J. (2001). Estrogen dan Cell Cycle Regulation in Breast Cancer. 'Trend in Endocrinology dan Metabolism'. 12(7): 320-327.
- Fulda S, Meyer E. dan Debatin K. M. (2000), Inhibition of TRAIL-Induced Apoptosis by Bcl-2 Overexpression. *Oncogen*; 21:2283-94.
- Gartner, L.P., Hiatt, J.L. (2007). Nucleus. In: Gartner, LP., Hiatt, JL. *Color Textbook of Histology*. 3rd. Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier. p. 61-8
- Goodman, S.R. (2008.) *Medical Cell Biology*. 3rd. Ed. London: Elsevier. p. 273-89
- Hardin, J. Bertoni G., dan Kleinsmith L.J. (2012). 'Becker's World of The Cell Eighth Edition'. Pearson Education, Inc.San Fransisco

- Henrikson, R.C., Kaye, G.L., Mazurkiewics, J.E. (1997). NMS Histology. Baltimore: Williams dan Wilkins. p. 40-5.
- Ikawati, Z. (2016). Pengantar Farmakologi Molekuler. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Jensen, F. (2007). Introduction to Computational Chemistry Second Edition. Odense: Wiley
- Junqueira, LC., Carneiro, J. (2003). Basic Histology. 10th. Ed. USA: Mc Graw-Hill. p. 59-67
- Kamal, A., Srikanth, Y. V. V., Khan, M. N. A., Shaik, T. B., dan Ashraf, M. (2010). Synthesis of 3,3-Diindolyl Oxyindoles Efficiently Catalysed by FeCl₃ dan Their in Vitro Evaluation for Anticancer Activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Vol. 20 (17), 5229–5231
- Khan, K. H., Blanco-Codecido, M. dan Molife, L. R. (2014) ‘Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway’, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Elsevier Ireland Ltd, 90(3), pp. 200–219.
- Knapp, B. (2012). 'An Introduction into Docking dan Molecular Dynamics Simulations'. Vienna: Department for Biosimulation dan Bioinformatics Medical University of Vienna
- Kobayashi, M. S. Aoki, K. Gato, K. Matsumi, M. Korusu, I. dan Kitagawa. (1994), 'Marine Natural Product, XXXIV. Trisindoline, a New Antibiotic Indole Trimer, Produced by Bacterium of *Vibrio* sp.'. *Journal Chem. Pharm. Bull*, Vol. 42, No. 12 : 2449-2451
- Kovács, B. dan Péter, P. (2016) ‘Computing RMSD dan fitting protein structures : how I do it dan how others do it’. Budapest: Pázmány Péter Catholic University
- Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. (1999),” Comparative Analysis of The Effects of Flavonoids on Proliferation, Cytotoxicity, dan Apoptosis in Human Colon Cancer Cell Lines”, *European Journal of Nutrition*; 38:133-42.
- Li, P., Zhou L, Zhao T, Liu X., Zhang P, Liu Y, Zheng X, dan Li Q. (2017) ‘Caspase-9: Structure, mechanisms dan clinical application’, *Oncotarget*, 8(14), pp. 23996–24008.
- Lyskov, S., dan Gray, J.J. (2008). The Rosetta Dock server for local protein-protein

- docking. *Nucleic Acids Res.* 36: 233-238.
- Mace, P. D., Riedl, S. J. dan Salvesen, G. S. (2014) 'Caspase Enzymology dan Activation Mechanisms', *Methods in Enzymology*. Academic Press, 544, pp. 161-178.
- Manson, A., Jones, E., dan Morris, A. (2006). The Molecular Basis of Genetis. In: Cell Biology dan Genetics. 2nd. Ed. London: Mosby. p. 72-7.
- Mansoori, B., Mohammadi A., Davudian S., Shirjang S., dan Baradaran B. (2017). 'The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review'. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. vol 7(3), pp: 339-348
- Maximov, G.K., (2008). The Role of p53 Tumor-Suppressor Protein in Apoptosis dan Carcinogenesis. *Biotechnol Review* 22:664-668.
- Miettinen, S. 2009. Targetting the Growth of Ovarian Cancer Cell. Dissertation. Finland: University of Tampere.
- Motiejunas, D. dan Wade, R. (2006). Structural, Energetics, dan Dynamics Aspect of Ligand-Receptor Interactions. In J. B. Taylor dan D. J. Triggle (Eds.), *Comprehensive Medicinal Chemistry II Volume 4: Computer-Assisted Drug Design*. Philadelphia: Elsevier
- Nurhayati, A. P. D., Santoso, M., Setiawan, E., & Lianingsih, F. (2017). Molecular Docking of Alkaloid Compound SA2014 from Marine Sponge *Cinachyrella anomala* towards P53 Protein. 'International Journal of Drug Discovery'. Vol. 8 (1), 247-249
- Nurse, P. (2000). A Long Twentieth Century of The Cell Cycle dan Beyond. *Cell*. 100: 71-78.
- Pollard, P. J. Spencer-Dene B, Shukla D, Howarth K, Nye E, El-Bahrawy M, dan Tomlinson I.P.M. (2007) 'Article Targeted Inactivation of Fh1 Causes Proliferative Renal Cyst Development dan Activation of the Hypoxia Pathway', (April), pp. 311-319.
- Ramanathan, K. V. K. (2015) 'Exploring the impact of F270V mutation in the β -tubulin (*Bos Taurus*) structure dan its function : a computational perspective', pp. 1003-1011. doi: 10.1007/s10529-015-1765-9.
- Rastogi RP, Richa, dan Sinha RP. (2009), 'Apoptosis: Molecular Mechanism dan Pathogenicity', *EXCLI Journal*;8:155-81.

- Richardson, C M., P.Dokurno, J.B.Murray, A.E.Surgenor. (2007). 'Discovery of A Potent Cdk2 Inhibitor with A Novel Binding Mode, Using Virtual Screening And Initial, Structure-Guided Lead Scoping'. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Vol. 17(14). pp:3880-3885
- Roe, Daniel R. and Thomas E. Cheatham, III, (2013) "PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data". *J. Chem. Theory Comput.*, 9 (7), pp 3084-3095.
- Rungnim, C. Phunpee¹ S. Kunaseth S. Namuangruk S. dan T. Rungrotmongkol (2015) 'Co-solvation effect on the binding mode of the α -mangostin/ β -cyclodextrin inclusion complex', *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 11, pp. 2306–2317.
- Ruddon, R.W. (2007). *Cancer Biology*. New York: Oxford University Press.
- Tambunan, U. S. F. (2011). Computational Design of Disulfide Cyclic Peptide as Potential Inhibitor of Complex NS2B-NS# Dengue Virus Protease. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 10 (57), 12281-12290
- Tegar, M. dan Purnomo, H. (2013). Tea Leaves Extracted as Anti-malaria Based on Molecular Docking PLANTS. *Procedia Environmental Sciences*. Vol. 17, 188-194.
- Thomas D. Pollard, William C. Earnshaw, Jennifer Lippincott-Schwartz, Graham T. Johnson. (2017). *Cell biology* Third edition. Elsevier, Philadelphia, PA.
- Santoso, M dan Mursyidah, Y. (2010), Sintesis dan Sitotoksisitas 5-Bromo-3-Hidroksi-3-(1H-Indol-3-Il)Indolin-2-On dan 3-Hidroksi-5- Kloro-1-Metil-3-(1H-Indol-3-Il)Indolin-2-On Terhadap Sel Kanker Serviks HeLa dan Sel Kanker Kolon WiDr, Skripsi, Program Studi S1 Kimia, Institut Teknologi Sepuluh Nopember : Surabaya
- Schneider, G. dan Baringhaus, K. H. (2008). *Molecular Design: Concepts dan Applications*. Weinheim: Wiley-VCH
- Shiozaki, E.N., J.Chai, D.J.Rigotti, S.J.Riedl, P.Li, S.M.Srinivasula. (2003). 'Mechanism Of Xiap-Mediated Inhibition Of Caspase-9'. *Molecular Cell*. Vol 11(2):519-527
- Sri, R. T., Sathyanathan, V., Kumar, D. P., & Chowdari, M. (2011). Docking Studies on Synthesized Quinazoline Compounds Against Androgen

- Receptor. 'The International Journal of Pharmacy & Industrial Research'. Vol. 1 (4), 266-269
- Stephen K B., Helen M. Berman. (2019) 'RCSB Protein Data Bank: biological macromolecular structures enabling research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology and energy'. *Nucleic Acids Research* 47: D464–D474
- Trott, O., A. J. Olson, 'AutoDock Vina: improving the speed dan accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization dan multithreading' *Journal of Computational Chemistry* 31 (2010) 455-461
- Wong R. (2011), Apoptosis in Cancer: From Pathogenesis to Treatment, 'Journal of Experimental & Clinical Cancer Research'. 30(87):1-14.
- Yoo, M. Choi, S. Young, K. Hwang, G. Chang, J. Kim, D. Zylstra, G dan Kim, E. (2008), Trisindoline Synthesis dan Anticancer Activity, 'Biochemical dan Biophysical Research Communication', 376 : 96-99.ity, *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*, Vol. 20 : 5229-5231.
- Zhao, K., Chai, X., Johnston, K., Clements, A., & Marmorstein, R. (2001). Crystal Structure of the Mouse p53 Core DNA-Binding Domain at 2.7Å Resolution. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 276 (15), 12120–12127

LAMPIRAN

Lampiran 1

Pemasangan Autodock Vina

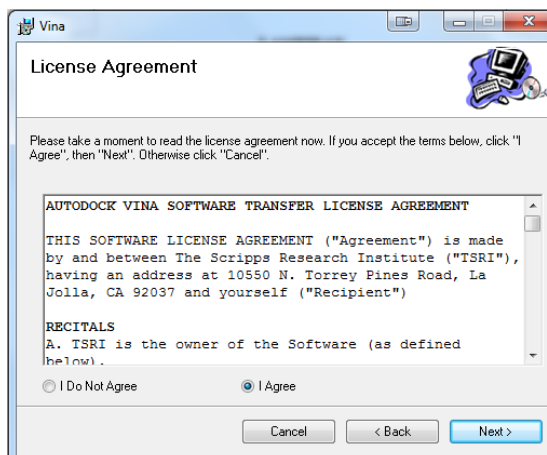
1. Autodock Vina dapat diunduh pada laman berikut:

http://vina.scripps.edu/download/autodock_vina_1_1_2_win32.msi

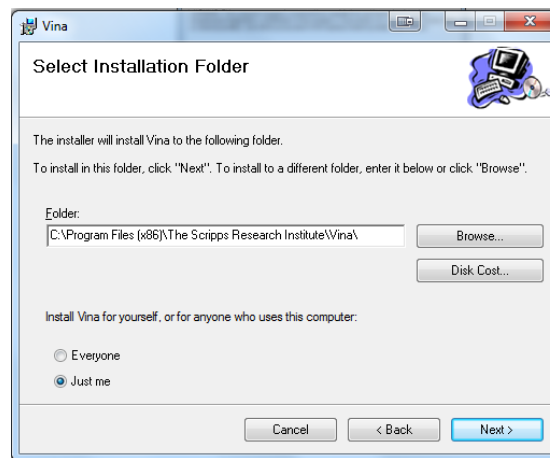
2. Buka pada autodock_vina_1_1_2_win32.msi yang telah diunduh dan akan muncul tampilan seperti di bawah ini dan klik "Next"



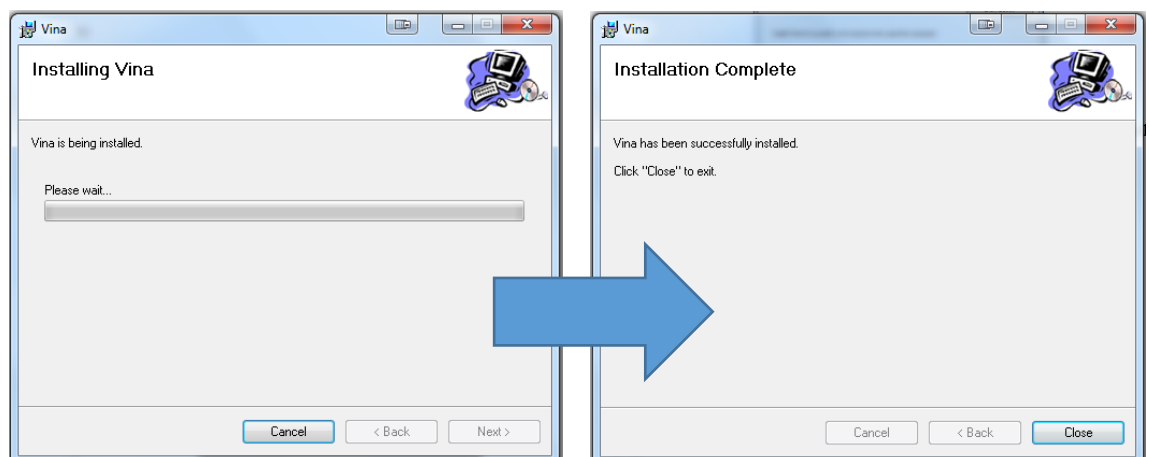
3. Akan muncul tampilan seperti di bawah ini dan dipilih "I agree" dan klik "Next"



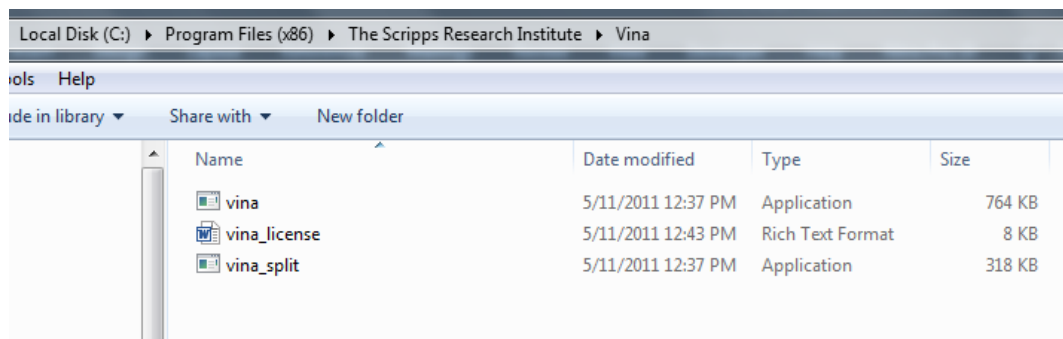
4. Pada kotak dialog akan muncul tampilan untuk memilih lokasi menyimpan perangkat lunak Autodock Vina dan klik “Next”



5. Proses pemasangan akan berjalan dan ditunggu hingga selesai. Selanjutnya akan muncul kotak dialog bahwa proses telah selesai dan klik “Close”



6. Proses pemasangan Autodock Vina selesai dapat dilihat pada lokasi penyimpanan di “C:\Program Files (x86)\The Scripps Research Institute\Vina\”



7. Program Autodock Vina dapat dijalankan melalui Command Prompt pada Windows dengan perintah:

```
cd ..\..\..\n
cd C:\Program Files (x86)\The Scripps Research
Institute\Vina\  

C:\Program Files (x86)\The Scripps Research
Institute\Vina\vina.exe --config conf.txt --log log.txt
```

8. Proses *molecular docking* akan berjalan dan menghasilkan output dalam satu file dalam format .pdbqt untuk memisahkannya dapat menggunakan perangkat Autodock Vina Split

```
cd ..\..\..\n
cd C:\Program Files (x86)\The Scripps Research
Institute\Vina\  

C:\Program Files (x86)\The Scripps Research Institute\Vina\  

vina_split.exe --input out.pdbqt
```

Lampiran 2

Konfigurasi dan Hasil Autodock Vina

• **Cdk-2 (2uze)**

```
receptor = 2uze.pdbqt  
ligand = tris(1-4).pdbqt  
out = 2uze_tris(1-4)_out.pdbqt  
center_x = 0  
center_y = -14  
center_z = 41  
size_x = 65  
size_y = 65  
size_z = 65  
num_modes = 100
```

• **p-53(1tup)**

```
receptor = 1tup.pdbqt  
ligand = tris1.pdbqt  
out = 1tup_tris1_out.pdbqt  
center_x = 68  
center_y = 13  
center_z = 89  
size_x = 60  
size_y = 60  
size_z = 60  
num_modes = 100
```

• **caspase-9(1nw9)**

```
receptor = 1tup.pdbqt  
ligand = tris1.pdbqt  
out = 1tup_tris1_out.pdbqt  
center_x = 68  
center_y = 13
```

```
center_z = 89  
size_x = 60  
size_y = 60  
size_z = 60  
num_modes = 100
```

Hasil Molecular Docking

- cdk-2 (2uze)

```
#####
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite: #
# #
# O. Trott, A. J. Olson, #
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking #
# with a new scoring function, efficient optimization and #
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010) #
# 455-461 #
# #
# DOI 10.1002/jcc.21334 #
# #
# Please see http://vina.scripps.edu for more information. #
#####
```

| tris 1 | | | | tris 2 | | | |
|--------|------------|---------------------|-----------|--------|------------|---------------------|-----------|
| mode | affinity | dist from best mode | | mode | affinity | dist from best mode | |
| | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b. | | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b. |
| 1 | -7.4 | 0.000 | 0.000 | 1 | -7.2 | 0.000 | 0.000 |
| 2 | -7.3 | 29.541 | 32.668 | 2 | -7.0 | 1.302 | 2.142 |
| 3 | -7.2 | 2.662 | 5.512 | 3 | -7.0 | 29.855 | 33.177 |
| 4 | -7.2 | 2.388 | 5.419 | 4 | -6.8 | 2.229 | 5.609 |
| 5 | -7.2 | 2.249 | 5.968 | 5 | -6.7 | 40.244 | 42.887 |
| 6 | -7.1 | 26.644 | 29.860 | 6 | -6.6 | 1.684 | 2.514 |
| 7 | -7.1 | 29.784 | 32.678 | 7 | -6.6 | 34.407 | 37.917 |
| 8 | -7.1 | 16.254 | 19.883 | 8 | -6.5 | 29.802 | 33.413 |
| 9 | -7.0 | 41.520 | 44.619 | 9 | -6.5 | 16.557 | 19.216 |
| 10 | -7.0 | 35.182 | 38.458 | 10 | -6.4 | 15.247 | 18.296 |
| 11 | -6.9 | 17.203 | 19.112 | 11 | -6.4 | 2.743 | 6.048 |
| 12 | -6.9 | 26.835 | 30.122 | 12 | -6.4 | 40.618 | 44.388 |
| 13 | -6.8 | 7.691 | 10.431 | 13 | -6.4 | 41.246 | 44.810 |
| 14 | -6.7 | 2.031 | 5.854 | 14 | -6.4 | 41.087 | 44.153 |
| 15 | -6.6 | 40.846 | 43.560 | 15 | -6.4 | 22.490 | 25.619 |
| 16 | -6.6 | 13.071 | 16.496 | 16 | -6.3 | 15.269 | 18.135 |
| 17 | -6.6 | 8.539 | 11.158 | 17 | -6.2 | 16.860 | 19.937 |
| 18 | -6.6 | 43.088 | 45.624 | 18 | -6.2 | 22.181 | 25.321 |
| 19 | -6.6 | 16.116 | 19.366 | 19 | -6.2 | 29.752 | 33.445 |
| 20 | -6.6 | 42.694 | 44.994 | 20 | -6.2 | 28.532 | 32.241 |

| tris 3 | | | | tris 4 | | | |
|--------|------------|---------------------|-----------|--------|------------|---------------------|-----------|
| mode | affinity | dist from best mode | | mode | affinity | dist from best mode | |
| | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b. | | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b. |
| 1 | -8.0 | 0.000 | 0.000 | 1 | -6.9 | 0.000 | 0.000 |
| 2 | -7.7 | 31.040 | 33.873 | 2 | -6.6 | 30.307 | 33.570 |
| 3 | -7.5 | 5.727 | 9.432 | 3 | -6.5 | 8.789 | 11.524 |
| 4 | -7.4 | 22.337 | 24.226 | 4 | -6.4 | 15.066 | 18.592 |
| 5 | -7.3 | 4.704 | 7.690 | 5 | -6.3 | 1.037 | 2.165 |
| 6 | -7.3 | 6.759 | 9.336 | 6 | -6.2 | 34.429 | 38.085 |
| 7 | -7.3 | 21.789 | 23.757 | 7 | -6.2 | 40.969 | 44.599 |
| 8 | -7.2 | 4.691 | 7.623 | 8 | -6.2 | 29.823 | 33.658 |
| 9 | -7.2 | 31.580 | 33.311 | 9 | -6.2 | 40.402 | 43.535 |
| 10 | -7.2 | 27.652 | 29.580 | 10 | -6.1 | 42.357 | 46.311 |
| 11 | -7.2 | 30.858 | 32.815 | 11 | -6.1 | 40.802 | 43.759 |
| 12 | -7.1 | 10.044 | 12.327 | 12 | -6.1 | 34.829 | 38.424 |
| 13 | -7.1 | 29.610 | 33.151 | 13 | -6.0 | 22.820 | 26.269 |
| 14 | -7.1 | 5.373 | 9.010 | 14 | -6.0 | 25.259 | 28.397 |
| 15 | -7.1 | 29.518 | 32.276 | 15 | -6.0 | 19.050 | 22.901 |
| 16 | -6.9 | 30.033 | 31.583 | 16 | -5.9 | 35.360 | 39.145 |
| 17 | -6.9 | 22.422 | 24.589 | 17 | -5.8 | 31.152 | 34.173 |
| 18 | -6.9 | 34.776 | 37.590 | 18 | -5.8 | 29.990 | 33.815 |
| 19 | -6.9 | 37.749 | 41.061 | 19 | -5.8 | 34.944 | 37.560 |
| 20 | -6.9 | 39.371 | 42.019 | 20 | -5.8 | 22.218 | 25.412 |

- p-53 (1tup)

tris 1

mode | affinity | dist from best mode
| (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.

| mode | affinity (kcal/mol) | dist from best mode rmsd l.b. | dist from best mode rmsd u.b. |
|------|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 1 | -8.3 | 0.000 | 0.000 |
| 2 | -7.8 | 2.760 | 3.383 |
| 3 | -7.5 | 2.373 | 5.244 |
| 4 | -7.5 | 1.495 | 5.176 |
| 5 | -7.5 | 2.100 | 5.346 |
| 6 | -7.5 | 2.681 | 6.117 |
| 7 | -7.3 | 18.915 | 22.737 |
| 8 | -7.3 | 2.748 | 5.507 |
| 9 | -7.3 | 2.960 | 6.188 |
| 10 | -7.2 | 17.457 | 21.228 |
| 11 | -7.2 | 3.187 | 5.787 |
| 12 | -7.1 | 2.950 | 6.008 |
| 13 | -7.1 | 3.212 | 6.363 |
| 14 | -7.0 | 3.268 | 6.290 |
| 15 | -7.0 | 23.770 | 27.373 |
| 16 | -6.9 | 3.192 | 6.486 |
| 17 | -6.8 | 23.595 | 27.463 |
| 18 | -6.8 | 25.646 | 28.611 |
| 19 | -6.7 | 2.558 | 5.776 |
| 20 | -6.6 | 18.233 | 21.499 |

tris 2

mode | affinity | dist from best mode
| (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.

| mode | affinity (kcal/mol) | dist from best mode rmsd l.b. | dist from best mode rmsd u.b. |
|------|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 1 | -7.9 | 0.000 | 0.000 |
| 2 | -7.5 | 2.114 | 5.367 |
| 3 | -7.3 | 2.658 | 5.931 |
| 4 | -7.3 | 2.592 | 6.323 |
| 5 | -7.3 | 25.272 | 28.703 |
| 6 | -7.3 | 2.411 | 5.469 |
| 7 | -7.2 | 2.350 | 5.890 |
| 8 | -7.2 | 2.602 | 5.919 |
| 9 | -7.1 | 18.160 | 22.195 |
| 10 | -6.9 | 2.689 | 5.877 |
| 11 | -6.8 | 2.917 | 4.812 |
| 12 | -6.5 | 23.492 | 26.947 |
| 13 | -6.3 | 17.926 | 22.017 |
| 14 | -6.3 | 25.472 | 28.997 |
| 15 | -6.2 | 2.718 | 6.400 |
| 16 | -6.2 | 3.577 | 6.441 |
| 17 | -6.1 | 19.981 | 23.958 |
| 18 | -5.9 | 2.881 | 5.728 |
| 19 | -5.9 | 3.181 | 5.079 |
| 20 | -5.8 | 25.556 | 29.075 |

tris 3

mode | affinity | dist from best mode
 | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.

| mode | affinity (kcal/mol) | dist from best mode rmsd l.b. | dist from best mode rmsd u.b. |
|------|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 1 | -8.1 | 0.000 | 0.000 |
| 2 | -7.9 | 23.964 | 27.422 |
| 3 | -7.8 | 25.209 | 27.109 |
| 4 | -7.8 | 3.376 | 7.991 |
| 5 | -7.8 | 22.786 | 26.806 |
| 6 | -7.7 | 1.660 | 2.707 |
| 7 | -7.6 | 25.722 | 27.795 |
| 8 | -7.5 | 23.393 | 27.280 |
| 9 | -7.4 | 21.750 | 24.608 |
| 10 | -7.4 | 23.152 | 27.065 |
| 11 | -7.4 | 4.202 | 6.696 |
| 12 | -7.3 | 2.640 | 6.007 |
| 13 | -7.2 | 8.298 | 13.315 |
| 14 | -7.2 | 4.068 | 8.422 |
| 15 | -7.2 | 1.867 | 3.535 |
| 16 | -7.1 | 3.329 | 5.845 |
| 17 | -7.1 | 4.581 | 8.165 |
| 18 | -7.1 | 13.526 | 16.430 |
| 19 | -7.0 | 22.007 | 25.016 |
| 20 | -7.0 | 15.677 | 19.095 |

tris 4

mode | affinity | dist from best mode
 | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.

| mode | affinity (kcal/mol) | dist from best mode rmsd l.b. | dist from best mode rmsd u.b. |
|------|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 1 | -7.5 | 0.000 | 0.000 |
| 2 | -7.4 | 19.119 | 22.738 |
| 3 | -7.4 | 2.499 | 6.244 |
| 4 | -7.4 | 23.750 | 27.809 |
| 5 | -7.3 | 1.068 | 2.336 |
| 6 | -7.0 | 1.318 | 3.155 |
| 7 | -7.0 | 3.188 | 5.938 |
| 8 | -6.9 | 1.894 | 3.281 |
| 9 | -6.7 | 2.150 | 5.184 |
| 10 | -6.7 | 2.962 | 6.349 |
| 11 | -6.6 | 3.113 | 5.897 |
| 12 | -6.5 | 21.204 | 25.642 |
| 13 | -6.5 | 3.462 | 6.438 |
| 14 | -6.5 | 2.463 | 5.490 |
| 15 | -6.5 | 20.698 | 24.054 |
| 16 | -6.5 | 25.414 | 27.704 |
| 17 | -6.5 | 22.299 | 25.889 |
| 18 | -6.4 | 1.426 | 2.561 |
| 19 | -6.3 | 2.219 | 5.936 |
| 20 | -6.3 | 2.382 | 5.871 |

- Caspase-9 (1nw9)

tris 1

mode | affinity | dist from best mode
 | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.

-----+-----+-----+-----

| | | | |
|----|------|--------|--------|
| 1 | -7.3 | 0.000 | 0.000 |
| 2 | -7.3 | 36.582 | 40.509 |
| 3 | -7.2 | 8.047 | 11.656 |
| 4 | -7.2 | 39.665 | 43.043 |
| 5 | -7.2 | 40.111 | 43.493 |
| 6 | -7.1 | 33.517 | 36.101 |
| 7 | -7.1 | 37.248 | 40.960 |
| 8 | -7.1 | 18.976 | 21.529 |
| 9 | -7.1 | 7.826 | 11.098 |
| 10 | -7.0 | 7.068 | 10.644 |
| 11 | -6.9 | 34.079 | 37.718 |
| 12 | -6.8 | 36.870 | 40.985 |
| 13 | -6.8 | 10.436 | 14.525 |
| 14 | -6.7 | 36.459 | 38.694 |
| 15 | -6.7 | 36.103 | 39.454 |
| 16 | -6.6 | 7.158 | 10.393 |
| 17 | -6.6 | 35.752 | 38.432 |
| 18 | -6.4 | 34.750 | 38.952 |
| 19 | -6.4 | 3.582 | 5.816 |
| 20 | -6.3 | 35.209 | 39.161 |

tris 2

mode | affinity | dist from best mode
 | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.

-----+-----+-----+-----

| | | | |
|----|------|--------|--------|
| 1 | -7.7 | 0.000 | 0.000 |
| 2 | -7.5 | 36.224 | 39.100 |
| 3 | -7.4 | 33.191 | 35.649 |
| 4 | -7.4 | 35.401 | 38.505 |
| 5 | -7.4 | 2.133 | 6.112 |
| 6 | -7.3 | 24.459 | 27.337 |
| 7 | -7.3 | 33.375 | 35.881 |
| 8 | -7.3 | 2.141 | 5.749 |
| 9 | -7.2 | 8.715 | 12.770 |
| 10 | -7.1 | 1.945 | 5.636 |
| 11 | -7.1 | 32.098 | 34.856 |
| 12 | -7.0 | 37.445 | 40.704 |
| 13 | -7.0 | 2.085 | 5.466 |
| 14 | -6.9 | 36.796 | 39.762 |
| 15 | -6.9 | 2.024 | 5.935 |
| 16 | -6.8 | 24.390 | 27.252 |
| 17 | -6.8 | 9.847 | 12.712 |
| 18 | -6.8 | 34.247 | 37.014 |
| 19 | -6.7 | 34.529 | 37.281 |
| 20 | -6.7 | 23.161 | 25.973 |

tris 3

mode | affinity | dist from best mode
 | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.

| mode | affinity (kcal/mol) | dist from best mode rmsd l.b. | dist from best mode rmsd u.b. |
|------|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 1 | -7.9 | 0.000 | 0.000 |
| 2 | -7.5 | 2.352 | 6.097 |
| 3 | -7.5 | 10.699 | 13.096 |
| 4 | -7.4 | 10.545 | 12.439 |
| 5 | -7.4 | 34.575 | 37.069 |
| 6 | -7.3 | 34.285 | 35.880 |
| 7 | -7.1 | 12.218 | 14.797 |
| 8 | -7.1 | 33.519 | 36.148 |
| 9 | -7.1 | 12.579 | 15.020 |
| 10 | -7.1 | 35.483 | 37.614 |
| 11 | -7.0 | 10.658 | 13.505 |
| 12 | -7.0 | 12.046 | 15.047 |
| 13 | -7.0 | 10.542 | 12.706 |
| 14 | -7.0 | 30.316 | 32.365 |
| 15 | -6.9 | 5.997 | 8.896 |
| 16 | -6.9 | 34.177 | 37.228 |
| 17 | -6.9 | 33.936 | 36.933 |
| 18 | -6.9 | 12.193 | 15.199 |
| 19 | -6.8 | 1.829 | 3.064 |
| 20 | -6.7 | 17.291 | 19.652 |

tris 4

mode | affinity | dist from best mode
 | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.

| mode | affinity (kcal/mol) | dist from best mode rmsd l.b. | dist from best mode rmsd u.b. |
|------|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 1 | -7.4 | 0.000 | 0.000 |
| 2 | -7.1 | 1.954 | 5.788 |
| 3 | -7.1 | 1.263 | 3.193 |
| 4 | -6.9 | 35.551 | 38.269 |
| 5 | -6.9 | 1.110 | 2.497 |
| 6 | -6.8 | 9.751 | 12.864 |
| 7 | -6.7 | 23.149 | 25.597 |
| 8 | -6.7 | 9.962 | 13.554 |
| 9 | -6.6 | 8.061 | 11.912 |
| 10 | -6.6 | 2.143 | 5.721 |
| 11 | -6.6 | 34.598 | 37.231 |
| 12 | -6.5 | 32.944 | 35.018 |
| 13 | -6.5 | 33.297 | 35.761 |
| 14 | -6.4 | 34.361 | 36.984 |
| 15 | -6.4 | 38.612 | 40.895 |
| 16 | -6.3 | 7.988 | 11.773 |
| 17 | -6.3 | 38.199 | 40.841 |
| 18 | -6.3 | 38.346 | 40.793 |
| 19 | -6.3 | 37.822 | 40.425 |
| 20 | -6.2 | 36.761 | 39.397 |

Lampiran 3

*MD Simulation***Persiapan Ligan**

1. **Unduh** struktur ligan/molecule dari laman PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trisindoline> dan click Download > select PDB format > save.

Atau dari struktur yang telah digambar strukturnya.

2. **Optimize** stuktur ligan/molecule
 - 1.) Konversi struktur ligan dalam format .gjf menggunakan perangkat lunak GaussView dan ubah judul header file .gjf seperti di bawah ini::

```
%chk=tris1.chk
%mem=1GB
%NPROCShared=7
#p HF/6-31G* opt scf=direct
```

- 2.) Jalankan script file -- g09_cpu.job

3. **Run Single point energy**

1.) Kumpulkan file .log dari optimisasi (langkah sebelumnya) dan simpan ke format .gjf menggunakan perangkat lunak GaussView dan ubah judul header file .gjf seperti di bawah ini:

```
%chk= tris1_ESP.chk
%mem=1GB
%NPROCShared=7
#p HF/6-31G* SCF=tight Test Pop=MK , iop(6/33=2)
iop(6/42=6)
```

- 2.) Jalankan script g09_cpu.job

4. **Persiapan file parameter dengan mengikuti perintah:**

```
1. antechamber -i tris1_OPT.log -fi gout -o
   tris1_ESP.prepin -fo prepi -at amber -c resp &
```

```
2. parmchk -i tris1_ESP.prepin -f prepi -o
   tris1_ESP.frcmod
```

output parameter yang didapatkan berupa: 1. file in .prepin, 2. .frcmod dan 3. NEWPDB.PDB

Persiapan Protein

1. **Kumpulkan file pdb dari kompleks struktur ligan dan protein**
2. **Penambahan Hydrogen** -- sebelum menambahkan hidrogen, perbaiki penomoran semua atom ligan dalam file kompleks dan hapus semua hidrogen.
 - Input files yang diperlukan -- ligan dan protein complex.pdb file, .prepin file, .frcmod file, t_addH.in file
 - Gunakan perintah -- tleap_f t_addH.in
 - Output files -- .crd, .pdb dan .top files
3. **Minimize Hydrogen** –
 - Input files yang diperlukan -- *_minh.crd, .pdb dan .top files, .prepin file, .frcmod file, minH.in file, minimize.job file
 - Rubah penomoran residu pada file -- minH.in file
 - Gunakan perintah -- qsub minimize.job
 - output files -- *_minH.restrt file
 - konversikan file .restrt ke file .pdb dengan perintah -- ambpdb -p *.top -c *.restrt > .pdb
4. **Add Water** -
 - Input files yang diperlukan -- minH.pdb file, .frcmod, .prepin, addwater.in file.
 - Gunakan perintah -- tleap_f t_addwater.in
 - output files -- *_addwater.crd, .pdb dan .top files
5. **Minimize Water** –
 - Input files yang diperlukan -- minwater.in file1 dan minwater.in file2, addwater.prmp, addwater.rst7 files, minwat.job file
 - Gunakan perintah -- qsub minwater.job
 - output files -- *_minwater.restrt
6. **MD simulation** –
 - Input files yang dibutuhkan antara lain:
 - *_addwater.crd, .pdb dan .top files ,
 - *_minwater.restrt, md.job file1 dan md.job file2

“halaman ini sengaja dikosongkan”

BIODATA PENULIS



Penulis dilahirkan di Trenggalek pada Juni 1994. Penulis merupakan anak pertama dari dua bersaudara dari pasangan Bapak Dari dan Ibu Sumarti. Penulis memulai pendidikan dasar di SDN 1 Ngranti, Boyolangu, Tulungagung. Kemudian penulis melanjutkan jenjang selanjutnya di SMP Negeri 1 Tulungagung. Setelah lulus, penulis melanjutkan jenjang selanjutnya di SMAN 1 Kauman, Tulungagung.

Penulis melanjutkan jenjang pendidikan Strata 1 di Departemen Biologi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya dan Lulus pada tahun 2018 dengan Tugas Akhir dalam Bidang Bioteknologi dan Bioenergi dengan judul “Pemanfaatan Mikroalga *Spirulina* sp. dan *Spirogyra* sp. sebagai Catu Daya Ponsel Pintar”. Penulis berkesempatan untuk melanjutkan pendidikan ke Strata 2 di Departemen Biologi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya dengan beasiswa *Fresh Graduate* ITS Tahun 2018. Pada awal 2019, Penulis berkesempatan untuk berkuliah di *Department of Biochemistry, Chulalongkorn University* dalam program pertukaran mahasiswa dengan beasiswa dari *ASEAN scholarship Chulalongkorn University* selama 1 semester