

LAPORAN PENELITIAN

**STUDI DINAMIKA MOLEKULAR KAEMPFEROL DARI DAUN MURBEI
(*Morus alba* L.) SEBAGAI PENGHAMBAT XANTIN OKSIDASE PADA
HIPERURISEMIA**

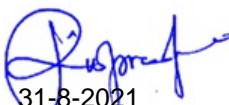


Tim Pengusul

Ketua Peneliti : Rizky Arcintha Rachmania, M.Si. (0305018603)

Anggota Peneliti : Dr. Apt. Hariyanti, M.Si., (0311097705)

PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI DAN SAINS
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF. DR. HAMKA
2021


31-8-2021

ABSTRAK

Hiperurisemia adalah kondisi dimana terjadi peningkatan kadar asam urat diatas normal sehingga dapat menyebabkan penumpukan kristal asam urat di jaringan. Xantin oksidase merupakan enzim yang berperan dalam mengkatalisis oksidasi hipoxantin menjadi xantin dan asam urat. Obat tradisional yang digunakan secara empiris untuk menurunkan asam urat adalah dau murbei. Kaempferol pada daun murbei telah diketahui memiliki afinitas terhadap enzim yang menghambat produksi asam urat yaitu xantin oksidase secara penambatan molekul, namun belum diketahui kestabilan kaempferol dalam berinteraksi dengan xantin oksidase. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kestabilan kempferol terhadap enzim xantin oksidase. Metode pengujian kestabilan menggunakan simulasi dinamika molekular dengan *software* GROMACS dengan waktu pergerakan atom 10 ns. Hasil dari pengujian parameter simulasi dinamika molekular yaitu RMSD, RMSF dan energi potensial menunjukkan bahwa kaempferol menunjukkan afinitas terhadap xantin oksidase. Kesimpulan dari penelitian ini yaitu kaempferol dapat digunakan sebagai kandidat obat untuk digunakan sebagai antihiperurisemia.

Kata kunci : Daun murbei, Hiperurisemia, Xantin Oksidase, kaempferol, dinamika molekular

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMBUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
ABSTRAK	iii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR.....	vi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	4
BAB 3 METODE PENELITIAN.....	10
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	17
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN.....	25
DAFTAR PUSTAKA.....	26

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Hasil Visualisasi Interaksi antara Ligan Daun Kaempferol dengan Xantin Oksidase Menggunakan Aplikasi Discovery Studio.....	23
Tabel 4.2. Hasil Visualisasi Interaksi antara Ligan Pembanding (Allopurinol) dengan Xantin Oksidase Menggunakan Aplikasi Discovery Studio.....	24

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Rumus bangun asam urat (Merck 2001).....	5
Gambar 2.2. Metabolisme asam urat (Dipiro <i>et al</i> 2014).....	6
Gambar 2.3. Struktur Allopurinol (Depkes RI 2014).....	7
Gambar 2.4. Road Map Penelitian.....	9
Gambar 3.1. Alur Langkah Penelitian.....	10
Gambar 3.2. Fishbond Penelitian.....	12
Gambar 3.3. Visualisasi File solv.gro Penambahan Molekul Air Menyesuaikan Box Triclinic yang Berisi Kompleks Protein-Kaempferol.....	14
Gambar 3.4. Visualisasi File solv.gro Penambahan Molekul Air Menyesuaikan Box Triclinic yang Berisi Kompleks Protein-Allopurinol.....	15
Gambar 3.5. Alur Prosedur Penelitian.....	16
Gambar 4.1. Grafik RMSD Hasil Molecular Dynamic Kaempferol dan Allopurinol.....	18
Gambar 4.2 Grafik RMSF Hasil Molecular Dynamic Kaempferol dan Allopurinol.....	20
Gambar 4.3. Grafik Energi Potensial hasil Molecular dynamic Allopurinol dan Kaempferol.....	21
Gambar 4.4. Visualisasi Ligan Kaempferol dari hasil Molecular Dynamic.....	22
Gambar 4.5. Visualisasi Ligan Allopurinol dari hasil Molecular Dynamic.....	24

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Hiperurisemia merupakan kondisi asimtomatik yang umumnya terjadi pada manusia dengan peningkatan kadar asam urat dalam darah. Peningkatan kadar asam urat dalam darah dapat terjadi pengendapan kristal asam urat disendi dan ginjal, menyebabkan artritis gout dan nephrolithiasis asam urat (Dipiro et al, 2008). Asam urat adalah asam yang berbentuk kristal yang merupakan hasil akhir dari metabolisme purin, yaitu salah satu komponen asam nukleat yang terdapat di inti sel tubuh. Purin yang berasal dari katabolisme asam nukleat dalam diet diubah menjadi asam urat secara langsung. Secara alami, asam urat diproduksi dalam tubuh melalui jalur metabolisme yang menggunakan makanan dan minuman sebagai substrat. Makanan dengan kandungan purin tinggi seperti kacang-kacangan, melinjo, jeroan, dan minuman yang mengandung kafein seperti kopi, teh serta minuman yang mengandung gas atau CO₂ dapat menaikkan kadar asam urat dalam darah (Sustrani 2005).

Asam urat menjadi salah satu penyakit yang umum ditemukan di masyarakat dengan insidensi dan prevalensi yang semakin meningkat pada dekade terakhir. Insidensi asam urat lebih tinggi pada laki-laki dibandingkan pada wanita dan meningkat seiring pertambahan usia. Prevalensi asam urat yang ditemukan pada laki-laki 4 kali lebih besar dibandingkan wanita, pada usia dibawah 65 tahun. Secara keseluruhan, prevalensi asam urat bervariasi antara 0,03% - 15,2% dengan persentase kejadian pada laki-laki mencapai 1-2% (Smith et al. 2010). Obat sintetik yang biasa digunakan untuk mengatasi asam urat adalah allopurinol.

Allopurinol merupakan penurun asam urat yang efektif dengan bekerja menghambat xantin oksidase. Allopurinol bekerja sebagai analog asam urat, yang bekerja menghambat aktivitas enzim xantin oksidase. Xantin oksidase adalah enzim yang berperan sebagai katalisator dalam proses oksidasi hipoxantin menjadi xantin dan kemudian menjadi asam urat, yang merupakan jalur degradasi purin (Price dan Wilson, 2005). Namun, allopurinol memiliki efek samping seperti kemerahan pada kulit, leukopenia, masalah gastrointestinal, sakit kepala, dan urtikaria (Dipiro et al. 2008). Sehingga banyak masyarakat yang menggunakan tanaman obat sebagai obat tradisional karena mudah didapatkan dan harganya relatif murah dibandingkan obat sintetik (Pertamawati 2015). Sebagai pengganti obat sintetik, orang-orang mencari alternatif baru dengan mengembangkan penggunaan obat tradisional. Tanaman yang dimanfaatkan sebagai bahan

untuk pengobatan asam urat secara empiris salah satunya adalah kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.).

Pemanfaatan kekayaan alam di Indonesia salah satunya sebagai obat herbal yang digunakan untuk mengobati beberapa penyakit sudah dilakukan sejak dahulu kala, salah satunya adalah pemanfaatan tanaman sebagai antihiperurisemia. Tanaman tersebut adalah daun murbei (*Morus alba* L.), yang memiliki efek terapi sebagai penghambat pembentukan asam urat dengan nilai IC50 sebesar 18 ppm dengan menggunakan ekstraksi penambahan pelarut polar dengan menggunakan air (Kong et al. 2000). Beberapa kandungan fitokimia dari daun murbei (*Morus alba* L.) yang mengandung flavonoid yang dapat menghambat enzim xantin oksidase adalah 3'-Geranyl-3-prenyl-2', 4', 5, 7-tetrahydroxyflavone, 3', 8-Diprenyl-4', 5, 7-trihydroxyflavone, kuwanon S, 8-geranylapigenin, kaempferol, morusin, atalantoflavone, cyclomulberrin, sanggenon J, sanggenon K, cyclomorusin (Chan et al., 2016) .

Molecular docking merupakan suatu perangkat yang dapat digunakan untuk mempelajari interaksi yang terjadi dari suatu kompleks molekul. Molecular docking membantu dalam mempelajari interaksi obat/ ligan dengan reseptor/protein. Molecular docking dilakukan dengan cara mengidentifikasi sisi aktif yang cocok pada reseptor/protein, memperoleh geometri terbaik dari ligan – kompleks reseptor dan menghitung energi interaksi tiap ligan yang berbeda untuk merancang ligan yang lebih efektif. Pratiwi (2019) telah melakukan molecular docking terhadap kandungan senyawa flavonoid daun murbei terhadap enzim xantin oksidase dan diperoleh senyawa Kaempferol memiliki energi bebas pengikatan yang hampir sebanding dengan allopurinol.

Pada penelitian ini dilakukan studi dinamika molecular untuk mengetahui kestabilan senyawa Kaempferol terhadap penghambatan xantin oksidase. Dinamika molekul memberikan solusi untuk mereproduksi tingkah laku mikroskopis suatu makromolekul dengan sistem-sistem model yang sesuai dengan keadaan aslinya.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah senyawa Kaempferol memiliki kestabilan dalam penghambatan xantin oksidase dibandingkan dengan allopurinol.

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kestabilan Kaempferol dalam penghambatan xantin oksidase dibandingkan dengan allopurinol .

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini diharapkan memperoleh informasi mengenai kestabilan Kaempferol dalam penghambatan xantin oksidase sebagai antihiperurisemia.

1.5. Urgensi (Keutamaan) Riset

Indonesia memiliki kekayaan herbal yang melimpah, salah satunya tanaman Kaempferol (*Morus alba* L.). Kandungan senyawa pada daun murbei yang diduga berpotensi sebagai antihiperurisemia adalah flavonoid. Berdasarkan penelitian yang pernah dilakukan, tanaman kayu secang diketahui memiliki aktivitas sebagai antihiperurisemia secara *in vitro/in vivo*. Kaempferol merupakan salah satu senyawa yang dapat menghambat enzim xantin oksidase secara *molecular docking* (Pratiwi 2019). Kemampuan Kaempferol dalam menghambat xantin oksidase menyebabkan terhambatnya pembentukan asam urat yang menyebabkan hiperurisemia.

Oleh karena itu penelitian penemuan obat dari senyawa bahan alam dalam rangka menemukan antihiperurisemia yang poten dan selektif sangat urgen untuk dilakukan. Bahan baku obat-obat yang beredar di Indonesia hampir 100% impor. Kondisi ini tidak menguntungkan bagi ketahanan nasional. Upaya mengembangkan bahan obat dari bahan alam dengan memanfaatkan produk dari alami Indonesia sangat perlu dilakukan.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Enzim Xantin Oksidase

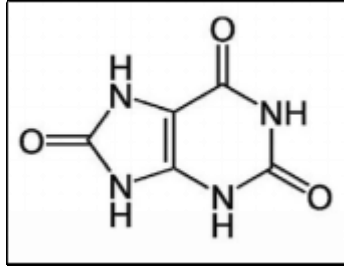
Enzim adalah biomolekul berupa protein yang berfungsi sebagai katalis dalam suatu reaksi kimia organik. Organisme hidup mampu mendapatkan dan menggunakan energi dengan cepat karena adanya katalis biologis yang disebut enzim. Sebagaimana katalis anorganik, enzim mengubah kecepatan suatu reaksi kimia. Tetapi tidak mempengaruhi kesetimbangan akhir reaksi. Enzim dibutuhkan dalam jumlah kecil untuk perubahan besar pada molekul substrat. Enzim hanya akan bekerja dalam kondisi yang sesuai, seperti pH, suhu, konsentrasi, kofaktor, dan sebagainya (Bintang 2010).

Xantin oksidase adalah enzim yang berperan sebagai katalisator dalam proses oksidasi hipoxantin menjadi xantin dan kemudian menjadi asam urat. Xantin oksidase merupakan enzim yang mereduksi O_2 menjadi H_2O_2 dalam sitosol dan diperkirakan faktor utama dalam cedera iskemia terutama pada sel mukosa usus. Xantin oksidase merupakan homodimer katalitik subunit independent adalah enzim yang mengkatalisis hipoxantin menjadi xantin dan xantin menjadi asam urat, yang merupakan jalur degradasi purin (Pertamawati 2015).

2.2. Asam Urat

a. Sifat fisika dan kimia asam urat

Asam urat dikenal dengan nama IUPAC 7,9-dihidro-1 H-purin-2,6,8 (3H)-trion atau dengan nama lain 2,6,8-trioksi purina. Dengan rumus molekul $C_5H_4N_4O_3$. Asam urat memiliki berat molekul 168,11 g/mol. Asam urat merupakan senyawa yang berbentuk kristal tidak berwarna. Asam urat memiliki sifat sukar larut dalam air, dan mudah larut dalam asam sulfat pekat (Merck 2001). Dasar kelarutan produk dari natrium urat pada suhu $37\text{ }^\circ\text{C}$ dan tambahan 0,4 mg/dl untuk batas urat dalam plasma adalah 6,8 mg/dl. Nilai diatas dapat berpotensi sebagai endapan dari kristal urat yang ada. Kelarutan dari natrium urat dalam plasma pada suhu $30\text{ }^\circ\text{C}$ hanya 4 mg/dl, yang menjelaskan bahwa bentuk kristal lebih baik di dalam suhu tubuh yang rendah (Merck 2001).



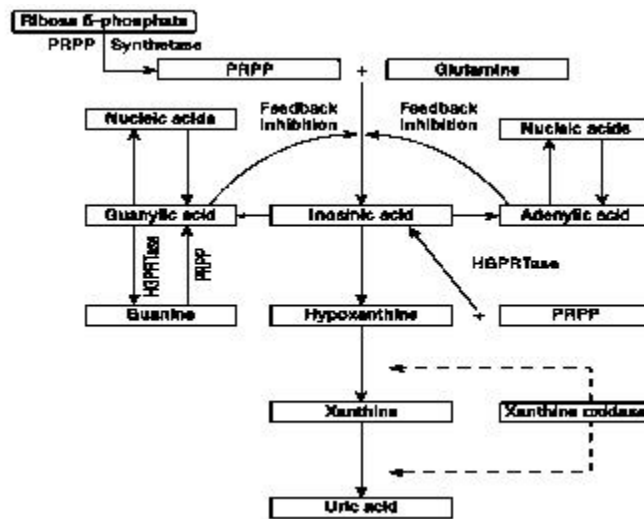
Gambar 2.1 Rumus bangun asam urat (Merck 2001)

b. Metabolisme Asam Urat

Dua pertiga total urat tubuh berasal dari pemecahan purin endogen, hanya sepertiga yang berasal dari diet yang mengandung purin. Pada pH netral asam urat dalam bentuk ion asam urat (kebanyakan dalam bentuk monosodium urat), banyak terdapat di dalam darah. Konsentrasi normal kurang dari 420 $\mu\text{mol/L}$ (7,0 md/dL). Kadar urat tergantung jenis kelamin, umur, berat badan, tekanan darah, fungsi ginjal, status peminum alkohol dan kebiasaan memakan makanan yang mengandung diet purin yang tinggi. Kadar Asam Urat mulai meninggi selama pubertas pada laki-laki tetapi wanita tetap rendah sampai menopause akibat efek urikosurik estrogen. Dalam tubuh manusia terdapat enzim asam urat oksidase atau urikase yang akan mengoksidasi asam urat menjadi allantoin. Defisiensi urikase pada manusia akan mengakibatkan tingginya kadar asam urat dalam serum. Urat dikeluarkan di ginjal (70%) dan traktus gastrointestinal (30%). Kadar asam urat di darah tergantung pada keseimbangan produksi dan ekskresinya (Dianita 2015).

Sintesis asam urat dimulai dari terbentuknya basa purin dari gugus ribosa, yaitu 5-phosphoribosyl-1- pirophosphat (PRPP) yang didapat dari ribose 5fosfat yang disintesis dengan ATP (Adenosinetriphosphate) dan merupakan sumber gugus ribosa. Reaksi pertama, PRPP bereaksi dengan glutamin membentuk fosforibosilamin yang mempunyai sembilan cincin purin. Reaksi ini dikatalisis oleh PRPP glutamil amidotranferase, suatu enzim yang dihambat oleh produk nukleotida inosin monofosfat (IMP), adenine monofosfat (AMP) dan guanin monofosfat (GMP). Ketiga nukleotida ini juga menghambat sintesis PRPP sehingga memperlambat produksi nukleotida purin dengan menurunkan kadar substrat PRPP.

Inosin monofosfat (IMP) merupakan nukleotida purin pertama yang dibentuk dari gugus glisin dan mengandung basa hipoxanthine. Inosinemonophosphat berfungsi sebagai titik cabang dari nukleotida adenin dan guanin. Adenosin monofosfat (AMP) berasal dari IMP melalui penambahan sebuah gugus amina aspartat ke karbon enam cincin purin dalam reaksi yang memerlukan GTP (Guanosine triphosphate). Guanosin monofosfat (GMP) berasal dari IMP melalui pemindahan satu gugus amino dari amino glutamin ke karbon dua cincin purin, reaksi ini membutuhkan ATP. Adenosine monophosphate mengalami deaminasi menjadi inosin, kemudian IMP dan GMP mengalami defosforilasi menjadi inosin dan guanosin. Basa hipoxanthine terbentuk dari IMP yang mengalami defosforilasi dan diubah oleh xantine oksidase menjadi xantine serta guanin akan mengalami deaminasi untuk menghasilkan xantine juga. Xantine akan diubah oleh xantine oksidase menjadi asam urat, seperti yang tertera pada gambar 3 (Dipiro *et al.* 2014).



Gambar 2.2. Metabolisme asam urat (Dipiro *et al* 2014)

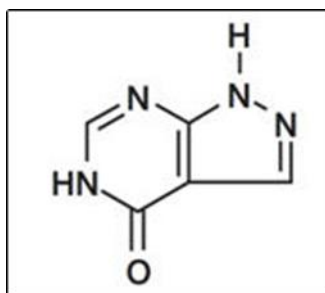
2.3.Hiperurisemia

Hiperurisemia merupakan kondisi dimana tingginya konsentrasi serum asam urat dalam darah, konsentrasi normal asam urat pada pria 3,0-7,0 mg/dl dan pada wanita yaitu 2,4-6,0 mg/dl. Penyakit ini lebih banyak menyerang pria dari pada wanita, karena pria memiliki kadar asam urat

yang lebih tinggi dari pada perempuan selain itu karena perempuan mempunyai hormon esterogen yang ikut membuang asam urat melalui urin (Carter 2010). Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi peningkatan kadar asam urat dalam darah dan merupakan faktor resiko terjadinya hiperurisemia. Faktor tersebut adalah peningkatan pembuatan asam urat, penurunan eliminasi asam urat dan gabungan antara kedua faktor tersebut. Pengobatan hiperurisemia dapat dilakukan dengan meningkatkan eliminasi asam urat atau dengan cara menghambat enzim xantin oksidase. Terdapat obat konvensional yang dapat digunakan dalam mengurangi gejala penyakit ini yaitu allopurinol (Jang *et al.* 2014)

2.4. Allopurinol

Allopurinol adalah salah satu obat yang paling sering digunakan untuk mengatasi penyakit hiperurisemia atau gout dengan mekanisme penghambatan xantin oksidase digunakan untuk mencegah dan mengurangi terbentuknya asam urat. Allopurinol mempengaruhi perubahan hipoxantin menjadi xantin dan xantin menjadi asam urat. Allopurinol dapat dengan cepat diabsorpsi dengan pemberian oral. Metabolit utama dari allopurinol adalah oksipurinol tetapi kurang aktif dibandingkan dengan allopurinol. Metabolit dari allopurinol mempunyai waktu paruh yang panjang yaitu 12 sampai 40 jam, sedangkan allopurinol sekitar 0,5 sampai 2 jam. Sehingga pemberian allopurinol biasanya cukup diberikan satu kali sehari dengan dosis oral harian sebesar 300 mg (Dipiro *et al.* 2014).



Gambar 2.3. Struktur Allopurinol (Depkes RI 2014)

2.5. Simulasi *Molecular Dynamic* (MD)

Dinamika molekuler adalah suatu bentuk simulasi komputer dimana atom dan molekul yang diizinkan untuk berinteraksi selama jangka waktu tertentu dengan pendekatan secara fisik

yang diketahui, memberikan pandangan dari gerak dan partikel. *Molecular dynamics* merupakan tahapan lebih lanjut dari pendekatan *molecular mechanic* dan didasari dari ide bahwa atom dari suatu molekul merasakan kekuatan untuk bergerak (Becker *et al.*, 2001). Simulasi secara virtual dapat digunakan untuk memahami sifat dari suatu molekul berdasarkan struktur dan interaksi mikroskopik antar molekul. Dua teknik utama dalam simulasi molekul secara virtual adalah dinamika molekuler (*molecular dynamics*) dan Monte Carlo (MC), selain itu terdapat juga teknik yang merupakan gabungan dari dua teknik tersebut.

Keunggulan dari teknik dinamika molekuler yaitu dapat memberikan rute terhadap sifat dinamika dan suatu sistem seperti koefisien transport, respon terhadap gangguan yang bergantung pada waktu dan sifat rheologi. Simulasi dinamik ini secara virtual dapat melakukan pekerjaan yang mustahil untuk dilakukan secara nyata di laboratorium seperti bekerja pada suhu atau tekanan yang ekstrim (Allen, 2004). Simulasi dinamika molekuler dapat digunakan dengan menggunakan beberapa aplikasi seperti Amber dan Gromac. Melalui simulasi dinamika molekuler yang dilakukan, maka informasi kinetika dan termodinamika suatu protein dapat ditelusuri lebih lanjut (Karplus & Kuriyan, 2007).

Aplikasi dan Metode yang digunakan:

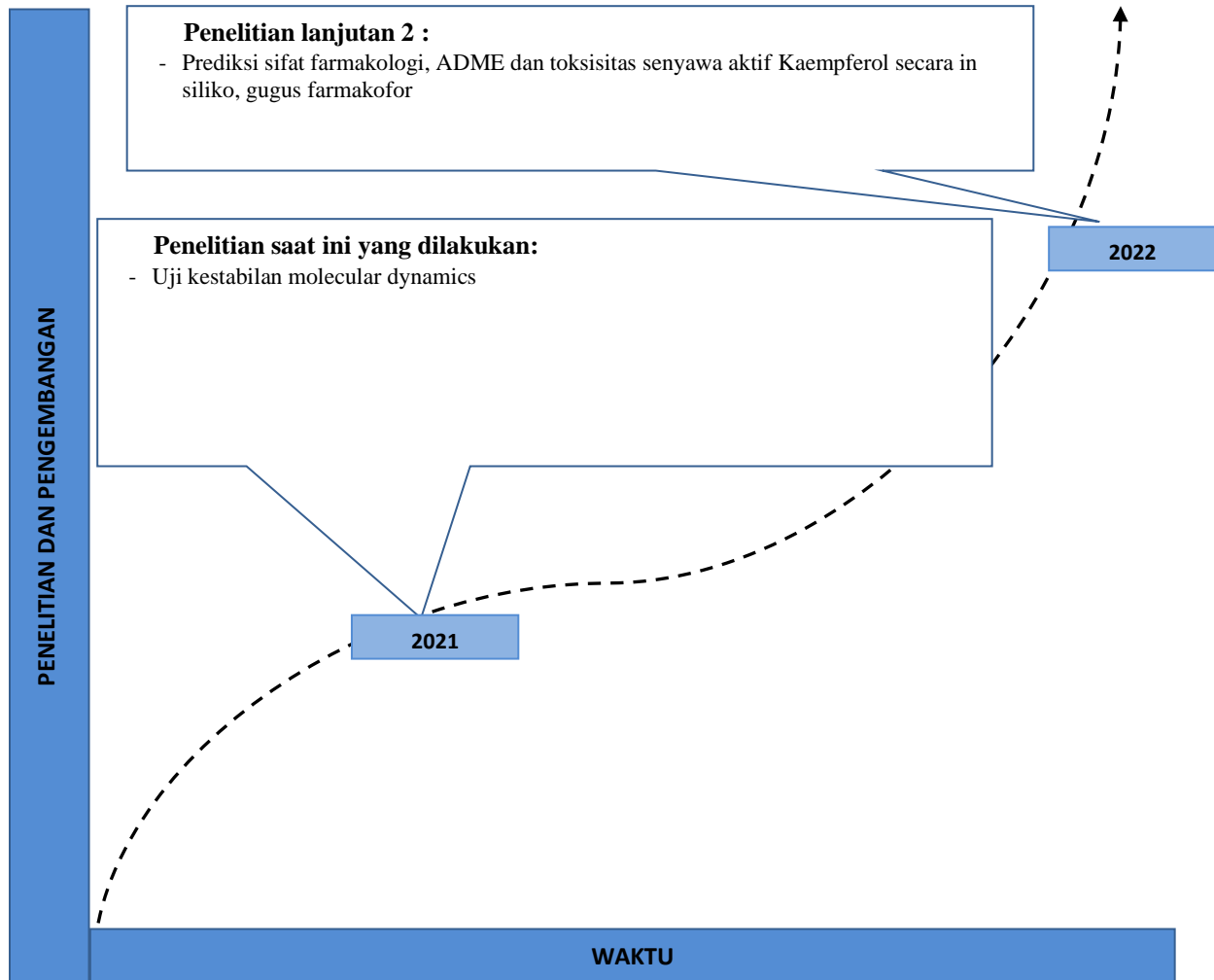
1. Simulasi *Molecular Dynamic* (MD) dengan Aplikasi GROMACS versi 5.1.2

Tujuan dari *Molecular Dynamic* adalah untuk melihat kestabilan senyawa terbaik yang didapat dari hasil *molecular docking*.

2. Visualisasi Hasil *Molecular Dynamic* dengan *Discovery studio*

Pada visualisasi ini digunakan aplikasi *Discovery studio*, yang bertujuan untuk melihat ikatan yang terjadi dan kemudian akan dibandingkan dengan hasil ikatan *molecular docking*.

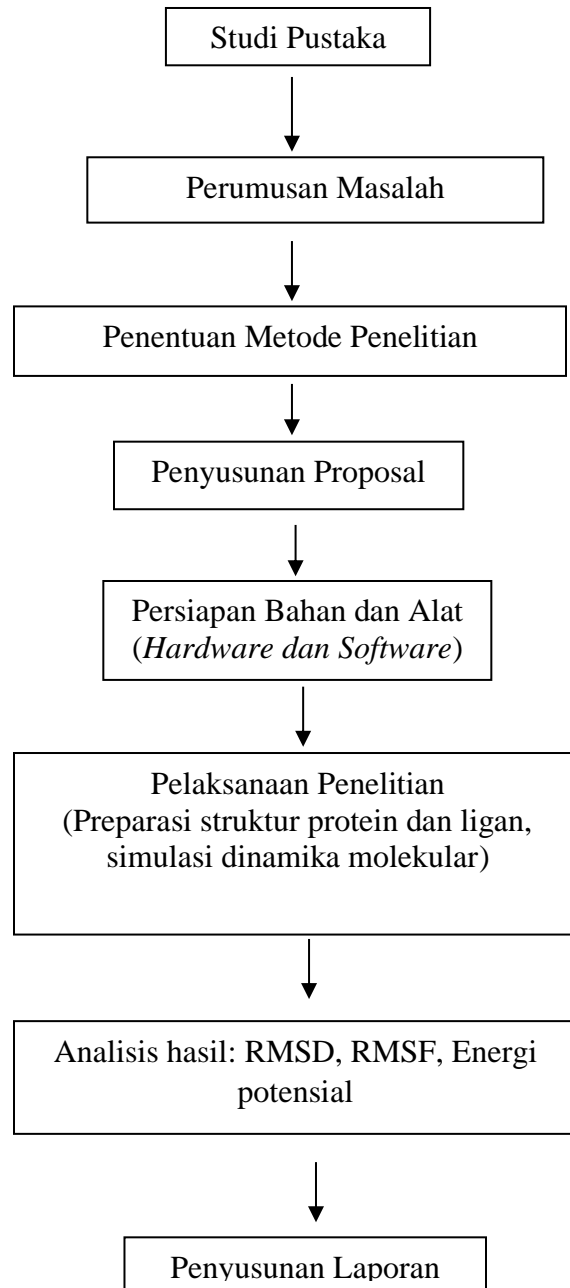
2.8. Road Map Penelitian



Gambar 2.4. Road Map Penelitian

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1. Alur/Langkah Penelitian



Gambar 3.1. Alur Langkah Penelitian

3.2.Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Komputasi Fakultas Farmasi dan Sains UHAMKA

3.3. Konsep Metode Penelitian yang digunakan

Konsep metode penelitian ini adalah simulasi dinamika molecular senyawa Kaempferol. Metode ini dapat mensimulasi bagaimana interaksi kestabilan Kaempferol dengan protein target yaitu enzim xantin oksidase.

3.4. Desain Penelitian Yang digunakan

Desain penelitian yang digunakan menggunakan metode eksperimental.

3.5. Populasi dan Sampel atau Subjek Penelitian/Informan Penelitian

Subjek penelitian yang digunakan adalah senyawa Kaempferol.

3.6. Cara Pengumpulan Data

Cara pengumpulan data subyek penelitian dengan cara restropektif berdasarkan jurnal-jurnal yang membahas tentang skrining senyawa pada daun murbei.

3.7. Instrumen yang digunakan, Manajemen Analisis Data

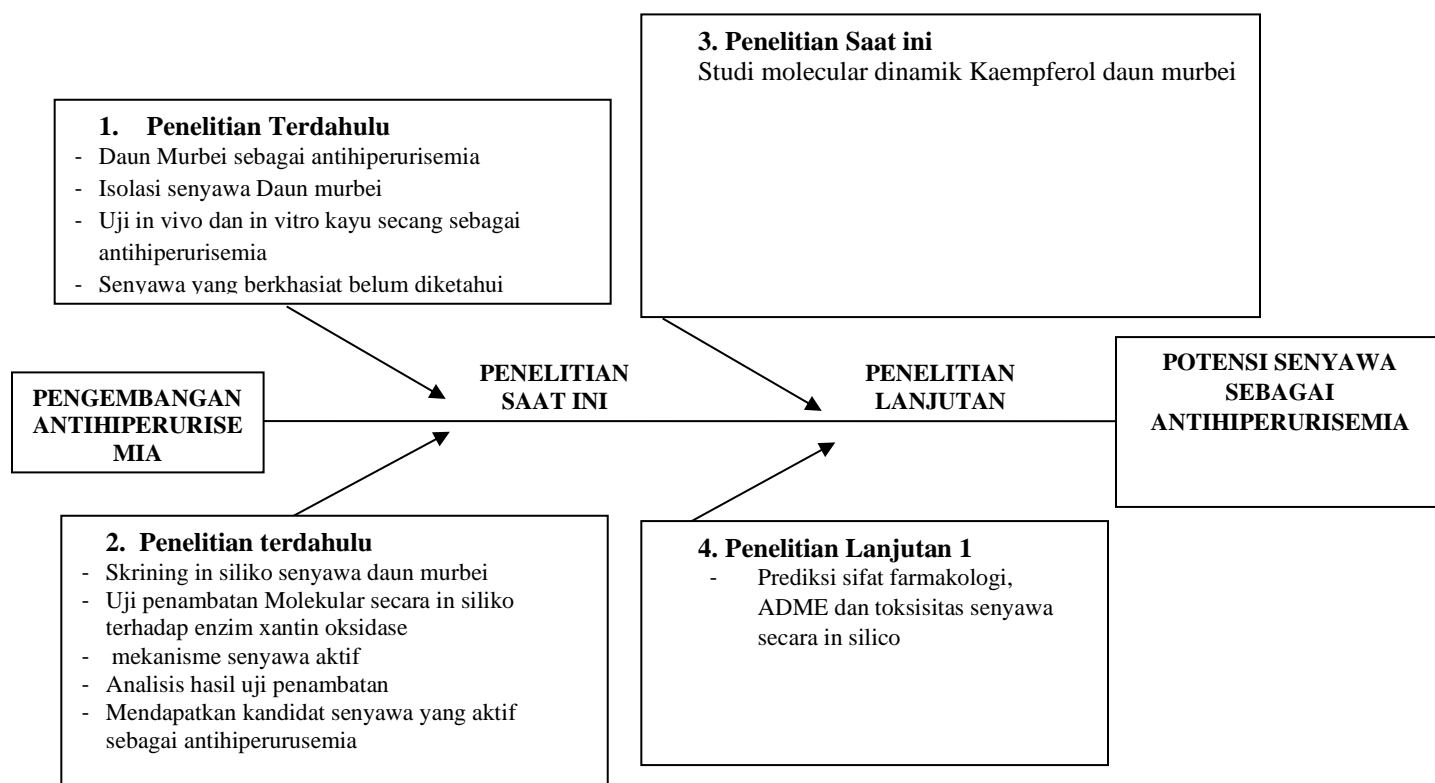
Analisis data yang digunakan dengan cara analisis in silico di antaranya dikenal sebagai *dinamika molekular*. Tujuan analisis adalah melakukan uji kestabilan senyawa terhadap xantin oksidase.

3.8. Indikator Capaian Hasil Penelitian

Indikator capaian hasil penelitian adalah

- Didapatkan kestabilan kaempferol pada waktu pergerakan atom protein xantin oksidase 10 ns.

3.9. Fishbond Penelitian



Gambar 3.2. Fishbond Penelitian

A. Prosedur Penelitian

1. Alat

Perangkat lunak berupa AutoDock Tools (Morris et al. 2009), Discovery Studio (www.3dsbiovia.com, dikembangkan oleh Dassault Systèmes Biovia Corp), PyMOL (www.pymol.org, dikembangkan oleh DeLano Scientific LLC), Chemicalize (www.chemicalize.com, dikembangkan oleh ChemAxon), GROMACS (Abraham et al. 2015), MM-PBSA (Miller et al. 2012).

Perangkat keras berupa personal computer (PC) dengan spesifikasi operating system Ubuntu 18.04.1 LTS, AMD Ryzen 7 2700x eight-core processor x 16, GNOME 3.28.2, 64-bit Operating System, HDD 4 TB.

2. Bahan

a. Struktur 3D Reseptor dari Xantin Oksidase

Struktur 3D dari reseptor xantin oksidase diunduh dari *Protein Data Bank* dengan situs <http://www.rcsb.org/pdb>. yang berformat .pdb.

b. Struktur 3D Senyawa Daun Murbei

Struktur 3D yang digunakan adalah senyawa daun murbei (Pratiwi, 2019)

3. Cara Kerja

Tahap Pengunduhan dan Penggunaan aplikasi Gromacs:

a. GROMACS 5.1.2

Aplikasi Gromacs diunduh melalui website <http://www.gromacs.org>. Setelah itu akan diaktifkan melalui terminal pada linux (Astuti & Mutiara, 2011).

b. Cara kerja MD

Simulasi MD merupakan model prediksi interaksi ligan-protein dalam kondisi biologis, sehingga model kompleks harus diatur berada dalam lingkungan yang menyerupai keadaan pada sistem biologis. Perlakuan yang digunakan antara lain adalah solvasi kompleks hasil docking dengan model air, penambahan ion (Na^+ dan Cl^-), ekuilibrisasi temperatur pada 310 K dengan *thermostat velocity rescale* dan tekanan pada 1 bar dengan barostat Parrinello-Rahman. Demi menjaga konsistensi proses, tahapan minimisasi energi kompleks dilakukan dengan medan gaya dari gromacs. Yang kemudian didapatkan hasil yang merupakan *file* Trayektori berupa diagram (Manna dkk, 2017). Analisa data perbandingan nilai dinyatakan dengan RMSD (*Root Mean Square Deviation*), metode dikatakan baik jika nilai RMSD-nya lebih kecil atau sama dengan 2,5 ($\leq 2,5$). Jika nilai RMSD yang diperoleh lebih besar dari 2,5 ($> 2,5$), metode yang digunakan tidak dapat dipercaya (Rollando, 2018). Nilai *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF) menunjukkan fluktuasi residu asam amino penyusun reseptor selama proses simulasi sehingga dapat merepresentasikan fleksibilitas residu (Dermawan, 2019).

c. Tahapan Aplikasi Gromacs

1) Konversi PDB file

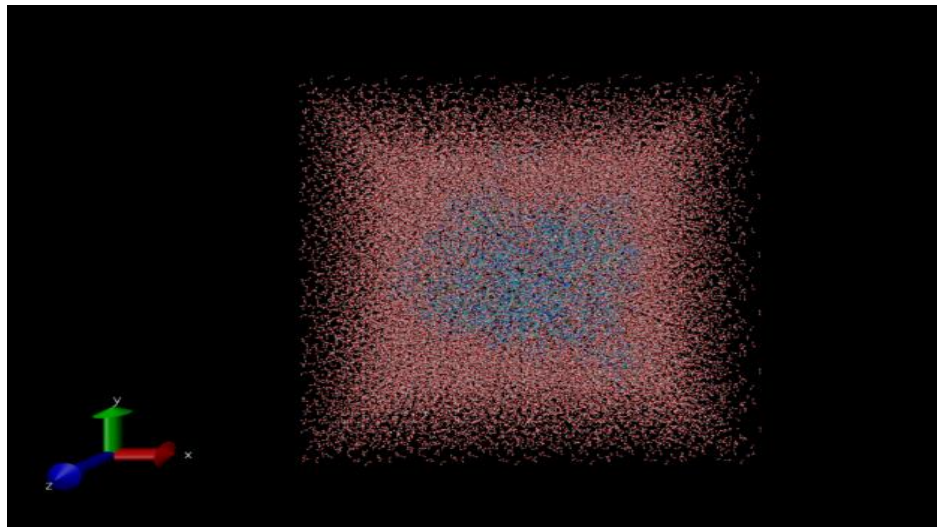
File yang berformat pdb pada tahap ini diubah menjadi file gromos (.gro) dengan program pdb2gmx. Kemudian pdb2gmx juga membentuk file topologi ber-extension (.top).

2) Pembentukan Box

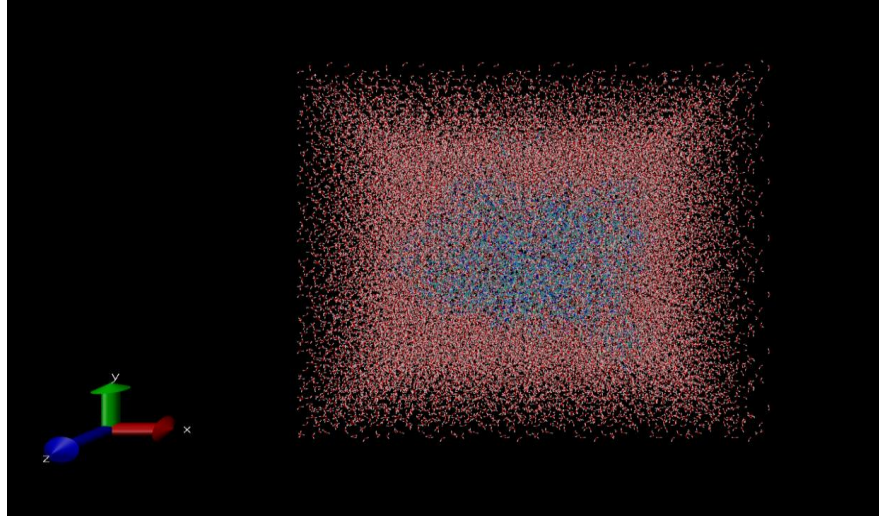
Pada Gromacs menyediakan 3 bentuk yaitu cubic, triclinic, dan octahedron. Agar simulasi terlihat nyata maka molekul harus dilarutkan ke dalam air. Pada tahap ini, program editconf (untuk mendefinisikan model box air yang akan digunakan untuk mesimulasikan suatu protein. Program ini tidak hanya mendefinisikan saja modelnya tapi juga mengatur jarak relatif antara tepi box dengan molekul) akan menentukan jenis box serta ukuran box yang akan digunakan dalam simulasi (Prayoga dkk. 2018).

3) Solvasi Protein-ligan

Perlakuan yang digunakan antara lain adalah solvasi kompleks hasil docking dengan model air, penambahan ion (Na^+ dan Cl^-), ekuilibrisasi temperatur pada 310 K dengan *thermostat velocity rescale* dan tekanan pada 1 atm dengan barostat Parrinello-Rahman (Kusuma & Hadi, 2019).



Gambar 3.3. Visualisasi File solv.gro Penambahan Molekul Air Menyesuaikan Box *Triclinic* yang Berisi Kompleks Protein-Kaempferol.



Gambar 3.4. Visualisasi File solv.gro Penambahan Molekul Air Menyesuaikan Box *Triclinic* yang Berisi Kompleks Protein-Allopurinol.

4) Penyusutan Energi

Sistem box di minimisasi menggunakan *script* yang telah disiapkan dengan suhu 310° K dan tekanan 1 bar, minimisasi energi dilakukan sebanyak 5000 *step* (Roy, 2018).

5) Simulasi MD

Pada simulasi ini dilakukan proses *running* hampir sama dengan minimisasi energi. Grompp menyiapkan file input untuk menjalankan mdrun. Proses simulasi juga memerlukan file mdp untuk men-*setup* parameter. Sebagian besar option mdrun pada dinamika molekuler digunakan juga pada penyusutan energi kecuali *-x* untuk membentuk file trajektori (Astuti & Mutiara, 2011).

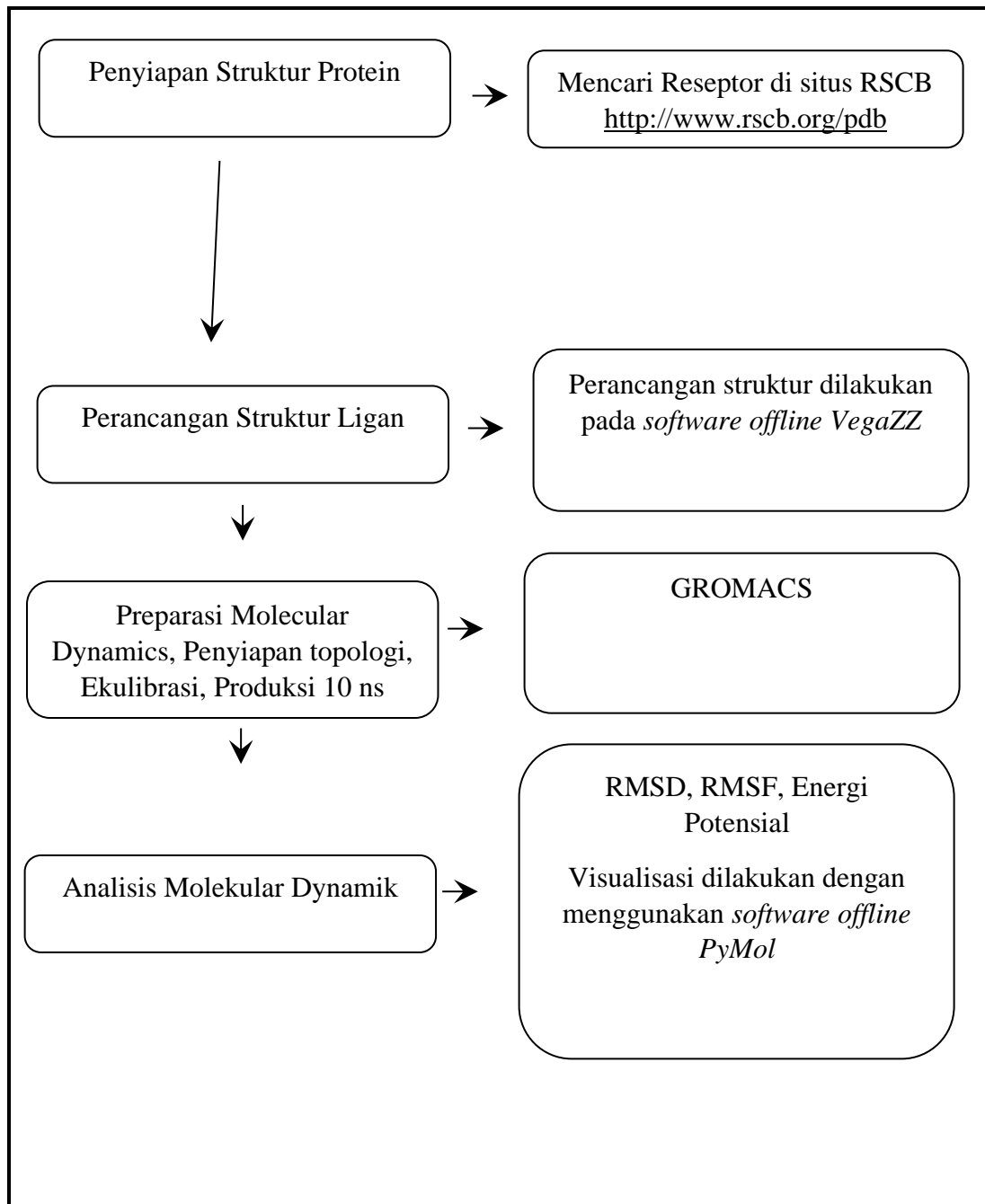
a) Ekuilibrase

Tahap ekuilibrase dilakukan dalam 3 tahapan. Pada tahapan pertama, dilakukan ekuilibrase untuk membuat volume yang konstan dan menaikkan suhu dari 0° K menjadi 310° K. Ekuilibrase tahapan kedua dan ketiga dilakukan untuk membuat seluruh sistem berada pada suhu dan tekanan yang konstan (Aulia, 2012).

b) Produksi

Pada penelitian ini ingin dihasilkan simulasi dinamika molekuler selama 10 *nanosecond* (ns). Program mdrun bisa dijalankan setelah waktunya diatur. Hasil yang didapatkan dari aplikasi GROMACS ini yaitu RMSD dan RMSF. *Root Mean*

Standart Deviasion (RMSD) yang bertujuan agar memperlihatkan protein dalam keadaan tetap stabil dan tidak terdenaturasi (Prayoga dkk. 2018). Nilai *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF) menunjukkan fluktuasi residu asam amino penyusun reseptor selama proses simulasi sehingga dapat merepresentasikan fleksibilitas residu (Dermawan, 2019).

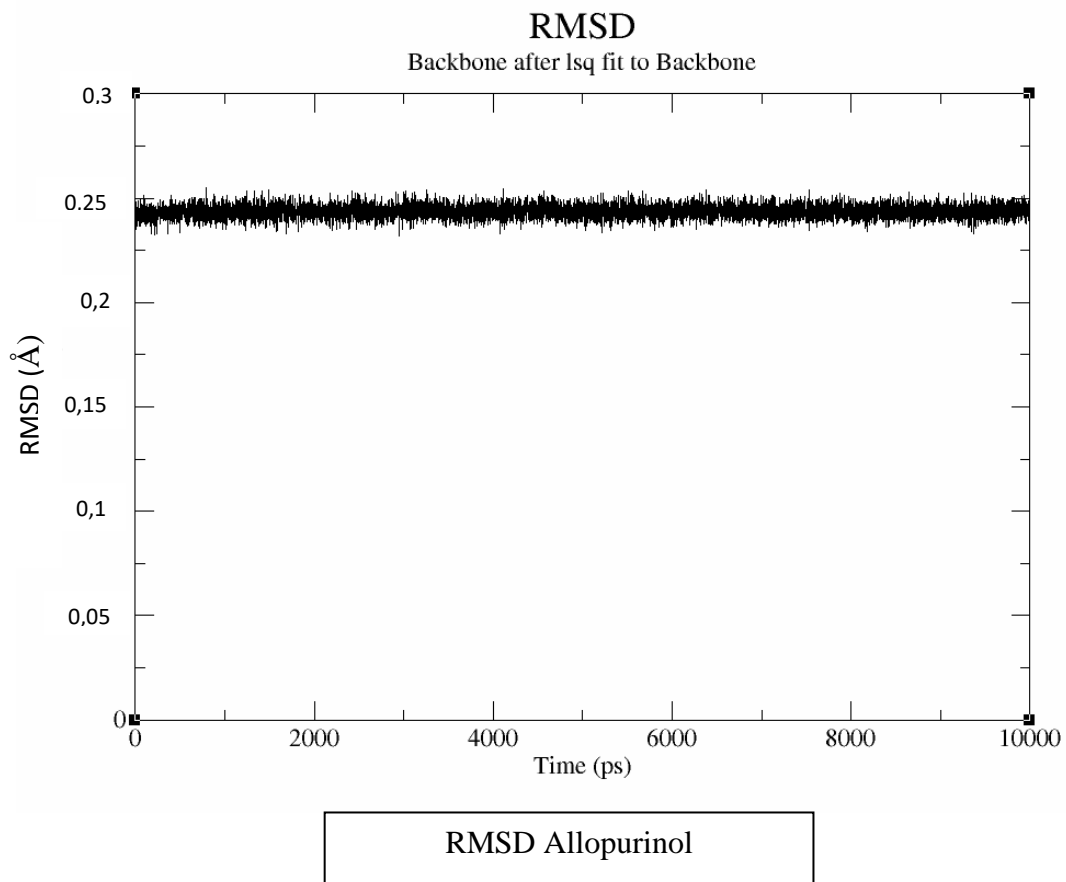


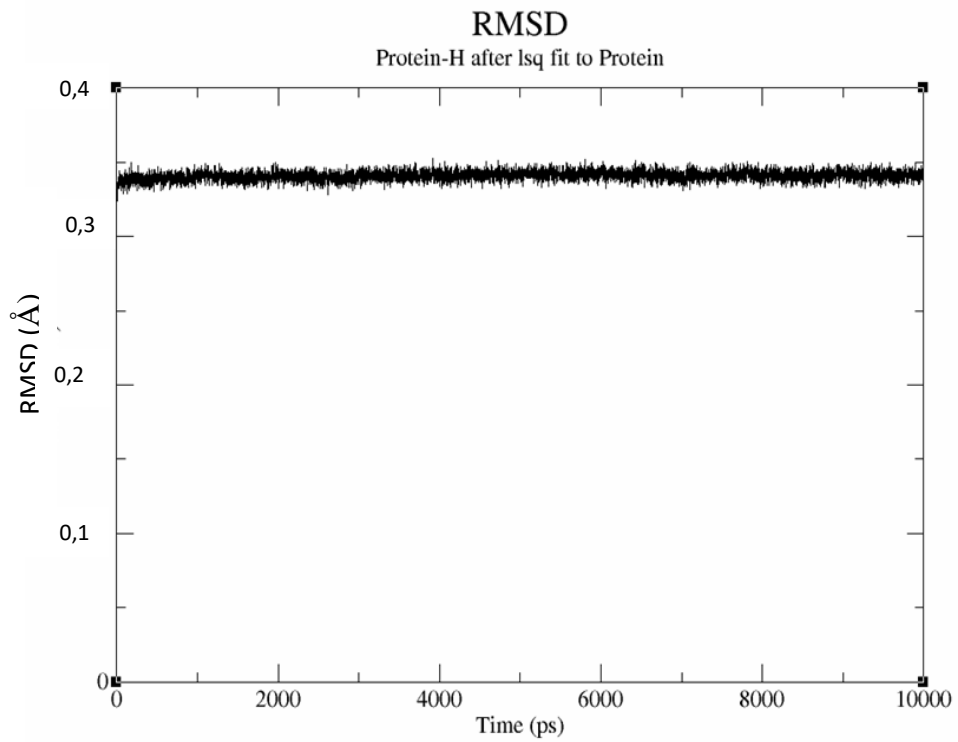
Gambar 3.5. Alur Prosedur Penelitian

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

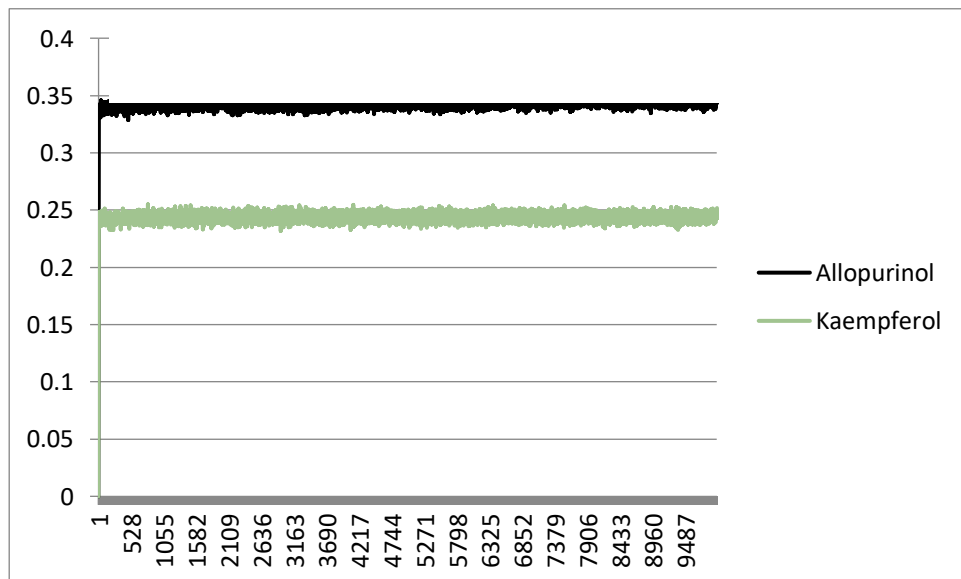
1. Root Mean Square Deviation (RMSD)

RMSD merupakan suatu ukuran yang sering digunakan dalam geometri 3 dimensi molekul untuk membandingkan pergeseran atau perubahan dari konformasi molekul. Nilai RMSD yang mulai stabil menandakan bahwa protein mampu mempertahankan posisinya. Selain itu, adanya interaksi antar residu pada enzim membuat protein cenderung mempertahankan strukturnya. (Farkhani 2012).





RMSD Kaempferol

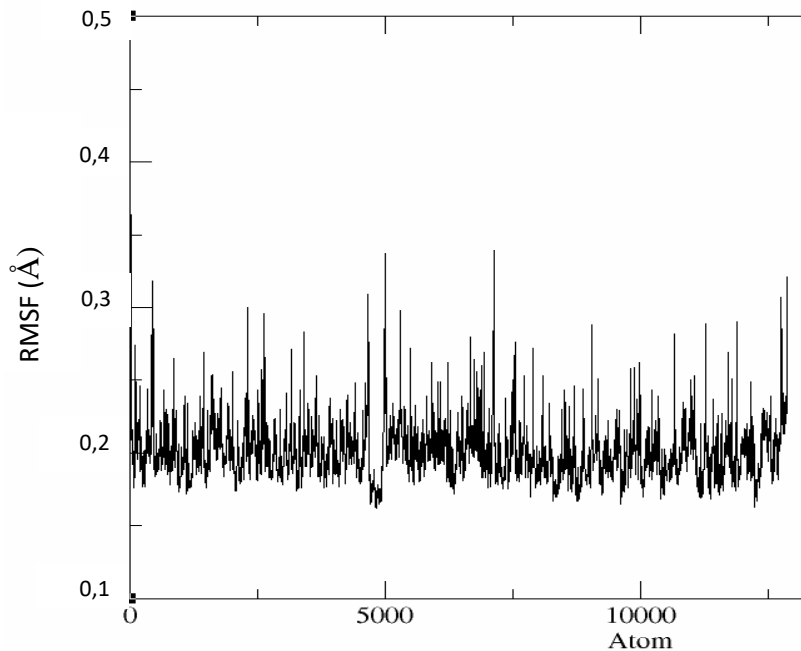


Gambar 4.1. Grafik RMSD Hasil *Molecular Dynamic* Kaempferol dan Allopurinol

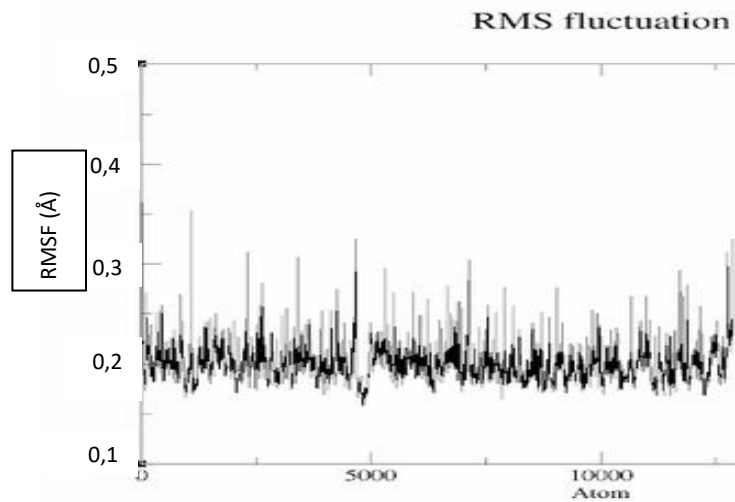
Gambar 4.1 menampilkan hasil grafik RMSD dari hasil *molecular dynamic* antara ligan senyawa Kaempferol dan Allopurinol. Dapat dikatakan bahwa hasil *molecular dynamic* pada senyawa Allopurinol cenderung tidak stabil, karena memiliki hasil RMSD sebesar 3 Å. Sedangkan pada senyawa Kaempferol memiliki kestabilan yang baik karena hasil RMSD dibawah 3 Å yaitu dengan rata-rata dibawah 0,25 Å. Pergerakan molekul dikatakan stabil jika nilai RMSD tersebut tidak melebihi 3 Å (Manna *et al.*, 2017).

2. RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*)

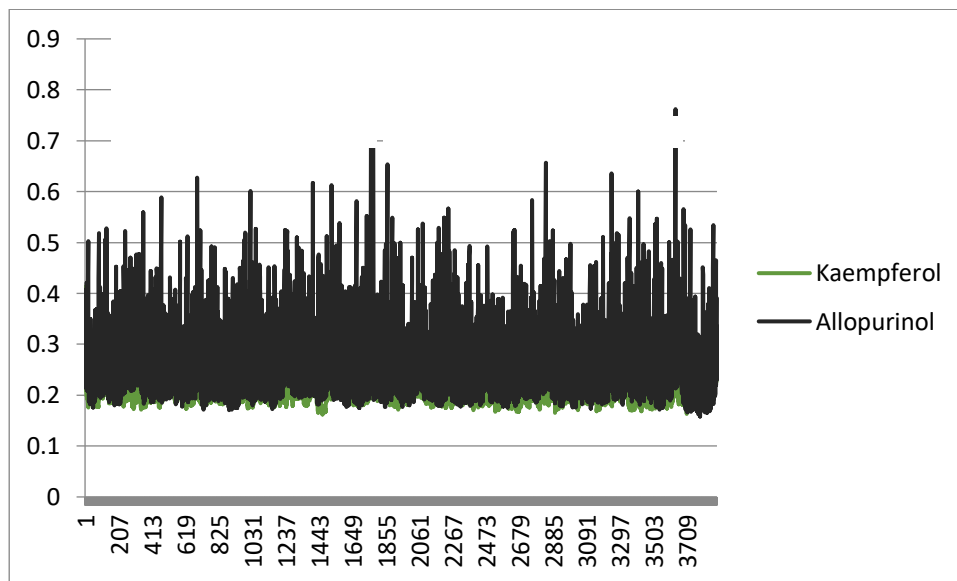
Root Mean Square Fluctuation (RMSF) adalah ukuran deviasi antara posisi partikel dan beberapa posisi referensinya. Berbeda dengan RMSD, RMSF dihitung terhadap masing-masing residu protein, yakni melihat sejauh mana fluktuasi pergerakan masing-masing residu selama simulasi berlangsung. Nilai RMSF secara garis besar akan menggambarkan pergeseran konformasi setiap residu asam amino yang memberikan fleksibilitas protein. Perbedaan fluktuasi dan nilai RMSD dapat disebabkan oleh bentuk struktur ligan (Farkhani 2012).



RMSF Allopurinol



RMSF Kaempferol



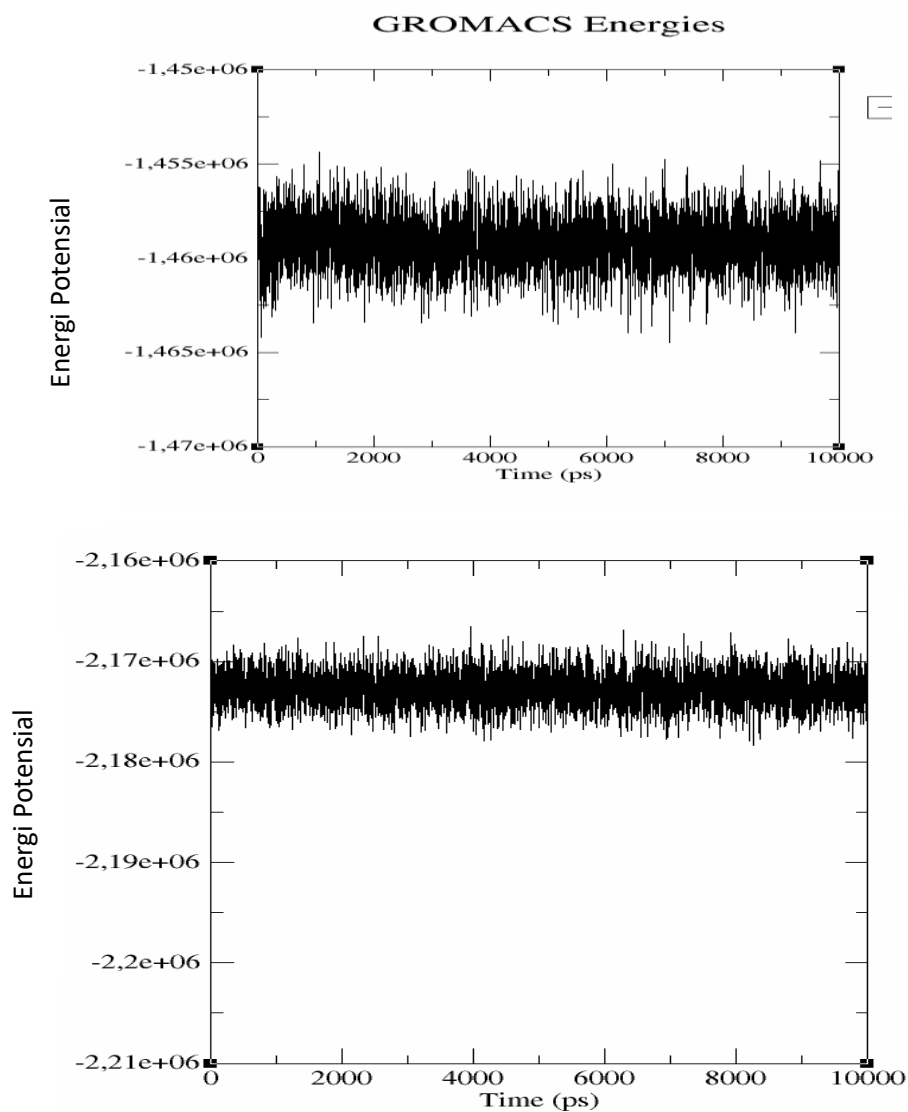
Gambar 4.2 Grafik RMSF Hasil *Molecular Dynamic* Kaempferol dan Allopurinol

Gambar 4.2 merupakan grafik RMSF dari hasil *molecular dynamic* kompleks ligan senyawa Kaempferol dan Allopurinol. Dari grafik RMSF, dapat diketahui bahwa kompleks Kaempferol dengan reseptor memiliki atom-atom yang lebih stabil daripada kompleks Allopurinol dengan reseptor. Jarak yang dimiliki pada ligan senyawa Kaempferol memiliki hasil RMSF sebesar 2 yang dapat stabil, sedangkan pada ligan

senyawa Allopurinol memiliki hasil RMSF lebih besar daripada ligan senyawa Kaempferol. Maka hal tersebut dapat dikatakan bahwa ligan senyawa Allopurinol kurang stabil.

3. Energi Potensial

Sistem berusaha untuk merelaksasi selama proses simulasi *molecular dynamic* ditandai dengan menurunnya nilai energi potensial. Relaksasi terjadi pada sistem kompleks ligan-reseptor dengan pelarutnya dalam bentuk *triclinic*. Mulai dari 1 nanodetik hingga akhir, sistem berusaha untuk mencapai kestabilan internal.

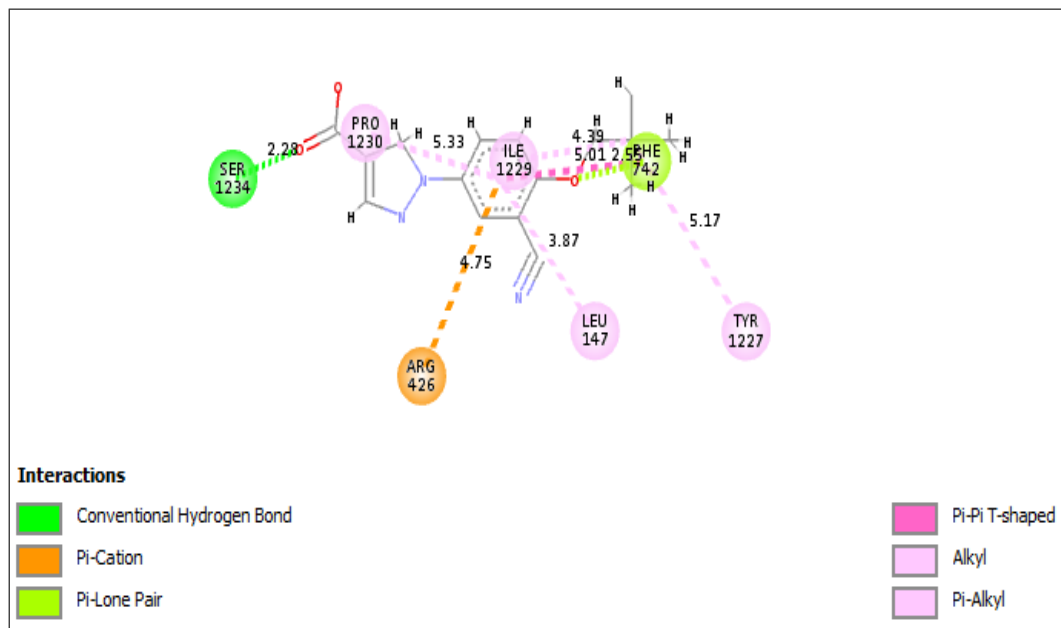


Gambar 4.3. Grafik Energi Potensial hasil *Molecular dynamic* Allopurinol dan Kaempferol

Gambar 4.3 merupakan grafik energi potensial kompleks antara ligan-reseptor yang memiliki energi potensial dengan kisaran -1455000-217000 kkal/mol. Secara keseluruhan, kompleks ligan senyawa Allopurinol memiliki nilai energi potensial yang stabil. Sedangkan nilai energi potensial dari kompleks ligan senyawa Kaempferol tidak stabil karena nilainya melebihi batas kisaran yaitu dengan nilai -1455000-217000 kkal/mol (Simanjuntak, 2015).

4. Visualisasi Hasil *Molecular Dynamic*

Pada visualisasi *molecular dynamic* menggunakan aplikasi *Discovery Studio*. Tujuan yang dilakukan visualisasi hasil *molecular dynamic* yaitu untuk melihat perubahan struktur dan kestabilan dari interaksi kompleks antara ligan dengan reseptor berdasarkan trayektori yang dihasilkan oleh simulasi yang dilakukan.

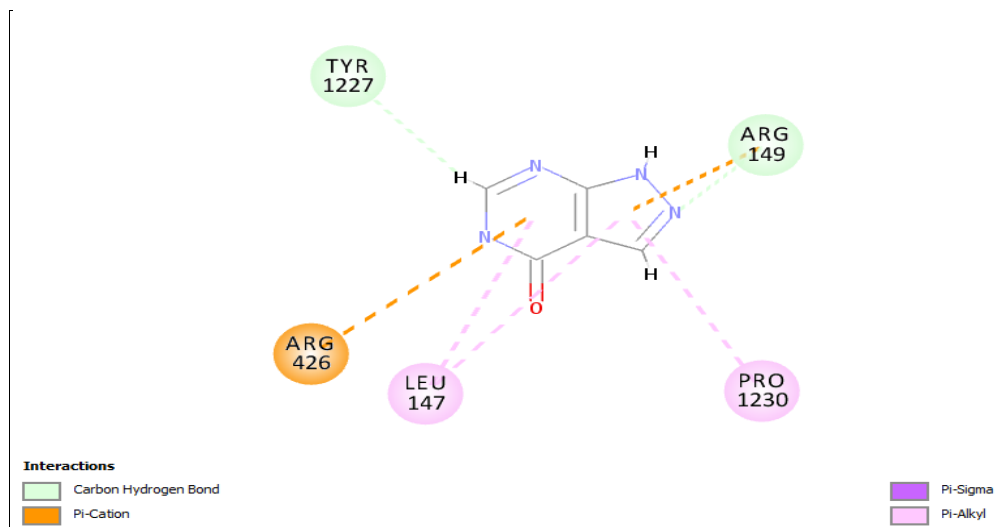


Gambar 4.4. Visualisasi Ligan Kaempferol dari hasil *Molecular Dynamic*

Tabel 4.1. Hasil Visualisasi Interaksi antara Ligan Daun Kaempferol dengan Xantin Oksidase Menggunakan Aplikasi *Discovery Studio*

Ligan	<i>Molecular Dynamic</i>	Tipe Interaksi
Kaempferol	Serin 1234	Ikatan Hidrogen Konvensional
	Arginin 426	Elektrostatik
	Phenylalanine 742	Hidrofobik
	Isoleusine 1229	Hidrofobik
	Tyrosin 1227	Hidrofobik
	Leusin 147	Hidrofobik
	Prolin 1230	Hidrofobik
	Isoleusine 1229	Ikatan Hidrogen Konvensional
	Serin 1234	Ikatan Hidrogen Konvensional
	Tyrosin 1227	Ikatan Hidrogen Konvensional
	Arginin 426	Ikatan Karbon Hidrogen
	Prolin 1230	Ikatan Karbon Hidrogen

Pada hasil visualisasi visualisasi *molecular dynamic* terdapat 12 asam amino diantaranya ada 2 asam amino Serin 1234, ada 2 asam amino Arginin 426, Phenylalanine 742, ada 2 asam amino Isoleusin 1229, ada 2 asam amino Tyrosin 1227, Leusin 147, dan juga ada 2 asam amino Prolin 1230 (Gambar 4.4). Hasil dari *molecular dynamic* pada Tabel 4.1. memiliki ikatan karbon hydrogen, Ikatan hidrogen dibedakan menjadi ikatan hidrogen konvensional dan ikatan karbon hidrogen, dimana ikatan hidrogen konvensional merupakan ikatan yang tarikannya lebih kuat karena melibatkan interaksi atom hidrogen yang terikat dengan atom elektronegatif (F, N, O) (Arwansyah dkk. 2014). Dapat disimpulkan bahwa hasil dari *molecular dynamic* yang paling stabil karena memiliki banyak ikatan hidrogen daripada hasil *molecular docking* saja.



Gambar 4.5. Visualisasi Ligan Pembanding Allopurinol dari hasil *Molecular Dynamic*

Tabel 4.2. Hasil Visualisasi Interaksi antara Ligan Pembanding (Allopurinol) dengan Xantin Oksidase Menggunakan Aplikasi *Discovery Studio*

Ligan	<i>Molecular Dynamic</i>	Tipe Interaksi
Allopurinol	Tyrosine 1227	Ikatan Karbon Hidrogen
	Arginine 426	Elektrostatik
	Leusine 147	Hidrofobik
	Arginine 147	Ikatan Karbon Hidrogen
	Proline 1230	Hidrofobik

Pada hasil visualisasi *molecular dynamic* terdapat ikatan karbon hidrogen pada ligan senyawa dan memiliki 5 asam amino diantaranya yaitu Tyrosine 1227, ada 2 asam amino Arginine 426, Leusine 147, dan juga Proline 1230 (Gambar 4.5). Dapat disimpulkan bahwa hasil dari *molecular dynamic* yang paling stabil karena memiliki ikatan hidrogen daripada hasil *molecular docking* saja yang hanya memiliki interaksi elektrostatik dan hidrofobik saja (Tabel 4.2).

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Kaempferol memiliki kestabilan yang sebanding dengan allopurinol, sehingga dapat dijadikan kandidat obat antihiperurisemia.

5.2. Saran

Perlu dilakukan penentuan prediksi afinitas ikatan MMPBSA dan prediksi toksisitas secara *in silico* terhadap senyawa Kaempferol sebagai antihiperurisemia.

DAFTAR PUSTAKA

- Abraham M, Berk H, David VDS, Erik L, Apol E, Apostolov R, Brendsen HJC, Bureen A, Bjekmar P, Drunen R, Feenstra A, Fritsch S, Groenhof G, Junghans C, Hub J, Kasson P, Kutzner C, Lambeth B, Larsson P, Lemkul JA, Marklund E, Meulenhoff P, Murtola T, Pall S, Pronk S, Schulz R, Shirts M, Sijbers A, Tieleman P, Wannberg C, Wolf M. (2016). *GROMACS Groningen Machine for Chemical Simulations*. University of Groningen. Netherlands Belanda.
- Allen M.P. (2004). Introduction to Molecular Dynamics Simulation. *Journal Scientific Physics for Computing*. **23**(1). 1-28.
- Arwansyah, Ambarsari L, I Tony, Sumaryada. 2014. Simulasi Docking Senyawa Kurkumin dan Analognya sebagai Inhibitor Reseptor Androgen pada Kanker Prostat. *Jurnal Current Biochemistry*. **1**(1): 11-19
- Astuti AD, Mutiara AB. (2011). International Journal of Computer Science & Information Security. *Journal of computer science and information security*. **13**(9).
- Aulia F.(2012). Analisis Dinamika Molekuler Hasil Penambatan Kompleks α - Glukosidase dengan Sulokrin. Skripsi. 1-117
- Becker OM, Mackerrel AD, Roux B & Wtanabe M. (2001). *Computational Biochemistry and Biophysics*, Marcel Dekker
- Dermawan D, Riyadi S, Deti D. (2019). Molecular Dynamics Simulation of Estrogen Receptor Alpha Against Andrografolid as Anti Breast Cancer. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. **6**(2). 65-76
- Farkhani A. 2012. Analisis Dinamika Molekuler Hasil Penambatan Kompleks α -Glukosidase dengan Sulokrin. *Skripsi*. Universitas Indonesia. Depok.
- Karplus, M, & Kuriyan J. (2005). Molecular Dynamics and Protein Function. *PNAS*. 6679-6685
- Kusuma AT, & Hadi D. 2019. Virtual Screening Natural Compounds from Plants as Inhibitor of Estrogen Receptor Alpha I (ESR1). *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. **1**(1): 30-41
- Manna A, Laksitorini MD, Hudiyanti D, Siahaan P. (2017). Molecular Docking of Interaction between E-Cadherin Protein and Conformational Structure of Cyclic Peptide ADTC3 (Ac-CADTPC-NH2) Simulated On 20 ns. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*. **20**(1). 30-36.
- Pratiwi, DE. 2019. Molecular Docking Kandungan Senyawa Flavonoid Daun Murbei (*Morus alba* L.) Terhadap Enzim Xantin Oksidase Sebagai Anti Hiperurisemia. Skripsi. Fakultas Farmasi dan Sains UHAMKA.

- Prayoga H, Yanti Y, & Agus R. (2018). Analisis Dinamika Molekul Protein Lysozyme Putih Telur Dengan Model Potensial Lennard-Jones Menggunakan Aplikasi Gromacs. *Jurnal Teori dan Aplikasi Fisika*. **06**(2). 239-248
- Purwanto, Hardjono S. (2016). Hubungan struktur, ikatan kimia dan aktivitas biologis obat. Dalam : Siswandono (ed). *Kimia Medisinal edisi kedua*. Airlangga University Press. Surabaya : 227-244
- Rollando R. (2018). Pendekatan Struktur Aktivitas dan Penambatan Molekul Senyawa 2-iminoethyl 2-(2-(1-hydroxypentan-2-yl) phenyl) acetate Hasil Isolasi Fungi Endofit Genus *Fusarium* sp pada Enzim β -ketoasil-ACP KasA Sintase dan Enzim Asam Mikolat Siklopropana Sintase. *Pharmaceutical Journal of Indonesia*. **3**(2). 45-51
- Roy GW. (2018). Pemodelan Molekul Pembentukan Liposom dengan Fosfolipid 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC): Perbandingan Gromacs dan NAMD. Skripsi. 1-47
- Simanjuntak RM. 2015. Analisis Dinamika Molekuler Hasil Penambatan Molekuler Kompleks α -Glukosidase dengan Sepuluh Senyawa Kimia Tanaman Hasil Virtual Screening dari Basis Data Herbal. Universitas Indonesia.