

**KAJIAN IN SILICO POTENSI HIDROGEN PEROKSIDA (H₂O₂) DOSIS RENDAH
SEBAGAI TERAPI KOMPLEMENTER L-DOPA TERKAIT PENCEGAHAN
DISFUNGSI ALFA-SINUKLEIN PADA PENYAKIT PARKINSON**

TESIS

**oleh
ATHIYAH LAYLA
226090100111018**



**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2024**

**KAJIAN IN SILICO POTENSI HIDROGEN PEROKSIDA (H₂O₂) DOSIS RENDAH
SEBAGAI TERAPI KOMPLEMENTER L-DOPA TERKAIT PENCEGAHAN
DISFUNGSI ALFA-SINUKLEIN PADA PENYAKIT PARKINSON**

TESIS

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains dalam Bidang Biologi**

**oleh
ATHIYAH LAYLA
226090100111018**



**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2024**

HALAMAN PENGESAHAN TESIS

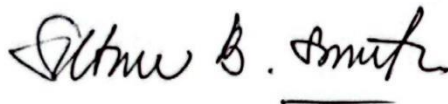
KAJIAN IN SILICO POTENSI HIDROGEN PEROKSIDA (H_2O_2) DOSIS RENDAH
SEBAGAI TERAPI KOMPLEMENTER L-DOPA TERKAIT PENCEGAHAN
DISFUNGSI ALFA-SINUKLEIN PADA PENYAKIT PARKINSON

ATHIYAH LAYLA
226090100111018

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 18 Juli 2024
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui

Pembimbing I



Prof. Drs. Sutiman Bambang Sumitro, SU., D.Sc

NIP. 195403111980021002

Pembimbing II




Dr. Sri Widyarti, M.Si

NIP.196705251991032001

Mengetahui

Ketua Departemen Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Yoga Dw. Jatmiko, S.Si., M.App.Sc., Ph.D
NIP. 198105102005011002

Ketua Program Studi Magister Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya



Prof. Amin Setyo Leksono, S.Si, M.Si, Ph.D

NIP. 197211172000121001

SUSUNAN KOMISI PEMBIMBING DAN PENGUJI TESIS

Judul Tesis:

**KAJIAN IN SILICO POTENSI HIDROGEN PEROKSIDA (H₂O₂) DOSIS RENDAH
SEBAGAI TERAPI KOMPLEMENTER L-DOPA TERKAIT PENCEGAHAN
DISFUNGSI ALFA-SINUKLEIN PADA PENYAKIT PARKINSON**

Nama : Athiyah Layla
NIM : 226090100111018

KOMISI PEMBIMBING :

Ketua : Prof. Drs. Sutiman Bambang Sumitro, SU., D.Sc

Anggota : Dr. Sri Widyarti, M.Si

TIM DOSEN PENGUJI :

Dosen Penguji I : Dr. Husnul Khotimah, S.Si., M.Kes

Dosen Penguji II : Prof. Dr. Ir. Moch. Sasmito Djati, MS

Tanggal Ujian : Kamis, 18 Juli 2024

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah Tesis ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam Naskah Tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur jiplakan, saya bersedia Tesis (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 2 dan pasal 70).



Nama: Athiyah Layla

NIM : 226090100111018

RIWAYAT HIDUP

Athiyah Layla, lahir di Pasuruan pada tanggal 20 Januari 1997, merupakan anak dari pasangan bapak Abdul Ghofur dan ibu Marjiatun. Menyelesaikan sekolah SD hingga SMA di Kota Pasuruan, lalu melanjutkan studi pendidikan sarjana di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Negeri Malang mulai tahun 2015 hingga 2019, dengan tugas akhir berjudul “Identifikasi Variasi Sekuen *Ovulation Rate Gene* pada Sapi Limousin Kembar Di Pacitan Jawa Timur”. Pengalaman selama menempuh pendidikan di Universitas Negeri Malang antara lain menjadi pengurus Bidang Literatur di Unit Kegiatan Mahasiswa (UKM) Sanggar Minat periode 2017-2018. Menjadi asisten dosen pada Matakuliah Parasitologi dan Matakuliah TABM (Teknik Analisis Biologi Molekuler). Serta melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Genetika Hewan, Bidang Zoologi Puslit Biologi LIPI, Cibinong, Bogor, pada tahun 2018.

Malang, 24 Mei 2024
Penulis

PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS

Tesis ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

RINGKASAN

Kajian In Silico Potensi Hidrogen Peroksida (H₂O₂) Dosis Rendah Sebagai Terapi Komplementer L-DOPA Terkait Pencegahan Disfungsi Alfa-Sinuklein Pada Penyakit Parkinson

Athiyah Layla, Sri Widyarti, Sutiman Bambang Sumitro

Program Studi Magister Biologi, Departemen Biologi,

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya

2024

Penyakit Parkinson (PD) merupakan gangguan neurodegeneratif yang menyebabkan gangguan memori dan kognitif, tremor, serta kontraksi otot yang menyakitkan. PD ditandai oleh berkurangnya produksi dopamin, oleh karena itu pengobatan PD dilakukan dengan pemberian prekursor dopamin yaitu L-DOPA. Pengobatan dengan L-DOPA dipilih karena dapat menyediakan dopamin sesuai dengan kebutuhan setiap individu. Selain itu, PD juga ditandai adanya disfungsi α -synuclein (α syn) intraneuron. L-DOPA membutuhkan energi untuk diubah menjadi dopamin. Hal ini dapat terganggu karena energi yang tersedia tidak mencukupi, disebabkan oleh adanya interkasi antara disfungsi α syn dengan *Voltage-Dependent Anion Channel* (VDAC) yang menyebabkan disfungsi mitokondria pada sel neuron. Khususnya kemampuan α syn untuk mengikat VDAC pada *outer membrane mitochondria* (OMM) sehingga dapat memblokir dan bertranslokasi ke *inner membrane mitochondria* (IMM).

Pada penderita PD, *reuptake* dopamin oleh *dopamine transporter* (DAT) tidak berfungsi dengan baik karena adanya disfungsi α syn yang berikatan dengan DAT, menyebabkan kelebihan dopamin di celah sinaptik. Serta adanya agregat dan monomer α syn yang dapat ditransfer antar sel neuron menyebabkan penderita PD semakin memburuk, mekanisme penyebaran tersebut dimediasi oleh protein *low-density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1). Selain menyebabkan disfungsi mitokondria pada sel neuron, α syn juga menyebabkan disregulasi dan disfungsi mitokondria pada endotel pembuluh darah otak hingga mengalami apoptosis. Pada kasus ini, apoptosis endotel pembuluh darah otak akan berpengaruh pada kinerja BBB, hingga akhirnya dapat menyebabkan degenerasi saraf. Oleh karena itu, diperlukan *treatment* yang dapat mencegah

degenerasi vaskular dengan mengaktifkan ERK1, ERK2, ERK5 dan ASK1 yang dapat mengontrol proliferasi sel endotel.

Pengobatan menggunakan L-DOPA tidak dapat mengatasi disfungsi mitokondria, disregulasi *reuptake* dopamin, penyebaran α syn interneuron dan apoptosis sel endotel. Sehingga pemberian L-DOPA menjadi tidak efektif dan membutuhkan H₂O₂ dosis rendah yang memiliki potensi neuroprotektif sebagai salah satu terapi komplementer PD. Penelitian ini ingin melihat lebih jauh efektifitas pemberian H₂O₂ dosis rendah, guna untuk membangun terapi L-DOPA yang lebih efektif. Penelitian dilakukan secara *in silico*, dimulai dengan pengumpulan data: untuk molekul H₂O₂ dari pubchem, α syn dan protein target (VDAC, DAT, LRRP1, ERK1/2/5 dan ASK1) dari *protein data bank* (PDB). Kemudian dilakukan preparasi pada H₂O₂ menggunakan Open Babel pada perangkat lunak PyRx 0.9.8 dan protein α syn serta protein target dipreparasi menggunakan Discovery Studio 2021 Client. Selanjutnya dilakukan *docking* (penambatan) H₂O₂ dengan protein α syn menggunakan PyRx 0.9.8 dan *docking* antara α syn dengan protein target menggunakan software online HDOCK, kemudian dianalisis *binding affinity* dan *binding site*-nya. Dilanjutkan dengan simulasi molekuler dinamik (MD) menggunakan YASARA Structure v.23.9.29, untuk mengevaluasi kestabilan sistem yang disimulasikan, perlu dilakukan analisis: *molecular mechanic poisson-boltzmann surface area* (MMPBSA), *root mean square deviation* (RMSD), *backbone root mean square fluctuation* (RMSF), *Radius of Gyration* (Rg), dan *superimpose*.

Hasil molekuler *docking* menunjukkan bahwa H₂O₂ dapat menurunkan *binding affinity* monomer dan polimer α syn pada protein target. Dengan menurunnya *binding affinity* menunjukkan bahwa molekul H₂O₂ memiliki potensi untuk mencegah monomer dan polimer α syn mengikat protein target. Penambatan molekul H₂O₂ dengan monomer dan polimer α syn juga dapat mempengaruhi *active site*-nya pada protein target, sehingga menyebabkan adanya perubahan interaksi. Adanya molekul H₂O₂ dapat merubah ikatan hidrogen menjadi ikatan *unfavorable* yang dapat mengurangi stabilitas kompleks, sehingga memungkinkan penambatan monomer dan polimer α syn dan protein target tidak stabil. Hasil molekuler dinamik, menunjukkan adanya H₂O₂ dapat mempengaruhi nilai RMSD, misalnya pada saat monomer dan polimer α syn ditambatkan dengan VDAC dan DAT dapat meningkatkan nilai RMSD yang mengakibatkan protein menjadi *unfolding* sehingga menjadikan protein menjadi tidak fungsional. Namun ketika ada molekul H₂O₂, menurunkan nilai RMSD pada VDAC dan DAT, yang memungkinkan VDAC dan DAT menjadi fungsional.

Pada penambatan dengan protein LRP1, ketika ada molekul H₂O₂ nilai RMSD menjadi lebih tinggi, sehingga LRP1 tidak fungsional, yang menyebabkan LRP1 tidak dapat

mengikat protein α syn, sehingga transfer α syn antar sel neuron dapat dicegah. Adanya molekul H_2O_2 meningkatkan fluktuasi (nilai RMSF) pada residu *active site* antara protein α syn dan protein target, sehingga memungkinkan untuk terlepasnya ikatan antara monomer dan polimer α syn pada protein target. Hasil penambahan H_2O_2 dengan ERK1/2/5 dan ASK1, menunjukkan bahwa molekul H_2O_2 mengaktifkan ERK1/2/5 dan ASK1 dengan mekanisme mengikatnya molekul H_2O_2 pada residu situs fosforilasi ERK1/2/5 dan ASK1. Serta molekul H_2O_2 menstabilkan ERK1/2/5 dan ASK1, ditandai dengan menurunnya nilai RMSD. Dalam beberapa penelitian menunjukkan bahwa dengan nilai RMSD yang rendah menunjukkan adanya fosforilasi yang terjadi, sehingga ERK1/2/5 dan ASK1 menjadi aktif. Namun dalam penelitian ini masih diperlukan simulasi MD lebih lanjut, dengan menambahkan molekul fosfat untuk memastikan adanya fosforilasi yang terjadi.

Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa mekanisme H_2O_2 dalam mencegah monomer dan polimer α syn mengikat protein target adalah dengan menurunkan *binding affinity*-nya dan menyebabkan perubahan interaksi. Selain itu H_2O_2 meningkatkan fluktuasi pada *active site*, menyebabkan kompleks protein-ligan menjadi lebih fleksibel yang memungkinkan terlepasnya ikatan antara monomer dan polimer α syn dengan protein target. Serta dengan molekul H_2O_2 mengaktifkan ERK1/2/5 dan ASK1. Sehingga, diketahui bahwa, H_2O_2 memiliki potensi untuk menjadi terapi komplementer L-DOPA, serta dapat mengoptimalkan pengobatan PD.

SUMMARY

In Silico Study of the Potential of Low-Dose Hydrogen Peroxide (H₂O₂) as a Complementary Therapy to L-DOPA for the Prevention of Alpha-Synuclein Dysfunction In Parkinson's Disease

Athiyah Layla, Sri Widyarti, Sutiman Bambang Sumitro,
Master Program of Biology, Department of Biology,
Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Brawijaya

2024

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder that causes memory and cognitive impairment, tremors, and painful muscle contractions. PD is characterized by reduced dopamine production, hence the treatment of PD is done by administering dopamine precursor, L-DOPA. Treatment with L-DOPA was chosen because it can provide dopamine according to the needs of each individual. In addition, PD is also characterized by intraneuron α -synuclein (α syn) dysfunction. L-DOPA requires energy to convert into dopamine. This can be disrupted due to insufficient energy available, because the interaction between α syn dysfunction and Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC) which causes mitochondrial dysfunction in neuronal cells. Especially the ability of α syn to bind VDAC on the outer membrane mitochondria (OMM) so that it can block and translocate to the inner membrane mitochondria (IMM).

In PD patients, dopamine reuptake by the dopamine transporter (DAT) does not function properly due to the dysfunction of α syn that binds to DAT, causing excess dopamine in the synaptic cleft. As well as the presence of α syn aggregates and monomers that can be transferred between neuronal cells causing PD patients to worsen, the spread mechanism is mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1). In addition to causing mitochondrial dysfunction in neuronal cells, α syn also causes dysregulation and mitochondrial dysfunction in the endothelium of cerebral blood vessels to undergo apoptosis. In this case, apoptosis of the cerebral vascular endothelium will affect the performance of the BBB, which can eventually lead to neurodegeneration. Therefore, treatment is needed that can prevent vascular degeneration by activating ERK1, ERK2, ERK5 and ASK1 which can control endothelial cell proliferation.

Treatment using L-DOPA cannot overcome mitochondrial dysfunction, dopamine reuptake dysregulation, α syn interneuron spreading and endothelial cell apoptosis. So that the administration of L-DOPA becomes ineffective and requires low-dose H_2O_2 which has neuroprotective potential as one of the complementary therapies for PD. This study aims to further examine the effectiveness of low-dose H_2O_2 , in order to build a more effective L-DOPA therapy. The research was conducted in silico, starting with data collection for H_2O_2 molecules from pubchem, α syn and target proteins (VDAC, DAT, LRPR1, ERK1/2/5 and ASK1) from the protein data bank (PDB). Then the preparation was carried out on H_2O_2 using Open Babel in PyRx 0.9.8 software, α syn and target proteins were prepared using Discovery Studio 2021 Client. Furthermore, H_2O_2 docking was carried out with α syn protein using PyRx 0.9.8 and docking between α syn and target protein using HDOCK online software, then analyzed the binding affinity and binding site. Followed by molecular dynamic simulation (MD) using YASARA Structure v.23.9.29, to evaluate the stability of the simulated system, it is necessary to analyze: molecular mechanic poisson-boltzmann surface area (MMPBSA), root mean square deviation (RMSD), backbone root mean square fluctuation (RMSF), Radius of Gyration (Rg), and superimpose.

The results of molecular docking showed that H_2O_2 can reduce the binding affinity of α syn monomers and polymers to the target protein. The decrease in binding affinity indicates that the H_2O_2 molecule has the potential to prevent monomer and α syn polymer from binding to the target protein. Inhibition of H_2O_2 molecules with α syn monomers and polymers can also affect its active site on the target protein, causing changes in interactions. The presence of H_2O_2 molecules can change hydrogen bonds into unfavorable bonds that can reduce the stability of the complex, thus allowing the docking of α syn monomers and polymers and target proteins to be unstable. The results of molecular dynamics show that the presence of H_2O_2 can affect the value of RMSD, for example, when the monomer and α syn polymer are tethered to VDAC and DAT, it can increase the value of RMSD which results in unfolding the protein so that the protein becomes non-functional. However, when H_2O_2 molecules are present, it decreases the RMSD value on VDAC and DAT, which allows VDAC and DAT to become functional.

In the docking between α syn and LRP1, when H_2O_2 molecules are present, the RMSD value becomes higher, so that LRP1 is not functional, which causes LRP1 to be unable to bind α syn protein, so that the transfer of α syn between neuronal cells can be prevented. The presence of H_2O_2 molecules increases the fluctuation (RMSF value) at the active site residue between the α syn protein and the target protein, making it possible to

detach the bond between the α syn monomer and polymer on the target protein. H_2O_2 docking results with ERK1/2/5 and ASK1, showed that the H_2O_2 molecule activates ERK1/2/5 and ASK1 by binding to phosphorylation sites of ERK1/2/5 and ASK1. As well as H_2O_2 molecule stabilizes ERK1/2/5 and ASK1, indicated by decreasing RMSD value. In several studies, it has been shown that a low RMSD value indicates that phosphorylation occurs, so that ERK1/2/5 and ASK1 become active. However, in this study, further MD simulation is still needed, by adding phosphate molecules to ensure that phosphorylation occurs.

Thus, it can be concluded that the mechanism of H_2O_2 in preventing α syn monomers and polymers from binding to target proteins is by decreasing their binding affinity and causing changes in interactions. In addition, H_2O_2 increases fluctuations in the active site, causing the protein-ligand complex to become more flexible which allows the release of the bond between the α syn monomer and polymer with the target protein. As well as with H_2O_2 molecules activate ERK1/2/5 and ASK1. Thus, it is known that, H_2O_2 has the potential to be a complementary therapy to L-DOPA, and can optimize PD treatment.

KATA PENGANTAR

Ungkapan rasa syukur penulis panjatkan pada Allah Yang Maha Esa, yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis mampu menyelesaikan penyusunan tesis yang merupakan salah satu syarat yang harus dipenuhi untuk memperoleh gelar Magister Sains di Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan ucapakn terima kasih kepada:

1. Prof. Drs. Sutiman Bambang Sumitro, SU., D.Sc. selaku dosen Pembimbing I serta Dr. Sri Widyarti, M.Si selaku Pembimbing II yang telah mendampingi dan memberi ilmu serta pengarahan yang berguna bagi penulis.
2. Dr. Husnul Khotimah, S.Si., M.Kes dan Prof. Dr. Ir. Moch. Sasmito Djati, MS selaku dosen penguji atas, pertanyaan, kritik, pengarahan dan saran yang diberikan dalam menyempurnakan penyusunan tesis.
3. Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) sebagai *support* utama bagi penulis sehingga dapat melanjutkan pendidikan ke jenjang Magister
4. Orang tua dan keluarga penulis yang telah memberikan doa serta dukungan secara moral kepada penulis selama masa studi dan penyusunan tesis,
5. Eka Diyah Putri L. dan seluruh anggota *working group* Sain Kompleksitas yang telah banyak memberikan pengarahan serta berbagai wawasan
6. Teman dekat penulis mahasiswa Magister Biologi Angkatan 2022 yang telah memberi dukungan moral, serta seluruh civitas akademik Departemen Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya yang membantu selama proses pengerjaan tesis.

Penulis berharap semoga segala kebaikan dari seluruh pihak yang membantu dibalas oleh Allah SWT. Penulisan tesis ini merupakan upaya sebagai sarana untuk pengembangan ilmu pengetahuan, sehingga saran dan kritik yang membangun sangat diperlukan untuk menjadikan tesis ini mampu memberikan banyak manfaat.

Malang, 24 Mei 2024

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	viii
SUMMARY	xi
KATA PENGANTAR	xiv
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xviii
DAFTAR LAMPIRAN	xx
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xxi
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan.....	4
1.4 Manfaat	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Treatment L-DOPA pada penderita Parkinson Disease (PD).....	5
2.2 Patologi α -Synuclein (α syn) pada Penderita PD.....	6
2.3 Interaksi VDAC dan α syn Penyebab Disfungsi Mitochondria.....	7
2.4 Aktivitas Reuptake Dopamin oleh Dopamine Transporter (DAT)...	11
2.5 Aktivitas Uptake α syn oleh LRP1.....	13
2.6 Akumulasi α syn Penyebab Kerusakan BBB pada Penderita PD.....	14
2.7 Kerangka Konsep Penelitian.....	17
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	19
3.2 Kerangka Operasional.....	19
3.3 Metode Penelitian.....	20
3.3.1 Pengumpulan Data dan Preparasi Target Protein.....	20
3.3.2 Molecular Docking	21
3.3.3 Molekuler Dinamik.....	22
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Potensi H ₂ O ₂ untuk Mencegah Monomer α syn Membentuk Fibril...	23
4.1.1 Analisis Hasil Molekular Docking.....	23
4.1.2 Analisis Hasil Molekuler Dinamik.....	27
4.2 Potensi H ₂ O ₂ untuk Mencegah α syn Mengikat VDAC.....	32
4.2.1 Analisis Hasil Molekular Docking.....	32
4.2.2 Analisis Hasil Molekuler Dinamik.....	35
4.3 Potensi H ₂ O ₂ untuk Mencegah α syn Mengikat DAT.....	39
4.3.1 Analisis Hasil Molekular Docking.....	39
4.3.2 Analisis Hasil Molekuler Dinamik.....	42

4.4 Potensi H ₂ O ₂ untuk Mencegah αsyn Mengikat LRP1.....	46
4.4.1 Analisis Hasil Molekular Docking.....	46
4.4.2 Analisis Hasil Molekular Dinamik.....	50
4.5 Potensi H ₂ O ₂ dalam Menstabilkan Protein ERK1/2/5 dan ASK1....	56
4.5.1 Analisis Hasil Molekular Docking.....	56
4.5.2 Analisis Hasil Molekular Dinamik.....	58
4.6 Mekanisme H ₂ O ₂ sebagai Terapi Komplementer L-DOPA.....	62
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan.....	65
5.2 Saran.....	66
DAFTAR PUSTAKA.....	67
LAMPIRAN 1.....	77

DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1	Grid Box pada <i>Blind Docking</i> dan <i>Targeted Docking</i>	23
2	Hasil <i>Docking</i> H ₂ O ₂ dengan monomer α syn.....	24
3	Perubahan interaksi dari residu asam amino kompleks α syn- α syn dan kompleks α synH ₂ O ₂ - α syn.....	26
4	Perubahan interaksi dari residu asam amino kompleks VDAC- α syn, VDAC- α synH ₂ O ₂ , VDAC- α syn _(pol) , dan VDAC- α synH ₂ O ₂ (pol).....	33
5	Perubahan interaksi dari residu asam amino kompleks DAT- α syn, DAT- α synH ₂ O ₂ , DAT- α syn _(pol) dan DAT- α synH ₂ O ₂ (pol).....	40
6	Perubahan interaksi dari residu asam amino pada kompleks LRP1- α syn, LRP1- α synH ₂ O ₂ , LRP1- α syn _(pol) dan LRP1- α synH ₂ O ₂ (pol).....	49
7	Hasil <i>Docking</i> ERK1, ERK2, ERK5 dan ASK1 dengan H ₂ O ₂	56

DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1	A. Struktur 3D protein α syn B. Struktur domain α syn.....	6
2	Konsekuensi Agregasi α syn di PD.....	7
3	Struktur tiga dimensi VDAC1 pada manusia.....	8
4	Model interaksi antara α syn dan VDAC pada permukaan mitokondria.....	9
5	Mekanisme α syn (A) memblokir VDAC dan (B) bertranslokasi melalui pori VDAC.....	9
6	Kematian sel neuron dopaminergik (DNs) oleh apoptosis.....	10
7	Mekanisme DAT mengatur reuptake dopamin pada presinaptik neuron.....	11
8	Diagram sinapsis dopaminergik yang menggambarkan kemungkinan efek dari hilangnya fungsi DAT.....	12
9	Struktural Protein LRP1.....	13
10	Ilustrasi skema karakteristik fisiologis dan patologis BBB selama perkembangan PD.....	15
11	Mekanisme pro-angiogenik dari jalur pensinyalan ERK.....	16
12	Skematis peristiwa yang terjadi setelah sel terpapar H_2O_2	16
13	Kerangka Konsep Penelitian.....	18
14	Kerangka Operasional Penelitian.....	20
15	Hasil docking H_2O_2 pada monomer α syn membentuk kompleks α syn- H_2O_2	25
16	Penambatan H_2O_2 pada residu asam amino monomer α syn.....	25
17	(A) Kompleks α syn- α syn dan (B) Kompleks α syn H_2O_2 - α syn.....	27
18	RMSD total, dari <i>single</i> α syn dan kompleks α syn H_2O_2 , α syn- α syn, dan α syn H_2O_2 - α syn.....	28
19	RMSD $C\alpha$, dari <i>single</i> α syn dan kompleks α syn H_2O_2 , α syn- α syn, dan α syn H_2O_2 - α syn.....	29
20	Perbandingan pola RG antara <i>single</i> α syn dengan kompleks α syn.....	30
21	Superimpose (A) <i>single</i> α syn dan (B) kompleks α syn H_2O_2 , (C) α syn- α syn, (D) α syn H_2O_2 - α syn.....	31
22	RMSF dari kompleks α syn- α syn, α syn H_2O_2 - α syn.....	32
23	Hasil docking kompleks VDAC dengan protein α syn.....	34
24	RMSD total single VDAC dan kompleks VDAC- α syn.....	36
25	RMSD $C\alpha$ single VDAC dan kompleks VDAC- α syn.....	36
26	RMSD Ligan kompleks VDAC- α syn H_2O_2 , dan VDAC- α syn H_2O_2 (pol).....	37
27	MMPBSA kompleks VDAC- α syn H_2O_2 , dan VDAC- α syn H_2O_2 (pol).....	38
28	RMSF pada single VDAC dan kompleks VDAC- α syn.....	38
29	Nilai RMSF kestabilan ligan pada VDAC- α syn(pol), dan VDAC- α syn H_2O_2 (pol).....	39

30	Hasil superimpose pada (A) VDAC- α syn _(pol) , dan (B) VDAC- α synH ₂ O ₂ _(pol)	39
31	Hasil penambatan dengan HDOCK protein DAT dan α syn.....	41
32	RMSD total <i>single</i> DAT dan Kompleks DAT- α syn.....	43
33	RMSD <i>Ca</i> <i>single</i> DAT dan Kompleks DAT- α syn.....	43
34	RMSD ligan DAT- α synH ₂ O ₂ , dan DAT- α synH ₂ O ₂ _(pol)	44
35	MMPBSA kompleks DAT- α synH ₂ O ₂ , dan DAT- α synH ₂ O ₂ _(pol)	44
36	RMSF <i>single</i> DAT dan Kompleks DAT- α syn.....	45
37	Superimpose Kompleks DAT- α syn	45
38	Hasil SWISS MODEL CR3–10 subunit CCR2 dari LRP1.....	47
39	Setelah daerah β - <i>propeller</i> yang melengkung di atas CR dipotong.....	48
40	Hasil penambatan Kompleks LRP1- α syn	50
41	RMSD total pada single LRP1, LRP1- α syn.....	51
42	RMSD <i>Ca</i> pada single LRP1, LRP1- α syn.....	52
43	RMSD ligan pada LRP1- α synH ₂ O ₂ dan LRP1- α synH ₂ O ₂ _(pol)	52
44	Nilai MMPBSA pada LRP1- α synH ₂ O ₂ dan LRP1- α synH ₂ O ₂ _(pol)	53
45	Rg pada single LRP1 dibandingkan dengan LRP1 dan α syn.....	53
46	Hasil superimpose pada kompleks LRP1- α syn	55
47	RMSF pada single LRP1, LRP1- α syn.....	55
48	Hasil Penambatan Protein ERK dan ASK1 dengan H ₂ O ₂	57
49	RMSD Total dari semua kompleks ERK dan ASK1.....	59
50	RMSD <i>Ca</i> dari semua kompleks ERK dan ASK1.....	60
51	RMSF pada semua kompleks ERK dan ASK1.....	60

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1	<i>Active site</i> semua kompleks dari docking HDOCK.....	77
2	Sertifikat Bebas Plagiasi.....	80
3	Letter of Acceptance.....	81

DAFTAR LAMBANG SINGKATAN

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
α syn	α -synuclein
O_2^-	superoxide
AADC	Aromatic L-amino acid decarboxylase
AD	Aldehyde dehydrogenase
ADP	Adenosine diphosphate
APAF-1	Protease activating factor 1 atau apoptosis activating factor-1
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
ATP	Adenosin-5'-trifosfat
BBB	Blood-brain barrier
BEC	Brain endothel cell
DAT	Dopamine transporter
DNs	Dopaminergic neuron cell atau sel neuron dopaminergik
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ETC	Electron transport chain atau rantai transpor electron
H_2O_2	Hydrogen peroksida
IMM	Inner membrane mitochondria
LAT-1	L-Type Amino Acid Transporter 1
LBs	lewy body
L-DOPA	Levo-3,4-dihydroxyphenylalanine
LID	Levodopa-induced dyskinesia
LRP1	Low-density lipoprotein receptor-related protein 1
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MD	Molecular dynamic
MMPBSA	Mechanic poisson-boltzmann surface area
mPTP	Mitochondria permeability transition pore
ND	Neurodegenerative disease
OMM	Outer membrane mitochondria
PD	Parkinson Disease atau Penyakit Parkinson
QoL	quality of life
Rg	Radius of Gyration

RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
RMSF	<i>Root Mean Square Fluctuation</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
<i>SNc</i>	Substantia nigra pars compacta
SSP	Sistem saraf pusat
TH	Tirosin hidroksilase
VDAC	<i>Voltage-Dependent Anion Channel</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit parkinson atau *Parkinson disease* (PD) adalah gangguan neurodegeneratif (Shadrina dkk., 2010), merupakan penyakit multisistem yang melibatkan matinya saraf dopaminergik secara progresif (Paul dkk., 2020) di *substantia nigra pars compacta* (SNc) yang terletak di otak tengah (Jones dkk., 2014; Muthuraman dkk., 2018; Simon dkk., 2020). PD menyebabkan gangguan memori dan kognitif, serta mempengaruhi kemampuan seseorang untuk bergerak, berbicara, dan bernapas (Gitler dkk., 2017). Jumlah penderita PD semakin meningkat dalam beberapa tahun terakhir. Secara global, jumlah penderita PD dan kematian yang diakibatkan oleh PD meningkat lebih cepat daripada gangguan neurologis lainnya. Prevalensi PD meningkat dua kali lipat dalam 25 tahun terakhir. Pada tahun 2019, jumlah penderita PD sejumlah 5,8 juta dan meningkat 81% sejak tahun 2000, dan menyebabkan 329.000 kematian (WHO, 2023). Penyakit ini mengalami peningkatan setiap tahunnya di Indonesia, prevalensi PD pada tahun 2005 sebesar 900.000 dan diperkirakan akan meningkat lebih dari 2 kali lipat di tahun 2030 (Hanriko & Anzani, 2018). Beberapa peneliti berpendapat bahwa PD masih tidak dapat disembuhkan secara total (Lima dkk., 2021), serta belum diketahui bagaimana mencegahnya (Blaess & Herrera, 2023), hal inilah yang menyebabkan jumlah penderita PD meningkat setiap tahunnya.

Penyebab utama PD adalah berkurangnya jumlah dopamin (Latif dkk., 2021). Produksi dopamin yang berkurang ini diakibatkan oleh kematian sel neuron dopaminergik secara progresif di SNc (Jones dkk., 2014; Muthuraman dkk., 2018; Paul dkk., 2020; Simon dkk., 2020), dimana neuron dopaminergik di otak tengah adalah sumber utama dopamin dalam sistem saraf pusat (SSP) (Chinta & Andersen, 2005). Oleh karena itu, pengobatan PD dilakukan dengan terapi levo-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) atau levodopa, yang merupakan prekursor dopamin untuk mengatasi kekurangan dopamin (Thanvi & Lo, 2004). Pemberian prekursor dopamin lebih dipilih jika dibandingkan dengan pemberian dopamin secara langsung, karena L-DOPA yang telah masuk dalam sel neuron nanti akan diubah menjadi dopamin oleh enzim DOPA dekarboksilase (Muthuraman et al., 2018) menyesuaikan dengan kebutuhan masing-masing individu. Berbeda jika diberikan dopamin dengan dosis tertentu, dapat memberikan efek samping secara langsung karena pada dasarnya kebutuhan dopamin setiap individu berbeda. Selain itu, penggunaan L-DOPA lebih

dipilih, karena dopamin itu sendiri memiliki bioavailabilitas rendah dan tidak melewati *blood-brain barrier* (BBB), sehingga L-DOPA digunakan secara klinis karena mudah diangkut ke SSP (Muthuraman, dkk., 2018).

Pada patogenesis PD terjadi disfungsi α syn endogen dengan mengalami salah pelipatan (*misfolding*) dan oligomerisasi sehingga memicu kaskade polimerisasi (Kuusisto, dkk., 2003; Burré, 2015; Park dkk., 2020). Serta ekspresi yang berlebihan α syn dapat memicu efek toksik pada manusia (Ibáñez dkk., 2004) dan menyebabkan matinya neuron dopaminergik dalam SNc (Hijaz & Volpicelli-Daley, 2020). L-DOPA membutuhkan energi untuk diubah menjadi dopamin, namun dapat terganggu karena energi yang tersedia tidak mencukupi, disebabkan oleh disfungsi mitokondria sel neuron. Interaksi α syn dengan *Voltage-Dependent Anion Channel* (VDAC) (Risiglione dkk., 2021; Pathak dkk., 2013), khususnya kemampuan α Syn untuk mengikat VDAC pada *outer membrane mitochondria* (OMM) sehingga dapat memblok dan bertranslokasi ke *inner membrane mitochondria* (IMM) (Rostovtseva dkk., 2015). Hal inilah yang menyebabkan disfungsi mitokondria pada sel saraf (Park dkk., 2020; Pathak dkk., 2013). Selain itu, disfungsi α syn menyebabkan disregulasi *reuptake* dopamin oleh *dopamine transporter* (DAT) (Butler dkk., 2015; Swant dkk., 2011; Vaughan & Foster, 2013).

PD juga ditandai dengan adanya persebaran serta penyerapan monomer dan polimer α syn antar sel (K. Chen dkk., 2022; Kang dkk., 2022), yang dimediasi oleh *low-density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1) (K. Chen dkk., 2022; Robert dkk., 2020) sehingga dapat memperburuk kondisi penderita PD. Selain menyebabkan disfungsi mitokondria pada sel neuron, α syn juga menyebabkan disregulasi dan disfungsi mitokondria pada endotel pembuluh darah otak. Disfungsi α syn pada mitokondria endotel pembuluh darah otak, menyebabkan apoptosis sel endotel dan gangguan pada BBB (Hourfar dkk., 2023; Yuan dkk., 2023). Sehingga, *treatment* yang dapat mencegah degenerasi vaskular diperlukan (Bretón-Romero & Lamas, 2014; Song dkk., 2023) dengan mengatur proliferasi endotel pembuluh darah otak. Sehingga stabilitas sel endotel dapat dipertahankan dan kerusakan endotel tidak akan terjadi. Oleh karena itu, idealnya strategi pengobatan terbaru harus dikembangkan, yaitu dengan terapi komplementer menggunakan H₂O₂ dosis rendah yang memiliki potensi neuroprotektif (Widyarti dkk., 2023). H₂O₂ dikenal sebagai senyawa toksik yang bertanggung jawab atas kerusakan saraf akibat radikal bebas. Namun, dalam beberapa tahun terakhir, 'reputasi buruk' H₂O₂ telah berubah (Nisticò dkk., 2008). Dalam penelitian yang dilakukan oleh Nisticò dkk., (2008), tindakan pengobatan H₂O₂ menunjukkan proses neuroprotektif terhadap OGD (*oxygen/glucose deprivation*) in vitro

pada neuron hipokampus CA1, diamati pada irisan yang diobati dengan H₂O₂ (3 mM). Serta dengan konsentrasi H₂O₂ yang rendah, sangat penting untuk beberapa proses fisiologis, sedangkan konsentrasi tinggi bersifat toksik bagi sel manusia (Nisticò dkk., 2008).

Atas dasar latar belakang tersebut, maka penelitian dengan judul “Kajian In Silico Potensi Hidrogen Peroksida (H₂O₂) Dosis Rendah sebagai Terapi Komplementer L-DOPA Terkait Pencegahan Disfungsi Alfa-Sinuklein pada Penyakit Parkinson” perlu untuk dilakukan, untuk mengurangi beberapa gejala pada penderita PD, meningkatkan *quality of life* (QoL), menghilangkan *movement disorder* pada penderita PD serta dapat membangun efektifitas terapi dengan L-DOPA. Diharapkan penelitian ini dapat memberikan gambaran terkait peran H₂O₂ sebagai agen neuroprotektif, dengan mencegah disfungsi α syn. Sehingga dapat diketahui potensi H₂O₂ sebagai terapi komplementer L-DOPA pada penderita PD.

1.2 Rumusan Masalah

Disfungsi α syn menyebabkan berbagai masalah pada penderita PD yang tidak bisa diselesaikan hanya dengan pengobatan L-DOPA, sehingga menyebabkan pengobatan L-DOPA menjadi kurang efektif. Pada akhirnya memerlukan H₂O₂ sebagai *complementary therapy*. Mengenai hal tersebut maka perlu diketahui kajian secara in silico tentang:

1. Bagaimana mekanisme H₂O₂ dalam mencegah monomer α syn membentuk fibril?
2. Bagaimana mekanisme H₂O₂ dalam mencegah monomer dan polimer α syn mengikat VDAC?
3. Bagaimana mekanisme H₂O₂ dalam mencegah monomer dan polimer α syn mengikat DAT dalam proses *reuptake* dopamin?
4. Bagaimana mekanisme H₂O₂ dalam mencegah monomer dan polimer α syn mengikat LRP1?
5. Bagaimana mekanisme H₂O₂ dalam mengaktifkan protein ERK1/2/5 dan ASK1 untuk mengontrol proliferasi sel endotel pada pembuluh darah otak?

1.3 Tujuan Penelitian

Pengobatan dengan L-DOPA pada penderita PD menjadi kurang efektif, karena ada disfungsi α syn yang tidak bisa diselesaikan, menyebabkan diperlukan adanya terapi komplementer dengan H_2O_2 . Sehingga perlu dilakukan penelitian ini dengan tujuan sebagai berikut:

1. Mendeskripsikan mekanisme H_2O_2 untuk mencegah monomer α syn membentuk fibril
2. Mendeskripsikan mekanisme H_2O_2 dalam mencegah monomer dan polimer α syn mengikat VDAC
3. Mendeskripsikan mekanisme H_2O_2 dalam mencegah monomer dan polimer α syn mengikat DAT dalam proses *reuptake* dopamin
4. Mendeskripsikan mekanisme H_2O_2 dalam mencegah monomer dan polimer α syn mengikat LRP1
5. Mendeskripsikan mekanisme H_2O_2 dalam mengaktifkan protein ERK1/2/5 dan ASK1 untuk mengontrol proliferasi sel endotel pada pembuluh darah otak

1.4 Manfaat Penelitian

Diharapkan penelitian ini dapat memberikan bukti ilmiah peran H_2O_2 serta menjadi landasan edukasi ilmiah ke masyarakat dan dunia medis terkait manajemen terapi PD, sehingga dapat membangun efektifitas pengobatan dengan L-DOPA.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Treatment L-DOPA pada penderita *Parkinson Disease* (PD)

Patologis utama PD adalah matinya neuron dopaminergik di SNc yang menyebabkan bekurangnya produksi dopamin (Latif dkk., 2021). Dopamin merupakan neurotransmitter yang diproduksi oleh neuron dopaminergik di otak (Speranza dkk., 2021) dan merupakan neurotransmitter yang penting dalam otak, yang berfungsi dalam mengendalikan pergerakan tubuh dan memori (Latif dkk., 2021). Oleh karena itu, dopamin yang berkurang menyebabkan penderita PD mengalami gangguan pada fungsi motorik dan nonmotorik. Strategi pengobatan gangguan motorik pada PD umumnya didasarkan pada peningkatan transmisi dopaminergik, salah satunya dengan pengobatan L-DOPA yang merupakan prekursor dopamin (Dorszewska dkk., 2014).

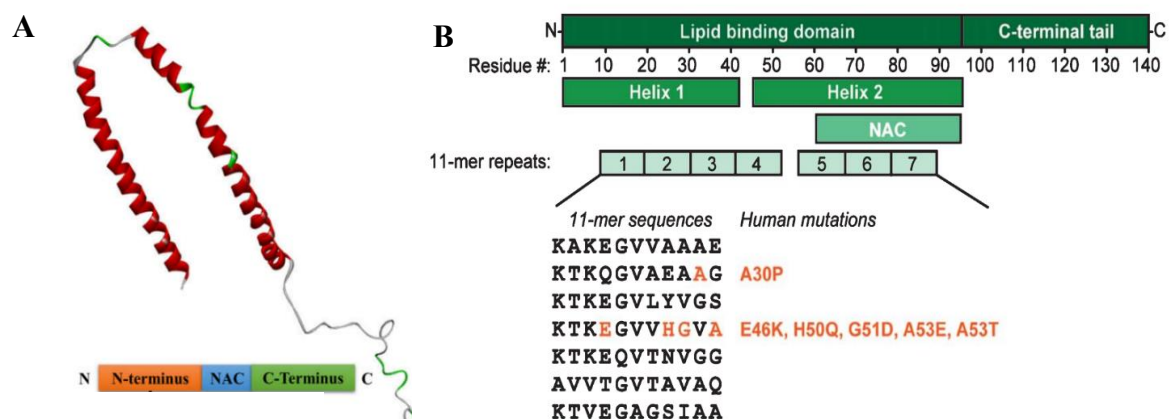
Levodopa atau L-DOPA adalah pengobatan simtomatik pada penyakit PD (Thanvi & Lo, 2004), serta merupakan pengobatan yang paling sering digunakan (Kwon dkk., 2022) dan dapat meningkatkan transmisi dopamin sinaptik. Pengobatan L-DOPA digunakan karena dopamin itu sendiri memiliki bioavailabilitas rendah dan tidak melewati *blood-brain barrier* (BBB), sedangkan L-DOPA secara klinis mudah diangkut ke sistem saraf pusat (SSP) dan diubah menjadi dopamin di otak oleh enzim DOPA *decarboxylase* (Muthuraman dkk., 2018). Selain itu, pemberian L-DOPA dipilih karena produksi dopamin nantinya dapat menyesuaikan dengan kebutuhan masing-masing individu. L-DOPA memasuki neuron presinaptik melewati *L-Type Amino Acid Transporter 1* (LAT-1) yang ada di sel endotel dan telah menjadi salah satu pengangkut yang paling banyak diselidiki untuk mengantarkan obat untuk mencapai lokasi targetnya (Puris dkk., 2020).

L-DOPA diberikan secara oral, biasanya diminum dalam bentuk tablet atau cairan. L-DOPA diserap terutama di duodenum dan usus proksimal, masuk ke aliran darah dan sampai ke otak. L-DOPA diserap oleh sel-sel saraf di otak dan diubah menjadi dopamin (Thanvi & Lo, 2004). Pemberian L-DOPA pada pasien PD terutama terapi jangka panjang, dapat menyebabkan efek samping berupa peningkatan toksisitas, respons inflamasi dan sekitar 80% pasien PD yang diobati mengalami *levodopa-induced dyskinesia* (LID) pada stadium lanjut penyakit ini (Dorszewska dkk., 2014; Kwon dkk., 2022). Karena pada dasarnya, pengobatan dengan menggunakan L-DOPA saja tidak dapat mencegah matinya sel dopaminergik, selain itu PD juga ditandai dengan adanya fibril α syn (Hijaz & Volpicelli-

Daley, 2020). L-DOPA yang seharusnya diubah menjadi dopamin ini dapat mengalami gangguan karena kurangnya ketersediaan energi yang disebabkan oleh disfungsi α syn yang pada akhirnya menyebabkan disfungsi mitokondria. Oleh karena itu, diperlukan terapi komplementer pada PD yang dapat berkontribusi pada peningkatan kualitas hidup pasien PD, serta dapat memperlambat atau menghentikan perkembangan penyakit PD (Dorszewska dkk, 2014). Terapi komplementer dapat memberikan kemungkinan perbaikan secara signifikan, mengurangi kompleksitas penggunaan obat, dan menurunkan efek samping (Kwon dkk., 2022).

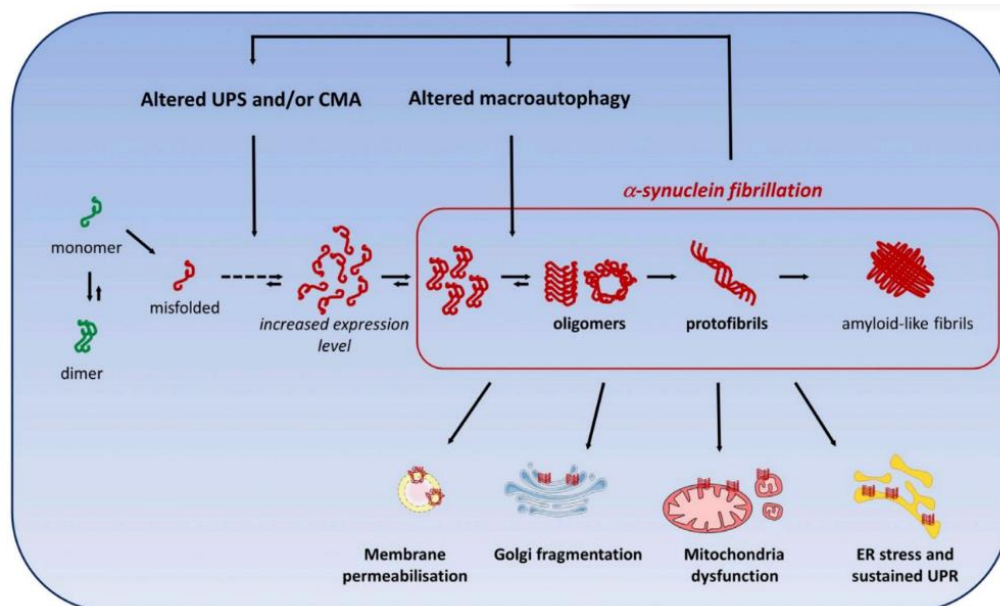
2.2 Patologi α -Synuclein (α syn) pada Penderita PD

α syn merupakan protein yang diekspresikan di terminal presinaptik sistem saraf pusat dan sangat terkait secara genetik dan patologis dengan PD. Akumulasi α syn dalam bentuk oligomer yang salah lipatan dan agregat besar mendefinisikan beberapa penyakit neurodegeneratif yang disebut "sinukleinopati". Pada dasarnya fungsi utama dari α syn sebagian besar masih belum jelas (Burré dkk., 2014). α syn adalah 140 asam amino polipeptida dengan tiga domain fungsional yang berbeda (Gambar 1). Asam amino 1-60 yang merupakan daerah N-terminal bermuatan positif, N-terminal membentuk struktur α -helix amphipathic yang bertanggung jawab atas interaksi α syn dengan membran lipid. Domain pusat, asam amino 61-95 yang dikenal sebagai *non-amyloid β component* (NAC) yang mengandung motif hidrofobik yang sangat penting untuk agregasi α syn. Domain C-terminal, asam amino 96-140 dari protein kaya akan asam amino bermuatan negatif, (Burré, 2015; Risiglione dkk., 2021; Widyarti dkk., 2022).



Gambar 1. A. Struktur 3D protein α syn (RCSB-PDB, 2005. Entry: P37840, akses 2023)
B. Struktur domain α syn (Burré, 2015).

Protein α syn mengalami kesalahan lipatan dan agregasi, kemudian agregat α syn menjadi fibril amiloid yang terakumulasi secara intra-seluler (Park dkk., 2020). Kesalahan lipatan dan agregasi α syn menunjukkan peran sentral dari kematian sel saraf pada PD (Michel dkk., 2016). Pada tahap ini, agregasi α syn berkembang menjadi protofibril tak larut dengan berat molekul lebih tinggi dan berpuncak pada pembentukan *amyloid-like fibrils* yang membangun struktur patologis seperti badan Lewy (Gambar 2). Fibrillogenesis dan agregasi pada α syn (oligomer dan fibril amiloid) diyakini sangat beracun bagi neuron (Lashuel dkk., 2013; Michel dkk., 2016). Dengan demikian intervensi terapeutik yang diarahkan untuk mengurangi toksisitas dan agregasi α syn diperlukan untuk mengembangkan pengobatan masa depan untuk PD (Lashuel dkk., 2013).

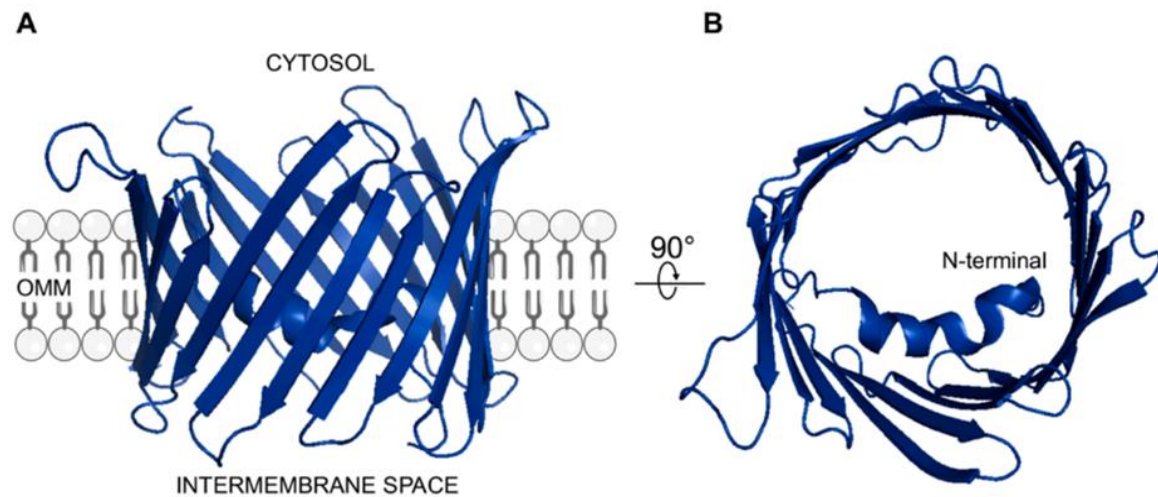


Gambar 2. Konsekuensi Agregasi α syn di PD (Michel dkk., 2016)

2.3 Interaksi VDAC dan α syn Penyebab Disfungsi Mitochondria

Protein presinaptik α syn sebagian besar terlokalisasi di sitosol dan mitokondria (Park dkk., 2020). Akumulasi α syn pada mitokondria telah dikaitkan dengan gangguan respirasi yang bergantung pada protein kompleks-I pada membran dalam mitokondria (Devi et al., 2008). Sehingga akumulasi abnormal α syn berkontribusi terhadap disfungsi mitokondria yang merupakan pusat perkembangan PD (Park dkk., 2020). Hal ini dikaitkan dengan patologi α syn dan interaksinya dengan VDAC (Risiglione dkk., 2021). Porin mitokondria atau protein VDAC adalah saluran yang paling banyak ditemukan di membran luar mitokondria (Rosencrans dkk., 2021) (Gambar 3) serta sebagai gerbang utama untuk ADP/ATP dan berbagai substrat menuju organel, bertindak sebagai penghubung mitokondria

dengan banyak protein sitosol, termasuk α syn (Risiglione dkk., 2021; Rosencrans dkk., 2021). Agregasi α syn ini juga terkait dengan pelepasan neurotransmitter dan kalsium (Singh dkk., 2017). Oligomer α syn menyebabkan serangkaian efek toksik seperti permeabilisasi membran, peningkatan masuknya Ca^{2+} (Rosencrans dkk., 2021), disfungsi mitokondria, stres oksidatif, dan kematian sel (Risiglione dkk., 2021).

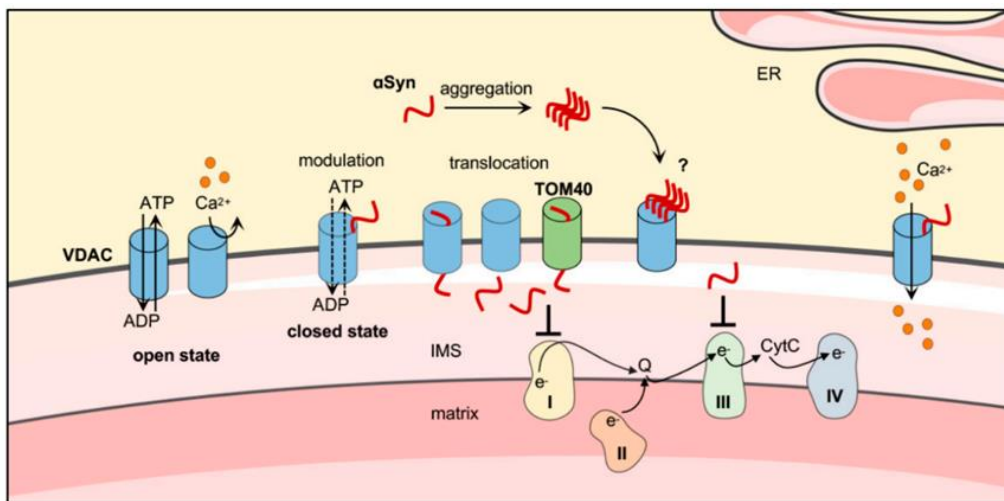


Gambar 3. Struktur tiga dimensi VDAC1 pada manusia (Risiglione dkk., 2021)

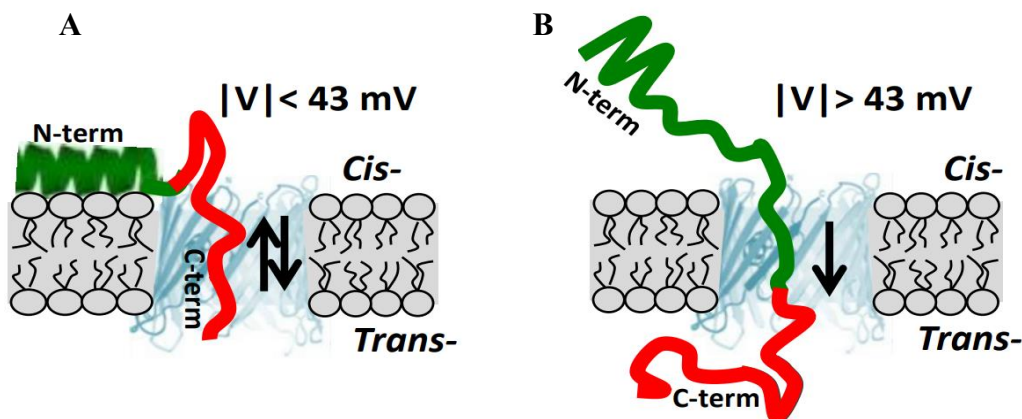
VDAC adalah protein pembentuk pori yang terletak di membran luar mitokondria atau *outer membrane mitochondria* (OMM) di mana VDAC mencapai ~50% dari keseluruhan kandungan protein, serta bertanggung jawab atas ~90% dari keseluruhan permeabilitas OMM. Fungsi VDAC adalah untuk mempertahankan komunikasi “*cross-talk*” metabolik antara mitokondria dan organel sel lainnya (Risiglione dkk., 2021). Studi terbaru melaporkan kemampuan α syn untuk mengikat VDAC. Data dari analisis menunjukkan bahwa monomer α syn secara reversibel memblokir konduktansi VDAC1 (Risiglione dkk., 2021; Rosencrans dkk., 2021; Rostovtseva dkk., 2015) dan memodulasi aktivitas elektrofisiologisnya yang mendorong transisi dari keadaan terbuka ke keadaan tertutup (Gambar 4). Bagian domain terminal-C, adalah wilayah spesifik α syn yang berinteraksi dengan VDAC1. Dengan demikian, VDAC memiliki keterlibatan yang jelas dalam timbulnya berbagai penyakit neurodegeneratif, termasuk PD (Risiglione dkk., 2021; Rosencrans dkk., 2021)

VDAC yang diblokir oleh α syn bersifat reversibel dan parsial, dengan mempertahankan sekitar 40% dari konduktansi dengan keadaan terbuka. Ada tiga konsekuensi fisiologis langsung dari interaksi α syn-VDAC ini (Gambar 4) dalam kondisi tertentu, i) α syn dapat bertranslokasi melalui pori VDAC (Gambar 5) dan menargetkan

kompleks-1 respirasi di intermembrane mitokondria yang mengakibatkan berinteraksi langsung dengan kompleks rantai transpor elektron dari membran dalam yang menyebabkan gangguan fungsi mitokondria (Rosencrans dkk., 2021; Rostovtseva dkk., 2015), ii) ketika domain terminal-C bermuatan negatif ditangkap secara sementara di dalam pori VDAC memblokir pori VDAC (Rostovtseva dkk., 2015) (Gambar 5) keadaan yang diblokir menjadi selektif kation, mencegah translokasi metabolit bermuatan negatif (ATP dan ADP) karena penghalang elektrostatik, iii) keadaan *αsyn*-blocked yang lebih selektif kation menunjukkan bahwa Ca^{2+} lebih tinggi pada keadaan ini daripada pada keadaan terbuka (Rosencrans dkk., 2021). Ketiga hal tersebut menyebabkan disfungsi mitokondria yang ditandai dengan menurunnya produksi ATP dan peningkatan produksi spesies oksigen reaktif (ROS) (Rostovtseva dkk., 2015).

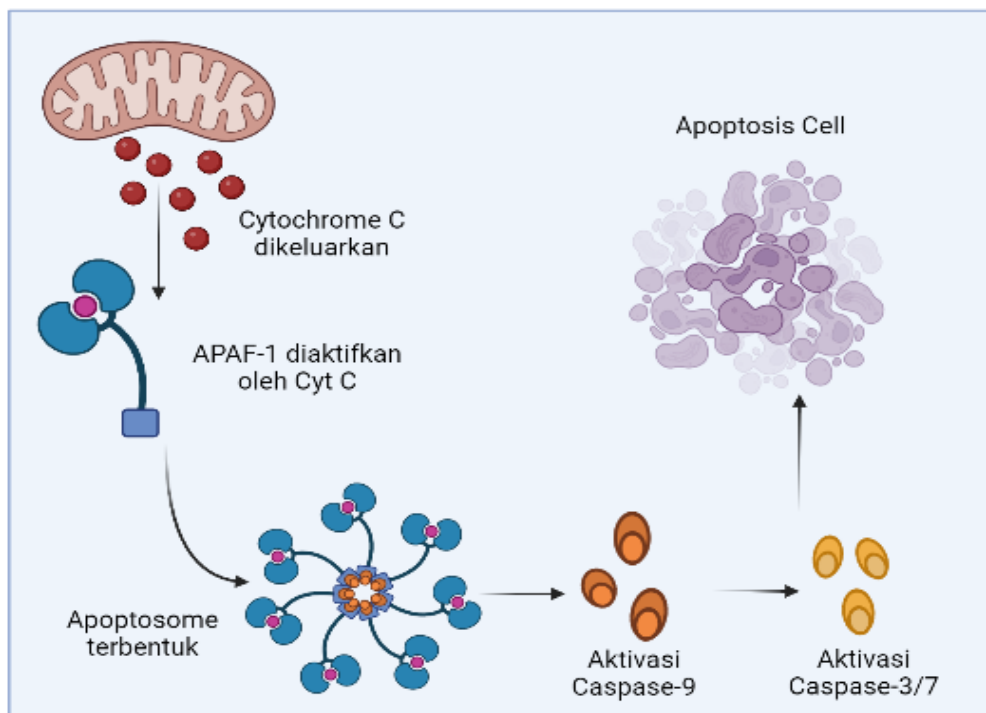


Gambar 4. Model interaksi antara α syn dan VDAC pada permukaan mitokondria (Risiglione dkk., 2021)



Gambar 5. Mekanisme α syn (A) memblokir VDAC dan (B) bertranslokasi melalui pori VDAC (Rostovtseva, dkk, 2015)

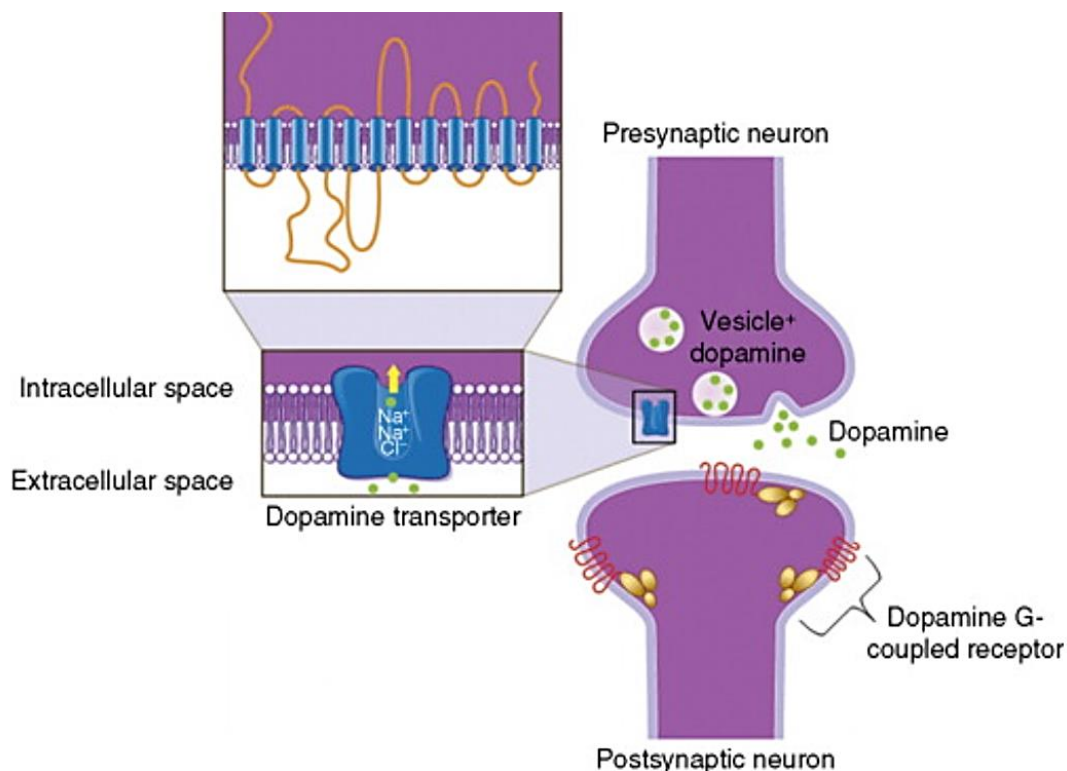
Sebagai respons terhadap kerusakan sel, akumulasi Ca^{2+} yang berlebihan terjadi dalam matriks dan berfungsi sebagai pemicu utama pembukaan *permeability transition pore* (mPTP). Pembukaan mPTP menyebabkan peningkatan permeabilitas membran mitokondria, sehingga memungkinkan terjadinya akumulasi ROS, menghasilkan stres oksidatif yang lebih besar. Hal ini menghasilkan pengurangan produksi ATP yang pada akhirnya mengarah pada aktivasi jalur apoptosis intrinsik dan kematian sel. Peningkatan permeabilitas mitokondria juga memediasi kebocoran protein ke dalam sitoplasma, termasuk protein sitokrom c. Sitokrom c terlibat dalam metabolisme mitokondria normal dan berfungsi sebagai pembawa elektron dari kompleks III ke kompleks IV dalam rantai transpor elektron (ETC). Ketika dilepaskan ke dalam sitoplasma, sitokrom c mengikat protein yang disebut faktor pengaktifan apoptosis-1 (APAF-1) (Norat dkk., 2020), menginduksi oligomerisasi dan pembentukan apoptosom. Apoptosom merekrut procaspase-9 yang mengarah ke dimerisasi dan aktivasi caspase-9. Setelah diaktifkan, caspase-9 merangsang kaskade caspase (Boland dkk., 2013; Lima dkk., 2021; Norat dkk., 2020). Kaskade mengaktifkan caspases eksekutor, seperti caspase-3, -6, dan -7, yang mendorong pembelahan DNA secara enzimatik dan fragmentasi nukleus yang terkait dengan apoptosis (Norat dkk., 2020) (Gambar 6). Hal inilah yang menyebabkan matinya sel dopaminergik, sehingga produksi dopamin rendah, yang merupakan gejala utama PD.



Gambar 6. Kematian sel neuron dopaminergik (DNs) oleh apoptosis. Gambar dikembangkan dari Boland dkk., (2013) menggunakan Biorender.com.

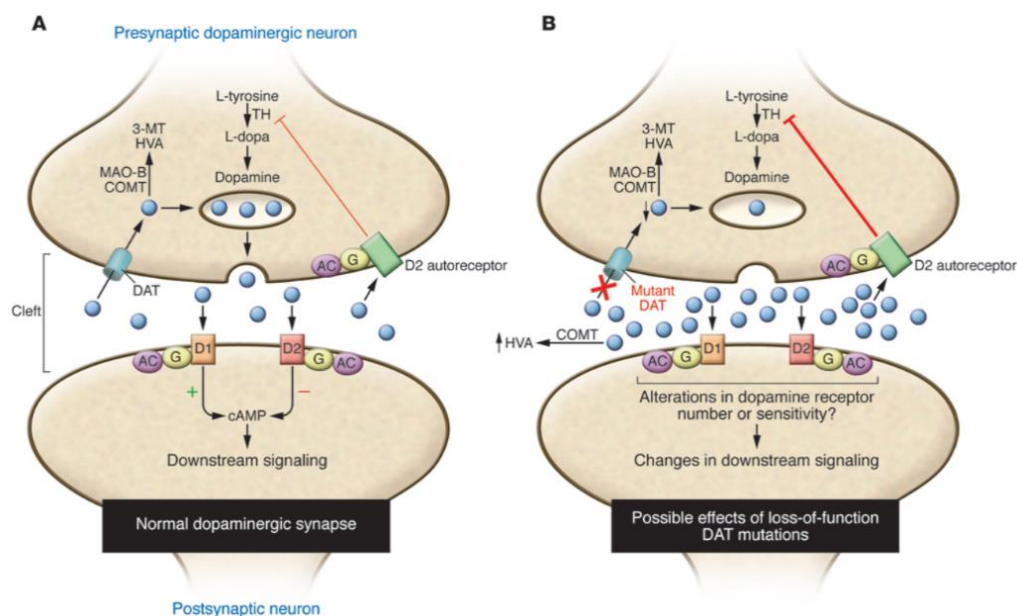
2.4 Aktivitas *Reuptake* Dopamin oleh Dopamine Transporter (DAT)

Jumlah dopamin pada terminal presinaptik dapat berkurang setelah eksositosis vesikel dopamin. Dopamin berikatan dengan reseptor dopamin pada membran postsinaptik, yang mengarah ke transduksi sinyal dalam neuron pascasinaps. Namun ada sejumlah dopamin yang kemudian didaur ulang dengan di *reuptake* melalui transporter dopamin (DAT) (Ford, 2014; Jones dkk., 2014). Dopamin di celah sinaptik dapat berikatan secara prasinaps dengan autoreseptor DAT, atau secara pascasinaps berikatan dengan reseptor kelas D1 dan D2 (reseptor dopamin). DAT sebagian besar terletak di presinaptik (Blackstone & Blackstone, 2009) dan merupakan salah satu komponen presinaptik utama yang terlibat dalam pengaturan dopaminergik (Lee dkk., 2007). DAT mengontrol keberadaan neurotransmisi dopamin dan menjaga homeostasis dopamin pada celah sinaps. DAT merupakan protein membran plasma yang secara aktif mentranslokasi dopamin yang dilepaskan dari ruang ekstraseluler ke neuron presinaptik (Vaughan & Foster, 2013). DAT adalah 12 *transmembrane-spanning protein* yang merupakan simporter (Overk, C. & Mufson, 2010) yang bergantung pada Na^+ , Cl^- . Setelah pelepasan eksositosis, substrat dopamin berdifusi ke transporter, berikatan dengan DAT dan diangkut kembali ke dalam sitosol (Gambar 7) (R. Chen dkk., 2010), peristiwa ini yang ditemukan di area perisinaptik neuron dopaminergik (Overk, C. & Mufson, 2010).



Gambar 7. Mekanisme DAT mengatur *reuptake* dopamin pada presinaptik neuron (Overk, C. & Mufson, 2010).

Disregulasi DAT menyebabkan disfungsi dopaminergik, karena DAT adalah gerbang khusus dopaminergik termasuk dopamin (Vaughan & Foster, 2013). Jika terjadi transportasi yang tidak teratur atau perubahan aktivitas DAT (Butler dkk., 2015), maka menjadi mekanisme yang dapat berkontribusi pada perkembangan penyakit seperti PD, yang dikaitkan dengan tingkat dopamin yang abnormal (Vaughan & Foster, 2013) atau disregulasi dopamin. DAT sangat penting untuk pemeliharaan homeostasis dopamin di otak (Swant dkk., 2011). Menurut Blackstone & Blackstone, (2009), hilangnya fungsi DAT ini bisa disebabkan oleh adanya mutasi. DAT yang tidak berfungsi dengan baik menyebabkan penipisan simpanan dopamin di presinaptik dan kemungkinan penurunan regulasi fungsi reseptor dopamin postinaptik, yang mengakibatkan gangguan pada neurotransmisi dopaminergik yang konsisten serta mengakibatkan kelebihan dopamin di celah sinaptik. Karena terlalu banyak dopamin yang terdapat pada celah sinaptik menyebabkan banyak dopamin yang berikatan dengan autoreseptor D2 sehingga menyebabkan adanya overstimulasi. Overstimulasi autoreseptor D2 diperkirakan menghambat aktivasi tirosin hidroksilase (TH) yang bergantung pada fosforilasi, yang pada akhirnya membatasi laju produksi dopamin endogenus (Blackstone & Blackstone, 2009)(Gambar 8).



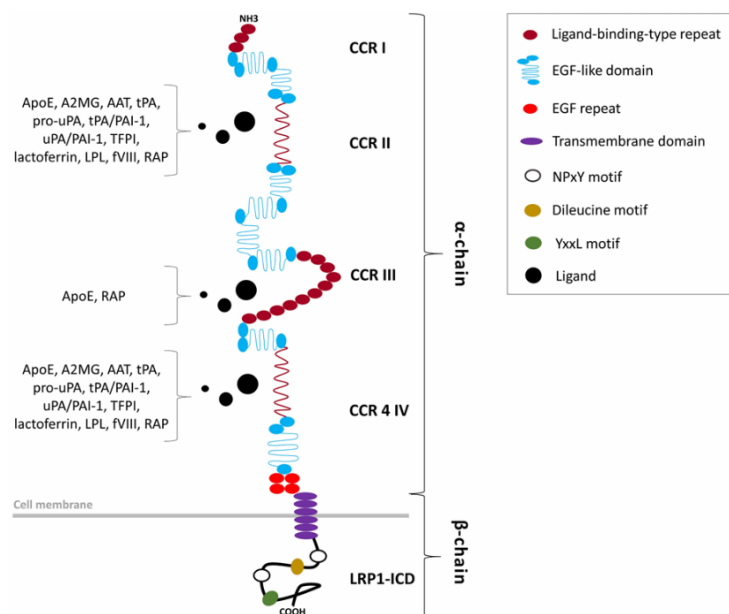
Gambar 8. Diagram sinapsis dopaminergik yang menggambarkan kemungkinan efek dari hilangnya fungsi DAT (Blackstone & Blackstone, 2009).

Lokalisasi membran dan aktivitas DAT diatur oleh sejumlah protein intraseluler, yaitu α syn yang membentuk kompleks stabil dengan DAT yang pada umumnya terlibat dalam penyakit neurodegenerative (Butler dkk., 2015; Swant dkk., 2011). Sebagian besar

kompleks protein DAT- α syn ditemukan di membran plasma neuron dopaminergik. Interaksi DAT dan α syn mengungkapkan adanya depolarisasi membran yang diinduksi DAT (Butler dkk., 2015), sehingga dapat mempengaruhi lingkungan mikro membran di dekat transporter, menjadikan disregulasi pada DAT yang dapat mengubah homeostasis neuron dopamin (Swant dkk., 2011). Hal ini juga menyebabkan disregulasi neurotransmisi dopamin dan disertai dengan patologis α syn (Butler dkk., 2015). Pada dasarnya interaksi α syn dan DAT menyebabkan adanya penurunan ekspresi permukaan sel DAT dan penghambatan aktivitas DAT ketika α syn diekspresikan secara berlebihan (Swant dkk., 2011).

2.5 Aktivitas *Uptake* α syn oleh LRP1

LRP1 diekspresikan secara luas dalam berbagai jenis sel termasuk neuron, astrosit, mikroglia, makrofag, fibroblas, dan sel otot polos. Dalam penelitian ini menunjukkan peran LRP1 untuk memediasi penyerapan α syn dalam neuron (K. Chen dkk., 2022). LRP1 juga dikenal sebagai reseptor transmembran yang berinteraksi dengan lebih dari 40 ligan yang diketahui (Faissner, 2023) dan merupakan reseptor membran sel endositik yang ada di mana-mana dengan kemampuan untuk menginternalisasi berbagai macam ligan yang beragam secara struktural dan fungsional (Potere dkk., 2019). LRP1 terdiri dari 515-kD rantai α yang terikat secara non-kovalen ke rantai β , yang terdiri 85-kDa. Rantai- α bertanggung jawab atas aktivitas pengikatan ligan LRP1, mencakup empat kelompok *cysteine-rich complement-type repeats* (CCRsI-IV) dan *EGF-like domain* (Potere dkk., 2019) (Gambar 9).



Gambar 9. Struktural Protein LRP1 (Potere dkk., 2019)

Agregasi dan penyebaran protein α syn juga merupakan patologi utama penyakit PD (K. Chen dkk., 2022). Perkembangan klinis dan tingkat keparahan penyakit sinukleinopati dikaitkan dengan pengendapan dan penyebaran agregat protein. α syn menyebar di antara sel-sel menyebabkan neurotoksisitas (K. Chen dkk., 2022; Peng dkk., 2022). Oligomer, fibril, dan monomer α syn, dapat ditransfer antar sel (Kang dkk., 2022). LRP1 telah terlibat dalam internalisasi tau fibrillar (Boder dkk., 2023), serta memiliki peran penting dalam mekanisme transmisi interneuronal α syn monomer dan oligomer (Pan & Peng, 2022). LRP1 sebagai pengatur utama penyerapan neuron α syn, serta mediator penting penyebaran α syn di otak (K. Chen dkk., 2022). LRP1 memediasi penyerapan α syn melalui pengikatan pada residu lisin di ujung N dari α syn (Peng dkk., 2022). Sehingga dapat memberikan wawasan terapeutik potensial yang menargetkan penyakit yang relevan dengan patologi α syn (K. Chen et al., 2022) dan menyoroti LRP1 sebagai target obat yang menjanjikan untuk memblokir penyebaran α syn (Pan & Peng, 2022).

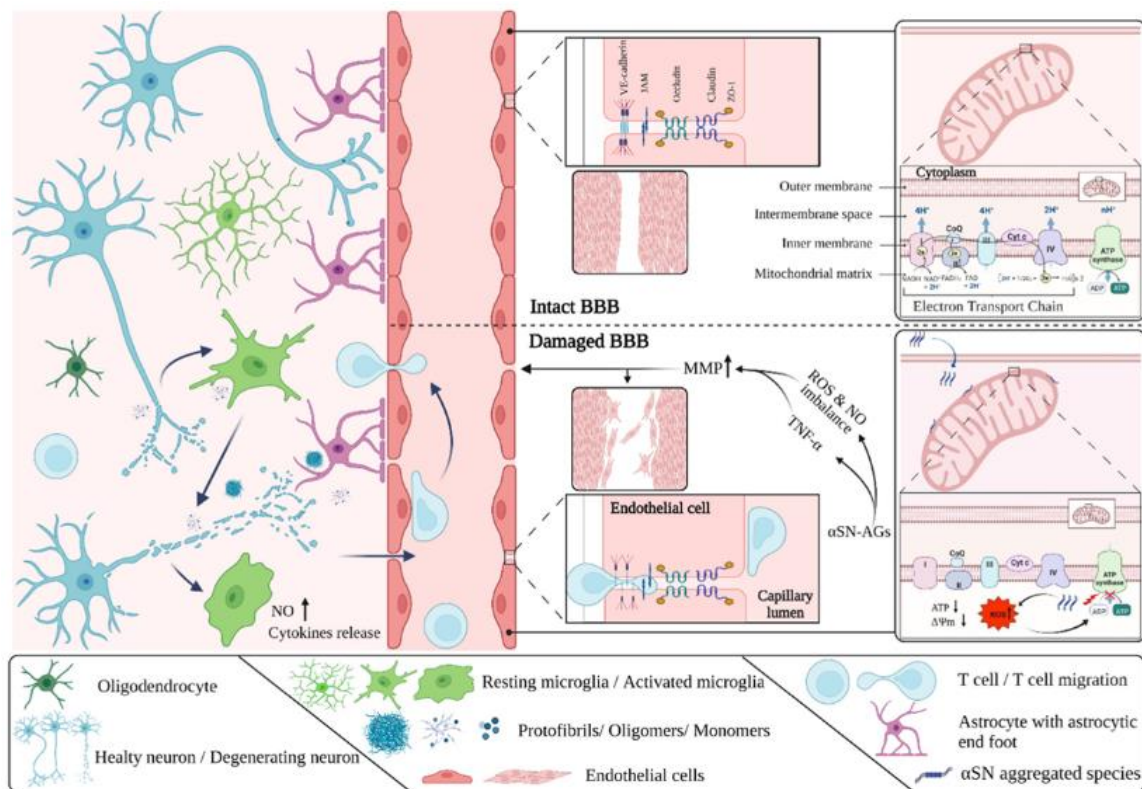
2.6 Akumulasi α syn Penyebab Apoptosis Sel Endotel Pembuluh Darah Otak

PD juga disebabkan oleh adanya gangguan pada sel endotel pembuluh darah otak (Burré, 2015; Hourfar dkk., 2023; Alkhalifa dkk., 2023), ini disebabkan oleh efek langsung dari akumulasi α syn toksik pada sel endotel otak atau *brain endothel cells* (BEC) (Jeong dkk., 2023), yang merupakan bagian utama dari BBB (Yuan dkk., 2023). Agregat α syn menyebabkan disfungsi mitokondria dan disregulasi pada BEC, sehingga menyebabkan BEC menjadi disfungsi serta apoptosis (Hourfar dkk., 2023; Thanvi & Lo, 2004; Yuan dkk., 2023) (Gambar 10). Hal ini lah yang menyebabkan kebocoran pada BBB (Alkhalifa dkk., 2023), kerusakan pada BBB dan dapat meningkatkan permeabilitas BBB.

Gangguan BBB menyebabkan peradangan saraf, yang dapat menyebabkan disfungsi saraf dan degenerasi saraf (Profaci dkk., 2020) yang berakhir menyebabkan penyakit neurodegeneratif, salah satunya adalah PD. Hingga saat ini, L-DOPA digunakan karena dapat melewati BBB, mudah diangkut ke sistem saraf pusat (SSP), dan kemudian diubah menjadi dopamin oleh enzim DOPA dekarboksilase (Muthuraman dkk., 2018). *L-Type Amino Acid Transporter 1* (LAT-1) adalah protein transmembran di BEC, mengangkut L-DOPA melintasi BBB ke otak untuk mencapai lokasi targetnya (Gynther dkk., 2019; Puris dkk., 2020). LAT1 diekspresikan pada sisi apikal dan basolateral membran BECs (Gynther dkk., 2019; Zaragoza, 2020).

Terapi hanya menggunakan L-DOPA tidak dapat mengatasi apoptosis sel endotel pembuluh darah otak, oleh karena itu, pengobatan yang mencegah degenerasi pembuluh

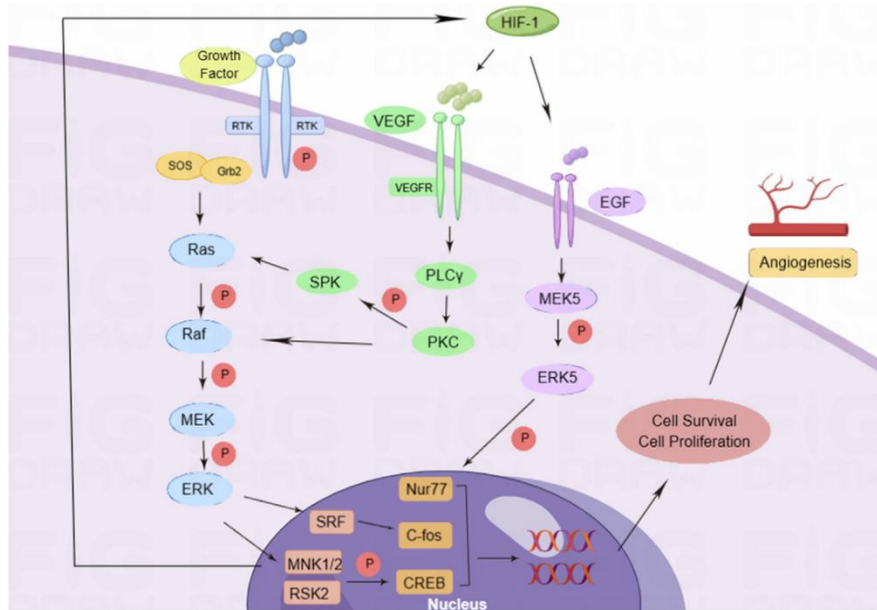
darah otak dapat menjadi target baru bagi penyakit PD (Blanc dkk., 2003). Pemberian H_2O_2 dosis rendah dapat digunakan sebagai terapi komplementer, dengan mengaktifkan *Extracellular signal-regulated kinases* (ERK/1/2/5), p38 dan JNK (Bretón-Romero & Lamas, 2014), dimana ERK, p38 dan JNK termasuk dalam keluarga *mitogen activated protein kinase* (MAPK) (Olea-Flores dkk., 2019). Protein MAPK dapat memfosforilasi dan mengaktifkan beberapa protein pengatur, terkait erat dengan ekspresi gen, dan *growth promotion*, aktivasi komponen sinyal ini merupakan respons fisiologis terhadap H_2O_2 (Blanc dkk., 2003).



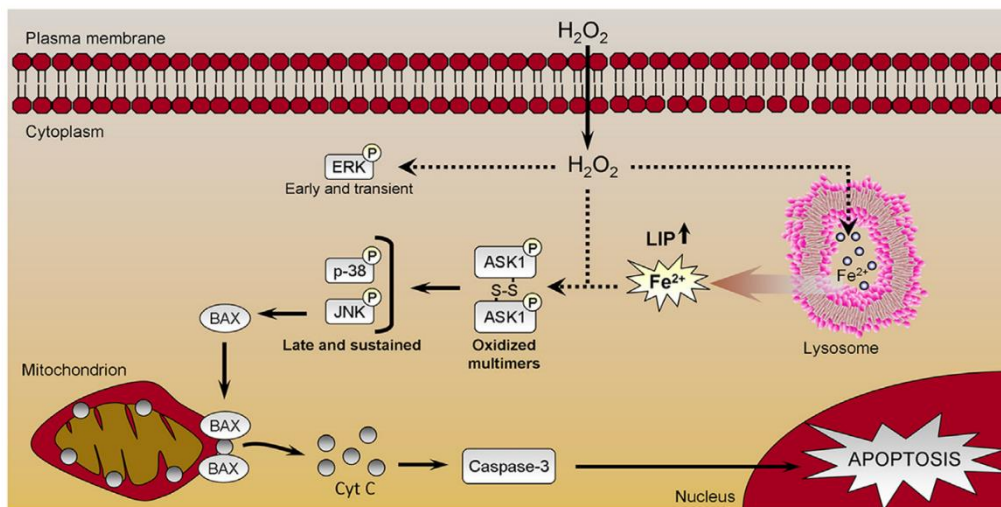
Gambar 10. Ilustrasi skema karakteristik fisiologis dan patologis BBB selama perkembangan PD. Perlakuan dengan pemberian agregasi α syn menyebabkan penurunan potensi membran mitokondria (Hourfar dkk., 2023).

Fosforilasi ERK1/2 memainkan peran sentral dalam pengendalian proliferasi sel endotel (R. Srinivasan dkk., 2009) melalui jalur; menginduksi ekspresi *serum response factor* (SRF), *MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 1 and 2* (MNK1/2), dan RSK2; untuk mengaktifkan faktor transkripsi c-fos dan *cAMP-response element-binding protein* (CREB); sehingga mengatur transkripsi dan translasi sel; mempromosikan proliferasi sel (Cargnello & Roux, 2011; Olea-Flores dkk., 2019; Song dkk., 2023) (Gambar 11). ERK5 diekspresikan dalam tingkat tinggi di otak. Diusulkan untuk mengatur perkembangan pembuluh darah, aktivitas saraf, kelangsungan hidup (Olea-Flores dkk., 2019), dan

menghambat apoptosis sel endotel (Bretón-Romero & Lamas, 2014). Fosforilasi ERK5, meningkatkan aktivitas faktor transkripsi *nuclear receptor subfamily 4 group A member 1* (Nur77), dan mendorong proliferasi sel (Song dkk., 2023).



Gambar 11. Mekanisme pro-angiogenik dari jalur pensinyalan ERK (Song dkk., 2023).



Gambar 12. Skematis peristiwa yang terjadi setelah sel terpapar H₂O₂. Memodulasi oksidasi ASK1, yang diperlukan untuk aktivasi berkelanjutan sumbu JNK-p38, mendorong sel ke apoptosis yang dimediasi mitokondria (Mantzaris dkk., 2016).

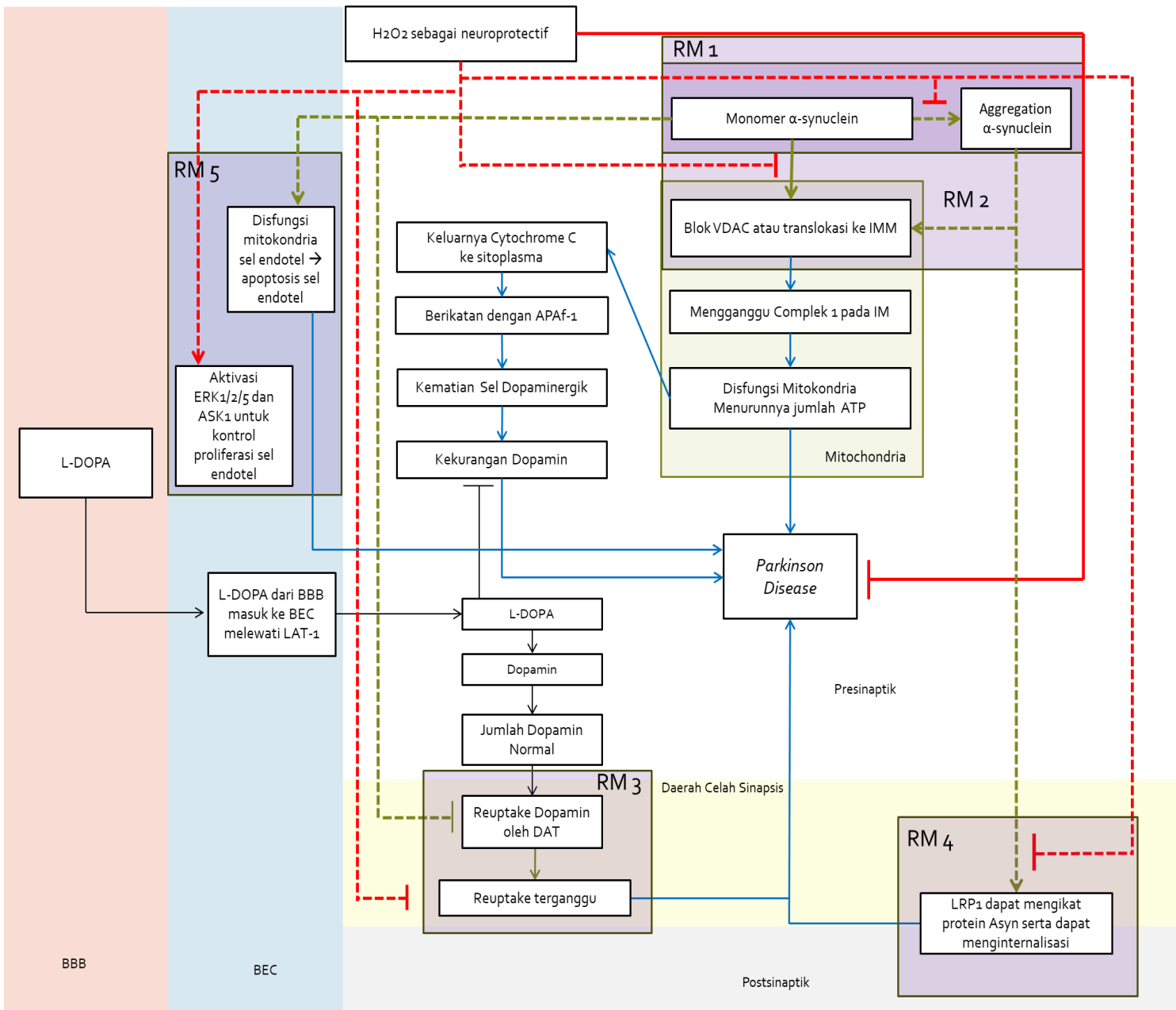
Peningkatan jumlah BEC secara signifikan juga dapat memperburuk PD (Bradaric dkk., 2012), sehingga diperlukan pengaturan homeostatis untuk mengatur pertumbuhan BEC agar tetap normal. Regulasinya dilakukan secara apoptosis melalui aktivasi *apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK1) oleh H₂O₂ (Gambar 12). ASK1 mengaktifkan protein kinase yang diatur stres p38-MAPK (protein kinase teraktivasi mitogen) dan kaskade c-Jun N

terminal kinases (JNKs) (Mantzaris dkk., 2016), merupakan modulator utama dari kelangsungan hidup sel dan keseimbangan apoptosis/kematian (*death balance*) (Meijles dkk., 2020).

2.7 Kerangka Konsep Penelitian

PD diakibatkan oleh matinya sel neuron dopaminergik yang menyebabkan berkurangnya produksi dopamin dan diakibatkan oleh α syn yang menyebabkan disfungsi mitokondria. Protein α syn dapat memblokir VDAC yang ada pada membran luar mitokondria sehingga mencegah translokasi metabolit bermuatan negatif (ATP dan ADP) serta dapat bertranslokasi masuk ke membran dalam mitokondria dan mengganggu fungsi kompleks mitokondria I sehingga sistem respirasi tidak berjalan dengan baik dan menyebabkan menurunnya jumlah ATP yang berakhir pada disfungsi mitokondria dan disfungsi energi. PD juga dapat disebabkan oleh adanya proses reuptake dopamin oleh DAT yang terganggu oleh adanya α syn, serta adanya proses *uptake* α syn oleh LRP1 dari sel ke sel yang juga menyebabkan PD semakin memburuk. Adanya protein α syn juga dapat menyebabkan disfungsi mitokondria pada BEC, hingga menyebabkan apoptosis sel endotel.

Disfungsi mitokondria yang terjadi menyebabkan matinya sel dopaminergik dengan mengeluarkan cytochrome C ke sitosol yang akan berikatan dengan APAF-1 yang merupakan agen pro-apoptosis. Sel dopaminergik yang mati ini menyebabkan produksi dopamin rendah, yang merupakan gejala utama PD. Oleh karena itu pengobatan PD pada umumnya menggunakan treatment L-DOPA yang merupakan precursor dopamin. Namun, L-DOPA tidak dapat mencegah disfungsi mitokondria serta patologi α syn. Sehingga dengan seiring waktu, pasien lebih sering mengalami resistensi L-DOPA dan memiliki efek samping seperti diskinesia. Selain itu, pemberian L-DOPA menjadi tidak efektif jika pada dasarnya L-DOPA membutuhkan energi untuk bisa di ubah menjadi dopamin, sedangkan energi yang tersedia tidak mencukupi karena mitokondria yang berfungsi sebagai penghasil energi mengalami disfungsi. Terapi komplementer L-DOPA dengan memberikan H_2O_2 dosis rendah yang diketahui berperan dalam neuroprotektif diperlukan, karena diperkirakan dapat memperbaiki kerusakan mitokondria dan mencegah adanya patologi α syn. Studi *in silico* digunakan untuk mendeskripsikan mekanisme H_2O_2 dalam mencegah terbentuknya fibril α syn, mekanisme H_2O_2 dalam mencegah mengikatnya α syn dengan VDAC, DAT dan LRP. Serta mendeskripsikan mekanisme H_2O_2 dalam mengaktifkan ERK1/2/5 dan ASK1 untuk mengontrol proliferasi sel endotel pembuluh darah otak. Kerangka konsep pada penelitian ini dapat dilihat pada gambar 13.



Gambar 13. Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan:

BEC : Brain Endothel Cell

→ : Jalur Pengobatan L-DOPA

BBB : Brain Blood Barrier

RM : Rumusan Masalah

IMM : Inner Membran Mitokondria

- - - → : Kinerja H₂O₂

- - - → : Disfungsi αsyn

→ : Jalur PD

BAB III

METODE PENELITIAN

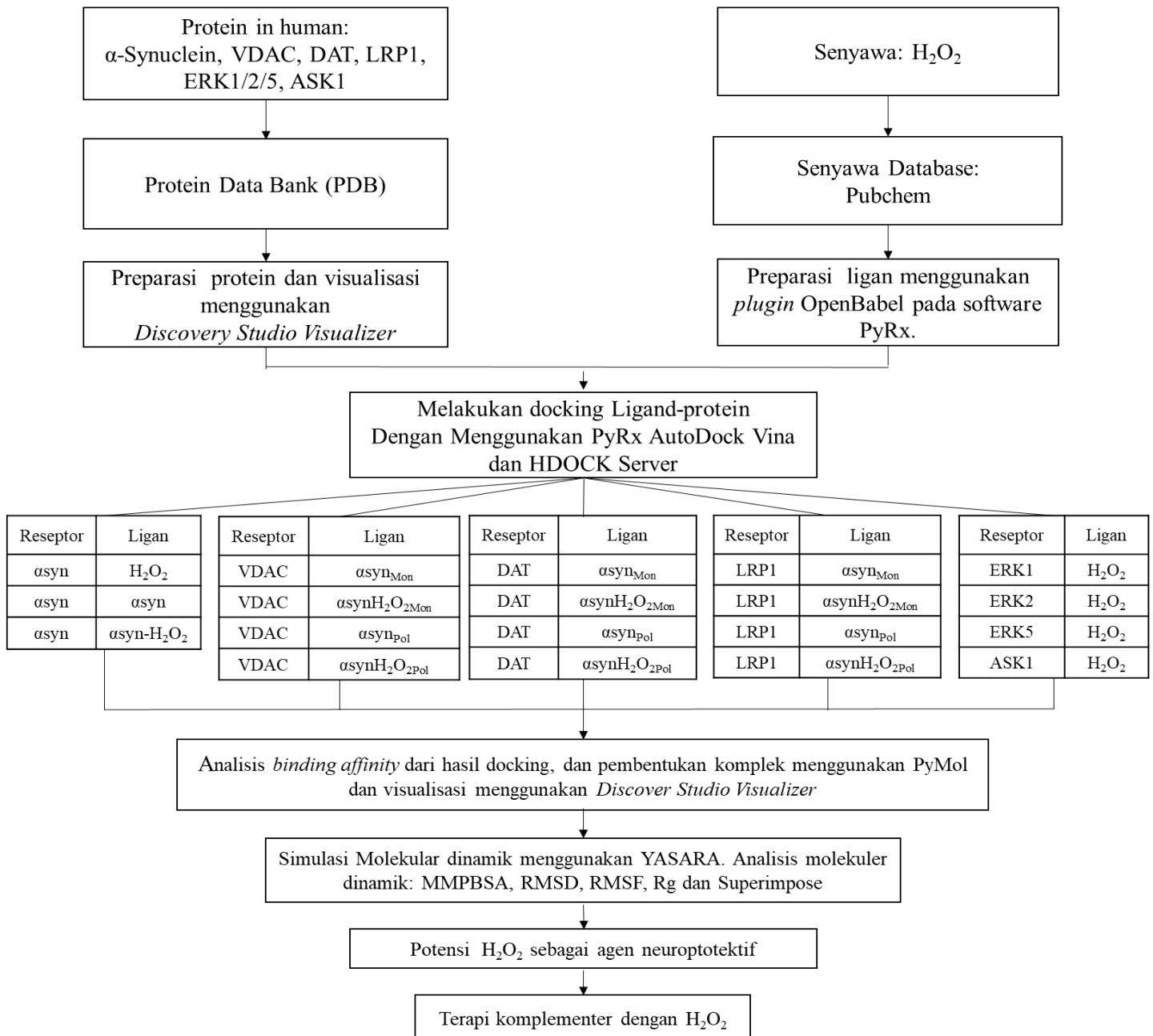
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan secara *in silico* pada bulan Mei 2023 - April 2024, dan dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Laboratorium Biokomputasi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Kerangka Operasional

Berdasarkan kerangka operasional (Gambar 14) langkah utama dalam penelitian ini dengan mendownload struktur protein target yaitu α syn, VDAC, DAT, LRP1, ERK 1/2/5 dan ASK1 pada *protein data bank* (PDB). Mendownload struktur senyawa kimia H₂O₂ pada Pubchem. Sebelum molekular *docking*, maka perlu dilakukan preparasi sampel protein dengan menggunakan *Discover Studio Visualizer*, dan preparasi ligan menggunakan *plugin* OpenBabel pada software PyRx.

Selanjutnya dilakukan molekular docking menggunakan software *PyRx Autodock Vina* untuk *docking* H₂O₂ dengan α syn, dan *docking* H₂O₂ dengan ERK 1/2/5 dan ASK1 untuk mengetahui potensi H₂O₂ dalam menstabilkan protein ERK 1/2/5 dan ASK1, pembentukan kompleks hasil docking menggunakan software Pymol dan divisualisasikan dengan *Discover Studio Visualizer*. Untuk *docking* antar protein menggunakan software online yaitu HDOCK untuk mengetahui: potensi H₂O₂ untuk mencegah terbentuknya fibril α syn, potensi H₂O₂ dalam menurunkan *binding affinity* α syn dengan VDAC, serta pengaruh H₂O₂ terhadap *binding affinity* pada kompleks DAT- α syn dalam proses reuptake dopamin, serta menurunkan *binding affinity* protein α syn pada LRP1 untuk mencegah penyerapan dan persebaran α syn. Analisis parameter yang digunakan adalah posisi pengikatan ligan pada makromolekul, binding afinitas dan jenis ikatan. Dilanjutkan dengan analisis molekular dinamik menggunakan YASARA untuk mengetahui nilai MMPBSA, RMSD, RMSF, Rg dan superimpose. Kerangka operasional dalam penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Kerangka Operasional Penelitian

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Pengumpulan Data dan Preparasi Target Protein

Struktur tiga dimensi (3D) target protein (*Homo sapiens*) diambil dari *Protein Data Bank* (PDB) (<https://www.rcsb.org/>). Target protein terdiri dari α syn (ID PDB: 8A9L), VDAC (ID PDB: 5XDO), DAT (ID PDB: AF-Q01959-F1), ERK1 (ID PDB: 8AOJ), ERK2 (ID PDB: 4QTB), ERK5 (ID PDB: 5BYZ) dan ASK1 (PDB ID: 2CLQ), diunduh dalam format pdb dan dipreparasi menggunakan *Discovery Studio 2021 Client v21.1.0.20298*, yang dioperasikan dengan *Microsoft Windows 11*, kemudian hasil preparasi juga disimpan dalam

format (.pdb). Karena struktur protein yang diunduh pada PDB mengandung molekul pelarut berupa air dan residu lainnya, sehingga perlu dihilangkan agar tidak mengganggu pada saat simulasi *docking* dan untuk memastikan bahwa yang berinteraksi adalah ligan dan reseptor (Sari dkk., 2020) serta menghindari kemungkinan ligan uji melekat pada molekul pengganggu (Masriany dkk., 2022). Preparasi sampel juga diperlukan untuk menghapus molekul protein lain yang menempel pada protein target, sehingga preparasi sampel ini penting (Dar & Mir, 2017). Struktur LRP1 belum ditemukan dalam PDB (Boder dkk., 2023), untuk melakukan pemodelan homologi untuk mendapatkan model LRP1 kami menggunakan SWISS MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>). Pertama, kami menggunakan server web Uniprot untuk menemukan sekuen lengkap dari sekuen manusia LRP1 (Uniprot #Q07954) (Boder dkk., 2023). Sekuen LRP1 tersebut disalin dan dimasukkan ke dalam SWISS MODEL untuk pemodelan homologi.

3.3.2 Molekuler Doking

Hidrogen peroksida (CID: 784), diunduh dalam format SDF dari PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Proses preparasi ligan dilakukan dengan menggunakan Open Babel (Price dkk., 2014) yang diintegrasikan pada perangkat lunak PyRx 0.9.8, untuk menurunkan atau meminimisasi energi bebas pada ligan sebelum dilakukan *docking* (Lestari dkk., 2023; Masriany dkk., 2022). Kemudian, diubah ke dalam format pdbqt. AutoDock Vina yang terintegrasi dalam PyRx v.0.9.8. digunakan untuk *docking* molekul H₂O₂ dengan α syn untuk membentuk kompleks α syn- H₂O₂, serta *docking* molekul H₂O₂ dengan protein ERK dan ASK1 untuk membentuk kompleks ERK1-H₂O₂, ERK2-H₂O₂, ERK5-H₂O₂ dan ASK1-H₂O₂.

Docking dalam penelitian ini menggunakan parameter *exhausted* 50 dan 9 mode dengan visualisasi menggunakan PyMOL v.2.5.5 (Schrodinger, LLC) dan Discovery Studio 2021 Client. Di dalam otak, α syn ada yang berbentuk monomer dan ada yang sudah membentuk polimer (agregasi α syn) (Lashuel dkk., 2013). Dengan demikian, akan diketahui potensi H₂O₂ untuk mencegah monomer α syn membentuk agregasi α syn dan mencegah pengikatan monomer atau polimer α syn pada protein target (VDAC, DAT dan LRP1). Server HDOCK (dari Lab Biofisika dan Pemodelan Molekuler, Universitas Huazhong) (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>), digunakan untuk *docking* (penambatan) protein-protein, untuk membentuk kompleks: VDAC- α Syn, DAT- α Syn dan LRP1- α Syn (semua dalam bentuk monomer atau polimer α -Syn, dengan dan tanpa H₂O₂). Kemudian, menganalisis *binding affinity* dan situs pengikatan masing-masing kompleks.

3.3.3 Molekuler Dinamik

Simulasi molekuler dinamik (MD) menggunakan YASARA Structure v.23.9.29, dengan forcefield AMBER 14. Variabel yang digunakan dalam simulasi meliputi: pelarut air dengan densitas 0,997 g/ml; konsentrasi ion NaCl 0,9%; pH 7,4; temperatur 310K (Lestari dkk., 2023); save interval dalam 25000 fs dan durasi simulasi dalam 20 ns. Untuk mengevaluasi kestabilan kompleks protein yang disimulasikan, perlu dilakukan analisis: *molecular mechanic poisson-boltzmann surface area* (MMPBSA), *root mean square deviation* (RMSD), *backbone root mean square fluctuation* (RMSF), *Radius of Gyration* (Rg), dan superimpose (Biswas dkk., 2023; Chaudhuri dkk., 2019).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHSAN

4.1 Potensi H₂O₂ untuk Mencegah Monomer α syn Membentuk Fibril α syn

4.1.1 Analisis Hasil Molekular *Docking*

Potensi H₂O₂ untuk mencegah terbentuknya fibril α syn dapat diketahui dengan melakukan *molecular docking* antara monomer α syn dengan molekul H₂O₂ pada beberapa *active site* residu asam amino monomer α syn sehingga membentuk kompleks α syn-H₂O₂. Lalu hasilnya, *didocking* dengan sesama monomer α syn membentuk kompleks α synH₂O₂- α syn. Kemudian dibandingkan dengan kompleks α syn tanpa H₂O₂ yaitu kompleks α syn- α syn. Untuk menentukan *active site* pada monomer α syn, menggunakan *blind docking* dan divalidasi menggunakan *targeted docking* (Tabel 1).

Tabel 1. Grid Box pada *Blind Docking* dan *Targeted Docking*

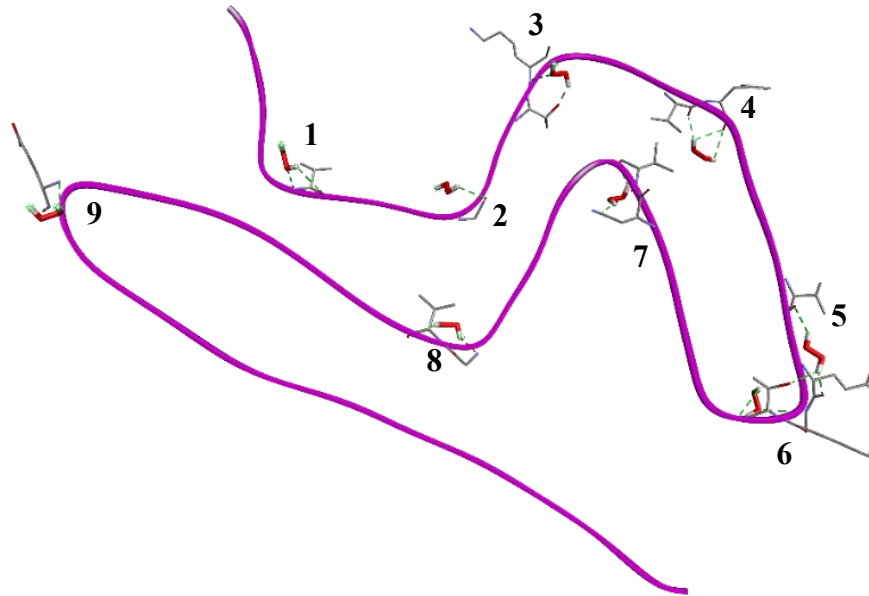
No	Tipe docking	Residu Asam Amino	Tipe Interaksi
1	<i>Blind Docking</i>	Glisin	Hidrogen konvensional
		Asparagin	<i>Unfavorable</i>
		Glisin	<i>Unfavorable</i>
2	<i>Targeted Docking</i>	Lisin	Hidrogen konvensional
		Valin	Hidrogen konvensional
		Valin	<i>Unfavorable</i>

Berdasarkan hasil *blind docking* dan *targeted docking* (dari prankweb) tersebut, diketahui bahwa molekul H₂O₂ mengikat pada golongan residu asam amino hidrofobik (glisin dan valin) serta amfipatik (lisin) (Hamzi dkk., 2022), serta membentuk ikatan hidrogen konvensional karena terjadi ikatan antara atom H-N-O pada molekul H₂O₂ dan monomer α syn (Horowitz & Trievel, 2012). Selain itu, juga membentuk interaksi *unfavorable* pada residu asam amino asparagin. Interaksi *unfavorable* merupakan golongan ikatan yang tidak menguntungkan antara/dalam kompleks protein-ligan serta dapat mempengaruhi stabilitas aktivitas obat, karena jenis ikatan ini menunjukkan gaya tolak menolak yang terjadi antara 2 molekul dan sebuah atom (Dhorajiwala dkk., 2019). Berdasarkan kedua hasil doking tersebut, *docking* H₂O₂ terhadap monomer α syn, yaitu pada residu asam amino hidrofobik. Berikut akan ditampilkan hasil *docking* H₂O₂ dengan

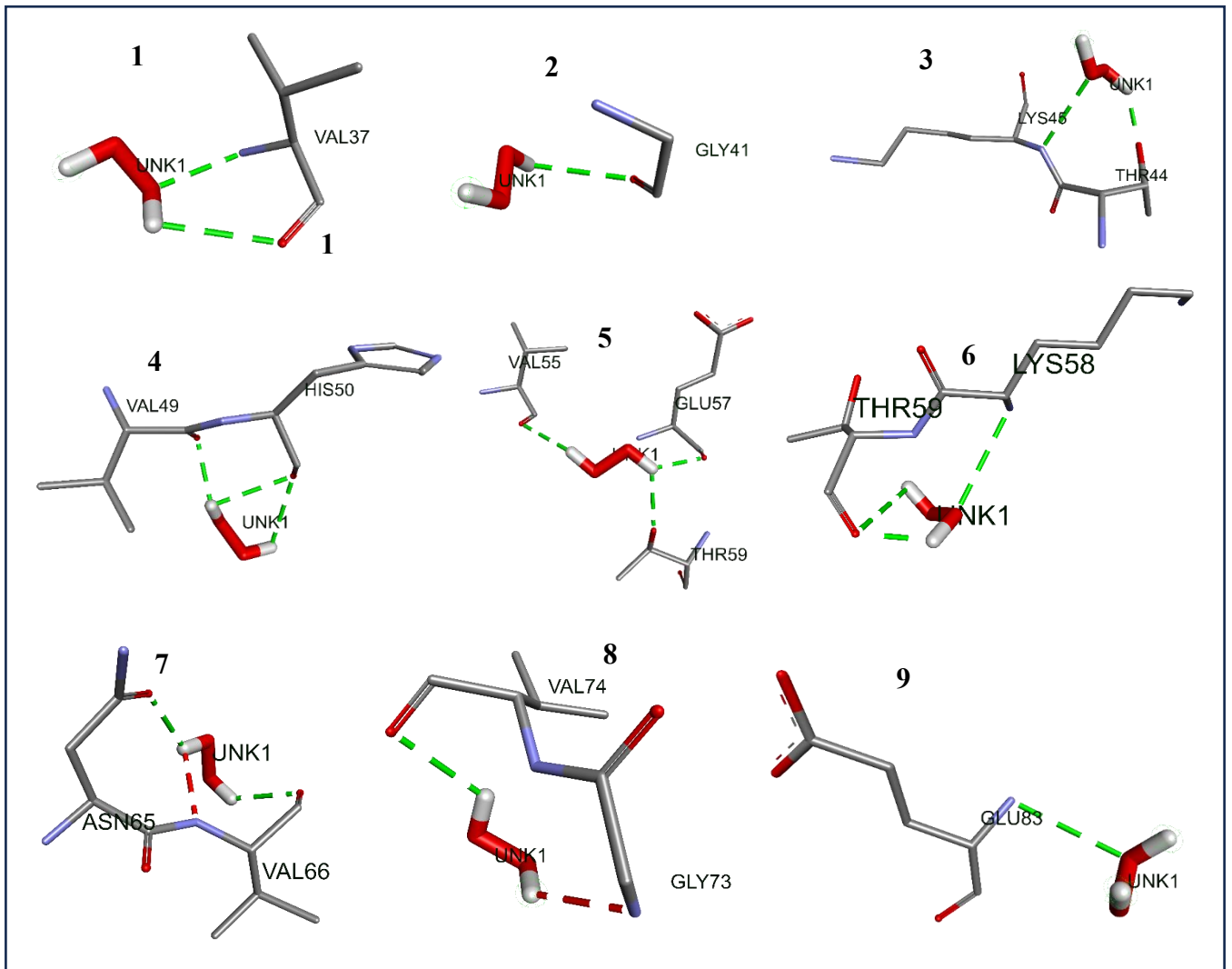
monomer α syn dengan dimension size (5; 5; 5) *exhaustiveness* 50 dan mode 9. Hasil penambatan molekuler H_2O_2 dengan monomer α syn (Tabel 2 dan gambar 15) mempunyai nilai negatif yang menunjukkan bahwa interaksi reseptor-ligan berlangsung secara spontan (Du dkk., 2016).

Tabel 2. Hasil *Docking* H_2O_2 dengan monomer α syn

No.	Residu Asam Amino	Binding Affinity (kcal/mol)	Interaksi
1	A:VAL37:O	-1,5	Conventional Hydrogen Bond
	A:VAL37:N		Conventional Hydrogen Bond
2	A:GLY41:O	-1.4	Conventional Hydrogen Bond
3	A:THR44:OG1	-1,9	Conventional Hydrogen Bond
	A:LYS45:N		Conventional Hydrogen Bond
4	A:VAL49:O	-1,5	Conventional Hydrogen Bond
	A:HIS50:O		Conventional Hydrogen Bond
5	A:GLU57:O	-1,6	Conventional Hydrogen Bond
	A:THR59:OG1		Conventional Hydrogen Bond
	A:VAL55:O		Conventional Hydrogen Bond
6	A:THR59:O	-1.3	Conventional Hydrogen Bond
	A:LYS58:N		Conventional Hydrogen Bond
7	A:VAL66:O	-1.7	Conventional Hydrogen Bond
	A:ASN65:OD1		Conventional Hydrogen Bond
	A:VAL66:N		Unfavorable Donor-Donor
8	A:VAL74:O	-1,4	Conventional Hydrogen Bond
	A:GLY73:N		Unfavorable Donor-Donor
9	A:GLU83:N	-1.6	Conventional Hydrogen Bond



Gambar 15. Hasil docking H_2O_2 pada monomer α syn membentuk kompleks α syn- H_2O_2 , dengan gambar setiap residu *active site* ditunjukkan pada gambar 16.



Gambar 16. Penambatan H_2O_2 pada residu asam amino monomer α syn membentuk ikatan *conventional hydrogen carbon* (garis putus-putus hijau) dan *unfavorable* (garis putus-putus merah).

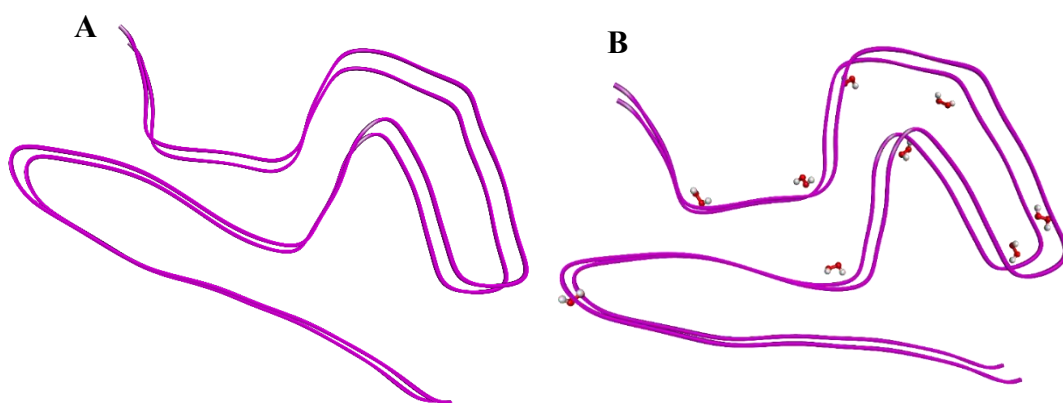
Hasil *docking* menggunakan HDOCK (Gambar 17) dari monomer α syn dengan sesama monomer α syn tanpa ada H_2O_2 yang membentuk kompleks α syn- α syn menunjukkan nilai *binding energy* -1144.50 kkal/mol. Sedangkan hasil *docking* dari kompleks α syn- H_2O_2 dengan monomer α syn, membentuk kompleks kompleks α syn H_2O_2 - α syn menunjukkan nilai *binding energy* -1066.09 kkal/mol. Sehingga, nilai *binding energy* kompleks α syn- α syn lebih rendah jika dibandingkan dengan nilai *binding energy* α syn H_2O_2 - α syn. Dalam molekuler *docking*, semakin rendah atau semakin negatif energi pengikatan pada hasil penambatan, semakin baik afinitas pengikatan senyawa tersebut terhadap protein target (Li dkk., 2021; Musfiroh dkk., 2020). Dengan demikian kompleks α syn- α syn memiliki afinitas yang lebih baik daripada kompleks α syn H_2O_2 - α syn. Hal ini menunjukkan bahwa dengan adanya molekul H_2O_2 berpotensi untuk mencegah terbentuknya fibril α syn, karena H_2O_2 dapat menurunkan *binding affinity* kompleks α syn H_2O_2 - α syn. Berikut akan ditampilkan perubahan interaksi dari residu asam amino kompleks α syn- α syn dan kompleks α syn H_2O_2 - α syn (Tabel 3), untuk hasil interaksi dari semua residu *active site* di tampilkan pada Lampiran 1.

Tabel 3. Perubahan interaksi dari residu asam amino kompleks α syn- α syn dan kompleks α syn H_2O_2 - α syn

Komplek	Perubahan <i>active site</i> dan jenis interaksi
α syn- α syn dibandingkan dengan α syn H_2O_2 - α syn	<ul style="list-style-type: none"> • GLU57 berubah dari ikatan hidrogen konvensional \rightarrow ikatan hidrogen karbon • ALA91 ikatan hidrofobik \rightarrow menjadi ikatan hidrogen karbon • Ikatan elektrostatis yang dimiliki oleh monomer αsyn bergeser dari residu aktif GLU57 menjadi LYS58 • ALA53 dan VAL48 mengalami perubahan dari ikatan hidrogen konvensional \rightarrow menjadi ikatan <i>unfavorable</i>

Kompleks α syn H_2O_2 - α syn memiliki ikatan hidrofobik yang lebih sedikit daripada kompleks α syn- α syn, hal ini terjadi karena residu ALA91 pada kompleks α syn- α syn memiliki ikatan hidrofobik kemudian berubah menjadi ikatan hidrogen karbon pada kompleks α syn H_2O_2 - α syn. Hal ini menunjukkan tidak adanya optimalisasi ikatan hidrofobik pada kompleks α syn H_2O_2 - α syn. Menurut Pell dkk., (2003) ikatan hidrofobik memiliki peran penting dalam pengikatan ligan. Dari hasil yang disajikan, ikatan hidrofobik yang tidak optimal menunjukkan bahwa pengikatan ligan (monomer α syn) pada kompleks α syn H_2O_2 - α syn tidak stabil. Sehingga dapat menurunkan nilai *binding affinity* pada kompleks α syn H_2O_2 - α syn, karena pada dasarnya ikatan hidrogen dan ikatan hidrofobik yang dioptimalkan dapat menstabilkan ligan di lokasi target, dan membantu mengubah afinitas

pengikatan (Patil dkk., 2010). Berdasarkan hasil analisis, adanya penambahan ikatan *unfavorable* pada kompleks $\alpha\text{synH}_2\text{O}_2\text{-}\alpha\text{syn}$ menunjukkan adanya potensi molekul H_2O_2 dalam mencegah terbentuknya fibril αsyn , karena ikatan *unfavorable* sendiri merupakan ikatan yang tidak menguntungkan dan dapat mempengaruhi stabilitas aktivitas obat. Pembentukan *unfavorable* antara/dalam kompleks protein-ligan mengurangi stabilitas kompleks karena jenis ikatan ini menunjukkan gaya tolak menolak yang terjadi antara 2 molekul dan sebuah atom (Dhorajiwala dkk., 2019). Dengan adanya perubahan ikatan pada residu *active site* menunjukkan H_2O_2 dapat mengganggu residu *active site* pada protein αsyn sehingga bukan bagian residu aktif yang diikat.

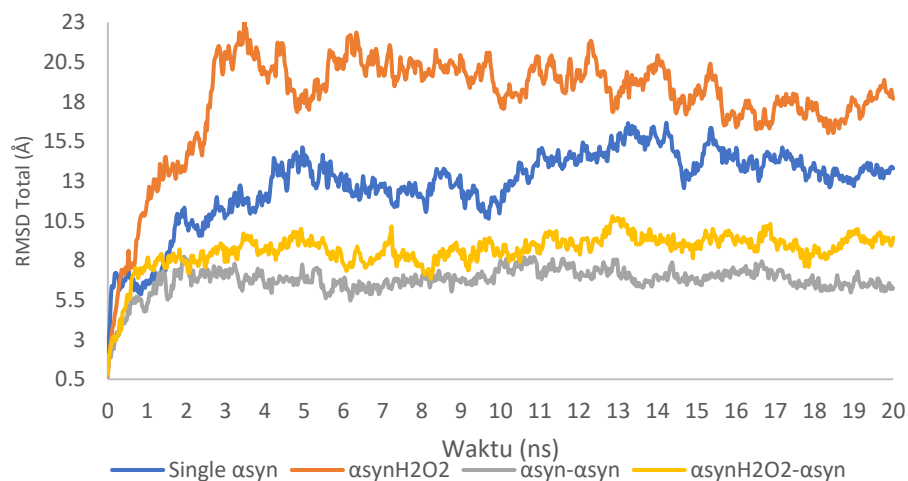


Gambar 17. (A) Kompleks $\alpha\text{syn-}\alpha\text{syn}$ dan (B) Kompleks $\alpha\text{synH}_2\text{O}_2\text{-}\alpha\text{syn}$

4.1.2 Analisis Hasil Molekuler Dinamik

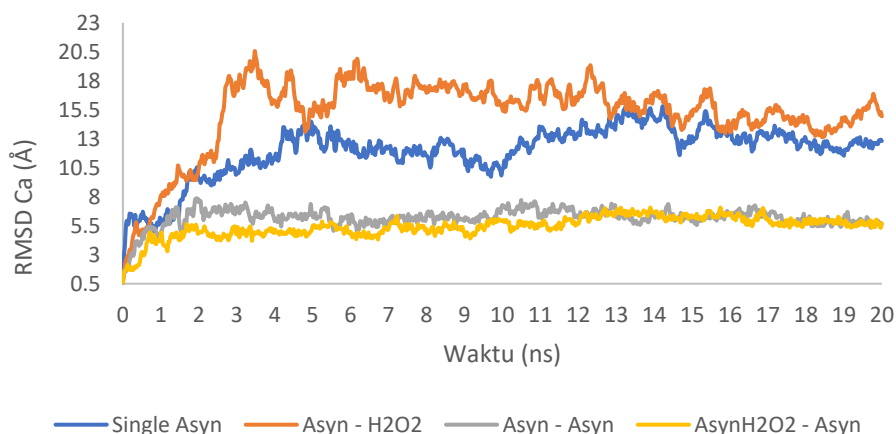
Analisis nilai RMSD total digunakan untuk mengonfirmasi sifat stabil dari kompleks protein-ligan dalam kondisi simulasi (Alom dkk., 2023). RMSD memastikan bahwa sistem berada dalam keseimbangan dan digunakan sebagai indikator keakuratan kompleks protein sampel (Arnittali dkk., 2019), serta cukup merepresentasikan kestabilan sampel pada kondisi simulasi (Biswas dkk., 2023). RMSD memberikan informasi yang berkaitan dengan perubahan konformasi protein. $\text{RMSD} > 2.50\text{\AA}$ menunjukkan perubahan konformasi dalam struktur protein dan $\text{RMSD} > 8.0\text{\AA}$ menunjukkan adanya peristiwa *unfolding* (Sumaryada dkk., 2016). Proses protein yang membuat molekul fungsional disebut pelipatan protein atau *protein folding*, sedangkan protein *unfolding* adalah sebaliknya. Pelipatan protein merupakan proses biologis dan fisikokimia yang bergantung pada urutannya. Faktanya, proses ini terjadi lebih rumit dan dalam beberapa kasus dapat menyebabkan kesalahan pelipatan menyebabkan struktur amiloid dan kelainan fatal yang disebut penyakit konformasi (Alaei dkk., 2021), salah satunya adalah penyakit PD yang disebabkan oleh adanya misfolding pada protein αsyn (Padilla-Godínez dkk., 2021).

Jika membandingkan antara single α syn dengan kompleks α synH₂O₂ pada Gambar 18, dapat diketahui bahwa nilai rerata RMSD total kompleks α synH₂O₂ adalah 18.169 Å, lebih besar dibandingkan dengan single α syn dengan nilai rerata RMSD 12.81 Å. Kompleks α syn- α syn jika dibandingkan dengan kompleks α synH₂O₂- α syn, menunjukkan bahwa rerata nilai RMSD total kompleks α synH₂O₂- α syn yaitu 10.778 Å, lebih tinggi jika dibandingkan dengan kompleks α syn- α syn dengan rerata nilai RMSD total 8.464 Å. Dengan demikian, rata-rata total RMSD kompleks dengan H₂O₂ (α synH₂O₂ dan α synH₂O₂- α syn) lebih tinggi. Sehingga dengan adanya molekul H₂O₂ dapat meningkatkan nilai RMSD total (>8Å) dan kompleks protein mengalami *unfolding* (Sumaryada dkk., 2016) yang menyebabkan protein tidak berfungsi (*unfunctional*) (Alaei dkk., 2021) oleh karena, itu berpotensi untuk mengurangi patologi α syn, karena protein α syn tidak mengalami *misfolding*.



Gambar 18. RMSD total, dari *single* α syn dan kompleks α synH₂O₂, α syn- α syn, dan α synH₂O₂- α syn

Simulasi *molekular dinamic* (MD) juga memberikan hasil analisis terkait RMSD C-alpha protein (RMSD-C α) (Gambar 7). Menurut Siraj dkk., (2021) RMSD-C α menunjukkan adanya perubahan konformasi pada protein target. Hasil analisis RMSD-C α (gambar 19) dari keempat sampel menunjukkan nilai diatas 3 Å dan mempunyai nilai yang menyerupai RMSD total. Nilai RMSD C α kompleks α synH₂O₂ lebih tinggi dibandingkan dengan single α syn. Hal ini menunjukkan bahwa penambatan ligan molekul H₂O₂ menyebabkan protein *single* α syn menjadi *unfolding* (Alaei dkk., 2021). Namun pada kompleks α syn- α syn dan α synH₂O₂- α syn memiliki nilai RMSD C α yang hampir sama, dimana molekul H₂O₂ pada kompleks α synH₂O₂- α syn tidak dapat meningkatkan nilai RMSD C α secara signifikan, sehingga perubahan konformasi yang terjadi pada kompleks protein tidak signifikan.

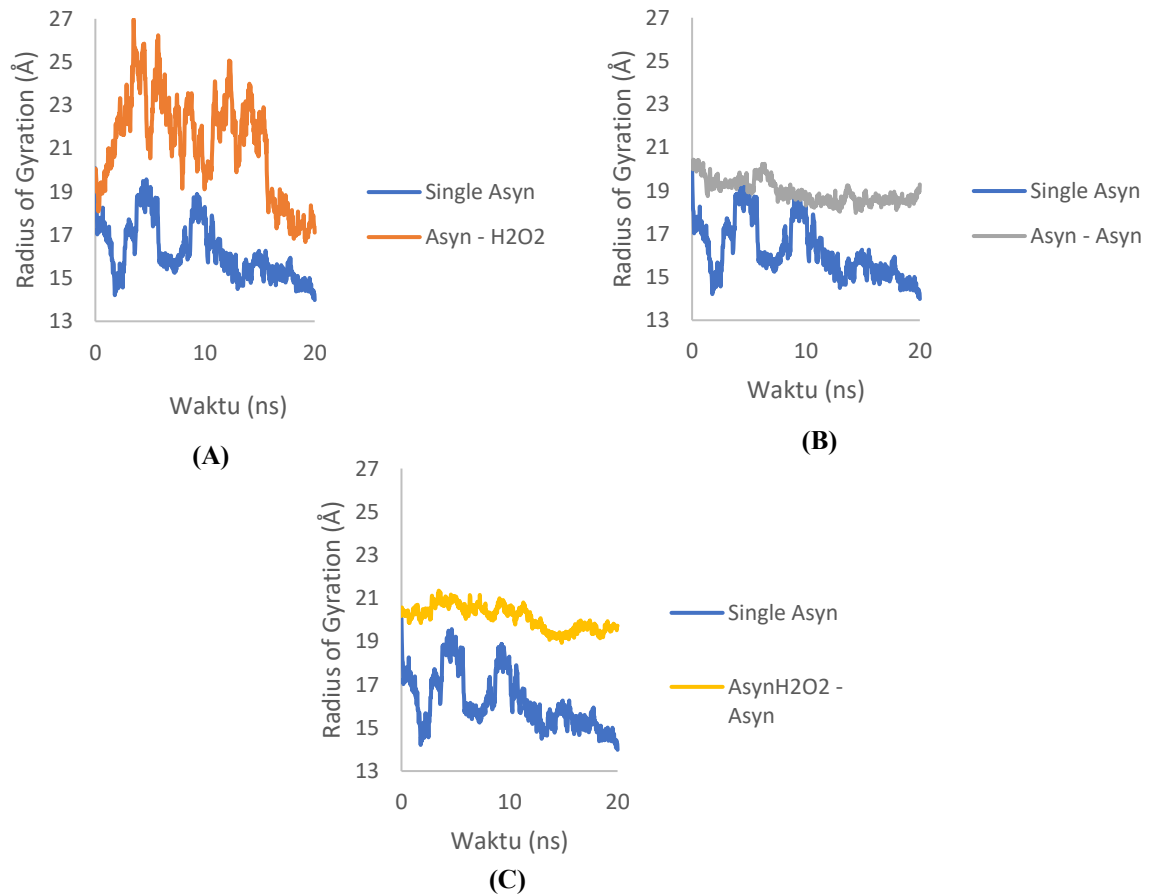


Gambar 19. RMSD Ca, dari *single asyn* dan kompleks $\alpha\text{synH}_2\text{O}_2$, $\alpha\text{syn}-\alpha\text{syn}$, dan $\alpha\text{synH}_2\text{O}_2-\alpha\text{syn}$

Radius of gyration (Rg) adalah parameter yang menggambarkan konformasi kesetimbangan pada suatu sistem total. Diketahui jika nilai Rg berkurang atau menurun selama simulasi, hal ini menunjukkan bahwa struktur protein menjadi lebih kompak atau stabil, sedangkan peningkatan nilai Rg menunjukkan bahwa struktur menjadi lebih memanjang atau menjadi tidak stabil (Lobanov dkk., 2008). Nilai Rg yang lebih rendah sesuai dengan konformasi terlipat (*folding*), sedangkan nilai yang lebih tinggi menunjukkan konformasi yang *unfolding* (Yamamoto dkk., 2021). Berdasarkan hasil analisis Rg pada gambar 20 (A) dapat diketahui perbandingan antara Rg *single asyn* dengan protein kompleks $\alpha\text{synH}_2\text{O}_2$, menunjukkan bahwa hasil penambatan ligan H_2O_2 , dapat mengubah pola Rg dari protein *single asyn* secara signifikan. Hasil analisis juga menunjukkan bahwa nilai Rg pada kompleks $\alpha\text{synH}_2\text{O}_2$ yang lebih tinggi dari *single asyn*, sehingga menunjukkan konformasi protein ketika *unfolded* (Yamamoto dkk., 2021) dan protein menunjukkan ketidakstabilan, hasil ini sesuai dengan analisis RMSD total kompleks $\alpha\text{synH}_2\text{O}_2$ diatas.

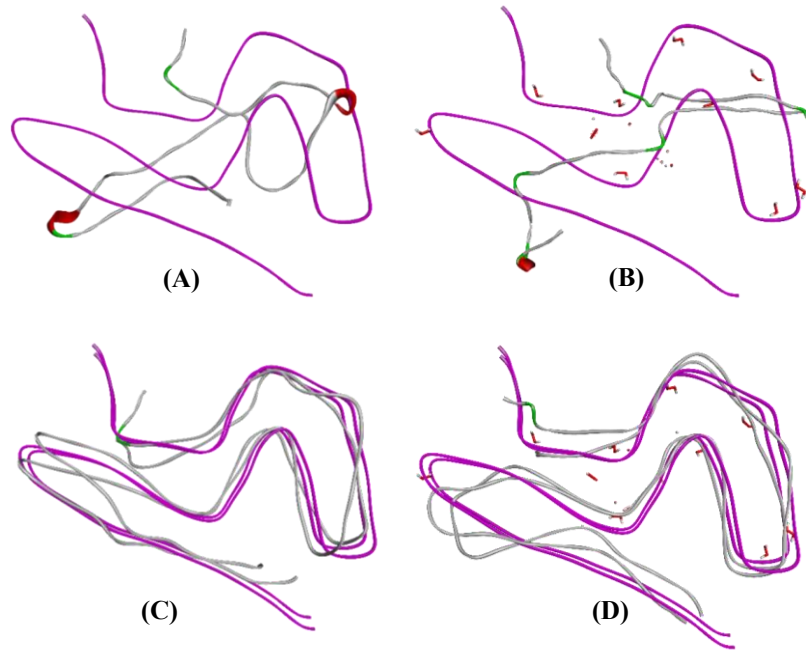
Kompleks $\alpha\text{syn}-\alpha\text{syn}$ (Gambar 20 B) dibandingkan dengan *single asyn*, dapat diketahui bahwa kompleks $\alpha\text{syn}-\alpha\text{syn}$ tidak mengubah pola secara signifikan, selain itu dengan nilai Rg yang rendah menunjukkan keadaan protein yang *folding* (Yamamoto dkk., 2021) sehingga kompleks menjadi lebih stabil dan kompak. Sedangkan pada kompleks $\alpha\text{synH}_2\text{O}_2-\alpha\text{syn}$ jika dibandingkan dengan *single asyn* (Gambar 20 C), menunjukkan kompleks $\alpha\text{synH}_2\text{O}_2-\alpha\text{syn}$ dapat mengubah pola Rg meskipun tidak signifikan. Selain itu juga memiliki nilai Rg yang tinggi yang menunjukkan bahwa protein dalam keadaan *unfolding*, hal ini juga didukung nilai RMSD total kompleks $\alpha\text{synH}_2\text{O}_2-\alpha\text{syn}$ yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan kompleks $\alpha\text{syn}-\alpha\text{syn}$. Dengan demikian, adanya molekul

H₂O₂ pada kompleks α synH₂O₂- α syn dapat mengubah pola Rg dan menunjukkan bahwa struktur menjadi lebih memanjang atau menjadi tidak stabil (Lobanov dkk., 2008).



Gambar 20. Perbandingan pola RG antara *single asyn* dengan kompleks (A) α synH₂O₂, (B) α syn- α syn, (D) α synH₂O₂- α syn,

Analisis superimpose menunjukkan adanya perbandingan seluruh protein sampel dari sebelum dan sesudah simulasi. Hasil analisis superimpose akan memberikan informasi terkait efek dari penambatan ligan pada kestabilan konformasi protein α syn sebagai reseptor (Bauer dkk., 2008). Jika dibandingkan antara gambar 21 A dan 21 B dapat diketahui bahwa perubahan konformasi setelah simulasi terlihat lebih jelas pada kompleks α synH₂O₂, dibandingkan dengan *single asyn*. Hal ini sesuai dengan nilai RMSD total dan Rg yang pada α synH₂O₂, dengan demikian dapat disimpulkan bahwa dengan adanya molekul H₂O₂ dapat mengubah konformasi kompleks α synH₂O₂. Ketika gambar 21 C dan 21 D dibandingkan, dapat diketahui bahwa perubahan konformasi terjadi secara signifikan terjadi pada kompleks α synH₂O₂- α syn, hal ini juga sesuai dengan nilai RMSD totalnya. Kompleks α synH₂O₂- α syn memiliki rerata nilai RMSD lebih tinggi jika dibandingkan dengan kompleks α syn- α syn. Hal ini menunjukkan dengan adanya molekul H₂O₂ dapat merubah konformasi α synH₂O₂- α syn.

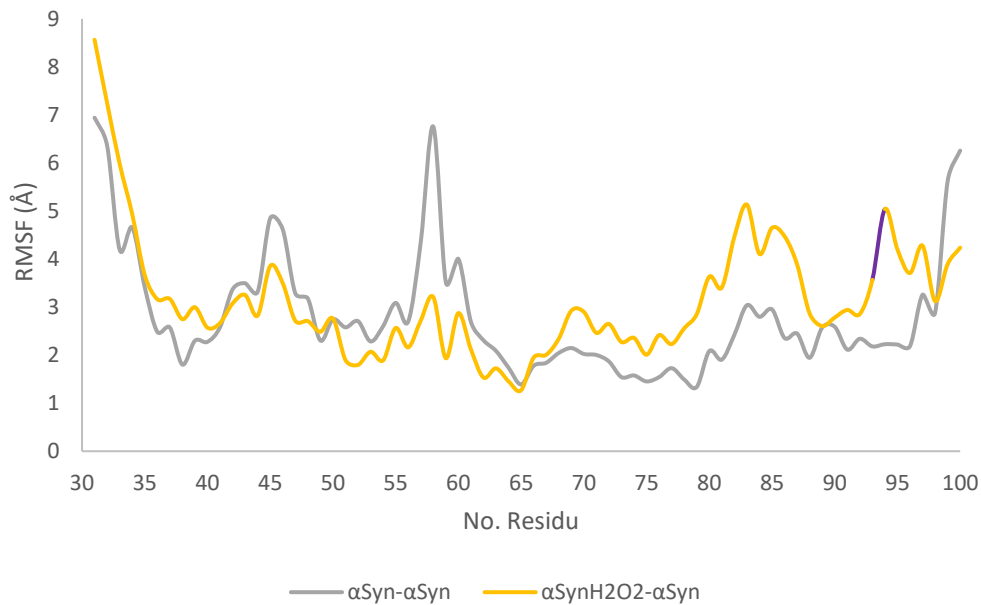


Gambar 21. Superimpose (A) *single* Asyn dan (B) kompleks $\alpha\text{synH}_2\text{O}_2$, (C) $\alpha\text{syn}-\alpha\text{syn}$, (D) $\alpha\text{synH}_2\text{O}_2-\alpha\text{syn}$ (D). (Warna ungu menunjukkan sebelum simulasi, dan warna abu-abu setelah simulasi).

Parameter RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*) adalah ukuran umum yang digunakan untuk mengukur fluktuasi tentang interaksi atau posisi ligan dengan residu asam amino (Farmer dkk., 2017). RMSF dihitung terhadap residu penyusun protein dengan melihat fluktuasi pergerakan masing-masing residu. Dengan demikian RMSF memungkinkan pengukuran fluktuasi residu protein spesifik yang terjadi selama simulasi (Barazorda-Ccahuana dkk., 2018; Rampogu dkk., 2022). Hasil RMSF diperoleh dengan mempertimbangkan rata-rata semua residu atom *backbone* untuk memeriksa variasi lokal fleksibilitas protein. Fluktuasi yang diamati mempunyai peran penting dalam fleksibilitas kompleks protein sehingga mempengaruhi aktivitas dan stabilitas protein-ligan. Nilai RMSF yang tinggi menunjukkan fleksibilitas yang lebih besar dengan tingkat fluktuasi maksimum, sedangkan RMSF minimum menunjukkan pergerakan yang sangat terbatas (Ajarapu dkk., 2021). Menurut Soumia dkk., (2022) rendahnya nilai RMSF residu situs pengikatan, menunjukkan kestabilan pengikatan ligan terhadap protein.

RMSF digunakan untuk mengukur fluktuasi interaksi atau posisi ligan dengan residu asam amino (Farmer et al., 2017). (Gambar 22) Pada kompleks $\alpha\text{synH}_2\text{O}_2-\alpha\text{syn}$, residu asam amino protein target yang berfluktuasi melebihi 3 Å, yaitu pada nomor 45; 58; 80; 86 dan 97, dan yang paling tinggi mencapai 5 Å residu pada nomor 83 dan 94 yang termasuk ke dalam residu *active site*, diperkirakan residu ini memiliki dampak besar terhadap pengikatan

ligan (Rampogu dkk., 2022). Beberapa residu dengan nilai RMSF yang tinggi, menunjukkan fleksibilitas yang lebih besar dengan tingkat fluktuasi yang maksimum (Ajarapu dkk., 2021). Jadi ketika residu *active site* yang berfluktuasi, maka berpotensi protein α syn terlepas dari kompleks α synH₂O₂- α syn, sehingga pembentukan fibril α syn dapat dicegah



Gambar 22. RMSF dari kompleks α syn- α syn, α synH₂O₂- α syn.

4.2 Potensi H₂O₂ untuk Mencegah α syn Mengikat VDAC

4.2.1 Analisis Hasil Molekular *Docking*

Potensi H₂O₂ dalam menurunkan *binding affinity* monomer dan polimer α syn terhadap VDAC dapat diketahui setelah melakukan *molecular docking* dengan menggunakan web server HDOCK. Docking dilakukan dengan menambatkan monomer α syn dengan VDAC membentuk kompleks VDAC- α syn, kemudian dibandingkan dengan penambatan kompleks α synH₂O₂ dengan VDAC sehingga membentuk kompleks VDAC- α synH₂O₂. Selain monomer α syn, penambatan juga dilakukan dengan polimer α syn (α syn_(pol)) dengan membentuk kompleks VDAC- α syn_(pol) dan VDAC- α synH₂O₂(_{pol}), hal ini dilakukan karena dimungkinkan dalam tubuh ada beberapa α syn yang sudah membentuk polimer, sehingga potensi H₂O₂ juga dapat diketahui pada polimer α syn untuk menurunkan *binding affinity*-nya dengan VDAC. *Docking* dilakukan dengan metode *targeted docking*, yaitu dengan cara memasukkan *active site* dari protein VDAC: Arg15, Lys20, Lys12, and Lys32, beberapa dari residu dasar ini ditemukan berpartisipasi dalam pembentukan situs pengikatan ATP berafinitas tinggi di dalam pori VDAC dan oleh karena itu mengganggu

transportasi ATP melalui keadaan VDAC yang diblokir α -tubulin. Dan telah menetapkan bahwa α syn berinteraksi dengan VDAC melalui mekanisme yang sama seperti tubulin; sehingga diperkirakan gangguan serupa juga terjadi pada fluks ATP/ADP melalui VDAC yang diblokir oleh α syn (Rostovtseva dkk., 2021).

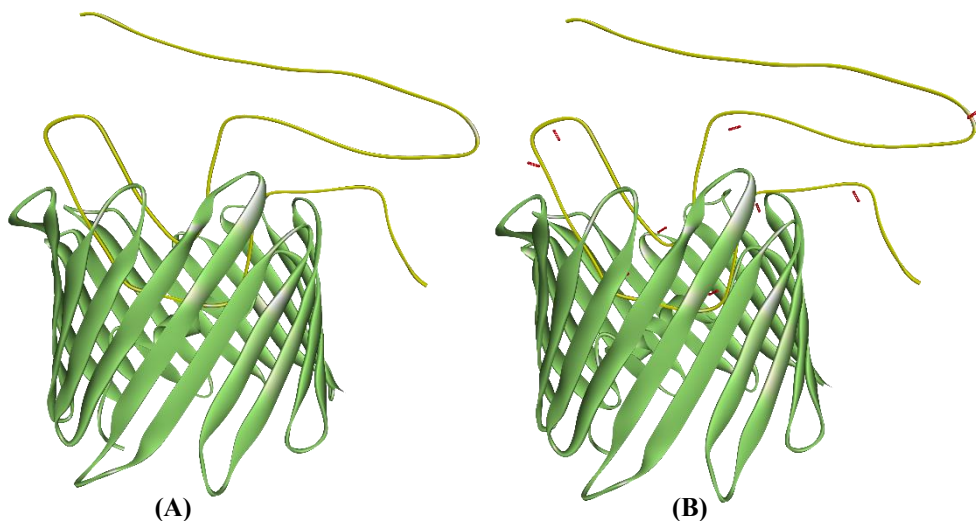
Hasil penambatan dari kompleks VDAC- α syn menunjukkan nilai *binding energy* -130.59 kkal/mol, nilai tersebut lebih kecil jika dibandingkan dengan hasil penambatan kompleks VDAC- α synH₂O₂ dengan nilai *binding energy* sebesar -122.70 kkal/mol. Dengan adanya molekul H₂O₂ dapat meningkatkan nilai *binding energy*, sehingga menurunkan nilai *binding affinity* pada kompleks VDAC- α synH₂O₂, hal ini dikarenakan semakin tinggi energi pengikatan pada hasil penambatan, semakin rendah afinitas pengikatan ligan terhadap protein target (Li dkk., 2021). Hasil penambatan kompleks VDAC- α syn_(pol) memiliki nilai *binding energy* yang lebih kecil yaitu -164.42 kkal/mol dibandingkan dengan nilai *binding energy* kompleks VDAC- α synH₂O₂(pol), yaitu -154.13 kkal/mol. Sehingga dengan adanya molekul H₂O₂ dapat meningkatkan nilai *binding energy* dan menurunkan *binding affinity* pada kompleks VDAC- α synH₂O₂(pol), dengan demikian molekul H₂O₂ juga memiliki potensi untuk mencegah polimer α syn untuk mengikat VDAC. Dari hasil docking menggunakan HDOCK maka dapat disimpulkan bahwa dengan adanya molekul H₂O₂ berpotensi mencegah pengikatan monomer dan polimer α syn pada protein VDAC. Hal ini dapat dibuktikan dengan perubahan interaksi pada Tabel 4 dan hasil penambatan ditampilkan pada Gambar 23.

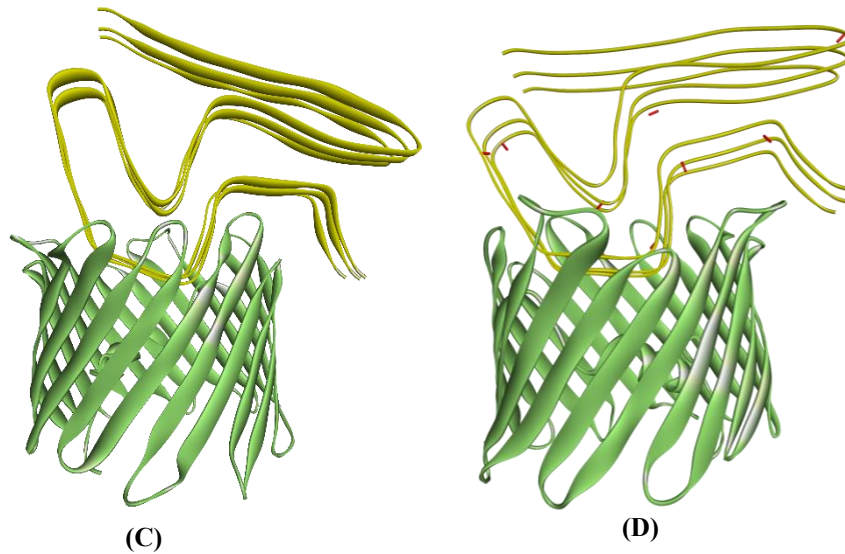
Tabel 4. Perubahan interaksi dari residu asam amino kompleks VDAC- α syn, VDAC- α synH₂O₂, VDAC- α syn_(pol), dan VDAC- α synH₂O₂(pol)

Kompleks	Perubahan <i>active site</i> dan jenis interaksi
VDAC- α Syn dibandingkan dengan VDAC- α SynH ₂ O ₂	<ul style="list-style-type: none"> • Membentuk ikatan baru yang tidak ada sebelumnya, SER44 dan GLU189 membentuk ikatan hidrogen konvensional dan LEU10 membentuk ikatan hidrogen karbon baru. • Terdapat pergeseran residu ikatan elektrostatik dari LYS20 ke LYS32 berdasarkan hasil analisis,
VDAC- α syn _(pol) dibandingkan dengan VDAC- α synH ₂ O ₂ (pol)	<ul style="list-style-type: none"> • Residu asam amino ikatan hidrogen konvensional dan ikatan hidrogen karbon pada kompleks VDAC- αsynH₂O₂(pol) yang berkurang jika dibandingkan dengan residu asam amino pada kompleks VDAC- αsyn_(pol) • Bertambahnya ikatan <i>unfavorable</i> pada kompleks VDAC- αsynH₂O₂(pol) • Terdapat penambahan residu asam amino pada ikatan hidrofobik, elektrostatik, dan <i>unfavorable</i> pada kompleks VDAC- αsynH₂O₂(pol) (LEU26, THR51, THR80, THR107, ALA212, ASN48, ASN168 dan ASN185)

-
- THR107 mengalami perubahan dari ikatan *unfavorable* → menjadi ikatan hidrogen konvensional,
 - ARG218 mengalami perubahan dari ikatan hidrogen karbon → menjadi ikatan elektrostatis
 - THR80 mengalami perubahan dari hidrogen konvensional → menjadi ikatan *unfavourable*
 - ASN185 mengalami perubahan dari ikatan hidrogen karbon → menjadi ikatan *unfavorable*
-

Berdasarkan hasil analisis, terjadi penambahan dan perubahan residu *active site* pada kompleks VDAC- α synH₂O₂, serta ikatan *unfavorable* menjadi berkurang. Hal ini menunjukkan bahwa molekul H₂O₂ pada kompleks memiliki potensi dalam mengganggu residu *active site* pada VDAC. Residu asam amino dengan ikatan hidrogen konvensional dan ikatan hidrogen karbon pada kompleks VDAC- α synH₂O₂(pol) berkurang, jika dibandingkan dengan residu asam amino pada kompleks VDAC- α syn(pol). Dengan demikian menyebabkan kompleks VDAC- α synH₂O₂(pol) menjadi kurang stabil daripada kompleks VDAC- α syn(pol), karena ikatan hidrogen konvensional pada dasarnya mewakili gaya stabilisasi fundamental dalam struktur biomolekul (Horowitz & Trievel, 2012), sehingga dengan adanya molekul H₂O₂ memiliki potensi untuk menurunkan stabilitas pengikatan polimer α syn(pol) pada VDAC. Penambahan residu *active site* pada ikatan *unfavorable* ini juga menunjukkan bahwa stabilitas pada VDAC- α synH₂O₂(pol) berkurang, karena pada dasarnya terbentuknya ikatan *unfavorable* ini mengurangi stabilitas dalam kompleks protein ligan (Dhorajiwala dkk., 2019). Dengan adanya penambahan ikatan *unfavorable* dan perubahan jenis interaksi tersebut, menunjukkan bahwa molekul H₂O₂ memiliki potensi menghambat polimer α syn untuk memblok VDAC. Hal ini dapat terjadi karena molekul H₂O₂ dapat mengganggu residu *active site* pada VDAC.

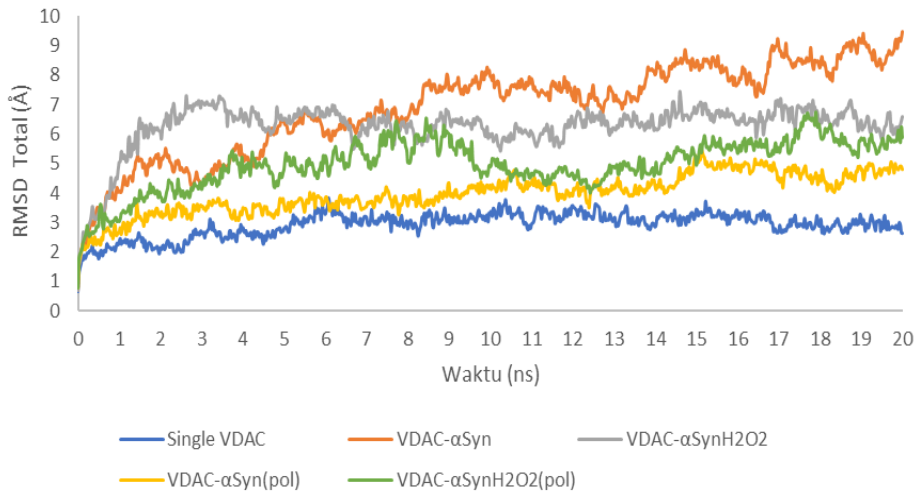




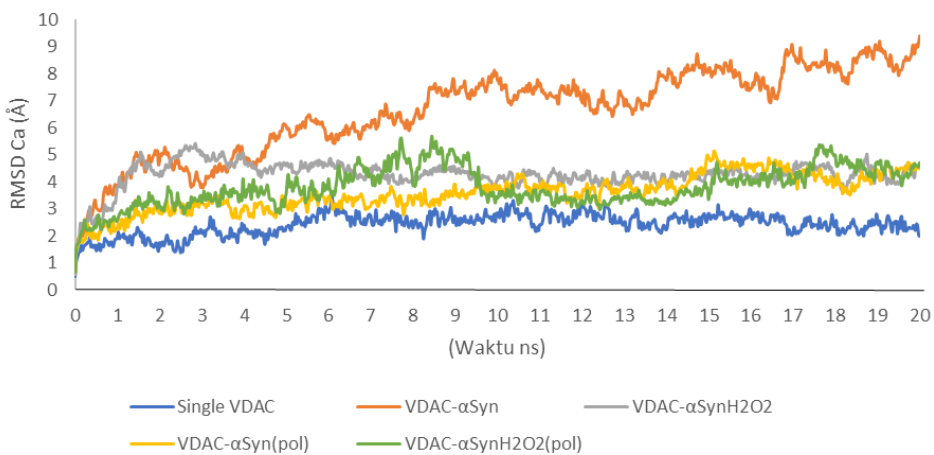
Gambar 23. Hasil docking kompleks VDAC dengan protein α syn (A)Kompleks VDAC- α syn, (B)Kompleks VDAC- α synH₂O₂, (C)VDAC- α syn_(pol), dan VDAC- α synH₂O₂_(pol) (protein berwarna hijau: VDAC, protein berwarna kuning: monomer dan polimer α syn)

4.2.2 Analisis Hasil Molekuler Dinamik

Gambar 24 menunjukkan hasil analisis RMSD total pada *single* VDAC dan kompleks VDAC- α syn, VDAC- α synH₂O₂, VDAC- α syn_(pol), dan VDAC- α synH₂O₂_(pol). Berdasarkan hasil simulasi dinamik RMSD total pada *single* VDAC memiliki nilai paling rendah yaitu 2.931 Å, sehingga *single* VDAC menunjukkan protein yang stabil dan fungsional (Biswas dkk., 2023) sebelum berikatan dengan monomer atau polimer α syn. Namun setelah membentuk kompleks dengan monomer atau polimer α syn, menyebabkan menjadi tidak stabil karena memiliki nilai RMSD total yang tinggi. Berdasarkan hasil analisis menunjukkan bahwa kompleks VDAC- α syn memiliki nilai RMSD total yang tinggi (>8Å) dan menjadi protein *unfolding* (Sumaryada dkk., 2016), yang mengindikasikan protein VDAC menjadi tidak berfungsi ketika berikatan dengan α syn (Alaei dkk., 2021). Kompleks VDAC- α synH₂O₂ memiliki nilai RMSD total yang lebih rendah hingga <8Å, hal ini menunjukkan dengan adanya molekul H₂O₂ dapat menurunkan nilai RMSD total, yang berpotensi membuat kompleks tersebut menjadi lebih fungsional. Namun, hasil ini tidak sesuai dengan VDAC yang berikatan dengan polimer α Syn (VDAC- α syn_(pol)) yang memiliki nilai RMSD total yang lebih rendah dibandingkan dengan kompleks VDAC- α synH₂O₂_(pol).



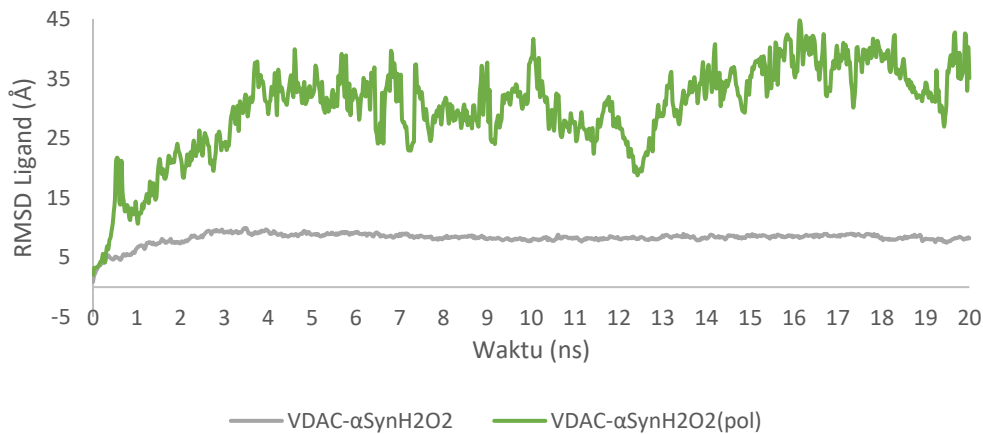
Gambar 24. Nilai RMSD total single VDAC dan kompleks VDAC- α syn, VDAC- α synH₂O₂, VDAC- α syn(pol), dan VDAC- α synH₂O₂(pol).



Gambar 25. Nilai RMSD Ca single VDAC dan kompleks VDAC- α syn, VDAC- α synH₂O₂, VDAC- α syn(pol), dan VDAC- α synH₂O₂(pol).

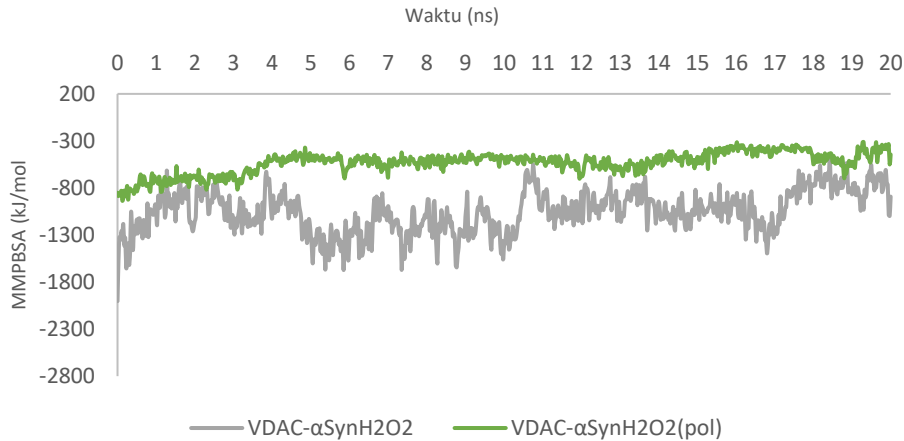
Hasil RMSD total tersebut, bisa dibandingkan dengan analisis dari RMSD Ca (menunjukkan perubahan konformasi pada protein target) (Gambar 25), jika membandingkan RMSD Ca kompleks VDAC- α syn dan VDAC- α synH₂O₂, menunjukkan nilai yang hampir sama dengan RMSD totalnya, dimana kompleks VDAC- α syn memiliki nilai RMSD Ca lebih tinggi, yang menunjukkan adanya perubahan hingga protein *unfolding*. Hal inilah yang menyebabkan protein VDAC menjadi tidak fungsional ketika berikatan dengan protein α syn. Sedikit berbeda dengan nilai RMSD totalnya, kompleks VDAC- α synH₂O₂(pol) memiliki nilai RMSD Ca yang rendah, meskipun tidak menyebabkan adanya penurunan yang signifikan, hal ini menunjukkan adanya molekul H₂O₂ pada kompleks

VDAC- α synH₂O_{2(pol)} bekerja kurang maksimal. Hal tersebut terjadi dikarenakan molekul H₂O₂ pada kompleks VDAC- α synH₂O_{2(pol)} memiliki nilai RMSD ligan (Gambar 26) yang sangat tinggi bahkan bisa melebihi >40 Å, yang menunjukkan dinamika yang tidak stabil sehingga tidak bisa bekerja dengan maksimal untuk mencegah polimer α syn mengikat protein VDAC (Alaei dkk., 2021).



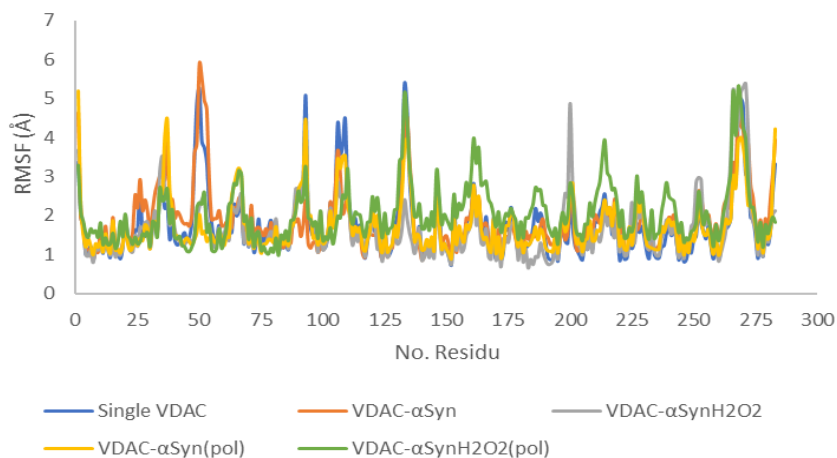
Gambar 26. RMSD Ligan kompleks VDAC- α synH₂O₂, dan VDAC- α synH₂O_{2(pol)}.

Hasil analisis RMSD ligan ini dapat didukung dengan hasil analisis nilai MMPBSA (Gambar 27). MMPBSA merupakan perhitungan pengikatan energi bebas yang menunjukkan pengikatan ligan ke protein (Alom dkk., 2023; Biswas dkk., 2023), sehingga dapat mengetahui kekuatan interaksi biomolekulernya (Kumari dkk., 2014). Semakin besar nilai MMPBSA menunjukkan bahwa nilai *binding energy* yang dimiliki semakin kecil dan memiliki *binding affinity* yang besar. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa dimana semakin banyak energi positif menunjukkan semakin baik pengikatan dan kompleks semakin stabil (Srinivasan & Rajasekaran, 2016; Dash dkk., 2019). Kompleks VDAC- α synH₂O_{2(pol)} memiliki nilai MMPBSA yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan kompleks VDAC- α synH₂O₂. Hal ini menunjukkan bahwa kompleks VDAC- α synH₂O_{2(pol)} memiliki pengikatan yang semakin baik dan kompleks semakin stabil (Dash dkk., 2019), berbeda dengan kompleks VDAC- α synH₂O₂, yang memiliki kompleks pengikatan yang kurang stabil. Dengan demikian, keberadaan molekul H₂O₂ dapat mendestabilisasi kompleks VDAC- α synH₂O₂ karena memiliki nilai MMPBSA yang rendah, dan berpotensi untuk melepaskan ikatan protein monomer α syn dengan VDAC. Oleh karena itu, disfungsi mitokondria dapat dicegah dan produksi ATP kembali normal.

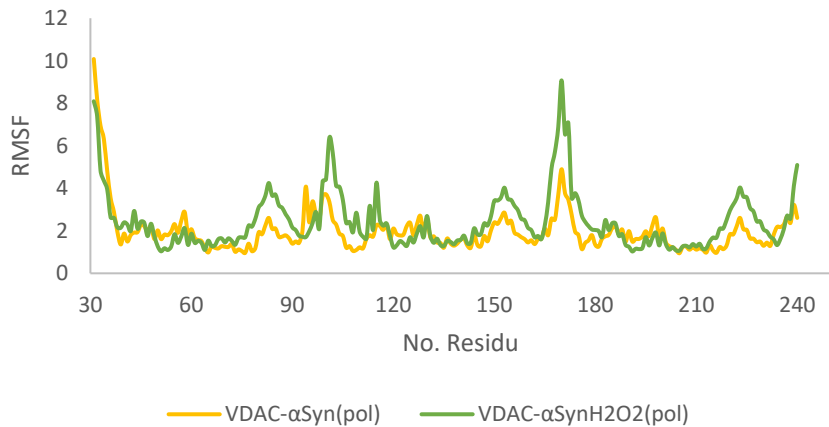


Gambar 27. Nilai MMPBSA kompleks VDAC- α synH₂O₂, dan VDAC- α synH₂O₂(pol).

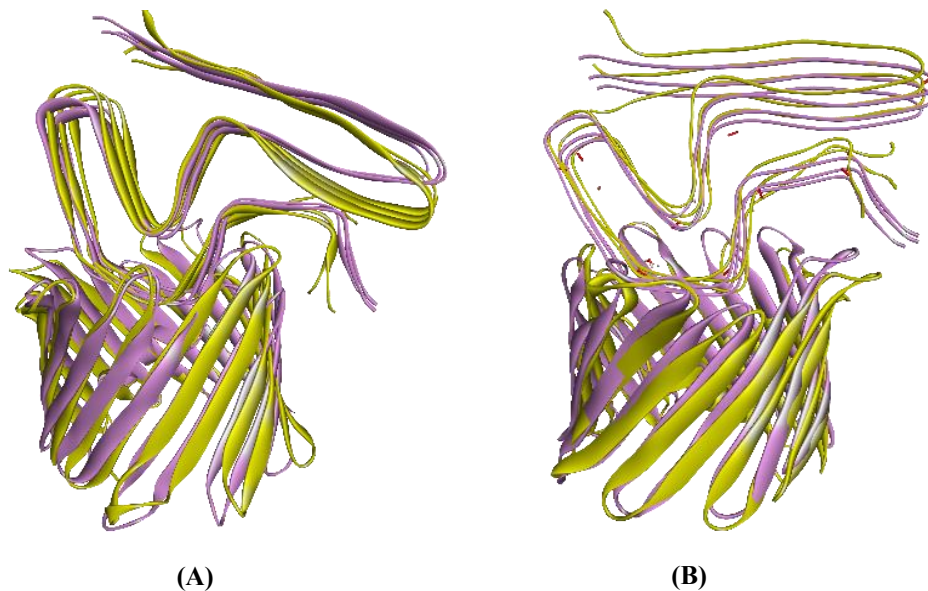
Hasil MMPBSA pada kompleks VDAC- α synH₂O₂(pol) menunjukkan pengikatan antara ligan dan protein yang baik, namun jika dilihat dari analisis RMSF kestabilan protein, pada kompleks VDAC- α synH₂O₂(pol) terdapat lebih banyak *active site* yang mengalami fluktuasi yang tinggi melebihi 3 Å yaitu pada residu 212, 218, 186, 189, 168, dan 185. Hasil RMSF kestabilan protein (Gambar 28) dengan lebih banyak residu *active site* pada kompleks VDAC- α synH₂O₂(pol) yang berfluktuasi, menunjukkan bahwa ikatan antara VDAC dan α synH₂O₂(pol) menjadi kurang stabil (Ajarapu dkk., 2021; Rampogu dkk., 2022), dan ligan α synH₂O₂(pol) berpotensi terlepas dari VDAC, hal ini dapat divalidasi dengan hasil analisis RMSF kestabilan ligan (Gambar 29) yang menunjukkan bahwa ligan α synH₂O₂(pol) pada kompleks VDAC- α synH₂O₂(pol) memiliki nilai fluktuasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan ligan α syn(pol) pada kompleks VDAC- α syn(pol). Dengan demikian, molekul H₂O₂ dapat meningkatkan nilai RMSF pada binding *active site* dan dapat menurunkan kestabilan kompleks, dan untuk lebih jelasnya dapat dilihat dari superimpose kompleks (Gambar 30)



Gambar 28. Nilai RMSF pada single VDAC dan kompleks VDAC- α syn, VDAC- α synH₂O₂, VDAC- α syn(pol), dan VDAC- α synH₂O₂(pol).



Gambar 29. Nilai RMSF kestabilan ligan pada VDAC- α syn_(pol), dan VDAC- α synH₂O₂_(pol).



Gambar 30. Hasil superimpose pada (A) VDAC- α syn_(pol), dan (B) VDAC- α synH₂O₂_(pol). (Ket: kompleks dengan warna merah menunjukkan sebelum simulasi MD dan kompleks dengan warna kuning menunjukkan sesudah simulasi MD)

4.3 Potensi H₂O₂ untuk Mencegah α syn Mengikat DAT

4.3.1 Analisis Hasil Molekular *Docking*

DAT penting untuk pemeliharaan homeostasis dopamin (DA) di otak, dan disregulasi homeostasis DA terlibat dalam penyakit neurodegenerative. Hal ini disebabkan oleh α syn dapat membentuk kompleks yang stabil dengan DAT dan terkait dengan patogenesis penyakit neurodegenerative yaitu PD (Butler dkk., 2012). Sehingga diperlukan pengembangan intervensi terapeutik yang efektif untuk degenerasi saraf, yaitu dengan terapi komplementer menggunakan H₂O₂. Potensi H₂O₂ dalam mempengaruhi *binding affinity* kompleks DAT- α syn dan kompleks DAT- α syn_(pol) dalam proses *reuptake* dopamin dapat

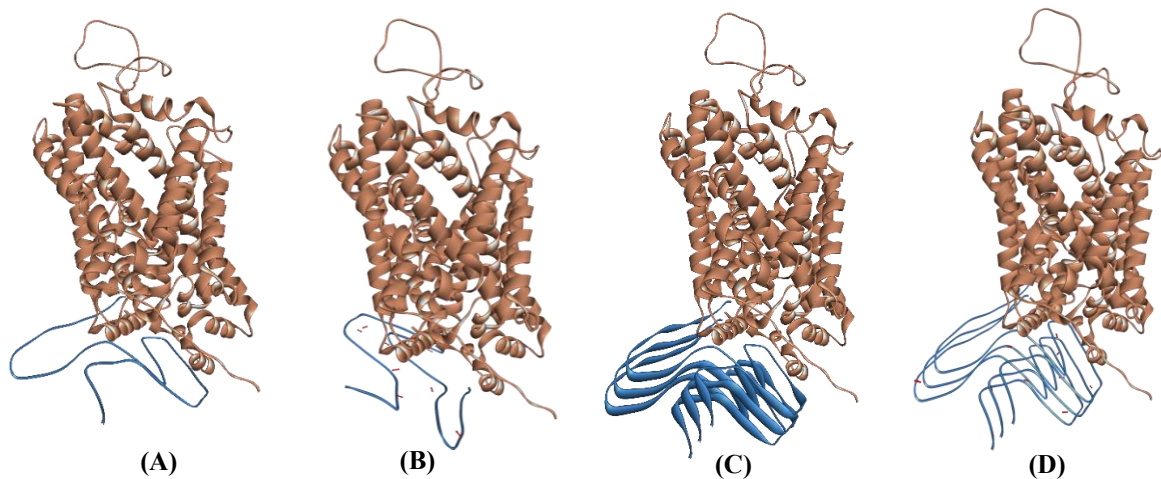
diketahui dengan melakukan *molecular docking*. Docking dilakukan dengan menambatkan monomer αsyn dengan DAT untuk membentuk kompleks DAT- αsyn , kemudian dibandingkan dengan penambatan monomer $\alpha\text{syn-H}_2\text{O}_2$ dengan DAT membentuk kompleks DAT- $\alpha\text{synH}_2\text{O}_2$. Karena dimungkinkan dalam sistem tubuh sudah terbentuk polimer αsyn , maka penambatan protein DAT juga dilakukan pada polimer αsyn , yaitu dengan membentuk kompleks DAT- $\alpha\text{syn}_{(\text{pol})}$ dan DAT- $\alpha\text{synH}_2\text{O}_{2(\text{pol})}$, dengan demikian maka dapat diketahui potensi H_2O_2 dalam menurunkan *binding affinity* protein DAT dengan monomer dan polimer αsyn dalam proses *reuptake* dopamin. Penambatan antara protein DAT dan αsyn dilakukan dengan cara *targeted docking*, hal ini didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Lee dkk (2001) bahwa kompleks αsyn dengan *presynaptic human dopamine transporter* (hDAT) di sel neuron, melalui pengikatan langsung komponen amiloid *beta non-A* dari *alpha-synuclein* ke *carboxyl-terminal tail* dari hDAT, yaitu residu nomor 579–620 (Wersinger dkk., 2003).

Proses penambatan menjadi kompleks menggunakan web server HDOCK, sehingga diperoleh nilai *binding energy* yaitu kompleks DAT- αsyn sebesar -182.74 kkal/mol dan kompleks DAT- $\alpha\text{synH}_2\text{O}_2$ adalah -135.36 kkal/mol. Kompleks DAT- $\alpha\text{syn}_{(\text{pol})}$ dengan *binding energy* -190.86 kkal/mol dan kompleks DAT- $\alpha\text{synH}_2\text{O}_{2(\text{pol})}$ dengan nilai -189.02 kkal/mol. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa, nilai *binding energy* kompleks DAT- $\alpha\text{synH}_2\text{O}_2$ dan DAT- $\alpha\text{synH}_2\text{O}_{2(\text{pol})}$ lebih tinggi, sehingga memiliki *binding affinity* yang lebih rendah jika dibandingkan dengan kompleks DAT- αsyn dan DAT- $\alpha\text{syn}_{(\text{pol})}$, karena pada dasarnya semakin mendekati nilai positif atau semakin tinggi nilai penambatan mengindikasikan *binding affinity* yang lemah (Xue dkk., 2022). Sehingga dapat disimpulkan bahwa molekul H_2O_2 memiliki potensi untuk menurunkan *binding affinity* dan mencegah pengikatan protein αsyn pada DAT. Berikut akan ditampilkan perubahan interaksi dari residu asam amino kompleks DAT- αsyn , DAT- $\alpha\text{synH}_2\text{O}_2$, DAT- $\alpha\text{syn}_{(\text{pol})}$ dan DAT- $\alpha\text{synH}_2\text{O}_{2(\text{pol})}$, pada tabel 5, hasil penambatan ditampilkan pada Gambar 31 dan untuk seluruh *active sites* dari semua kompleks ditampilkan pada Lampiran 1.

Tabel 5. Perubahan interaksi dari residu asam amino kompleks DAT- αsyn , DAT- $\alpha\text{synH}_2\text{O}_2$, DAT- $\alpha\text{syn}_{(\text{pol})}$ dan DAT- $\alpha\text{synH}_2\text{O}_{2(\text{pol})}$.

Kompleks	Perubahan <i>active site</i> dan jenis interaksi
DAT- αsyn dibandingkan dengan DAT- $\alpha\text{synH}_2\text{O}_2$	<ul style="list-style-type: none"> • Residu <i>active site</i> yang dipertahankan pada kompleks DAT-$\alpha\text{synH}_2\text{O}_2$ hanya sedikit. • GLU608 mengalami perubahan dari ikatan <i>unfavorable</i> → menjadi ikatan hidrogen konvensional,

	<ul style="list-style-type: none"> • ARG606 mengalami perubahan dari ikatan hidrofobik → menjadi ikatan <i>unfavorable</i> • VAL620 dan ARG615 pada awalnya memiliki interaksi elektrostatis → berubah menjadi interaksi hidrogen konvensional
DAT- α syn _(pol) dibandingkan dengan DAT- α synH ₂ O ₂ (pol),	<ul style="list-style-type: none"> • DAT-αsynH₂O₂(pol), memiliki ikatan <i>unfavorable</i> pada residu ARG515, sedangkan kompleks DAT-αsyn_(pol) tidak memiliki ikatan <i>unfavorable</i>



Gambar 31. Hasil penambatan dengan HDOCK (A) Kompleks DAT- α syn, (B) DAT- α synH₂O₂, (C) DAT- α syn_(pol) dan (D) DAT- α synH₂O₂(pol) (Protein berwarna coklat: DAT, protein berwarna biru: monomer dan polimer α syn)

Ketika membandingkan kompleks DAT- α syn dengan DAT- α synH₂O₂, hasil analisis menunjukkan kompleks DAT- α synH₂O₂ hanya sedikit mempertahankan residu *active site* dari kompleks DAT- α syn, sehingga dengan adanya molekul H₂O₂ dapat mempengaruhi *active site* pada monomer α syn pada protein DAT. Kompleks DAT- α synH₂O₂ tidak memiliki ikatan elektrostatis. Padahal interaksi elektrostatis memainkan peran utama dalam menentukan mekanisme pembentukan kompleks protein-protein, pengenalan molekul, stabilitas termal, kemampuan adaptasi konformasi, dan pergerakan protein serta pentingnya dalam pelipatan, pengikatan, dan fungsi protein (Sinha & Smith-Gill, 2005). Menurut Huddk., (2000) interaksi elektrostatis memainkan peran utama dalam mengarahkan ligan ke tempat pengikatan reseptor. Sehingga ketika kompleks DAT- α synH₂O₂ yang tidak memiliki ikatan elektrostatis menunjukkan bahwa kompleks tersebut memiliki ikatan yang kurang stabil jika dibandingkan dengan kompleks DAT- α syn, hal ini juga didukung dengan kemampuan *binding affinity*-nya, dimana kompleks yang memiliki afinitas yang tinggi memiliki interaksi elektrostatis yang lebih tinggi dan lebih kuat (Sinha & Smith-Gill, 2005).

Kompleks DAT- α synH₂O₂ memiliki *binding affinity* yang lebih rendah karena tidak memiliki ikatan elektrostatik.

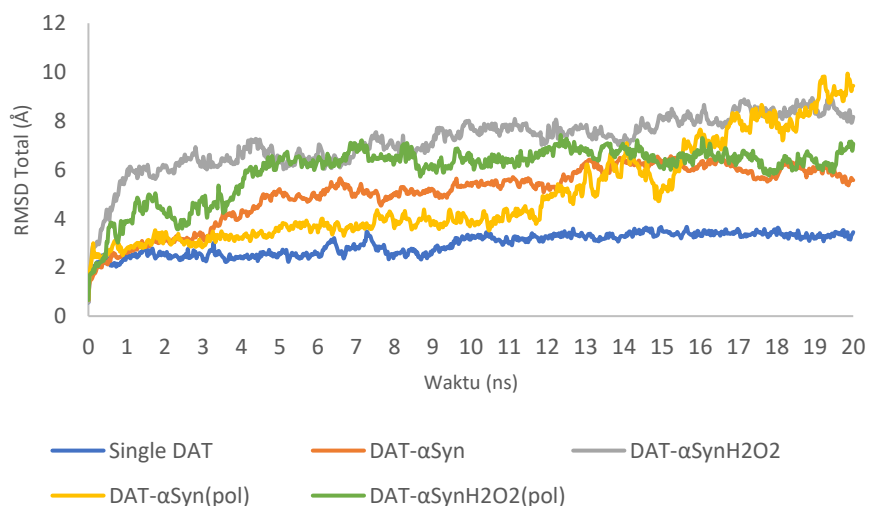
Hasil analisis interaksi residu pada kompleks DAT- α syn_(pol) dan DAT- α synH₂O₂(_{pol}) diatas, menunjukkan kompleks DAT- α synH₂O₂(_{pol}) memiliki ikatan *unfavorable*, sedangkan pada kompleks DAT- α syn_(pol) tidak memiliki ikatan *unfavorable*. Ikatan *unfavorable* ini merupakan Ikatan yang dapat mengurangi stabilitas dalam kompleks protein ligan (Dhorajiwala dkk., 2019). Dengan adanya perubahan interaksi pada kompleks DAT- α synH₂O₂ dan DAT- α synH₂O₂(_{pol}) berupa hilangnya ikatan elektrostatik dan bertambahnya ikatan *favourable* menunjukkan bahwa molekul H₂O₂ dapat mengganggu residu *active site* pada protein DAT serta dapat menurunkan stabilitas pengikatan antara α syn dan protein DAT. Selain itu, molekul H₂O₂ dapat menurunkan *binding affinity* monomer dan polimer α syn pada protein DAT, sehingga berpotensi untuk mencegah pengikatan DAT dan protein α syn.

4.3.2 Analisis Hasil Molekular Dinamik

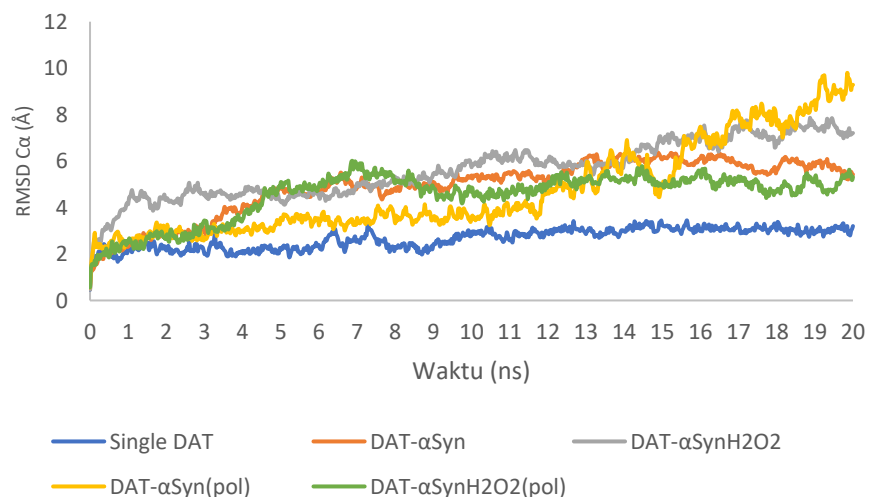
DAT mengatur pensinyalan dopamin dan dapat berinteraksi dengan protein neuron α syn (Threlfell dkk., 2021). Pembentukan kompleks DAT- α syn adalah penyimpangan dan dapat berkontribusi pada degenerasi neuron dopaminergik di PD (Longhena dkk., 2018). α syn dapat memodulasi aktivitas DAT dengan mengatur keberadaannya di permukaan sel. Interaksi DAT dan α syn dapat mempengaruhi lingkungan mikro membran di dekat transporter. Aktivitas DAT dihambat ketika α syn diekspresikan secara berlebihan dan dapat mengubah homeostasis neuron dopamin (Butler dkk., 2015; Swant dkk., 2011). Oleh karena itu, dalam penelitian ini mengevaluasi potensi H₂O₂ untuk mencegah pengikatan α syn ke DAT. Hasil docking dari HDOCK menunjukkan adanya molekul H₂O₂ dapat menurunkan afinitas ikatan protein α syn dengan DAT. Hal ini didukung oleh hasil analisis RMSD total.

Hasil analisis RMSD total *single* DAT dan kompleks DAT- α syn, DAT- α synH₂O₂, DAT- α syn_(pol) dan DAT- α synH₂O₂(_{pol}) ditampilkan pada Gambar 32. Hasil analisis menunjukkan bahwa single protein DAT memiliki nilai RMSD yang paling rendah sekitar 3 Å. Menurut Ejaz dkk., (2023) nilai rata-rata RMSD dihitung sebesar 2,9 Å yang dianggap stabil dan dianggap seimbang, sehingga menunjukkan bahwa single DAT adalah protein yang stabil jika dibandingkan dengan DAT yang membentuk kompleks dengan monomer dan polimer α syn. RMSD total kompleks DAT- α syn_(pol) meningkat secara signifikan menjadi >8Å, yang mengindikasikan ketika DAT mengikat polimer α syn menjadi protein yang *unfolding* dan menjadi tidak berfungsi (Alaei dkk., 2021). Kompleks DAT- α synH₂O₂(_{pol}) memiliki nilai RMSD total yang lebih rendah <8Å, hal ini mengindikasikan kompleks

tersebut menjadi lebih stabil dan memungkinkan DAT menjadi lebih fungsional. Namun, ketika melihat RMSD total dari kompleks DAT- α syn dan DAT- α synH₂O₂ menunjukkan hasil yang berlawanan, dimana kompleks DAT- α synH₂O₂ memiliki nilai RMSD total yang lebih tinggi daripada kompleks DAT- α syn. Analisis RMSD C α (Gambar 33) memiliki hasil yang sama dengan RMSD total, dimana DAT- α synH₂O₂ juga memiliki nilai RMSD C α yang lebih tinggi daripada kompleks DAT- α syn dan kompleks DAT- α synH₂O₂(pol) memiliki nilai RMSD C α yang lebih stabil dan rendah daripada DAT- α syn(pol).



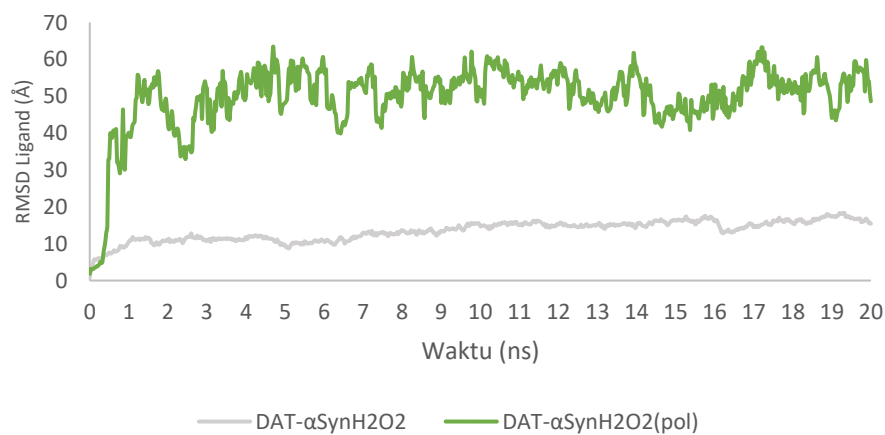
Gambar 32. RMSD total *single* DAT dan Kompleks DAT- α syn, DAT- α synH₂O₂, DAT- α syn(pol) dan DAT- α synH₂O₂(pol).



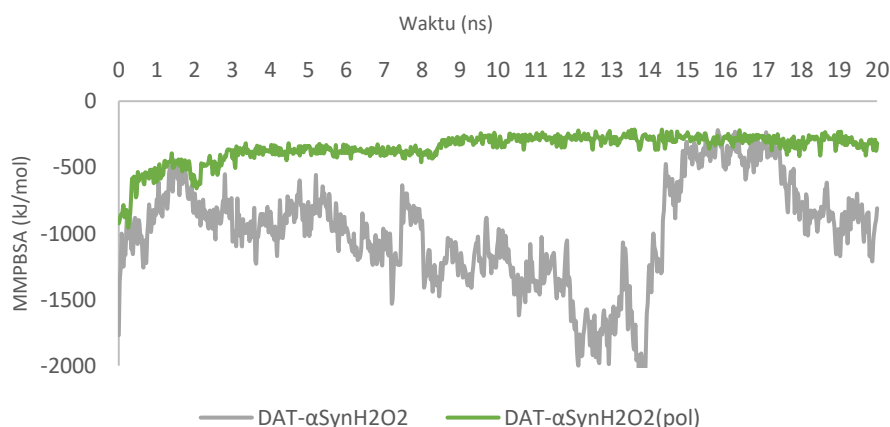
Gambar 33. RMSD C α *single* DAT dan Kompleks DAT- α syn, DAT- α synH₂O₂, DAT- α syn(pol) dan DAT- α synH₂O₂(pol).

Hasil analisis RMSD C α tersebut tidak sesuai jika dibandingkan dengan analisis RMSD ligan (Gambar 34), dimana RMSD ligan α synH₂O₂ pada kompleks DAT- α synH₂O₂ memiliki nilai yang lebih rendah ≥ 10 Å, yang seharusnya menjadi lebih fungsional

(Sumaryada dkk., 2016), dan dapat menurunkan nilai RMSD total dan RMSD C α pada kompleks DAT- α synH₂O₂ serta dapat melemahkan pengikatan antara protein dan ligan. RMSD ligan yang rendah pada kompleks DAT- α synH₂O₂, menunjukkan molekul H₂O₂ lebih fungsional untuk mencegah protein α syn mengikat DAT, sehingga memungkinkan pengikatan kompleks DAT- α synH₂O₂ menjadi kurang stabil. Hal ini didukung dengan hasil analisis nilai MMPBSA (Gambar 35), kompleks DAT- α synH₂O_{2(pol)} memiliki nilai MMPBSA sebesar -354.243 kJ/mol, sedangkan kompleks DAT- α synH₂O₂ memiliki nilai MMPBSA yang lebih rendah, yaitu -984.115 kJ/mol. Hal ini menunjukkan pengikatan ligan dan protein kompleks DAT- α synH₂O₂ menjadi kurang stabil karena memiliki nilai MMPBSA yang lebih rendah (Dash dkk., 2019).



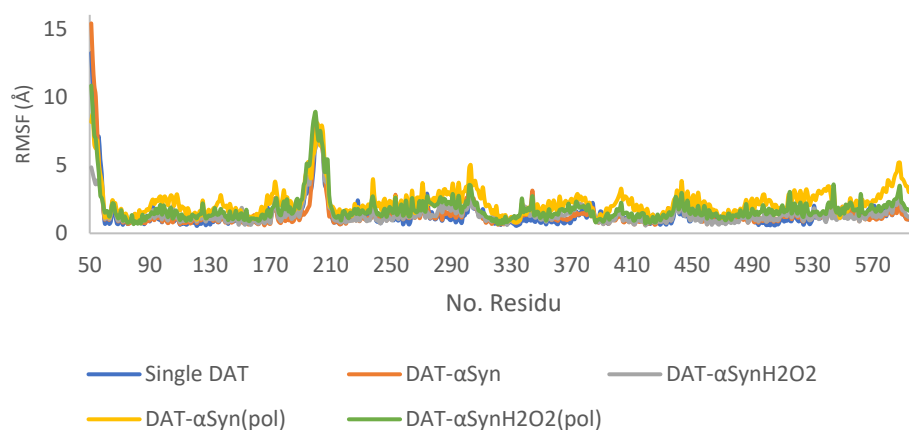
Gambar 34. RMSD ligan DAT- α synH₂O₂, dan DAT- α synH₂O₂(pol).



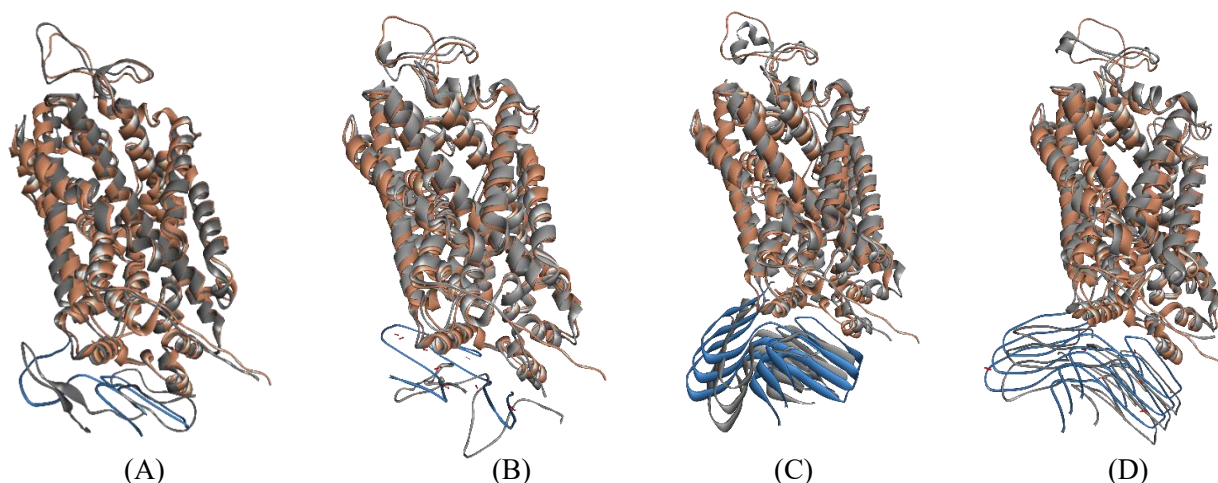
Gambar 35. Nilai MMPBSA kompleks DAT- α synH₂O₂, dan DAT- α synH₂O₂(pol).

Meskipun terjadi ketidakseuaian antara hasil RMSD total dan C α kompleks dengan nilai MMPBSA, hasil analisis RMSF (Gambar 36) menunjukkan pada kompleks DAT- α synH₂O₂, semua residu *active site* mengalami fluktuasi (nilai RMSF >3Å), yaitu pada

nomor residu 521, 606, 610, 615, 619, 620, 608, dan 518. Fluktuasi pada residu *active site* menyebabkan penurunan stabilitas pengikatan $\alpha\text{SynH}_2\text{O}_2$ pada DAT (Ejaz dkk., 2023) dan memungkinkan terjadinya pelepasan $\alpha\text{SynH}_2\text{O}_2$ dari DAT. Pada kompleks DAT- $\alpha\text{synH}_2\text{O}_2(\text{pol})$ di mana semua *active site* juga mengalami peningkatan fluktuasi pada 514, 606, 610, 615, 619, 608, 515, 518, 618, 619. Hal ini mengindikasikan bahwa molekul H_2O_2 dapat meningkatkan nilai RMSF kompleks DAT- $\alpha\text{synH}_2\text{O}_2$ dan DAT- $\alpha\text{synH}_2\text{O}_2(\text{pol})$ khususnya pada residu *active site*, kompleks menjadi kurang stabil dan ikatan antar residu asam amino menjadi renggang (Wargasetia dkk., 2023). Adanya molekul H_2O_2 menyebabkan monomer dan polimer αsyn dapat terlepas dari DAT, ini dapat dipastikan dari hasil superimpose pada Gambar 37.



Gambar 36. RMSF *single* DAT dan Kompleks DAT- αsyn , DAT- $\alpha\text{synH}_2\text{O}_2$, DAT- $\alpha\text{syn}(\text{pol})$ dan DAT- $\alpha\text{synH}_2\text{O}_2(\text{pol})$.



Gambar 37. Superimpose (A) Kompleks DAT- αsyn , (B) DAT- $\alpha\text{synH}_2\text{O}_2$, (C) DAT- $\alpha\text{syn}(\text{pol})$ dan (D) DAT- $\alpha\text{synH}_2\text{O}_2(\text{pol})$. (Kompleks berwarna menunjukkan sebelum simulasi MD, dan kompleks berwarna gelap menunjukkan setelah simulasi MD)

4.4 Potensi H₂O₂ untuk Mencegah α syn Mengikat LRP1

4.4.1 Analisis Hasil Molekuler *Docking*

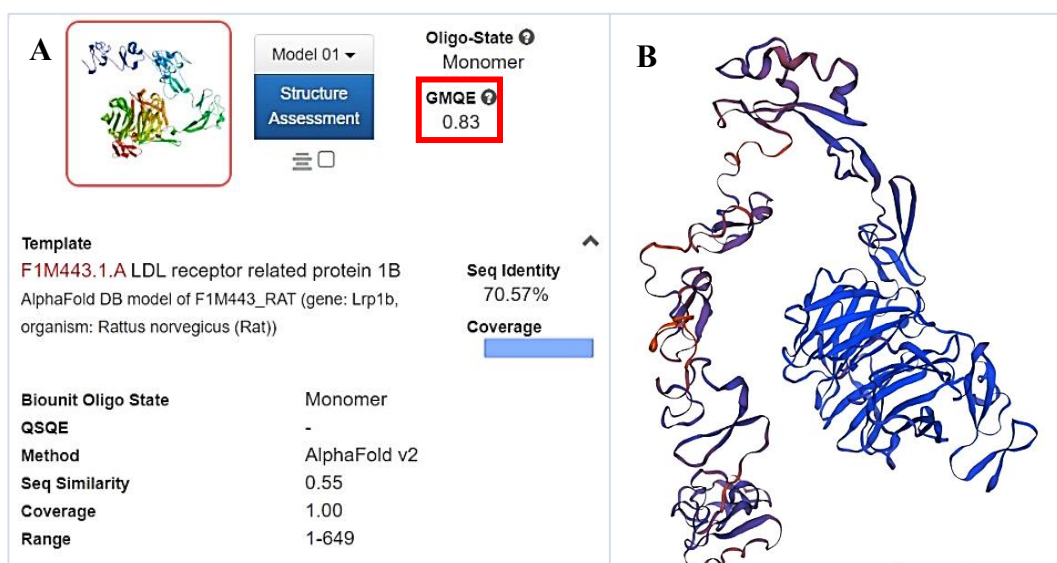
LRP1 sebagai pengatur utama penyerapan α syn, serta mediator penting penyebaran α syn di otak (K. Chen dkk., 2022). Fungsi utamanya terkait dengan proses endositosis ligan α syn. Setelah pengikatan ligan α syn, proses endositosis dimulai yang mengarah pada transit LRP1 ke kompartemen endosom, kemudian LRP1 didaur ulang kembali ke membran sel setelah pelepasan α syn di dalam sel (Faissner, 2023). Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Chen dkk., (2022), menunjukkan bahwa penyerapan α syn monomer dan oligomer berkurang secara signifikan pada *human induced pluripotent stem cells* (iPSCs) dengan LRP1 *knockout* (LRP1-KO) dibandingkan dengan kontrol wild type (WT). Penyerapan α syn juga dihambat dalam iPSN LRP1-KO. Sehingga, pada tikus LRP1-KO, penyebaran α syn berkurang secara signifikan dibandingkan dengan tikus WT. Penelitian ini memberikan pengetahuan baru tentang peran fisiologis LRP1 dalam persebaran dan patologi α syn, serta menawarkan strategi pengobatan terbaru yang menasar pada LRP1. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi dan H₂O₂ dalam mencegah monomer dan polimer α syn mengikat LRP1.

Molekuler *docking* dilakukan untuk mengetahui potensi hasil interaksi docking H₂O₂ dengan monomer dan polimer α syn dalam menurunkan *binding affinity*-nya terhadap LRP1. *Docking* dilakukan dengan menambatkan protein LRP1 dengan monomer α syn untuk membentuk kompleks LRP1- α syn kemudian dibandingkan dengan penambatan LRP1 dengan monomer α synH₂O₂ sehingga membentuk kompleks LRP1- α synH₂O₂. Selain itu, protein LRP1 juga ditambatkan dengan polimer α syn sehingga membentuk kompleks LRP1- α syn_(pol) dan LRP1- α synH₂O₂(_{pol}). Docking dilakukan dengan cara *targeted docking*, hal ini dimulai dari menentukan domain situs pengikatan ligan pada LRP1. Pada dasarnya LRP1 mempunyai lima domain. Rantai ekstraseluler terdiri dari 4 *cluster complement-like repeats* (CCR), berfungsi sebagai situs pengikatan ligan (Potere dkk., 2019), dan secara khusus cluster 2 dan 4 (CCR2 dan CCR4) merupakan target sebagian besar dari aktivitas pengikatan ligan LRP1 (Fouët dkk., 2020). Karena struktur kristal protein LRP1 masih belum terpecahkan, sehingga diperlukan menentukan struktur Cluster 2 (CCR2) terlebih dahulu melalui pemodelan homologi (Boder dkk., 2023).

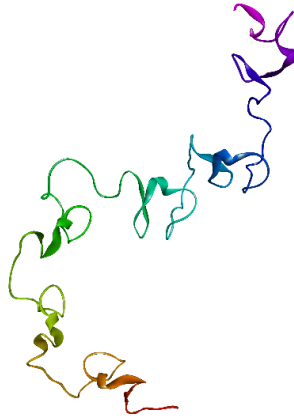
Menentukan CCR2 LRP1 melalui pemodelan homologi menggunakan perangkat lunak Swiss Model yang merupakan sistem otomatis untuk memodelkan struktur 3D suatu protein dari rangkaian asam aminonya menggunakan teknik pemodelan homologi (Biasini dkk., 2014). Dimulai dengan membuka server web UniProt digunakan untuk menemukan

sekuen lengkap dari *human* LRP1. Homologi templat urutan LRP1 yang ditemukan berkisar dari residu asam amino 933 hingga 1581 yang mengandung pengulangan tipe komplemen kaya sistein 3–10 (CR 3–10) dari Cluster 2 (CCR2) dari LRP1 (Boder dkk., 2023). Kemudian ditentukan bagian situs pengikatan berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Boder dkk., (2023), menambatkan antara protein tau dengan LRP1. Hasilnya menunjukkan bahwa tau berinteraksi dengan segmen 23-asam amino (SKAWVCDGDND CEDNSDEENCES) dari LRP1 yang mengandung domain tipe komplemen kaya sistein dari wilayah CR 3-10 di Cluster 2 (CCR2).

Penilaian dalam Swiss model yang digunakan untuk mengetahui model yang terbentuk akurat adalah *global quality estimation score* (GMQE). GMQE yang dihasilkan dinyatakan sebagai angka antara nol dan satu, dimana angka yang lebih tinggi atau mendekati satu menunjukkan kualitas yang lebih baik (Biasini dkk., 2014). Gambar 38 (A) menunjukkan hasil dari model protein dari Swiss Model. Berdasarkan hasil tersebut, dapat diketahui nilai GMQE adalah 0.83, dimana nilai tersebut mendekati angka 1 yang menunjukkan bahwa model yang terbentuk memiliki kualitas yang baik. Struktur yang mengandung CR 3-10 dari CCR2 ditunjukkan pada Gambar 38 (B). Sesuai dengan tujuan dalam penelitian ini adalah untuk menguji interaksi protein α syn dengan LRP1, maka daerah β -propeller yang melengkung di atas CR dipotong untuk memungkinkan pengikatan α syn, struktur akhir yang digunakan ditunjukkan pada Gambar 39. Kemudian digunakan untuk menentukan afinitasnya terhadap protein α syn, karena dalam penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa cluster LRP1 CCR2 terlibat dalam pengikatan ligan (Boder dkk., 2023).



Gambar 38. (A) Hasil SWISS MODEL. (B) CR3–10 subunit CCR2 dari LRP.



Gambar 39. Setelah daerah β -propeller yang melengkung di atas CR dipotong

Penambatan antara protein LRP1 dengan α syn menggunakan cara *targeted docking* yaitu dengan memasukkan situs pengikatan pada protein reseptor dan protein ligan. Situs pengikatan atau *binding site* pada protein LRP1 didasarkan pada segmen 23-asam amino (SKAWVCDGDNDCEDNSDEENCES) (Boder dkk., 2023). Protein α syn dapat berinteraksi dengan protein LRP1 pada domain N terminal α syn melalui residu lisin (Chen dkk., 2022). Berdasarkan hasil penambatan menggunakan web server HDOCK, dapat diketahui *binding energy* dari setiap kompleks yang terbentuk. Kompleks LRP1- α syn memiliki nilai *binding energy* -131.42 kkal/mol sedangkan kompleks LRP1- α synH₂O₂ memiliki nilai -123.32 kkal/mol, dengan demikian dapat diketahui bahwa *binding affinity* kompleks LRP1- α syn lebih tinggi dibandingkan dengan kompleks LRP1- α synH₂O₂, hal ini dikarenakan semakin rendah energi pengikatan maka memiliki *binding affinity* yang dimiliki semakin baik (Li dkk., 2021). Sehingga dengan adanya molekul H₂O₂ dapat menurunkan afinitas pengikatan protein α syn dengan LRP1 pada kompleks LRP1- α synH₂O₂.

Hal ini juga terjadi pada protein LRP1 yang berikatan dengan polimer α syn, dimana kompleks LRP1- α syn_(pol) memiliki nilai *binding energy* yang lebih rendah (-149.0 kkal/mol) jika dibandingkan dengan nilai *binding energy* pada kompleks LRP1- α synH₂O₂_(pol) yaitu -120.39 kkal/mol. Sehingga nilai *binding affinity* pada kompleks LRP1- α syn_(pol) lebih tinggi. Dengan demikian, molekul H₂O₂ memiliki potensi untuk mencegah polimer α syn berinteraksi dengan protein LRP1, dalam Tabel 6 akan ditampilkan perubahan interaksi dari residu asam amino, dan hasil interaksi dari semua residu *active site* di tampilkan pada Lampiran 1, serta kompleks hasil penambatan ditampilkan pada Gambar 40.

Tabel 6. Perubahan interaksi dari residu asam amino pada kompleks LRP1- α syn, LRP1- α synH₂O₂, LRP1- α syn_(pol) dan LRP1- α synH₂O₂(_{pol}).

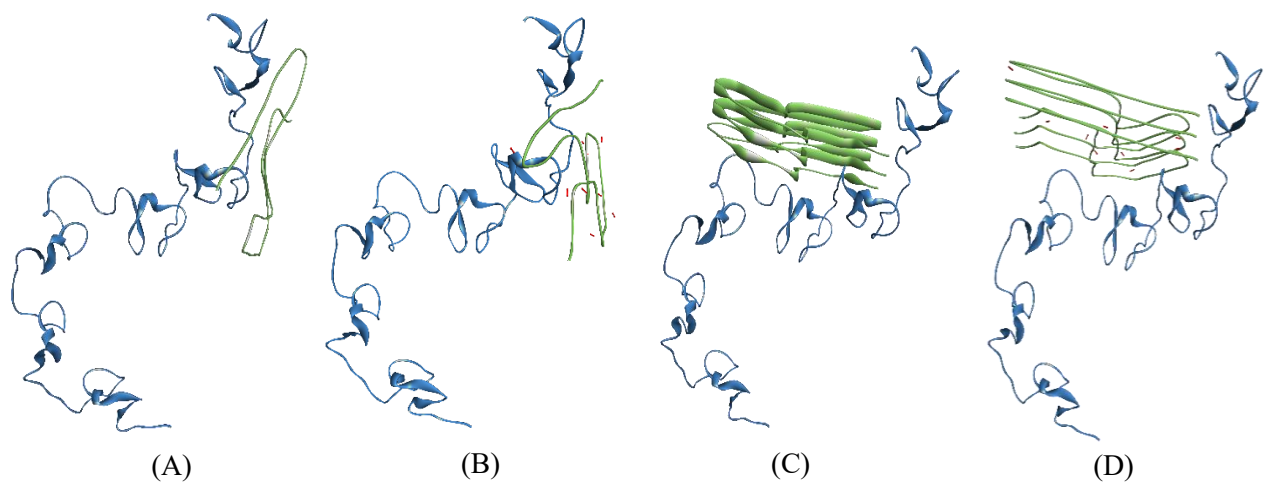
Kompleks	Perubahan <i>active site</i> dan jenis interaksi
LRP1- α Syn dibandingkan dengan LRP1- α SynH ₂ O ₂	<ul style="list-style-type: none"> • Kompleks LRP1-αsynH₂O₂ hanya sedikit mempertahankan residu <i>active site</i> dari kompleks LRP1-αsyn • ASN202 mengalami perubahan dari ikatan hidrogen konvensional \rightarrow menjadi <i>unfavorable</i> • Kompleks LRP1-αsyn, terdapat interaksi sulfur-X pada residu CYS208. • Jumlah ikatan hidrogen konvensional pada kompleks LRP1-αSynH₂O₂ yang lebih sedikit
LRP1- α syn _(pol) dibandingkan dengan LRP1- α synH ₂ O ₂ (_{pol})	<ul style="list-style-type: none"> • Hanya satu situs pengikatan residu yang dipertahankan oleh kompleks LRP1-αsynH₂O₂(_{pol}), yaitu hanya pada residu ASN121. • Kompleks LRP1-αsynH₂O₂(_{pol}) memiliki lebih sedikit interaksi hidrogen konvensional, • GLN122 mengalami perubahan dari ikatan <i>unfavorable</i> \rightarrow menjadi ikatan hidrogen konvensional • ALA123 mengalami perubahan dari ikatan hidrogen karbon \rightarrow menjadi ikatan hidrofobik

Berdasarkan hasil analisis seluruh residu *active site* (Lampiran 1), kompleks LRP1- α SynH₂O₂ hanya sedikit mempertahankan residu *active site* kompleks LRP1- α Syn, dengan demikian maka dapat disimpulkan bahwa molekul H₂O₂ dapat mempengaruhi situs pengikatan atau *active site* dari monomer α syn terhadap protein LRP1. Hal ini juga didukung dengan jumlah ikatan hidrogen konvensional pada kompleks LRP1- α synH₂O₂ yang lebih sedikit jika dibandingkan pada kompleks LRP1- α syn. Karena pada dasarnya ikatan hidrogen konvensional menandakan adanya gaya stabilisasi fundamental dalam struktur biomolekul (Horowitz & Trievel, 2012), sehingga dengan berkurangnya ikatan hidrogen konvensional ini dapat mengurangi stabilitas kompleks kompleks LRP1- α synH₂O₂, dengan demikian molekul H₂O₂ juga mampu mengurangi kestabilan kompleks.

Terjadinya perubahan jenis interaksi seperti pada residu ASN202 yang pada awalnya memiliki interaksi hidrogen konvensional menjadi interaksi *unfavorable* ini juga semakin menunjukkan bahwa ikatan kompleks LRP1- α synH₂O₂ tidak stabil, karena terbentuknya interaksi *unfavorable* antara/dalam kompleks protein-ligan dapat mengurangi stabilitas kompleks (Dhorajiwala dkk., 2019). Pada kompleks LRP1- α syn, terdapat interaksi sulfur-X pada residu CYS208. Interaksi Sulfur-X sendiri ditemukan antara sulfur divalen dan atom N, O, atau S (Gómez-Jeria dkk., 2020), interaksi ini termasuk dalam interaksi nonkovalen yang melibatkan atom sulfur dan memainkan peran penting dalam struktur dan fungsi protein dengan memberikan kontribusi signifikan terhadap stabilitas, pelipatan, dan aktivitas

biologis protein (Kojasoy & Tantillo, 2023). Dengan demikian kompleks LRP1- α syn lebih stabil dibandingkan dengan kompleks LRP1- α SynH₂O₂ yang tidak memiliki ikatan sulfur-X

Kompleks LRP1- α synH₂O_{2(pol)} memiliki ikatan hidrogen konvensional lebih sedikit, hal ini menunjukkan bahwa kompleks tersebut kurang stabil jika dibandingkan dengan LRP1- α synH₂O₂, ikatan hidrogen konvensional lebih sedikit menandakan kurangnya adanya gaya gaya stabilisasi fundamental dalam struktur biomolekul (Horowitz & Trievel, 2012). Selain itu juga terjadi perubahan interaksi pada residu GLN122 yang pada awalnya memiliki ikatan *unfavorable* menjadi ikatan hidrogen konvensional dan residu ALA123 pada awalnya memiliki ikatan hidrogen karbon menjadi hidrofobik. Dengan sedikitnya residu *binding site* yang dipertahankan, berkurangnya ikatan hidrogen konvensional, serta adanya perubahan interaksi menunjukkan bahwa, dengan adanya molekul H₂O₂ dapat mempengaruhi interaksi polimer α syn dengan LRP1. Sehingga molekul H₂O₂ memiliki potensi untuk mencegah polimer α syn berikatan dengan protein LRP1.



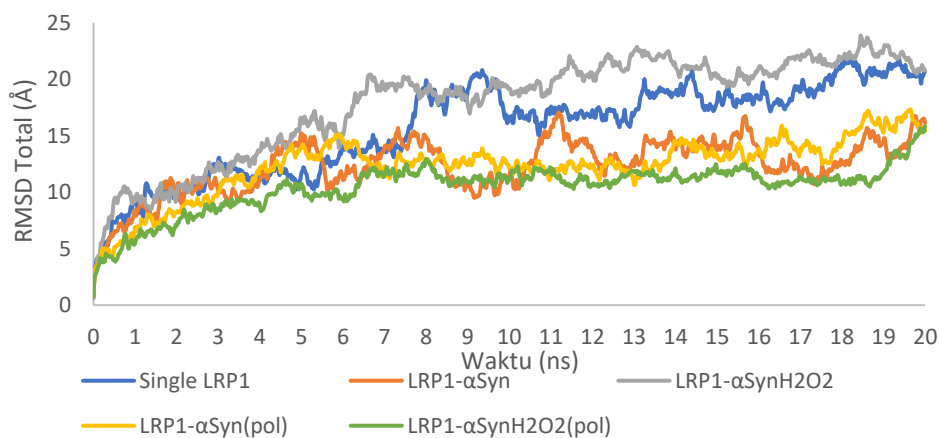
Gambar 40. Hasil penambatan Kompleks (A) LRP1- α syn, (B) LRP1- α synH₂O₂, (C) LRP1- α syn_(pol) dan (D) LRP1- α synH₂O_{2(pol)}. (Protein berwarna biru adalah LRP1, dan protein berwarna hijau adalah monomer dan polimer α syn).

4.4.2 Analisis Hasil Molekuler Dinamik

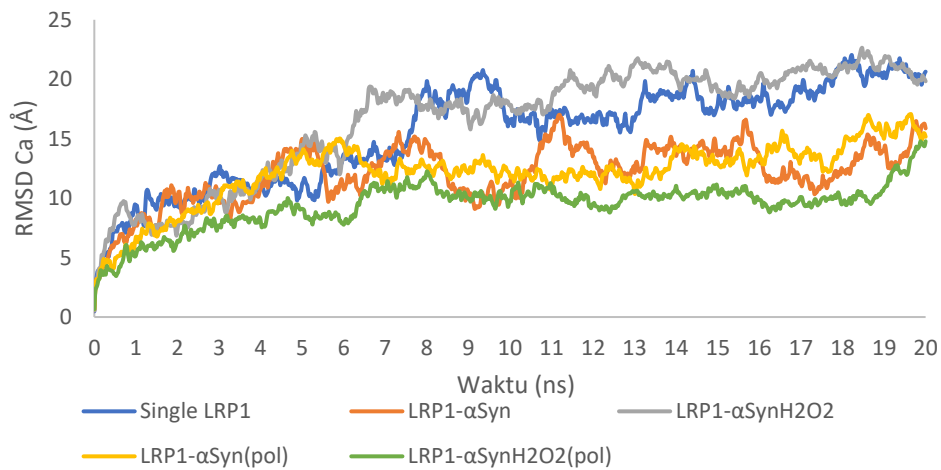
RMSD merupakan ukuran perubahan konformasi struktural awal hingga konformasi akhir. Perubahan yang dihasilkan selama simulasi menentukan stabilitas protein sehubungan dengan konformasi strukturalnya. Struktur protein yang stabil menunjukkan penyimpangan yang lebih kecil pada backbone protein dan struktur protein yang tidak stabil menunjukkan penyimpangan atau perubahan yang besar pada backbone protein (Mangat dkk., 2022). Gambar 41 menunjukkan hasil analisis RMSD total pada single LRP1, LRP1- α syn, LRP1- α synH₂O₂, LRP1- α syn_(pol) dan LRP1- α synH₂O_{2(pol)}. Nilai rerata RMSD untuk masing-

masing single dan kompleks adalah 15.735 Å; 12.348 Å; 17.886 Å; 12.315 Å dan 10.423 Å. Jika membandingkan nilai rerata RMSD total antara kompleks LRP1- α syn dan LRP1- α synH₂O₂, kompleks LRP1- α synH₂O₂ memiliki nilai RMSD total yang lebih tinggi daripada LRP1- α syn. Molekul H₂O₂ dapat meningkatkan nilai RMSD total, hal ini membuat kompleks LRP1- α synH₂O₂ menjadi *unfolding* dan tidak berfungsi (Alaei dkk., 2021), sehingga LRP1 tidak dapat mengikat α syn. Hasil ini berbanding terbalik ketika LRP1 berikatan dengan polimer LRP1- α syn_(pol) dan LRP1- α synH₂O₂_(pol), karena kompleks LRP1- α synH₂O₂_(pol) memiliki nilai RMSD total yang lebih rendah dibandingkan dengan LRP1- α syn_(pol).

Hasil RMSD total tersebut juga tidak jauh berbeda dengan hasil analisis RMSD C α (Gambar 42) pada single LRP1, LRP1- α syn, LRP1- α synH₂O₂, LRP1- α syn_(pol) dan LRP1- α synH₂O₂_(pol), dengan nilai rata-rata RMSD-C α untuk masing-masing single dan kompleks adalah 15.552 Å; 12.098 Å; 16.59 Å; 12.104 Å dan 9.392 Å. Kompleks LRP1- α synH₂O₂ memiliki nilai RMSD-C α yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan kompleks LRP1- α syn, sehingga kompleks LRP1- α syn dinilai lebih stabil (Ejaz et al., 2023), sehingga molekul H₂O₂ memiliki potensi menurunkan stabilitas kompleks. Namun, ketika membandingkan kompleks LRP1- α syn_(pol) dan LRP1- α synH₂O₂_(pol), diketahui bahwa rerata nilai RMSD-C α kompleks LRP1- α synH₂O₂_(pol) lebih kecil yang menandakan kompleks ini lebih stabil, namun saat simulasi MD pada waktu 18.75 ns mulai adanya peningkatan nilai RMSD-C α yang signifikan, dengan demikian jika simulasi dilakukan dengan waktu yang lebih lama dari 20 ns, kompleks LRP1- α synH₂O₂_(pol) berpotensi memiliki nilai RMSD-C α yang lebih tinggi. Sehingga molekul H₂O₂ juga memiliki potensi untuk mempengaruhi nilai RMSD-C α pada kompleks polimer α syn dan protein LRP1.

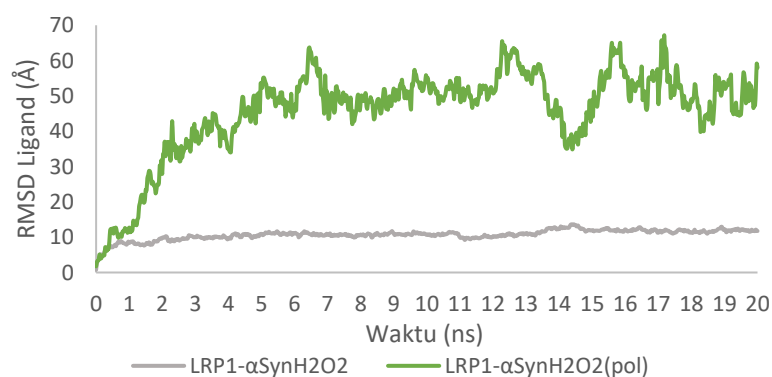


Gambar 41. RMSD total pada single LRP1, LRP1- α syn, LRP1- α synH₂O₂, LRP1- α syn_(pol) dan LRP1- α synH₂O₂_(pol).

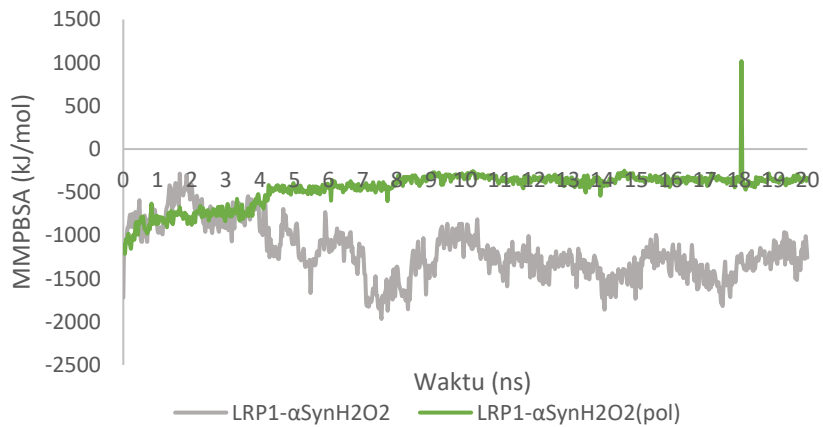


Gambar 42. RMSD C α pada single LRP1, LRP1- α syn, LRP1- α synH₂O₂, LRP1- α syn(pol) dan LRP1- α synH₂O₂(pol).

Nilai RMSD total dan RMSD C α pada LRP1- α synH₂O₂(pol) menunjukkan nilai yang lebih rendah, sehingga memungkinkan kompleks tersebut menjadi lebih stabil, hal ini dapat dilihat dari RMSD ligan (Gambar 43) pada kompleks tersebut. Dari hasil analisis menunjukkan bahwa ligan α synH₂O₂(pol) memiliki nilai yang lebih tinggi serta menunjukkan ketidakstabilan karena adanya peyimpangan atau perubahan yang besar (Mangat dkk., 2022), sehingga menyebabkan ligan menjadi kurang fungsional untuk mencegah pengikatan α syn(pol) dengan LRP1. Berbeda dengan ligan α synH₂O₂ pada kompleks LRP1- α synH₂O₂ yang memiliki nilai RMSD ligan yang rendah, sehingga lebih stabil dan lebih fungsional, yang pada akhirnya dapat mengubah konformasi kompleks LRP1- α synH₂O₂. Hal ini juga dapat dibuktikan dengan melihat hasil analisis nilai MMPBSA (Gambar 44), dimana nilai MMBSA kompleks LRP1- α synH₂O₂(pol) memiliki nilai yang lebih tinggi yang menunjukkan bahwa kompleks pengikatan ligan dan protein lebih stabil (Dash dkk., 2019; E. Srinivasan & Rajasekaran, 2016). Sedangkan kompleks LRP1- α synH₂O₂ memiliki nilai yang rendah, yang menjadikan pengikatan antara ligan dan protein kurang stabil.

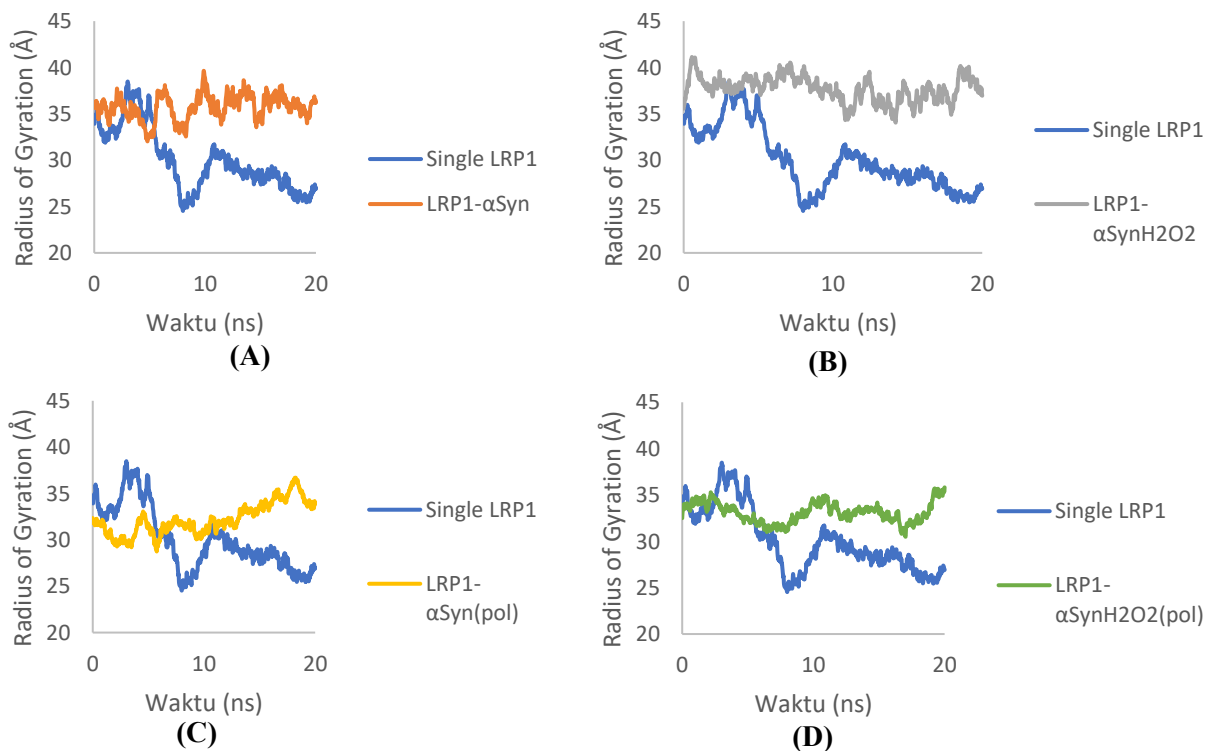


Gambar 43. RMSD ligan pada LRP1- α synH₂O₂ dan LRP1- α synH₂O₂(pol).



Gambar 44. Nilai MMPBSA pada LRP1- α synH₂O₂ dan LRP1- α synH₂O_{2(pol)}.

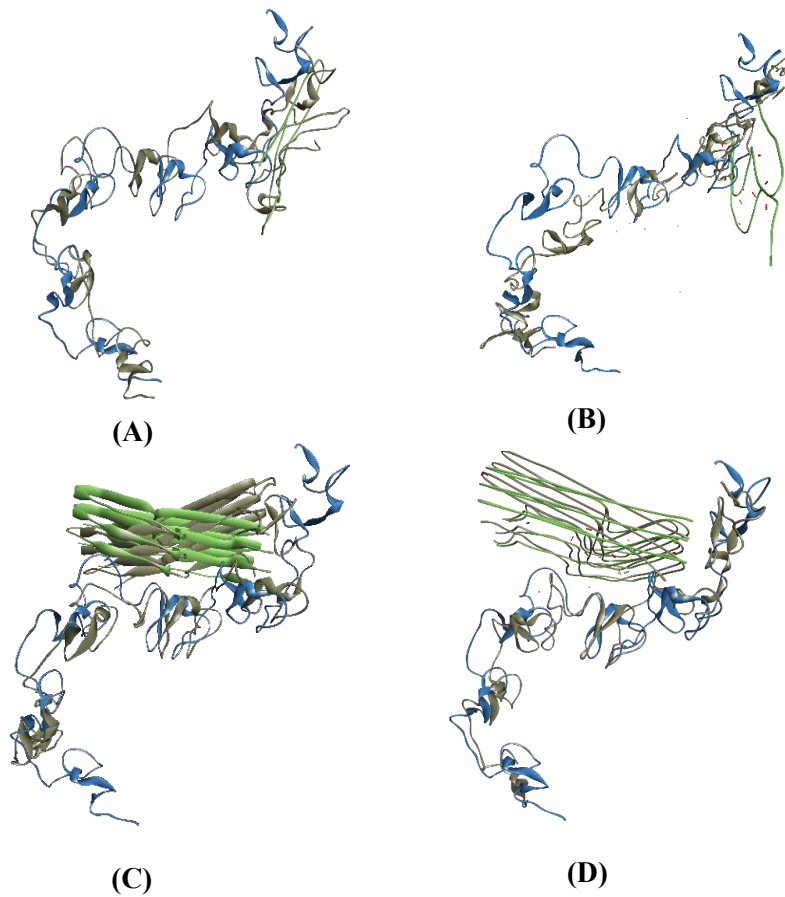
Kekompakan kompleks protein selama simulasi dievaluasi menggunakan Rg (Dankwa dkk., 2022), dimana nilai yang lebih tinggi menunjukkan sifat yang tidak stabil serta menggambarkan keadaan konformasi protein yang *unfolding* dan nilai yang lebih rendah menunjukkan protein menjadi lebih kompak atau stabil serta menggambarkan protein yang *folding* (Mahmud dkk., 2021; Hasan dkk., 2021; Lobanov dkk., 2008). Gambar 45 menampilkan hasil analisis nilai Rg pada kompleks LRP1- α syn, LRP1- α synH₂O₂, LRP1- α syn(pol) dan LRP1- α synH₂O_{2(pol)}, yang dibandingkan dengan single LRP1. Semua kompleks mempunyai rerata nilai Rg yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan single LRP1 dan dapat mengubah pola Rg.



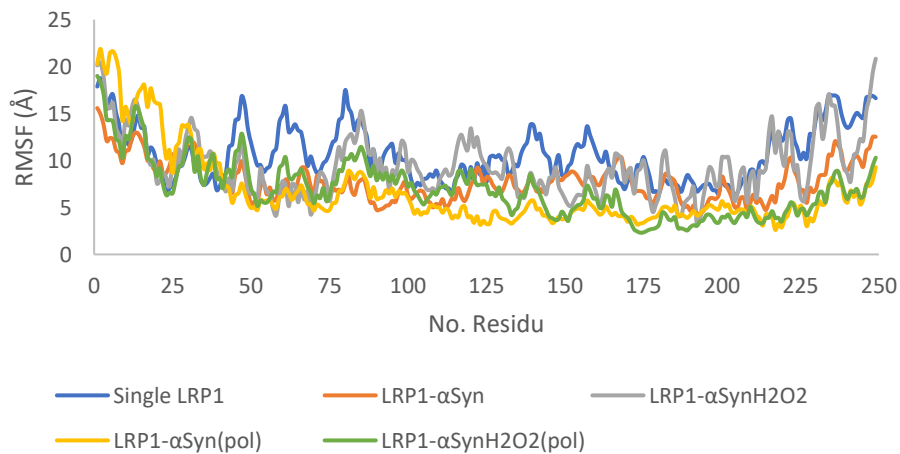
Gambar 45. Rg pada single LRP1 dibandingkan dengan (A) LRP1- α syn, (B) LRP1- α synH₂O₂, (C) LRP1- α syn(pol) dan (D) LRP1- α synH₂O_{2(pol)}.

Hasil analisis Rg pada Gambar 45 (A) dapat diketahui perbandingan antara Rg *single* LRP1 dengan kompleks LRP1- α syn, menunjukkan bahwa hasil penambatan ligan α syn dapat mengubah pola Rg namun tidak signifikan, selain itu didominasi dengan keadaan protein *folding* (terlihat dari nilai Rg yang rendah)(Yamamoto dkk., 2021), sehingga menunjukkan kompleks lebih stabil, sesuai dengan nilai RMSD total yang lebih rendah. Pada Gambar 45 (B), perbandingan antara Rg *single* LRP1 dengan kompleks LRP1- α synH₂O₂, dari hasil analisis, diketahui bahwa penambatan ligan α synH₂O₂ pada kompleks LRP1- α synH₂O₂ dapat mengubah pola Rg secara signifikan, selain itu dengan nilai Rg yang tinggi menunjukkan protein dalam keadaan *unfolding*, ini sesuai dengan nilai RMSD totalnya yang tinggi, yang menjadikan kompleks kurang stabil dan kurang kompak. Pada Gambar 45 (C), perbandingan nilai Rg antara *single* LRP1 dengan LRP1- α syn_(pol), dapat diketahui pada dasarnya penambatan ligan menunjukkan adanya pengaruh untuk mengubah pola Rg, namun dengan nilai yang rendah menunjukkan keadaan protein yang *folding*, sehingga memungkinkan protein LRP1 untuk mengikat protein α syn_(pol). Sedangkan pada Gambar 45 (D), perbandingan nilai Rg antara *single* LRP1 dengan LRP1- α synH₂O₂_(pol), menunjukkan bahwa penambatan ligan α synH₂O₂_(pol) menunjukkan adanya perubahan pola Rg, serta memiliki nilai Rg yang tinggi menunjukkan protein dengan keadaan *unfolding*, yang memungkinkan protein LRP1 menjadi kurang fungsional. Untuk memperjelas adanya perubahan konformasi, dapat dilihat dari hasil superimpose pada Gambar 46.

Hasil analisis Rg tersebut juga didukung oleh hasil analisis nilai RMSF (Gambar 47), dimana kompleks protein LRP1- α synH₂O₂ dan LRP1- α synH₂O₂_(pol) memiliki nilai fluktuasi pada *active site*, yang memungkinkan terlepasnya ligan dengan protein targetnya, fluktuasi tersebut terjadi pada residu nomor 206, 216, 202 dan 212. Karena pada dasarnya nilai RMSF yang tinggi menunjukkan fleksibilitas yang lebih besar, sedangkan RMSF minimum menunjukkan pergerakan yang sangat terbatas (Ajjarapu dkk., 2021). Sehingga dengan residu *active site* yang mengalami fluktuasi tentu saja dapat memberikan pengaruh pada pengikatan ligan dan protein, karena tingginya nilai RMSF residu situs pengikatan menunjukkan kurangnya kestabilan pengikatan ligan terhadap protein (Soumia dkk., 2022) sehingga memungkinkan untuk terlepasnya α syn dari LRP1 .



Gambar 46. Hasil superimpose pada kompleks (A) LRP1- α syn, (B) LRP1- α synH₂O₂, (C) LRP1- α syn_(pol) dan (D) LRP1- α synH₂O₂_(pol). (Kompleks protein yang berwarna menunjukkan sebelum simulasi MD, dan kompleks yang berwarna gelap menunjukkan setelah simulasi MD)



Gambar 47. RMSF pada single LRP1, LRP1- α syn, LRP1- α synH₂O₂, LRP1- α syn_(pol) dan LRP1- α synH₂O₂_(pol).

4.5 Potensi H₂O₂ dalam Menstabilkan Protein ERK1/2/5 dan ASK1

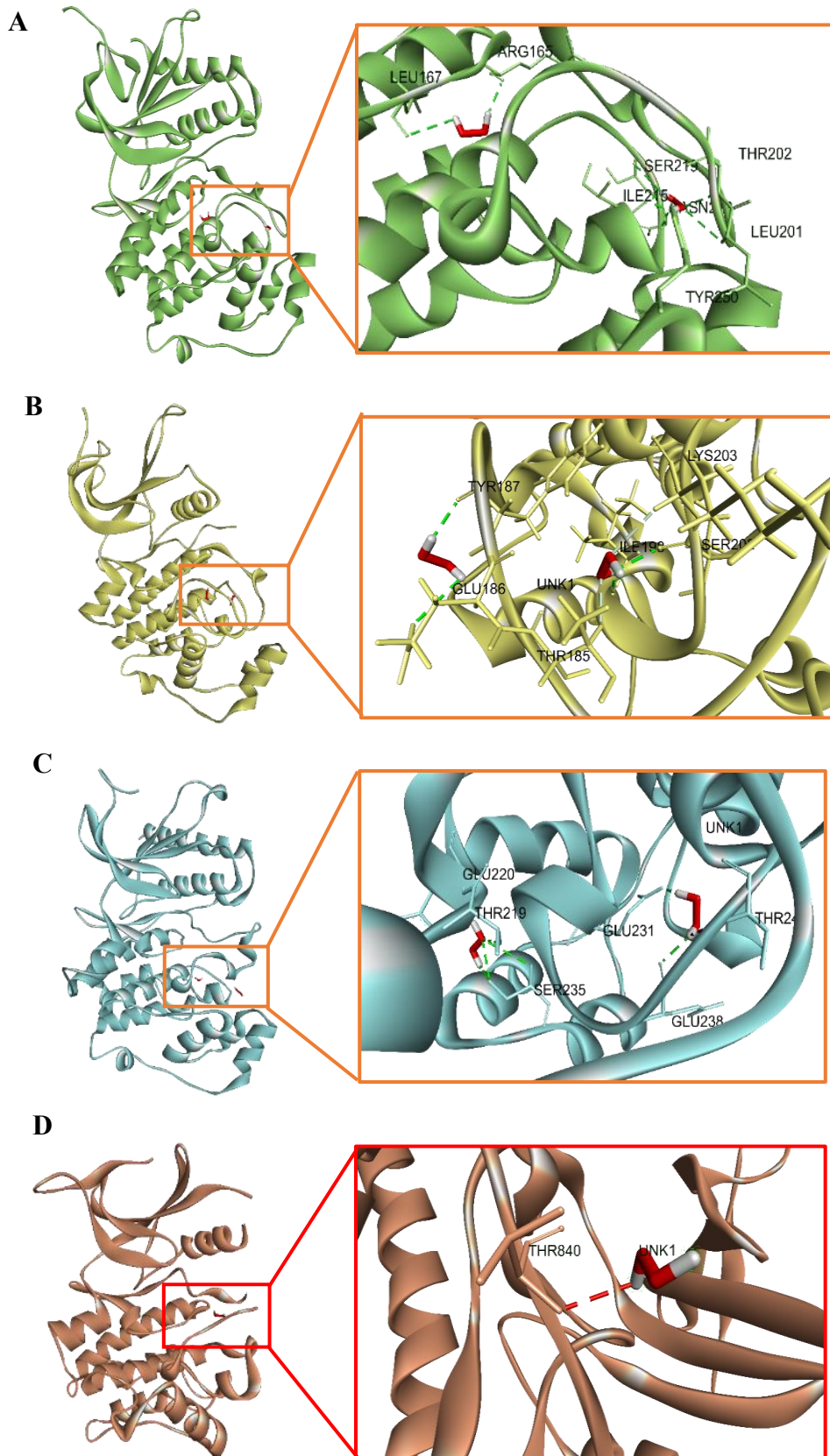
4.5.1 Analisis Hasil Molekuler *Docking*

Penambatan dilakukan dengan docking yang ditargetkan, dengan menyesuaikan situs fosforilasi masing-masing protein ERK dan ASK1. ERK adalah kelas MAPK yang diaktifkan oleh fosforilasi ganda pada residu tirosin dan treonin (Blanc dkk., 2003). ERK1 dengan situs fosforilasi pada residu Thr202 & Tyr204, ERK2 pada residu Thr185 & Tyr187 dan ERK5 pada residu Thr219 & Tyr221 (Olea-Flores dkk., 2019). Hasil penambatan pada ERK1, molekul H₂O₂ berikatan dengan situs fosforilasi hanya di Thr202. Pada ERK2, molekul H₂O₂ berikatan dengan situs fosforilasi di Thr185 dan Tyr187. Pada ERK5, molekul H₂O₂ mengikat situs fosforilasi hanya di Thr219. Situs fosforilasi ASK1 pada residu Thr-838 (Betanzos dkk., 2016; Hayakawa dkk., 2012; Shiizaki dkk., 2013) sedangkan pada hasil penambatan antara ASK1 dengan H₂O₂ pada residu THR-840 menjadi situs aktivasi fosforilasi. Hasil docking masing-masing protein dengan molekul H₂O₂ pada Tabel 7 dan semua kompleks hasil docking akan ditunjukkan pada Gambar 48.

Tabel 7. Hasil Docking ERK1, ERK2, ERK5 dan ASK1 dengan H₂O₂.

No	Protein Reseptor	Binding afinitas	Residu Asam Amino	Tipe Interaksi
1	ERK1	-2.8	A:LEU201 A:THR202 A:ASN218 A:ILE215 A:TYR250 A:SER219	Hidrogen konvensional
		-2.3	A:LEU167 A:ARG165	Hidrogen konvensional
2	ERK2	-1.9	A:ILE198 A:SER202 A:THR185 A:LYS203	Hidrogen konvensional Hidrogen karbon
		-2.2	A:GLU186 A:TYR187	Hidrogen konvensional
3	ERK5	-2.8	A:GLU220 A:SER235 A:THR219	Hidrogen konvensional
		-3.0	A:GLU231 A:GLU238 A:THR240	Hidrogen konvensional <i>Unfavorable</i>
4	ASK1	-1.8	THR840	<i>Unfavorable</i>

*Tulisan bold menunjukkan H₂O₂ mengikat residu situs fosforilasi



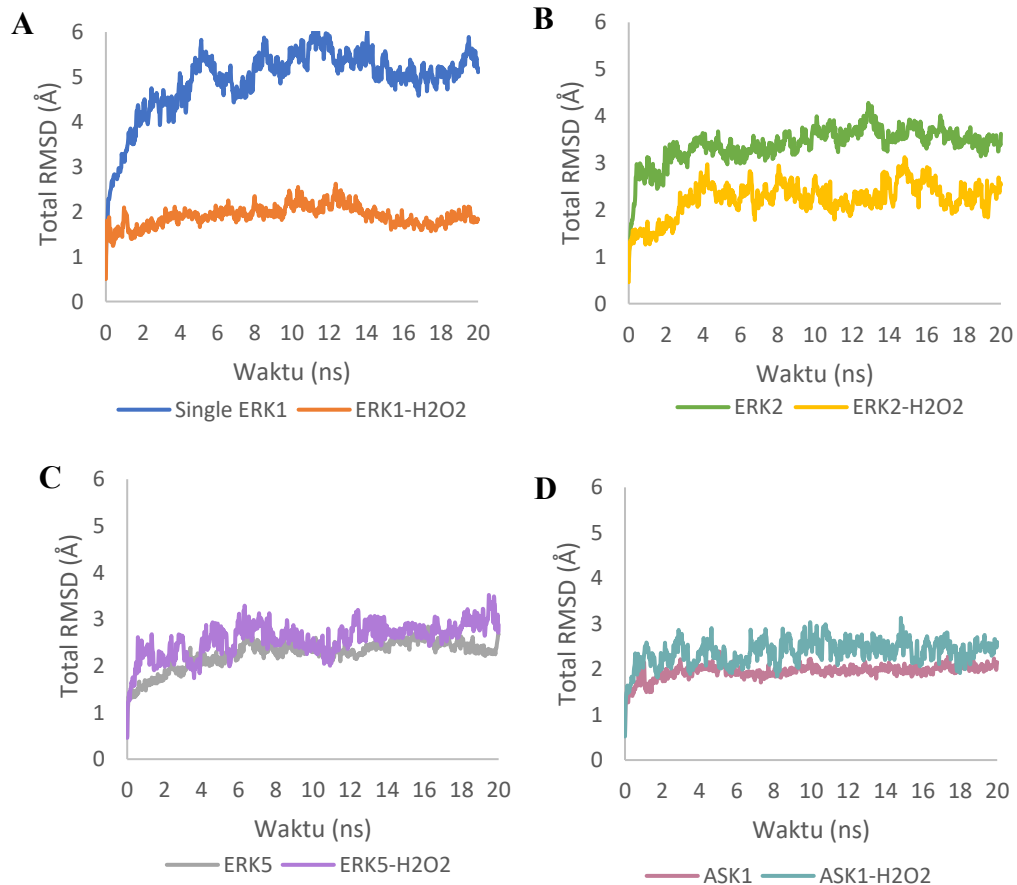
Gambar 48. Hasil Penambatan Protein ERK dan ASK1 dengan H_2O_2 . (A) ERK1- H_2O_2 , (B) ERK2- H_2O_2 , (C) ERK5- H_2O_2 , (D) ASK1- H_2O_2

Hasil penambatan molekuler menunjukkan molekul H_2O_2 pada kompleks ERK1- H_2O_2 , ERK2- H_2O_2 , dan ERK5- H_2O_2 berikatan dengan tempat fosforilasi sesuai dengan *origin native*-nya. Sedangkan pada kompleks ASK1- H_2O_2 , molekul H_2O_2 berikatan di tempat yang berbeda dari tempat asalnya (THR-838), berikatan dengan situs fosforilasi baru, yaitu pada residu THR-840. Ada kemungkinan bahwa ada perubahan pada tempat fosforilasi. Menurut Carrasco-Navarro & Aguirre, (2021), H_2O_2 menginduksi perubahan fosforilasi pada beberapa protein, dan sebagian besar perubahan yang diinduksi oleh H_2O_2 adalah proteini MAPK. Fosforilasi protein (serin / treonin) berubah pada beberapa komponen ini sebagai respons terhadap H_2O_2 .

Penelitian yang dilakukan oleh Carrasco-Navarro & Aguirre (2021), menggunakan analisis fosfo-proteomik. Disebutkan bahwa hasil fosfo-proteomik mengkonfirmasi adanya perubahan situs fosforilasi dengan menunjukkan protein SakA mengalami defosforilasi dengan tidak adanya H_2O_2 , SakA menjadi terfosforilasi pada residu T171 dan Y173, dan situs fosforilasi baru terdeteksi pada T176 dengan adanya H_2O_2 . Identifikasi protein yang terfosforilasi secara berbeda melalui analisis fosfo-proteomik, memberikan wawasan tentang jalur transduksi sinyal yang diaktifkan sebagai respons terhadap stimulasi faktor pertumbuhan, atau apoptosis yang diinduksi toksik. Dengan demikian dalam penelitian ini teknik-teknik fosfo-proteomik dapat digabungkan untuk menyelidiki secara kuantitatif perubahan dinamis dalam fosforilasi protein (de Graauw dkk., 2006).

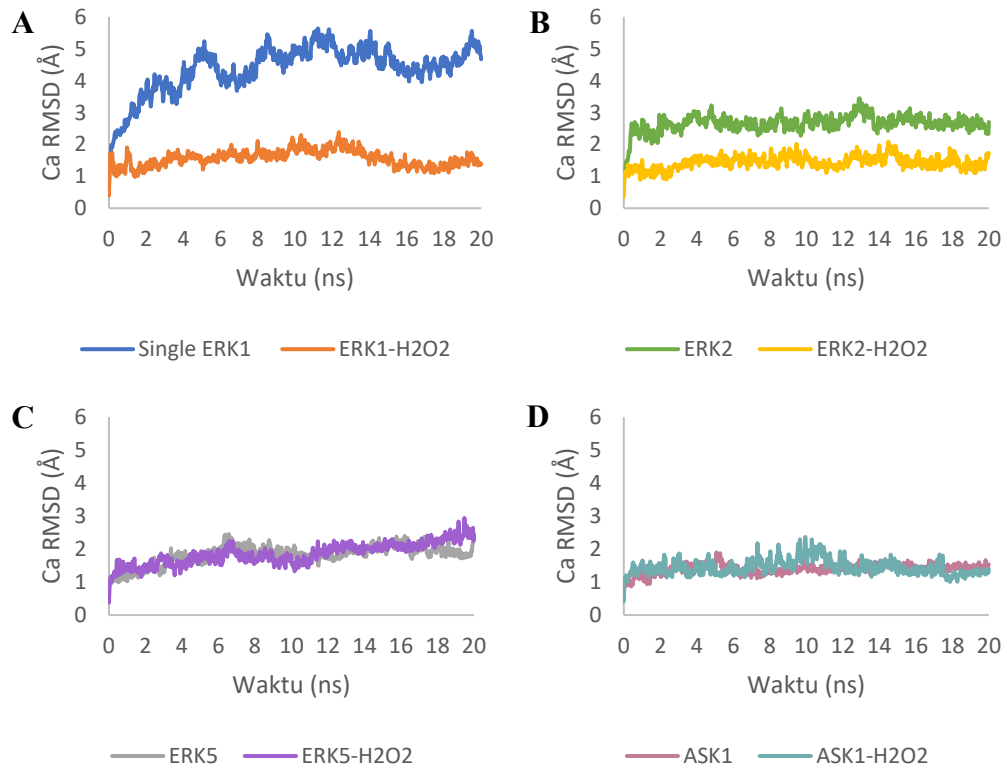
4.5.2 Analisis Hasil Molekuler Dinamik

Hasil analisis MD terdiri dari RMSD total, RMSD $C\alpha$ dan RMSF (Gambar 49). Analisis RMSD total protein ERK1 dan ERK2 memiliki nilai $>3\text{\AA}$, peningkatan nilai RMSD total pada kompleks ERK1 lebih signifikan dibandingkan ERK2, bahkan mencapai 5\AA . Sedangkan pada kompleks ERK1- H_2O_2 dan ERK2- H_2O_2 nilai RMSD totalnya menjadi $<3\text{\AA}$. Pada kompleks ERK5- H_2O_2 dan ASK1- H_2O_2 terjadi peningkatan nilai RMSD total, jika dibandingkan dengan ERK5 dan ASK1. Namun peningkatan nilai RMSD total yang terjadi masih berada pada kisaran 3\AA . RMSD total memastikan bahwa sistem berada dalam kesetimbangan, sebagai indikator keakuratan kompleks protein sampel (Arnitali dkk., 2019), serta digunakan untuk mengonfirmasi sifat stabil dari kompleks protein-ligan dalam kondisi simulasi (Alom dkk., 2023). Nilai RMSD yang lebih rendah menunjukkan kompleks yang lebih stabil (Biswas dkk., 2023).

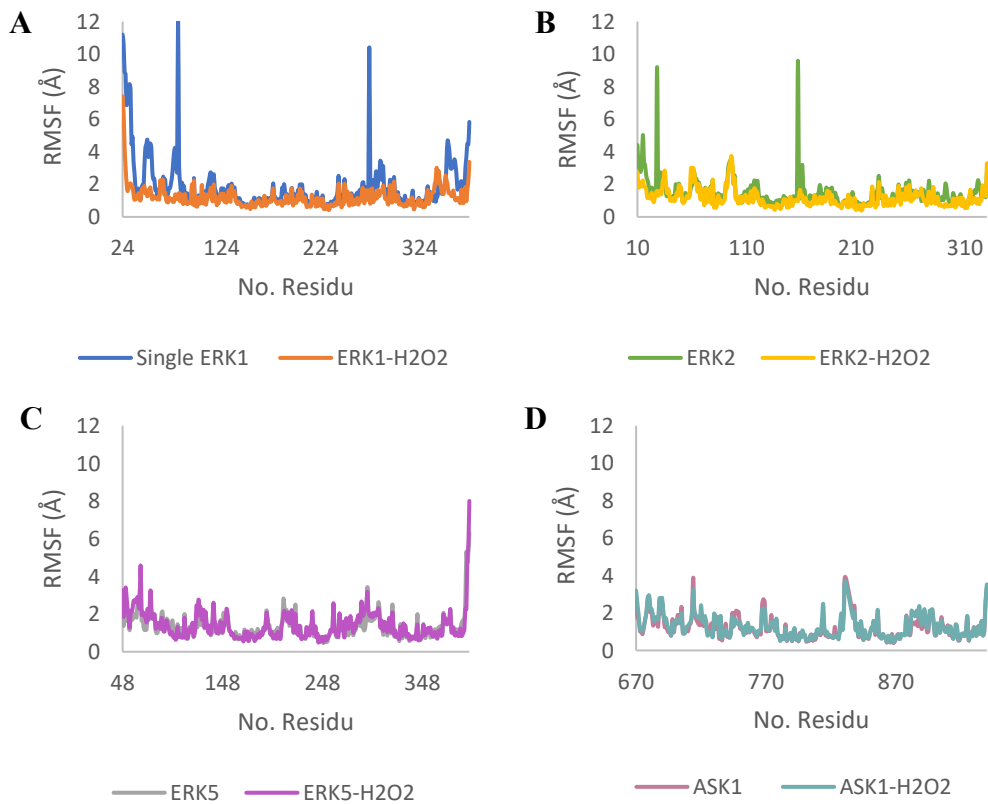


Gambar 49. RMSD Total dari semua kompleks (A) ERK1 and ERK1-H₂O₂, (B) ERK2 and ERK2-H₂O₂, (C) ERK5 and ERK5-H₂O₂, (D) ASK1 and ASK1-H₂O₂

RMSD α sebagai faktor utama yang berkontribusi dalam menstabilkan protein dan mengindikasikan perubahan konformasi pada protein target (Siraj dkk., 2021). Hasil RMSD α pada Gambar 50. RMSD α memiliki nilai yang hampir sama dengan RMSD total. Kompleks ERK1-H₂O₂ dan ERK2-H₂O₂ memiliki nilai yang lebih rendah (<3 Å), jika dibandingkan dengan kompleks ERK1/2 tanpa molekul H₂O₂ (nilai α RMSD >3 Å). Sedangkan kompleks ERK5 dan ASK1 mengalami sedikit peningkatan nilai α RMSD, namun masih <3 Å. RMSD α pada kompleks dengan H₂O₂ terutama pada ERK1 dan ERK2 memiliki nilai yang lebih rendah (<3 Å). Kompleks ERK5-H₂O₂ dan ASK1-H₂O₂ mengalami sedikit peningkatan nilai RMSD α , namun kestabilan kompleks masih terjaga karena nilai RMSD α masih <3Å.



Gambar 50. RMSD Ca dari semua kompleks (A) ERK1 and ERK1-H₂O₂, (B) ERK2 and ERK2-H₂O₂, (C) ERK5 and ERK5-H₂O₂, (D) ASK1 and ASK1-H₂O₂



Gambar 51. RMSF pada semua kompleks (A) ERK1 and ERK1-H₂O₂, (B) ERK2 and ERK2-H₂O₂, (C) ERK5 and ERK5-H₂O₂, (D) ASK1 and ASK1-H₂O₂

RMSF adalah ukuran umum yang digunakan untuk mengukur fluktuasi tentang interaksi atau posisi ligan dengan residu asam amino pada protein target yang terjadi selama simulasi (Barazorda-Ccahuana dkk., 2018; Farmer dkk., 2017; Rampogu dkk., 2022) Gambar 51 menunjukkan bahwa RMSF dari kompleks ERK1-H₂O₂, ERK2-H₂O₂, ERK5-H₂O₂ dan ASK1-H₂O₂, semua kompleks tersebut memiliki nilai RMSF yang lebih rendah (RMSF <3Å), jika dibandingkan dengan ERK1, ERK2, ERK5 dan ASK1. Hal ini menunjukkan bahwa keberadaan molekul H₂O₂, membuat kompleks lebih stabil dan kompak. Nilai RMSF yang rendah pada residu *binding site* mengindikasikan kestabilan ikatan ligan dengan protein (Soumia dkk., 2022). Oleh karena itu, H₂O₂ berpotensi menjadi terapi komplementer, karena kemampuannya dalam menstabilkan protein MAPK.

Hidrogen peroksida bertindak sebagai *second messenger* yang memberi sinyal dalam pembuluh darah. Targetnya dalam sistem kardiovaskular beragam, yang memberikan beragam efek pada endotel (Blanc dkk., 2003). Namun, dalam penelitian ini terfokus pada endotel pembuluh darah otak. Konsentrasi H₂O₂ yang rendah memainkan peran kunci dalam fungsi vaskular dan homeostasis (Jiang dkk., 2017). Erk1/2/5 dilaporkan sebagai target H₂O₂. Kaskade ERK pada dasarnya terlibat dalam proliferasi, diferensiasi, pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel (Bretón-Romero & Lamas, 2014). Dalam beberapa penelitian, H₂O₂ dosis rendah meningkatkan proliferasi sel endotel dengan meningkatkan fosforilasi protein ERK1/2/5. Fosforilasi faktor transkripsi oleh MAPK menyebabkan aktivasi beberapa gen yang terlibat dalam pertumbuhan dan diferensiasi, aktivasi komponen pensinyalan ini telah terlibat dalam memediasi beberapa respon fisiologis terhadap H₂O₂ (Blanc dkk., 2003).

Studi dari Blanc dkk., (2003) menunjukkan bahwa 100 µM H₂O₂ meningkatkan fosforilasi ERK 1/2 pada *vascular smooth muscle cells* (VSMC) dari aorta toraks embrionik tikus. Aktivasi ERK 1/2 yang diinduksi H₂O₂ dikaitkan dengan peningkatan fosforilasi tirosin reseptor EGF (Rao, 1996). Menurut Jiang dkk., (2017) konsentrasi H₂O₂ yang rendah mendorong proliferasi, migrasi, dan pembentukan *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC). ERK5 dalam HUVECs secara signifikan diaktifkan oleh H₂O₂. Peningkatan aktivitas ERK5 secara signifikan memperkuat efek proangiogenik H₂O₂. Oleh karena itu, ERK5 dapat menjadi target terapi yang potensial untuk meningkatkan angiogenesis dan meningkatkan kelangsungan hidup BEC (Jiang dkk., 2017).

Beberapa penelitian yang dilakukan di atas, menunjukkan bahwa H₂O₂ dapat mengaktifkan protein MAPK melalui fosforilasi. Pada penelitian ini, H₂O₂ menunjukkan potensinya dalam menstabilkan protein ERK dan ASK karena dapat menurunkan nilai RMSD total dan RMSF kompleks selama simulasi. Untuk menilai stabilitas struktur protein,

perlu dilakukan penghitungan RMSD C α protein. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Mal (2020) yaitu, protein yang tidak terfosforilasi mengalami perubahan konformasi yang drastis dan protein terfosforilasi memiliki nilai RMSD yang rendah dan mengalami perubahan konformasi yang minimal, dan lebih stabil. Fleksibilitas dalam posisi fosforilasi protein (SER, THR, TYR) akan dilemahkan pada saat fosforilasi. Hal ini mungkin dapat dikaitkan dengan RMSD dan RMSF yang rendah pada hasil penelitian ini, yang menunjukkan bahwa dengan adanya molekul H₂O₂ dapat memfosforilasi protein ERK1/2/5 dan ASK1 yang menunjukkan bahwa fosforilasi mengurangi perubahan konformasi dan dengan demikian menstabilkan struktur protein. Dengan demikian memungkinkan molekul H₂O₂ dapat mengaktifkan protein ERK1/2/5 dan ASK1. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Mal dkk., 2(020), untuk memastikan fosforilasi benar-benar terjadi, maka ditambahkan molekul fosfat pada saat simulasi MD dilakukan. Sehingga nanti dapat dipastikan dengan konsentrasi H₂O₂ yang rendah dapat merangsang angiogenesis, menunjukkan bahwa mengatur kadar H₂O₂ secara farmakologis dapat menjadi strategi angiogenik (Jiang dkk., 2017). Oleh karena itu dalam penelitian ini dibutuhkan analisis MD lebih lanjut untuk memastikan adanya fosforilasi yang terjadi pada kompleks ERK1-H₂O₂, ERK2-H₂O₂, ERK5-H₂O₂ dan ASK1-H₂O₂ dengan menambahkan gugus fosfat pada saat simulasi MD.

4.6 H₂O₂ Dosis Rendah sebagai Terapi Komplementer L-DOPA

Pengobatan yang hanya menggunakan L-DOPA tidak dapat mengatasi beberapa masalah akibat disfungsi α syn seperti disfungsi mitokondria sel neuron, disregulasi *reuptake* dopamin, penyebaran dan absorpsi α syn antar sel, serta apoptosis sel endotel pembuluh darah otak. Selain itu, ada efek samping yang berhubungan dengan penggunaan obat L-DOPA seperti; i) desensitisasi pada reseptor dopamin hingga menyebabkan pengobatan L-DOPA tidak memberikan efek, hingga menyebabkan komplikasi motorik meliputi diskinesia. Komplikasi ini dapat sangat melumpuhkan dan sulit diobati. (Thanvi & Lo, 2004). ii) menyebabkan adanya ketergantungan dengan obat L-DOPA, karena semakin lama proses pengobatan, maka dosis L-DOPA yang diberikan juga semakin besar. Hal ini menyebabkan pemberian L-DOPA menjadi tidak efektif. Sehingga membutuhkan terapi komplementer untuk memaksimalkan pengobatan L-DOPA, yaitu dengan terapi komplementer dengan menggunakan H₂O₂ dosis rendah.

Pada dasarnya secara fisiologi, sel memproduksi H₂O₂ intraseluler. Molekul H₂O₂ didalam tubuh (endogen) dihasilkan dari mitokondria, dimana mitokondria merupakan sumber intraseluler utama ROS. Produksi ROS mitokondria merupakan konsekuensi dari

fosforilasi oksidatif yang terkait dengan respirasi aerobik di dalam *electron transport chain* (ETC). Transfer elektron biasanya mengarah pada pembentukan ATP oleh kompleks kelima; namun, elektron yang berasal dari NADH atau FADH dapat secara langsung bereaksi dengan oksigen dan menghasilkan *superoxide* (O_2^-). Kebocoran elektron dari ETC menyebabkan reduksi parsial oksigen molekuler menjadi O_2^- . O_2^- mitokondria dismutasi oleh MnSOD mengarah pada pembentukan H_2O_2 di dalam mitokondria (Andrés dkk., 2022; Bretón-Romero & Lamas, 2014)(Andrés et al., 2022; Thanvi & Lo, 2004). Molekul H_2O_2 endogen (intraseluler) bersifat *locally*, artinya hanya di dalam sel yang menghasilkannya. Terapi dengan menggunakan H_2O_2 diaplikasikan secara intravena dengan dosis rendah. Karena pada dasarnya H_2O_2 , tidak dikenali oleh katalase pada dosis rendah. H_2O_2 dosis rendah yang diberikan secara intravena bersifat sistemik, sehingga bisa langsung menasar ke target protein tanpa terurai oleh katalase. Di dalam tubuh (darah) katalase tidak hanya berperan mengubah H_2O_2 menjadi air dan oksigen (Andrés dkk., 2022), tetapi secara alamiah katalase memiliki peran untuk menjaga H_2O_2 dalam konsentrasi yang rendah dibawah 100 μM (Ransy dkk., 2020). Oleh karena itu, dalam terapi komplementer dengan menggunakan H_2O_2 , perlu diperhatikan ada tidaknya defisiensi katalase (acatalasemia) (Góth & Nagy, 2012) pada pasien.

Data hasil *molecular docking* monomer dan polimer αsyn dengan protein target, yang dibandingkan dengan monomer dan polimer $\alpha syn-H_2O_2$ dengan protein target, menunjukkan adanya perubahan interaksi dan perbedaan nilai *binding energi*-nya. Interaksi dari hasil *molecular docking* tersebut merupakan interaksi dalam skala nano. Hasil *docking* menunjukkan adanya perbedaan pada *binding energi* ($-0,01 \times 10^3$ s/d $-0,08 \times 10^3$ kkal/mol). Perbedaan kecil yang terjadi, menunjukkan ada sesuatu yang berubah dalam skala nano, yang menandakan bahwa interaksi antar protein sudah terganggu. Penyakit Parkinson ditandai dengan adanya fibril αsyn (polimer αsyn). Sehingga dalam sel saraf penderita PD, αsyn sudah membentuk fibril dalam jumlah yang banyak. Oleh karena itu dalam penelitian ini juga memodelkan polimer αsyn yang kemudian ditambatkan dengan protein target (VDAC, DAT dan LRP1). Selanjutnya, dibandingkan dengan hasil penambatan polimer $\alpha syn-H_2O_2$ dengan protein target, untuk mengetahui kemampuan H_2O_2 dalam mencegah protein αsyn yang sudah membentuk polimer untuk mengikat protein target, dan data hasil penelitian menunjukkan bahwa molekul H_2O_2 memiliki potensi untuk mencegah polimer αsyn mengikat protein target serta berpotensi untuk dijadikan terapi komplementer dengan L-DOPA.

Dalam penelitian ini juga memodelkan monomer α syn yang ditambatkan dengan protein target, kemudian dibandingkan dengan monomer α syn-H₂O₂ yang ditambatkan dengan sesama protein monomer α syn dan protein target, untuk mengetahui kemampuan H₂O₂ dalam mencegah terbentuknya fibril dan mencegah monomer α syn mengikat protein target. Data hasil penelitian menunjukkan potensi H₂O₂ mencegah mengikatnya sesama monomer α syn dan mencegah mengikatnya monomer α syn dengan protein target. Hasil dari data monomer ini dapat dijadikan sebagai bentuk preventif atau pencegahan sebelum terbentuknya fibril α syn, untuk mengurangi patologi α syn. Selain itu, data hasil *docking* monomer dan polimer α syn-H₂O₂ dengan protein target dapat dipakai untuk memberikan landasan saintifik terkait dengan mempertahankan protein target tetap fungsional dalam kondisi saat ada pengobatan L-DOPA.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. H₂O₂ memiliki potensi untuk mencegah α syn membentuk fibril, mekanismenya dengan menurunkan *binding affinity* monomer α syn dan dapat mempengaruhi *active site*-nya. Serta dengan adanya H₂O₂ dapat menyebabkan α syn mengalami *unfolding* dan dapat meningkatkan fluktuasi pada residu *active site*, yang memungkinkan untuk terlepasnya ikatan antara monomer α syn.
2. H₂O₂ memiliki potensi untuk mencegah mengikatnya α syn terhadap VDAC, mekanismenya dengan menurunkan *binding affinity* dan mengganggu situs pengikatannya α syn terhadap VDAC yang menyebabkan perubahan interaksi. Dengan adanya H₂O₂ menyebabkan pengikatan ligan dan protein kurang stabil dengan meningkatkan fluktuasi *active site* pada VDAC, yang memungkinkan pengikatan α syn dengan VDAC menjadi lebih fleksibel dan berpotensi untuk terlepas.
3. H₂O₂ memiliki potensi untuk mencegah mengikatnya protein α syn terhadap DAT dengan menurunkan *binding affinity*-nya terhadap DAT, serta dapat mengganggu situs pengikatannya yang menyebabkan adanya perubahan *active site* dan perubahan interaksi. Adanya molekul H₂O₂ dapat menyebabkan pengikatan antara ligan dan protein menjadi kurang baik. Serta dapat meningkatkan fluktuasi pada semua residu *active site* yang memungkinkan ligan terpisah dengan protein targetnya.
4. H₂O₂ memiliki potensi untuk mencegah α syn mengikat LRP1 dengan menurunkan *binding affinity*-nya terhadap LRP1 dan mengganggu situs pengikatan yang menyebabkan perubahan interaksi α syn terhadap LRP1. Adanya molekul H₂O₂ menyebabkan pengikatan ligan dan protein kurang stabil dengan meningkatkan fluktuasi *active site* pada LRP1, yang memungkinkan situs pengikatan protein α syn dengan LRP1 menjadi lebih fleksibel dan berpotensi untuk terlepas.
5. Mekanisme H₂O₂ dalam mengaktifkan ERK 1/2/5 dan ASK1, dengan menstabilkan ERK 1/2/5 dan ASK1 melalui penurunan nilai RMSD total, RMSD C α dan RMSF, serta molekul H₂O₂ dapat mengikat residu fosforilasi pada protein ERK 1/2/5 dan ASK1.

5.1 Saran

Dalam penelitian ini, H_2O_2 menunjukkan potensinya dalam mengaktifkan protein ERK dan ASK karena menstabilkan kompleks dengan menurunkan nilai RMSD total dan RMSF kompleks selama simulasi, namun belum bisa memastikan dapat meningkatkan terjadinya fosforilasi pada protein ERK dan ASK1, sehingga perlu dilakukan analisis MD lebih lanjut untuk memastikan fosforilasi yang terjadi pada kompleks ERK1- H_2O_2 , ERK2- H_2O_2 , ERK5- H_2O_2 , dan ASK1- H_2O_2 dengan penambahan fosfat pada saat simulasi MD.

DAFTAR PUSTAKA

- Ajjarapu, S. M., Tiwari, A., Taj, G., Singh, D. B., Singh, S., & Kumar, S. (2021). Simulation studies, 3D QSAR and molecular docking on a point mutation of protein kinase B with flavonoids targeting ovarian Cancer. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s40360-021-00512-y>
- Alaei, L., Ashengroph, M., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2021). The concept of protein folding/unfolding and its impacts on human health. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (1st ed., Vol. 126). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2021.01.007>
- Alkhalifa, A. E., Al-Ghraiyyah, N. F., Odum, J., Shunnarah, J. G., Austin, N., & Kaddoumi, A. (2023). Blood–Brain Barrier Breakdown in Alzheimer’s Disease: Mechanisms and Targeted Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(22). <https://doi.org/10.3390/ijms242216288>
- Alom, M. M., Bonna, R. P., Islam, A., Alom, M. W., Rahman, M. E., Faruque, M. O., Khalekuzzaman, M., Zaman, R., & Islam, M. A. (2023). Unveiling Neuroprotective Potential of Spice Plant-Derived Compounds against Alzheimer’s Disease: Insights from Computational Studies. *International Journal of Alzheimer’s Disease*, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/8877757>
- Andrés, C. M. C., Pérez de la Lastra, J. M., Juan, C. A., Plou, F. J., & Pérez-Lebeña, E. (2022). Chemistry of Hydrogen Peroxide Formation and Elimination in Mammalian Cells, and Its Role in Various Pathologies. *Stresses*, 2(3), 256–274. <https://doi.org/10.3390/stresses2030019>
- Arnittali, M., Rissanou, A. N., & Harmandaris, V. (2019). Structure of Biomolecules Through Molecular Dynamics Simulations. *Procedia Computer Science*, 156, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2019.08.181>
- Barazorda-Ccahuana, H. L., Valencia, D. E., Aguilar-Pineda, J. A., & Gómez, B. (2018). Art v 4 Protein Structure as a Representative Template for Allergen Profilins: Homology Modeling and Molecular Dynamics. *ACS Omega*, 3(12), 17254–17260. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02288>
- Bauer, R. A., Bourne, P. E., Formella, A., Frömmel, C., Gille, C., Goede, A., Guerler, A., Hoppe, A., Knapp, E. W., Pöschel, T., Wittig, B., Ziegler, V., & Preissner, R. (2008). Superimpose: a 3D structural superposition server. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue), 47–54. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn285>
- Betanzos, C. M., Federspiel, J. D., Palubinsky, A. M., McLaughlin, B., & Liebler, D. C. (2016). Dynamic phosphorylation of apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) in response to oxidative and electrophilic stress. *Chem Res Toxicol*, 29(12), 2175–2183. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00339>
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T. G., Bertoni, M., Bordoli, L., & Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), 252–258. <https://doi.org/10.1093/nar/gku340>
- Biswas, P., Bibi, S., Yousafi, Q., Mehmood, A., Saleem, S., Ihsan, A., Dey, D., Hasan Zilani, M. N., Hasan, M. N., Saleem, R., Awaji, A. A., Fahmy, U. A., & Abdel-Daim, M. M. (2023). Study of MDM2 as Prognostic Biomarker in Brain-LGG Cancer and Bioactive Phytochemicals Inhibit the p53-MDM2 Pathway: A Computational Drug Development Approach. *Molecules*, 28(7). <https://doi.org/10.3390/molecules28072977>
- Blackstone, C., & Blackstone, C. (2009). Infantile parkinsonism-dystonia : a dopamine “ transportopathy .” *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1455–1458. <https://doi.org/10.1172/JCI39632.ter>
- Blaess, S., & Herrera, A. J. (2023). Editorial: Factors contributing to dopaminergic cell

- death. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1136930>
- Blanc, A., Pandey, N. R., & Srivastava, A. K. (2003). Synchronous activation of ERK 1/2, p38mapk and PKB/Akt signaling by H₂O₂ in vascular smooth muscle cells: potential involvement in vascular disease (review). *International Journal of Molecular Medicine*, 11(2), 229–234. <https://doi.org/10.3892/ijmm.11.2.229>
- Boder, E. J., Goncalves, B. G., Lebedenko, C. G., & Banerjee, I. A. (2023). Probing the Interactions of LRP1 Ectodomain-Derived Peptides with Fibrillar Tau Protein and Its Impact on Cellular Internalization. *Applied Sciences (Switzerland)*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/app13020853>
- Boland, K., Flanagan, L., & Prehn, J. H. M. (2013). Paracrine control of tissue regeneration and cell proliferation by Caspase-3. *Cell Death and Disease*, 4(7), e725-6. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.250>
- Bradaric, B. D., Patel, A., Schneider, J. A., Carvey, P. M., & Hendey, B. (2012). Evidence for angiogenesis in Parkinson's disease, incidental Lewy body disease, and progressive supranuclear palsy. *Journal of Neural Transmission*, 119(1), 59–71. <https://doi.org/10.1007/s00702-011-0684-8>
- Bretón-Romero, R., & Lamas, S. (2014). Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. *Redox Biology*, 2(1), 529–534. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.02.005>
- Burré, J. (2015). The synaptic function of α -synuclein. *Journal of Parkinson's Disease*, 5(4), 699–713. <https://doi.org/10.3233/JPD-150642>
- Burré, J., Sharma, M., & Südhof, T. C. (2014). α -Synuclein assembles into higher-order multimers upon membrane binding to promote SNARE complex formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(40), E4274–E4283. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416598111>
- Butler, B., Saha, K., & Khoshbouei, H. (2012). A-Synuclein Regulation of Dopamine Transporter. *Translational Neuroscience*, 3(3), 249–257. <https://doi.org/10.2478/s13380-012-0036-7>
- Butler, B., Saha, K., Rana, T., Becker, J. P., Sambo, D., Davari, P., Goodwin, J. S., & Khoshbouei, H. (2015). Dopamine transporter activity is modulated by α -synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 290(49), 29542–29554. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.691592>
- Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011). Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1), 50–83. <https://doi.org/10.1128/mubr.00031-10>
- Carrasco-Navarro, U., & Aguirre, J. (2021). H₂O₂ induces major phosphorylation changes in critical regulators of signal transduction, gene expression, metabolism and developmental networks in aspergillus nidulans. *Journal of Fungi*, 7(8), 12–15. <https://doi.org/10.3390/jof7080624>
- Chaudhuri, A., Biswas, S., & Chakraborty, S. (2019). Exploring protein–protein intermolecular recognition between meprin- α and endogenous protease regulator cystatinC coupled with pharmacophore elucidation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 37(2), 440–453. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1429311>
- Chen, K., Martens, Y. A., Meneses, A., Ryu, D. H., Lu, W., Raulin, A. C., Li, F., Zhao, J., Chen, Y., Jin, Y., Linares, C., Goodwin, M., Li, Y., Liu, C. C., Kanekiyo, T., Holtzman, D. M., Golde, T. E., Bu, G., & Zhao, N. (2022). LRP1 is a neuronal receptor for α -synuclein uptake and spread. *Molecular Neurodegeneration*, 17(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13024-022-00560-w>
- Chen, R., Furman, C. A., & Gnegy, M. E. (2010). Dopamine transporter trafficking: Rapid

- response on demand. *Future Neurology*, 5(1), 123–134. <https://doi.org/10.2217/fnl.09.76>
- Chinta, S. J., & Andersen, J. K. (2005). Dopaminergic neurons. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37(5 SPEC. ISS.), 942–946. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.09.009>
- Dankwa, B., Broni, E., Enninful, K. S., Kwofie, S. K., & Wilson, M. D. (2022). Consensus docking and MM-PBSA computations identify putative furin protease inhibitors for developing potential therapeutics against COVID-19. *Structural Chemistry*, 33(6), 2221–2241. <https://doi.org/10.1007/s11224-022-02056-1>
- Dar, A. M., & Mir, S. (2017). Molecular Docking: Approaches, Types, Applications and Basic Challenges. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, 08(02), 8–10. <https://doi.org/10.4172/2155-9872.1000356>
- Dash, R., Ali, M. C., Dash, N., Azad, M. A. K., Zahid Hosen, S. M., Hannan, M. A., & Moon, I. S. (2019). Structural and dynamic characterizations highlight the deleterious role of SULT1A1 R213H polymorphism in substrate binding. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24). <https://doi.org/10.3390/ijms20246256>
- de Graauw, M., Hensbergen, P., & van de Water, B. (2006). Phospho-proteomic analysis of cellular signaling. *Electrophoresis*, 27(13), 2676–2686. <https://doi.org/10.1002/elps.200600018>
- Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B. M., Avadhani, N. G., & Anandatheerthavarada, H. K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of α -synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 9089–9100. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710012200>
- Dhorajiwala, T. M., Halder, S. T., & Samant, L. (2019). Comparative in silico molecular docking analysis of l-threonine-3-dehydrogenase, a protein target against African trypanosomiasis using selected phytochemicals. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 6(3), 101–108. <https://doi.org/10.29252/JABR.06.03.04>
- Dorszewska, J., Prendecki, M., Lianeri, M., & Kozubski, W. (2014). Molecular Effects of L-dopa Therapy in Parkinson's Disease. *Current Genomics*, 15(1), 11–17. <https://doi.org/10.2174/1389202914666131210213042>
- Du, X., Li, Y., Xia, Y. L., Ai, S. M., Liang, J., Sang, P., Ji, X. L., & Liu, S. Q. (2016). Insights into protein–ligand interactions: Mechanisms, models, and methods. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 1–34. <https://doi.org/10.3390/ijms17020144>
- Ejaz, S. A., Aziz, M., Zafar, Z., Akhtar, N., & Ogaly, H. A. (2023). Revisiting the inhibitory potential of protein kinase inhibitors against NEK7 protein via comprehensive computational investigations. *Scientific Reports*, 13(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31499-7>
- Faissner, A. (2023). Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1) in the glial lineage modulates neuronal excitability. *Frontiers in Network Physiology*, 3(June), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnetp.2023.1190240>
- Farmer, J., Kanwal, F., Nikulsin, N., Tsilimigras, M. C. B., & Jacobs, D. J. (2017). Statistical measures to quantify similarity between molecular dynamics simulation trajectories. *Entropy*, 19(12), 1–17. <https://doi.org/10.3390/e19120646>
- Ford, C. P. (2014). The Role of D2-Autoreceptors in Regulating Dopamine Neuron Activity and Transmission. *Neuroscience*, 12(282), 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.01.025>
- Fouët, G., Gout, E., Wicker-Planquart, C., Bally, I., De Nardis, C., Dedieu, S., Chouquet, A., Gaboriaud, C., Thielens, N. M., Kleman, J. P., & Rossi, V. (2020). Complement C1q Interacts With LRP1 Clusters II and IV Through a Site Close but Different From

- the Binding Site of Its C1r and C1s-Associated Proteases. *Frontiers in Immunology*, 11(October), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583754>
- Gitler, A. D., Dhillon, P., & Shorter, J. (2017). Neurodegenerative disease: Models, mechanisms, and a new hope. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 10(5), 499–502. <https://doi.org/10.1242/dmm.030205>
- Gómez-Jeria, J. S., Robles-Navarro, A., Kpotin, G. A., Garrido-Sáez, N., & Gatica-Díaz, N. (2020). Some remarks about the relationships between the common skeleton concept within the Klopman-Peradejordi-Gómez QSAR method and the weak molecule-site interactions. *Chemistry Research Journal*, 5(2), 32–52.
- Góth, L., & Nagy, T. (2012). Acatalasemia and diabetes mellitus. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2), 195–200. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.02.005>
- Gynther, M., Puris, E., Peltokangas, S., Auriola, S., Kanninen, K. M., Koistinaho, J., Huttunen, K. M., Ruponen, M., & Vellonen, K. S. (2019). Alzheimer's Disease Phenotype or Inflammatory Insult Does Not Alter Function of L-Type Amino Acid Transporter 1 in Mouse Blood-Brain Barrier and Primary Astrocytes. *Pharmaceutical Research*, 36(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2546-7>
- Hamzi, H., Rajabpour, A., Roldán, É., & Hassanali, A. (2022). Learning the Hydrophobic, Hydrophilic, and Aromatic Character of Amino Acids from Thermal Relaxation and Interfacial Thermal Conductance. *Journal of Physical Chemistry B*, 126(3), 670–678. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c07628>
- Hanriko, R., & Anzani, B. P. (2018). Penyakit Parkinson: Ancaman Kesehatan bagi Komunitas Pertanian. *J Agromedicine*, 5(1), 508–512.
- Hasan, M. R., Chowdhury, S. M., Aziz, M. A., Shahriar, A., Ahmed, H., Khan, M. A., Mahmud, S., & Emran, T. Bin. (2021). In silico analysis of ciprofloxacin analogs as inhibitors of DNA gyrase of *Staphylococcus aureus*. *Informatics in Medicine Unlocked*, 26(October). <https://doi.org/10.1016/j.imu.2021.100748>
- Hayakawa, R., Hayakawa, T., Takeda, K., & Ichijo, H. (2012). Therapeutic targets in the ASK1-dependent stress signaling pathways. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*, 88(8), 434–453. <https://doi.org/10.2183/pjab.88.434>
- Hijaz, B. A., & Volpicelli-Daley, L. A. (2020). Initiation and propagation of α -synuclein aggregation in the nervous system. *Molecular Neurodegeneration*, 15(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00368-6>
- Horowitz, S., & Trievel, R. C. (2012). Carbon-oxygen hydrogen bonding in biological structure and function. *Journal of Biological Chemistry*, 287(50), 41576–41582. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.418574>
- Hourfar, H., Aliakbari, F., Aqdam, S. R., Nayeri, Z., Bardania, H., Otzen, D. E., & Morshedi, D. (2023). The impact of α -synuclein aggregates on blood-brain barrier integrity in the presence of neurovascular unit cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 229(December 2022), 305–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.134>
- Hu, Z., Ma, B., Wolfson, H., & Nussinov, R. (2000). Conservation of polar residues as hot spots at protein interfaces. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 39(4), 331–342. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(20000601\)39:4<331::AID-PROT60>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(20000601)39:4<331::AID-PROT60>3.0.CO;2-A)
- Ibáñez, P., Bonnet, A. M., Débarges, B., Lohmann, E., Tison, F., Pollak, P., Agid, Y., Dürr, A., & Brice, P. A. (2004). Causal relation between α -synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet*, 364(9440), 1169–1171. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17104-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17104-3)
- Jeong, J., Lee, H. J., Kim, N., Li, Y., Rah, J., & Oh, W. (2023). Impaired neuronal activity

- as a potential factor contributing to the underdeveloped cerebrovasculature in a young Parkinson's disease mouse model. *Scientific Reports*, 13(22613), 1–15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-023-49900-w>
- Jiang, S., Zhang, D., Huang, H., Lei, Y., Han, Y., & Han, W. (2017). Extracellular Signal-Regulated Kinase 5 is Required for Low-Concentration H₂O₂-Induced Angiogenesis of Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6895730>
- Jones, D. R., Moussaud, S., & Mclean, P. (2014). Targeting heat shock proteins to modulate α -synuclein toxicity. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 7(1), 33–51. <https://doi.org/10.1177/1756285613493469>
- Kang, S. J., Kim, S. J., Noh, H. R., Kim, B. J., Kim, J. B., Jin, U., Park, S. A., & Park, S. M. (2022). Neuronal ApoE Regulates the Cell-to-Cell Transmission of α -Synuclein. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15). <https://doi.org/10.3390/ijms23158311>
- Kojasoy, V., & Tantillo, D. J. (2023). Importance of Noncovalent Interactions Involving Sulfur Atoms in Thiopeptide Antibiotics \square Glycothiohexide α and Nocathiacin I. *The Journal of Physical Chemistry A*, 127, 2081–2090.
- Kumari, R., Kumar, R., & Lynn, A. (2014). G-mmpbsa -A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54(7), 1951–1962. <https://doi.org/10.1021/ci500020m>
- Kuusisto, E., Parkkinen, L., & Alafuzoff, I. (2003). Morphogenesis of Lewy Bodies: Dissimilar Incorporation of α -Synuclein, Ubiquitin, and p62. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 62(12), 1241–1253. <https://doi.org/10.1093/jnen/62.12.1241>
- Kwon, D. K., Kwatra, M., Wang, J., & Ko, H. S. (2022). Levodopa-Induced Dyskinesia in Parkinson's Disease: Pathogenesis and Emerging Treatment Strategies. *Cells*, 11(23). <https://doi.org/10.3390/cells11233736>
- Latif, S., Jahangeer, M., Maknoon Razia, D., Ashiq, M., Ghaffar, A., Akram, M., El Allam, A., Bouyahya, A., Garipova, L., Ali Shariati, M., Thiruvengadam, M., & Azam Ansari, M. (2021). Dopamine in Parkinson's disease. *Clinica Chimica Acta*, 522(June), 114–126. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.08.009>
- Lee, F. J. S., Pei, L., Moszczynska, A., Vukusic, B., Fletcher, P. J., & Liu, F. (2007). Dopamine transporter cell surface localization facilitated by a direct interaction with the dopamine D₂ receptor. *EMBO Journal*, 26(8), 2127–2136. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601656>
- Lestari, E. D. P., Widyarti, S., Santjojo, D. H., Widodo, N., & Sumitro, S. B. (2023). Computational approach to determine the combination of polyherbs based on the interaction of their metal complexes on the mucoadhesive properties of type II mucin. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 13(7), 109–122. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2023.35062>
- Li, H., Hung, A., & Yang, A. W. H. (2021). Herb-target virtual screening and network pharmacology for prediction of molecular mechanism of Danggui Beimu Kushen Wan for prostate cancer. *Scientific Reports*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86141-1>
- Lima, I. S., Pêgo, A. C., Barros, J. T., Prada, A. R., & Gozzelino, R. (2021). Cell Death-Osis of Dopaminergic Neurons and the Role of Iron in Parkinson's Disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, 35(6), 453–473. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8229>
- Lobanov, M. Y., Bogatyreva, N. S., & Galzitskaya, O. V. (2008). Radius of gyration as an indicator of protein structure compactness. *Molecular Biology*, 42(4), 623–628. <https://doi.org/10.1134/S0026893308040195>

- Longhena, F., Faustini, G., Missale, C., Pizzi, M., & Bellucci, A. (2018). Dopamine transporter/ α -synuclein complexes are altered in the post mortem caudate putamen of Parkinson's disease: An in situ proximity ligation assay study. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(6), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms19061611>
- Mahmud, S., Biswas, S., Kumar Paul, G., Mita, M. A., Afrose, S., Robiul Hasan, M., Sharmin Sultana Shimu, M., Uddin, M. A. R., Salah Uddin, M., Zaman, S., Kaderi Kibria, K. M., Arif Khan, M., Bin Emran, T., & Abu Saleh, M. (2021). Antiviral peptides against the main protease of SARS-CoV-2: A molecular docking and dynamics study. *Arabian Journal of Chemistry*, *14*(9), 103315. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103315>
- Mal, A., Dey, P., Hayes, R. M., McCarthy, J. V., Ray, A., & De, A. (2020). In Silico Identification of Potential Phosphorylation in the Cytoplasmic Domain of Epithelial Cell Adhesion Molecule. *ACS Omega*, *5*(48), 30808–30816. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02113>
- Mangat, H. K., Rani, M., Pathak, R. K., Yadav, I. S., Utreja, D., Chhuneja, P. K., & Chhuneja, P. (2022). Virtual screening, molecular dynamics and binding energy-MM-PBSA studies of natural compounds to identify potential EcR inhibitors against Bemisia tabaci Gennadius. *PLoS ONE*, *17*(1 January), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261545>
- Mantzaris, M. D., Bellou, S., Skiada, V., Kitsati, N., Fotsis, T., & Galaris, D. (2016). Intracellular labile iron determines H₂O₂-induced apoptotic signaling via sustained activation of ASK1/JNK-p38 axis. *Free Radical Biology and Medicine*, *97*, 454–465. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.07.002>
- Masriany, M., Rifaldi, R., & Sukmawaty, E. (2022). Studi In Silico Senyawa Cendawan Endofit Sebagai Kandidat Obat Antiangiogenesis Hemangioma. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, *27*(1), 62–69. <https://doi.org/10.18343/jipi.27.1.62>
- Meijles, D. N., Cull, J. J., Markou, T., Cooper, S. T. E., Haines, Z. H. R., Fuller, S. J., O'Gara, P., Sheppard, M. N., Harding, S. E., Sugden, P. H., & Clerk, A. (2020). Redox Regulation of Cardiac ASK1 (Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1) Controls p38-MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) and Orchestrates Cardiac Remodeling to Hypertension. *Hypertension*, *76*(4), 1208–1218. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14556>
- Michel, P. P., Hirsch, E. C., & Hunot, S. (2016). Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease. *Neuron*, *90*(4), 675–691. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.038>
- Musfiroh, I., Azura, A. R., & Rahayu, D. (2020). Prediction of Asiatic Acid Derivatives Affinity Against SARS-CoV-2 Main Protease Using Molecular Docking. *Pharmaceutical Sciences and Research*, *7*(4), 57–64. <https://doi.org/10.7454/psr.v7i4.1086>
- Muthuraman, M., Koirala, N., Ciolac, D., Pintea, B., Glaser, M., Groppa, S., Tamás, G., & Groppa, S. (2018). Deep brain stimulation and L-DOPA therapy: Concepts of action and clinical applications in parkinson's disease. *Frontiers in Neurology*, *9*(AUG), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00711>
- Nisticò, R., Piccirilli, S., Cucchiaroni, M. L., Armogida, M., Guatteo, E., Giampà, C., Fusco, F. R., Bernardi, G., Nisticò, G., & Mercuri, N. B. (2008). Neuroprotective effect of hydrogen peroxide on an in vitro model of brain ischaemia. *British Journal of Pharmacology*, *153*(5), 1022–1029. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707587>
- Norat, P., Soldozy, S., Sokolowski, J. D., Gorick, C. M., Kumar, J. S., Chae, Y., Yağmur, K., Prada, F., Walker, M., Levitt, M. R., Price, R. J., Tvrdik, P., & Kalani, M. Y. S. (2020). Mitochondrial dysfunction in neurological disorders: Exploring mitochondrial

- transplantation. *Npj Regenerative Medicine*, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41536-020-00107-x>
- Olea-Flores, M., Zuñiga-Eulogio, M. D., Mendoza-Catalán, M. A., Rodríguez-Ruiz, H. A., Castañeda-Saucedo, E., Ortuño-Pineda, C., Padilla-Benavides, T., & Navarro-Tito, N. (2019). Extracellular-signal regulated kinase: A central molecule driving epithelial–mesenchymal transition in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12), 1–32. <https://doi.org/10.3390/ijms20122885>
- Overk, C. & Mufson, E. (2010). Dopamine Transporter: Aging and Parkinson’s Disease. *Neuroscience and Biobehavioral Psychology*, 330-332.
- Padilla-Godínez, F. J., Ramos-Acevedo, R., Martínez-Becerril, H. A., Bernal-Conde, L. D., Garrido-Figueroa, J. F., Hiriart, M., Hernández-López, A., Argüero-Sánchez, R., Callea, F., & Guerra-Crespo, M. (2021). Protein misfolding and aggregation: The relatedness between Parkinson’s disease and hepatic endoplasmic reticulum storage disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22). <https://doi.org/10.3390/ijms222212467>
- Pan, C., & Peng, C. (2022). LRP1: a novel receptor for the transmission of pathological α -Synuclein. *Molecular Neurodegeneration*, 17(1), 1–3. <https://doi.org/10.1186/s13024-022-00582-4>
- Park, J. H., Burgess, J. D., Faroqi, A. H., Demeo, N. N., Fiesel, F. C., Springer, W., Delenclos, M., & McLean, P. J. (2020). Alpha-synuclein-induced mitochondrial dysfunction is mediated via a sirtuin 3-dependent pathway. *Molecular Neurodegeneration*, 15(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0349-x>
- Pathak, D., Berthet, A., & Nakamura, K. (2013). Energy Failure: Does It Contribute to Neurodegeneration? *Ann Neurol*, 7(4), 506–516. <https://doi.org/10.1002/ana.24014>.Energy
- Patil, R., Varma, A. K., Das, S., Stanley, A., Yadav, L., & Sudhakar, A. (2010). Optimized hydrophobic interactions and hydrogen bonding at the target-ligand interface leads the pathways of Drug-Designing. *PLoS ONE*, 5(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012029>
- Paul, D. A., Qureshi, A. R. M., & Rana, A. Q. (2020). *Peripheral neuropathy in Parkinson’s disease*. 2691–2701.
- Pell, G., Williamson, M. P., Walters, C., Du, H., Gilbert, H. J., & Bolam, D. N. (2003). Importance of hydrophobic and polar residues in ligand binding in the family 15 carbohydrate-binding module from *Cellvibrio japonicus* Xyn10C. *Biochemistry*, 42(31), 9316–9323. <https://doi.org/10.1021/bi0347510>
- Peng, C., Liu, J., For, B. I., Disorders, B., Li, Q., Liu, C., & Chen, M. (2022). LRP1 Regulates the Uptake and Propagation of α -Synuclein. *Research Square*, 1–24. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1411309/v1>
- Potere, N., Del Buono, M. G., Mauro, A. G., Abbate, A., & Toldo, S. (2019). Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 in Cardiac Inflammation and Infarct Healing. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6(April), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00051>
- Price, G. W., Gould, P. S., & Marsh, A. (2014). Use of freely available and open source tools for in silico screening in chemical biology. *Journal of Chemical Education*, 91(4), 602–604. <https://doi.org/10.1021/ed400302u>
- Profaci, C. P., Munji, R. N., Pulido, R. S., & Daneman, R. (2020). The blood–brain barrier in health and disease: Important unanswered questions. *Journal of Experimental Medicine*, 217(4), 1–16. <https://doi.org/10.1084/jem.20190062>
- Puris, E., Gynther, M., Auriola, S., & Huttunen, K. M. (2020). L-Type amino acid transporter 1 as a target for drug delivery. *Pharmaceutical Research*, 37(88), 1–17.

- <https://doi.org/10.1007/s11095-020-02826-8>
- Rampogu, S., Lee, G., Park, J. S., Lee, K. W., & Kim, M. O. (2022). Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations Discover Curcumin Analogue as a Plausible Dual Inhibitor for SARS-CoV-2. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031771>
- Ransy, C., Vaz, C., Lombès, A., & Bouillaud, F. (2020). Use of H₂O₂ to cause oxidative stress, the catalase issue. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms21239149>
- Rao, G. N. (1996). Hydrogen peroxide induces complex formation of SHC-Grb2-SOS with receptor tyrosine kinase and activates Ras and extracellular signal-regulated protein kinases group of mitogen-activated protein kinases. *Oncogene*, 13(4), 713–719.
- RCSB-PDB. (2005). *Alpha-synuclein*. <https://www.rcsb.org/structure/1XQ8>
- Risiglione, P., Zinghirino, F., Di Rosa, M. C., Magri, A., & Messina, A. (2021). Alpha-synuclein and mitochondrial dysfunction in parkinson's disease: The emerging role of vdac. *Biomolecules*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/biom11050718>
- Robert, J., Button, E. B., Martin, E. M., McAlary, L., Gidden, Z., Gilmour, M., Boyce, G., Caffrey, T. M., Agbay, A., Clark, A., Silverman, J. M., Cashman, N. R., & Wellington, C. L. (2020). Cerebrovascular amyloid Angiopathy in bioengineered vessels is reduced by high-density lipoprotein particles enriched in Apolipoprotein e. *Molecular Neurodegeneration*, 15(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00366-8>
- Rosencrans, W. M., Aguilera, V. M., Rostovtseva, T. K., & Bezrukov, S. M. (2021). α -Synuclein emerges as a potent regulator of VDAC-facilitated calcium transport. *Cell Calcium*, 95(December 2020), 102355. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2021.102355>
- Rostovtseva, T. K., Bezrukov, S. M., & Hoogerheide, D. P. (2021). Regulation of mitochondrial respiration by VDAC is enhanced by membrane-bound inhibitors with disordered polyanionic C-terminal domains. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14). <https://doi.org/10.3390/ijms22147358>
- Rostovtseva, T. K., Gurnev, P. A., Protchenko, O., Hoogerheide, D. P., Yap, T. L., Philpott, C. C., Lee, J. C., & Bezrukov, S. M. (2015). α -synuclein shows high affinity interaction with voltage-dependent anion channel, suggesting mechanisms of mitochondrial regulation and toxicity in Parkinson disease. *Journal of Biological Chemistry*, 290(30), 18467–18477. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.641746>
- Sari, I. W., Junaidin, & Pratiwi, D. (2020). Indah Wulan Sari, Junaidin, Dina Pratiwi 2020. *Jurnal Farmagazine*, VII(2), 54–60.
- Serrano Cardona, L., & Muñoz Mata, E. (2013). Paraninfo Digital. *Early Human Development*, 83(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2006.05.022>
- Shadrina, M. I., Slominsky, P. A., & Limborska, S. A. (2010). Molecular mechanisms of pathogenesis of Parkinson's disease. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (1st ed., Vol. 281, Issue C). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(10\)81006-8](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(10)81006-8)
- Shiizaki, S., Naguro, I., & Ichijo, H. (2013). Activation mechanisms of ASK1 in response to various stresses and its significance in intracellular signaling. *Advances in Biological Regulation*, 53(1), 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2012.09.006>
- Simon, D. K., Tanner, C. M., & Brundin, P. (2020). Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. *Clinics in Geriatric Medicine*, 36(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2019.08.002>
- Singh, S. K., Dutta, A., & Modi, G. (2017). α -Synuclein aggregation modulation: an emerging approach for the treatment of Parkinson's disease. *Chimia*, 71(10), 643. <https://doi.org/10.2307/j.ctvnwc0d0.18>
- Sinha, N., & Smith-Gill, S. (2005). Electrostatics in Protein Binding and Function. *Current*

- Protein & Peptide Science*, 3(6), 601–614. <https://doi.org/10.2174/1389203023380431>
- Siraj, M. A., Rahman, M. S., Tan, G. T., & Seidel, V. (2021). Molecular docking and molecular dynamics simulation studies of triterpenes from *vernonia patula* with the cannabinoid type 1 receptor. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073595>
- Song, Y. Y., Liang, D., Liu, D. K., Lin, L., Zhang, L., & Yang, W. Q. (2023). The role of the ERK signaling pathway in promoting angiogenesis for treating ischemic diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11(June), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1164166>
- Soumia, M., Hajji, H., El Mzibri, M., Younes, F. Z., Mohammed, B., Mohamed, B., & Benaissa, M. (2022). In-Silico Molecular Modeling Studies to Identify Novel Potential Inhibitors of HPV E6 Protein. *Vaccines*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/vaccines10091452>
- Speranza, L., Di Porzio, U., Viggiano, D., de Donato, A., & Volpicelli, F. (2021). Dopamine: The neuromodulator of long-term synaptic plasticity, reward and movement control. *Cells*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/cells10040735>
- Srinivasan, E., & Rajasekaran, R. (2016). Computational investigation of curcumin, a natural polyphenol that inhibits the destabilization and the aggregation of human SOD1 mutant (Ala4Val). *RSC Advances*, 6(104), 102744–102753. <https://doi.org/10.1039/c6ra21927f>
- Srinivasan, R., Zabuawala, T., Huang, H., Zhang, J., Gulati, P., Fernandez, S., Karlo, J. C., Landreth, G. E., Leone, G., & Ostrowski, M. C. (2009). Erk1 and erk2 regulate endothelial cell proliferation and migration during mouse embryonic angiogenesis. *PLoS ONE*, 4(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008283>
- Sumaryada, T., Hati, J., Wahyudi, S. T., Malau, N. D., & Sawitri, K. N. (2016). Elucidation of GB1 Protein Unfolding Mechanism via a Long-timescale Molecular Dynamics Simulation. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 31(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/31/1/012008>
- Swant, J., Goodwin, J. S., North, A., Ali, A. A., Gamble-George, J., Chirwa, S., & Khoshbouei, H. (2011). A-Synuclein Stimulates a Dopamine Transporter-Dependent Chloride Current and Modulates the Activity of the Transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 286(51), 43933–43943. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.241232>
- Thanvi, B. R., & Lo, T. C. N. (2004). Long term motor complications of levodopa: Clinical features, mechanisms, and management strategies. *Postgraduate Medical Journal*, 80(946), 452–458. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2003.013912>
- Threlfell, S., Mohammadi, A. S., Ryan, B. J., Connor-Robson, N., Platt, N. J., Anand, R., Serres, F., Sharp, T., Bengoa-Vergniory, N., Wade-Martins, R., Ewing, A., Cragg, S. J., & Brimblecombe, K. R. (2021). Striatal Dopamine Transporter Function Is Facilitated by Converging Biology of α -Synuclein and Cholesterol. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15(April), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.658244>
- Vaughan, R. A., & Foster, J. D. (2013). Mechanisms of dopamine transporter regulation in normal and disease states. *Trends Pharmacol Sci.*, 34(9), 1–16. <https://doi.org/doi:10.1016/j.tips.2013.07.005>
- Wersinger, C., Prou, D., Vernier, P., Niznik, H. B., & Sidhu, A. (2003). Mutations in the lipid-binding domain of α -synuclein confer overlapping, yet distinct, functional properties in the regulation of dopamine transporter activity. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24(1), 91–105. [https://doi.org/10.1016/S1044-7431\(03\)00124-6](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00124-6)
- Widyarti, S., Wibowo, S., Sabarudin, A., Abhirama, I., & Sumitro, S. B. (2023). Dysfunctional energy and future perspective of low dose H₂O₂ as protective agent in neurodegenerative disease. *Heliyon*, 9(7), e18123.

- <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18123>
- World Health Organization. (2023). *No Title*. WHO. <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/parkinson-disease>
- Xue, Q., Liu, X., Russell, P., Li, J., Pan, W., Fu, J., & Zhang, A. (2022). Evaluation of the binding performance of flavonoids to estrogen receptor alpha by Autodock, Autodock Vina and Surflex-Dock. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 233, 113323. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113323>
- Yamamoto, E., Akimoto, T., Mitsutake, A., & Metzler, R. (2021). Universal Relation between Instantaneous Diffusivity and Radius of Gyration of Proteins in Aqueous Solution. *Physical Review Letters*, 126(12), 128101. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.126.128101>
- Yuan, Y., Sun, J., Dong, Q., & Cui, M. (2023). Blood–brain barrier endothelial cells in neurodegenerative diseases: Signals from the “barrier.” *Frontiers in Neuroscience*, 17(February), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1047778>
- Zaragoza, R. (2020). Transport of Amino Acids Across the Blood-Brain Barrier. *Frontiers in Physiology*, 11(September), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00973>

LAMPIRAN 1

Table 1. Active site semua kompleks dari docking HDOCK

Kompleks	Binding Energy (kkal/mol)	Residu <i>active site</i>
α Syn- α Syn	-1144.50	Hidrogen Konvensional: LYS32, LYS34, VAL37, TYR39, GLY41, LYS43, LYS45, VAL48, GLY51, ALA53, VAL55, GLU57, THR59, GLU61, VAL63, ASN65, GLY68, VAL70, THR72, GLY73, THR75, VAL77, GLN79, THR81, GLY84, GLY86, ILE88, ALA90, THR92, PHE94, LYS96, ASP98, GLY36, LYS60, GLN62, GLY67, GLU83, LEU100
		Hidrogen Carbon: VAL37, GLY41, GLU46, THR72, ALA90, GLU35, SER42, GLU83
		Hidrofobik: TYR39, PHE94, LYS32, LYS34, VAL37, LEU38, VAL40, VAL71, LYS43, LYS45, VAL48, VAL49, VAL66, VAL52, VAL55, LYS58, LYS60, VAL63, VAL66, VAL70, VAL74, VAL77, LYS80, VAL82, ILE88, ALA91, VAL95, LYS96, LYS97, LEU100, ALA76, ALA78
		Elektrostatik: GLU61, LYS80, GLU57, LYS60
		Unfavorable: GLY31, LYS32, LYS34, LYS43, LYS45, LYS80, LYS96, LYS97, GLU35, GLU61, GLU8, ASP98
α Syn- α SynH ₂ O ₂	-1066.09	Hidrogen Konvensional: LYS34, VAL37, TYR39, GLY41, LYS43, LYS45, GLY51, VAL55, LYS58, GLU61, VAL63, ASN65, GLY68, VAL70, THR72, GLY73, THR75, VAL77, GLN79, THR81, GLY84, GLY86, ILE88, ALA90, THR92, PHE94, LYS96, GLY36, THR44, VAL48, HIS50, ALA53, GLU57, LYS60, GLN62, GLY67, GLU83, ASP98, LEU100
		Hidrogen Carbon: VAL37, TYR39, GLY41, LYS43, LYS45, GLU46, VAL48, ALA53, VAL55, GLU57, GLY68, THR72, VAL77, ALA90, LYS96, GLU35, SER42, THR44, GLN62, THR64, VAL66, YS80, VAL82, ALA91, VAL95, LYS97
		Hidrofobik: TYR39, PHE94, LYS32, LYS34, VAL37, LEU38, VAL40, VAL71, LYS43, LYS45, VAL48, VAL49, VAL66, VAL52, VAL55, LYS58, LYS60, VAL63, VAL66, VAL74, VAL77, LYS80, VAL82, ILE88, VAL95, LYS96, LYS97, LEU100, ALA76, ALA78
		Elektrostatik: GLU61, LYS80, LYS58, LYS60
		Unfavorable: GLY51, ALA53, GLY31, LYS32, LYS34, LYS43, LYS45, LYS80, LYS96, LYS97, GLU35, GLU61, GLU83, ASP98, VAL48
VDAC- α Syn	-130.59	Hidrogen Konvensional: THR55, GLN166
		Hidrogen Carbon: TYR7, THR77,
		Hidrofobik: LEU10
		Elektrostatik: LYS20, ASP30
VDAC- α SynH ₂ O ₂	-122.70	Hidrogen Konvensional: GLN166, SER44, THR55, GLU189
		Hidrogen Carbon: TYR7, LEU10, THR77, ALA56
		Hidrofobik: VAL54, LEU10
		Elektrostatik: LYS32, ASP30
		Unfavorable: VAL54, THR77, ARG15, SER57

VDAC- α Syn _(pol)	-164.42	Hidrogen Konvensional: LYS109, ASN185, ARG218, THR52, LYS53, THR55, ASN216, ASP78, THR80
		Hidrogen Carbon: ARG218, ASN185
		Hidrofobik: LYS53, ALA209
		Elektrostatik: GLU189
		Unfavorable: THR107, ASN76, ARG218, ASP186
VDAC- α SynH ₂ O ₂ _(pol)	-154.13	Hidrogen Konvensional: SER104, ASN106, THR107
		Hidrogen Carbon: SER57
		Hidrofobik: LEU26, LYS53, ALA212, PRO105
		Elektrostatik: ARG218, ASP186, GLU189
		Unfavorable: LEU26, THR51, THR80, THR107, ALA212, ASN48, ASN168, ASN185
DAT- α Syn	-182.74	Hidrogen Konvensional: GLN514, LEU518, ARG606, LYS619, LEU618
		Hidrofobik: ARG606, ARG615, LEU518
		Elektrostatik: ARG615, VAL620
		Unfavorable: GLN510, ARG615, ARG515, GLU608
DAT- α SynH ₂ O ₂	-135.36	Hidrogen Konvensional: ARG521, ARG606, ARG610, ARG615, LYS619, VAL620, GLU608
		Hidrofobik: ARG615, LYS619, EU518
		Unfavorable: ARG515, ARG615, ARG606
DAT- α Syn _(pol)	-190.86	Hidrogen Konvensional: GLN514, ARG610, ARG615, LYS619, GLU608
		Hidrogen Carbon: ARG515
		Hidrofobik: ARG606, LEU518, LEU618, LYS619
		Elektrostatik: ARG615
DAT- α SynH ₂ O ₂ _(pol)	-189.02	Hidrogen Konvensional: GLN514, ARG606, ARG610, ARG615, LYS619, GLU608
		Hidrogen Carbon: ARG515
		Hidrofobik: ARG606, LEU518, LEU618, LYS619
		Elektrostatik: ARG615
		Unfavorable: ARG515
LRP1- α Syn	-131.42	Hidrogen Konvensional: ASN202, ARG214, GLU206, GLU205, CYS227, SER217, ASP194
		Hidrogen Carbon: GLY195
		Hidrofobik: PRO216, PRO229
		Elektrostatik: ARG214, ASP194
		Unfavorable: ASP194, ASP196, GLU205
		Other: CYS208
LRP1- α SynH ₂ O ₂	-123.32	Hidrogen Konvensional: SER217, GLU206, CYS227
		Hidrogen Carbon: PRO216
		Hidrofobik: VAL226, PRO229, PRO216
		Elektrostatik: GLU209, ASP239
		Unfavorable: GLU205, GLU209, ASN202
LRP1- α Syn _(pol)	-149.0	Hidrogen Konvensional: ASN121, THR132, VAL171, THR132, SER210
		Hidrogen Carbon: ALA123
		Hidrofobik: VAL168, PHE178

		Elektrostatik: ASP173
		Unfavorable: GLN122, VAL171, ARG147, GLN12, SER175
LRP1- α SynH ₂ O ₂ (pol)	-120.39	Hidrogen Konvensional: ASN121, GLN122
		Hidrogen Carbon: ASN223
		Hidrofobik: ALA123
		Elektrostatik: LYS189
(pol): polimer		

LAMPIRAN 2

Sertifikat Bebas Plagiasi



plagiarism-detector
Cutting-edge class tool for plagiarism detection and prevention

KEMENTERIAN
PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
SEKOLAH PASCASARJANA

24 0219 T 



Nomor: 00009/UN10.F4001/B/DL.07.05/2024
Sertifikat ini diberikan kepada:

Nama : Athiyah Layla
NIM : 226090100111018
Program Studi : Program Magister Biologi
Fakultas : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas : Universitas Brawijaya

Dengan Judul Tesis

Kajian In Silico Potensi Hidrogen Peroksida (H₂O₂) Dosis Rendah sebagai Terapi Komplementer L-DOPA Terkait Pencegahan Disfungsi Alfa-Sinuklein pada Penyakit Parkinson

Telah dideteksi tingkat plagiasinya secara online pada tanggal **25 Juni 2024** dan dinyatakan **bebas plagiasi** dengan kriteria toleransi ≤ 5%.


Moh. Khusaini, S.E., M.Si., M.A.
NIP. 19710111199802 1 001


Prof. Setyo Tri Wahyudi, SE., M.Ec., Ph. D.
NIP. 19810702200501 1 002

Malang, 26 Juni 2024
Ketua Badan Penerbitan Jurnal



LAMPIRAN 3

Letter of Acceptance

MANUSCRIPT ACCEPTANCE LETTER

July 12, 2024

Dear Authors,

Based on the recommendations from the peer review board, I am pleased to inform you that your following manuscript has been **accepted** for publication in Berkala Penelitian Hayati.

Title : In Silico Study of Hydrogen Peroxide (H₂O₂) Binding Effect to Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERK)
Author (s) : Athiyah Layla, Sri Widyarti, Sutiman Bambang Sumitro
Manuscript ID : BKJT-311
Status : **Accepted**

Your accepted manuscript will now be transferred to our production department and work will begin on the creation of the proof and layout of the paper. I will convey the next progress along with payment and galley proof information.

Thank you for submitting your work to Berkala Penelitian Hayati.

Best Regard,



Prof. Sutiman Bambang Sumitro, SU, D.Sc
Editor in Chief

Berkala **PENELITIAN**
HAYATI

ISSN : 0852-6834 | e-ISSN : 2337-389X

ISSN: 0852-6834

E-ISSN: 2337-389X

Open Access www.berkalahayati.org

Office: Jl. Surakarta No. 5 Malang, East Java, Indonesia 65114

Telp/Fax: (0341) 570631 | Email: official@berkalahayati.org