



**POTENSI 7,8-DIHYDROXYFLAVONE PADA MEKANISME PERSINYALAN
PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE (PI3K) DAN PROLYL HYDROXYLASE**

DALAM STIMULASI EKSPRESI HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR (HIF)-1 α

PASCA STROKE ISKEMIK SECARA *IN SILICO*

THESIS

Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh Gelar Magister Biomedik



Oleh:

SAFIRA DITA ARVIANA

206070117111002

PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK

MINAT ANATOMI-HISTOLOGI

PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2022



**POTENSI 7,8-DIHYDROXYFLAVONE PADA MEKANISME PERSINYALAN
PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE (PI3K) DAN PROLYL HYDROXYLASE**

DALAM STIMULASI EKSPRESI HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR (HIF)-1 α

PASCA STROKE ISKEMIK SECARA *IN SILICO*

THESIS

Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh Gelar Magister Biomedik



Oleh:

SAFIRA DITA ARVIANA

206070117111002

PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK

MINAT ANATOMI-HISTOLOGI

PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2022



**Potensi 7,8-Dihydroxyflavone pada Mekanisme Persinyalan
Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) dan Prolyl Hydroxylase
dalam Stimulasi Ekspresi Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 α
Pasca Stroke Iskemik secara *In Silico***

Oleh:

Safira Dita Arviana

Dipertahankan di depan penguji
Pada Tanggal 28 Juli 2021
dan dinyatakan memenuhi syarat
Komisi Pembimbing,




Prof. Dr. dr. Yuyun Y. Annawati, M. Kes., Sp.Rad
Ketua


Dr. dr. Masruroh Rahayu, M. Kes.
Anggota

Penguji,


Dr. dr. Shalwely Nandari Kurniawan, Sp.S
Penguji 1


dr. Eviana Norahmawati, Sp.A(K)
Penguji 2



Dr. dr. Vessha Djamillo, Msi.Med, Sp.A(K)
NIP. 19730720-200501 1008

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 dapat 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 PLAGIASI, saya bersedia TESIS ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku. (UU NO.20 Tahun 2003, Pasal 25 ayat 2 dan pasal 70)

Malang, 28 Juli 2021

Mahasiswa,



Nama	Safira Dita Arviana
NIM	206070117111002
PS	Ilmu Biomedik
Prog	Pascasarjana
Fak	Kedokteran UB

**IDENTITAS TIM PENGUJI****JUDUL TESIS:**

Potensi 7,8-Dihydroxyflavone pada Mekanisme Persinyalan *Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)* dan *Prolyl Hydroxylase* dalam Stimulasi Ekspresi *Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 α* Pasca Stroke Iskemik Secara *In Silico*

Nama Mahasiswa : Safira Dita Arviana

NIM : 2060701171110002

Program Studi : Magister Ilmu Biomedik

Minat : Anatomi-Histologi

KOMISI PEMBIMBING:

Ketua : Prof. Dr. dr. Yuyun Yuniewati P.W, M.Kes, Sp.Rad (K)

Anggota : Dr.dr. Masrurroh Rahayu, M.Kes

TIM DOSEN PENGUJI:

Dosen Penguji 1 : Dr.dr. Shahdevi Nandar Kurniawan, Sp.S

Dosen Penguji 2 : dr. Eviana Norahmawati, Sp.PA (K)

Tanggal Ujian : 28 Juli 2021

SK Penguji : -----



KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Segala puji bagi Allah Subhanahu wa Ta'ala yang telah memberikan rahmat dan karuniaNya kepada penulis selama proses menyelesaikan thesis ini.

Shalawat dan salam senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad shallallahu 'alaihi wa sallam yang mengantarkan manusia dari zaman kegelapan ke zaman yang terang benderang ini. Alhamdulillah thesis dengan judul "Potensi 7,8-

Dihydroxyflavone pada Mekanisme Persinyalan *Phosphatidylinositol 3-Kinase* (PI3K) dan *Prolyl Hydroxylase* dalam Stimulasi Ekspresi *Hypoxia Inducible Factor* (HIF)-1 α Pasca Stroke Iskemik Secara *In Silico*" Ini dapat diselesaikan guna memenuhi salah satu persyaratan dalam menyelesaikan pendidikan pada Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Selama penulisan thesis ini tentunya penulis tidak lepas dari berbagai pihak yang telah mendukung dan membimbing penulis selama proses penyelesaian thesis ini. Kasih sayang yang tulus serta penghargaan yang setinggi-tingginya penulis berikan kepada:

1. Kedua orang tua dan seluruh keluarga penulis yang telah memberikan dorongan doa, nasihat, motivasi, serta pengorbanan materiilnya selama penulis menempuh studi di Universitas Brawijaya Malang.
2. Prof. Widodo, S.Si., M.Si., Ph.D.Med.Sc, selaku rektor Universitas Brawijaya Malang
3. Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si.Med., SpA(K), selaku ketua Dekan Fakultas Kedokteran Brawijaya.
4. Prof. Dr. dr. Yuyun Yuniewati P.W, M.Kes, Sp.Rad (K) dan Dr.dr. Masruroh Rahayu, M.Kes, selaku dosen pembimbing thesis yang telah memberikan



pengarahan dan pengalaman berharga sehingga penulis dapat menyusun proposal tesis ini dengan baik.

5. Dr.dr. Shahdevi Nandar Kurniawan, Sp.S dan dr. Eviana Norahmawati, Sp.PA (K) selaku penguji yang telah memberikan kritik dan saran yang membangun.
6. Aldita, Rizka, Faiza, Tsalsa, Tiara, Shanaz, dan Silvia yang selalu mendukung penulis dalam menyelesaikan tesis ini.
7. Segenap sivitas akademika Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
8. Semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan proposal tesis ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan proposal tesis ini masih terdapat kekurangan, maka, penulis sangat membutuhkan kritik dan saran yang membangun. Penulis juga berharap semoga hasil tesis ini bisa memberikan manfaat kepada para pembaca khususnya bagi penulis pribadi. *Amin Ya Rabbal Alamin.*

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Malang, 9 Juni 2021

Penulis

RINGKASAN

Safira Dita Arviana, NIM. 206070117111002, Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, 9 Juni 2021. Potensi 7,8-*Dihydroxyflavone* pada Mekanisme Persinyalan *Phosphatidylinositol 3-Kinase* (PI3K) dan *Prolyl Hydroxylase* dalam Stimulasi Ekspresi *Hypoxia Inducible Factor* (HIF)-1 α Pasca Stroke Iskemik Secara *In Silico*. Komisi Pembimbing Ketua: Yuyun Yueniwati Prabowowatii Wadjib, Anggota: Masruroh Rahayu, Shahdevi Nandar Kurniawan, Eviana Norahmawati.

Stroke iskemik merupakan salah satu penyakit tidak menular yang terjadi akibat kurangnya pasokan darah menuju otak yang disebabkan oleh ruptur atau adanya sumbatan pada pembuluh darah. Hipoksia jaringan akibat penurunan aliran darah menuju otak menyebabkan hilangnya energi, kegagalan homeostasis dan kematian sel. Tubuh merespon keadaan hipoksia dengan aktivasi jalur persinyalan PI3K dan selanjutnya inhibisi kerja enzim *prolyl hydroxylase* untuk meningkatkan transkripsi protein HIF-1 α . Transkripsi protein HIF-1 α menyebabkan peningkatan regulasi gen yang mengkode berbagai protein yang berperan dalam mekanisme adaptif sel, seperti angiogenesis, eritropoiesis, metabolisme, dan penghambatan apoptosis.

Tatalaksana farmakologis untuk stroke iskemik akut berdasarkan rekomendasi *Food and Drug Administration* adalah dengan pemberian agen trombolitik, yaitu *recombinant tissue plasminogen activator* (rtPA) secara intravena dalam waktu <4,5 jam setelah onset untuk mengembalikan reperfusi jaringan. Selain itu, agen neuroprotektan seperti sitikolin juga diberikan untuk mencegah perluasan infark. Senyawa 7,8-*Dihydroxyflavone* dijadikan sebagai kandidat agen neuroprotektan yang mampu bekerja untuk memicu angiogenesis, eritropoiesis, dan mencegah apoptosis sel akibat peningkatan ekspresi protein HIF-1 α .

Penelitian dengan metode *in silico* dilakukan untuk mengetahui potensi 7,8-DHF sebagai agen neuroprotektan jika dibandingkan dengan *native ligand* dari protein PI3K dan enzim *prolyl hydroxylase*. Mekanisme kerja 7,8-DHF sebagai agen neuroprotektan melalui aktivasi jalur persinyalan PI3K dan penghambatan kerja enzim *prolyl hydroxylase* untuk meningkatkan ekspresi protein HIF-1 α . Hasil penelitian menunjukkan bahwa interaksi senyawa 7,8-DHF dengan protein PI3K memberikan hasil energi ikatan sebesar -8,6 Kcal/mol, sedangkan energi ikatan *native ligand* dengan protein PI3K memberikan hasil energi ikatan sebesar -7,5 Kcal/mol. Nilai yang lebih kecil menunjukkan lebih sedikitnya energi yang dibutuhkan untuk memberikan efek dalam menstimulasi kerja protein kinase. Senyawa 7,8-DHF berikatan dengan protein PI3K pada asam amino Met953 dengan ikatan Pi-sulfur, Pro810, Ile831, Val882, dan Ile963 dengan ikatan Pi-Alkyl, Tyr867 dengan ikatan Pi-Pi T-shaped, serta residu Lys833 dan Asp964 yang membentuk ikatan hidrogen dan mengaktifasi jalur persinyalan PI3K/Akt/mTOR dan selanjutnya meningkatkan ekspresi protein HIF-1 α .

Selanjutnya, interaksi senyawa 7,8-DHF dengan enzim *prolyl hydroxylase* memberikan hasil energi ikatan sebesar -7,5 Kcal/mol, hasil ini sama besar dengan interaksi *native ligand* dengan enzim *prolyl hydroxylase*. Hasil ini menunjukkan efek inhibisi dari senyawa 7,8-DHF sama besar dengan efek inhibisi yang diberikan oleh *native ligand*. Senyawa 7,8-DHF berikatan dengan enzim *prolyl hydroxylase* pada asam amino Met299 dengan ikatan Pi-alkil, Tyr310, His313 dengan ikatan Pi-Pi T-shaped, Asp315 dengan ikatan Pi-anion, dan Arg322 dengan ikatan hidrogen. Ikatan 7,8-DHF dan asam amino tersebut menyebabkan penghambatan kerja enzim *prolyl hydroxylase* melalui jalur persinyalan PI3K/Akt/mTOR dan stimulasi transkripsi HIF-1 α .

Penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa 7,8-DHF dapat digunakan sebagai kandidat agen neuroprotektan pada kasus stroke iskemik melalui mekanisme stimulasi protein kinase. Senyawa 7,8-DHF meningkatkan ekspresi protein HIF-1 α melalui jalur persinyalan PI3K dan penghambatan kerja enzim *prolyl hydroxylase*.



SUMMARY

Safira Dita Arviana, NIM. 206070117111002. Postgraduate Programs Faculty of Medicine Brawijaya University Malang. June 9th 2021. In silico analysis of 7,8-Dihydroxyflavone's potential effect on *Phosphatidylinositol 3-Kinase* (PI3K) and Prolyl Hydroxylase Signaling Mechanisms towards *Hypoxia Inducible Factor* (HIF)-1 α Expression Stimulation in Post-Ischemic Stroke. Supervisor Chairman: Yuyun Yueniwati Prabowowatii Wadjib, Members: Masruroh Rahayu, Shahdevi Nandar Kurniawan, Eviana Norahmawati.

Ischemic stroke is a non-communicable disease that occurs due to lack of blood supply to the brain caused by rupture or blockage of blood vessels. Tissue hypoxia due to decreased blood flow to the brain causes loss of energy, failure of homeostasis and cell death. The body responds to hypoxia by activation of the PI3K signaling pathway and subsequent inhibition of the prolyl hydroxylase enzyme to increase transcription of the HIF-1 α protein. HIF-1 α protein transcription causes upregulation of genes encoding various proteins that play a role in cell adaptive mechanisms, such as angiogenesis, erythropoiesis, metabolism, and inhibition of apoptosis.

Pharmacological treatment for acute ischemic stroke based on the recommendations of the Food and Drug Administration is the administration of a thrombolytic agent, namely recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) intravenously within <4.5 hours after onset to restore tissue reperfusion. In addition, neuroprotectant agents such as cyticoline are also given to prevent the expansion of the infarct. The 7,8-Dihydroxyflavone compound was used as a candidate for neuroprotectant agents that are able to work to trigger angiogenesis, erythropoiesis, and prevent cell apoptosis due to increased expression of HIF-1 α protein.

In silico, research was conducted to determine the potential role of 7,8-DHF as a neuroprotectant agent when compared to the native ligand of PI3K protein and prolyl hydroxylase enzyme. The mechanism of action of 7,8-DHF as a neuroprotectant agent is through activation of the PI3K signaling pathway and inhibition of the prolyl hydroxylase enzyme to increase HIF-1 protein expression. The results showed that the interaction of the 7,8-DHF with PI3K protein gave a bond energy yield of -8.6 Kcal/mol, while the binding energy of the native ligand with protein PI3K gave a bond energy yield of -7.5 Kcal/mol. A smaller value indicates less energy is required to exert an effect in stimulating the action of protein kinases. 7,8-DHF binds to PI3K protein in the amino acid Met953 with Pi-sulfur bonds, Pro810, Ile831, Val882, and Ile963 with Pi-Alkyl bonds, Tyr867 with Pi-Pi T-shaped bonds, and Lys833 and Asp964 residues which form hydrogen bonds and activate the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and further increase the expression of the HIF-1 α protein.

Furthermore, the interaction of 7,8-DHF with the prolyl hydroxylase enzyme gave a bond energy yield of -7.5 Kcal/mol. This result was as large as the interaction of the native ligand and the prolyl hydroxylase enzyme. These results indicate that the inhibitory effect of 7,8-DHF is as large as the inhibitory effect of the native ligand. 7,8-DHF binds to the enzyme prolyl hydroxylase on the amino acid Met299 with a Pi-alkyl bond, Tyr310, His313 with a Pi-Pi T-shaped bond, Asp315 with a Pi-anion bond, and Arg322 with a hydrogen bond. The binding of 7,8-DHF to the amino acid causes inhibition of the prolyl hydroxylase enzyme through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and stimulates HIF-1 transcription.

This study demonstrates that the 7,8-DHF compound can be used as a neuroprotectant agent in cases of ischemic stroke via a protein kinase stimulation mechanism. The compound 7,8-DHF increases the expression of HIF-1 α protein through the PI3K signaling pathway and inhibits the action of the prolyl hydroxylase enzyme.



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN ORISINILITAS THESIS	iii
IDENTITAS TIM PENGUJI	iv
KATA PENGANTAR	v
RINGKASAN	vii
SUMMARY	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
DAFTAR SINGKATAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1 Tujuan Umum.....	5
1.3.1 Tujuan Khusus.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
1.4.1 Manfaat Umum.....	6
1.4.2 Manfaat Khusus.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Stroke Iskemik.....	7
2.1.1 Definisi dan Klasifikasi.....	7
2.1.2 Epidemiologi.....	8
2.1.3 Etiopatofisiologi.....	9



2.1.3.1 Eksitotoksitasitas Glutamat	10
2.1.3.2 Stress Oksidatif	10
2.1.3.3 Inflamasi	11
2.1.3.4 Disfungsi Sawar Darah Otak	11
2.1.4 Tanda dan Gejala	12
2.1.5 Jalur Persinyalan yang Terlibat dalam Patofisiologi Stroke ..	13
2.1.5.1 <i>Brain-derived Neurotrophic Factor</i> (BDNF)	13
2.1.5.2 <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> (PI3K)	14
2.1.5.3 <i>Prolyl hydroxylase</i> (PHD)	17
2.1.5.4 <i>Hypoxia-Inducible Factor</i> (HIF)	18
2.1.5.5 Mekanisme Regulasi HIF-1	20
2.1.6 Tatalaksana	22
2.2 Senyawa 7,8- <i>Dihydroxyflavone</i>	23
2.2.1 Struktur dan Karakteristik 7,8- <i>Dihydroxyflavone</i>	23
2.2.2 Aktivitas Biologis 7,8- <i>Dihydroxyflavone</i>	24
2.2.3 Farmakokinetik 7,8- <i>Dihydroxyflavone</i>	25
2.2.4 Farmakodinamik 7,8- <i>Dihydroxyflavone</i>	26
2.3 Metode <i>In Silico</i>	26
2.3.1 Definisi	26
2.3.2 <i>Molecular Docking</i>	28
2.3.3 Perangkat Lunak	29
2.3.4 Interaksi Ligan-Reseptor	32
2.3.5 Sumber Informasi Database	33
2.4 Kerangka Teori	34
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	35
3.1 Kerangka Konsep	35
3.2 Hipotesis Penelitian	36
BAB IV METODE PENELITIAN	37
4.1 Desain Penelitian	37
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian	37
4.3 Penjelasan Variabel	37
4.3.1 Variabel Bebas	37



4.3.2 Variabel Terikat.....	37
4.4 Alat dan Bahan Penelitian	38
4.4.1 Alat.....	38
4.4.2 Bahan.....	38
4.5 Definisi Operasional.....	38
4.6 Prosedur Penelitian.....	39
4.6.1 Preparasi Ligan.....	39
4.6.2 Preparasi Protein Target.....	40
4.6.3 Analisis Farmakokinetik.....	40
4.6.4 Uji Fungsi Obat dengan <i>Prediction of Activity Spectra for Substance (PASS)</i>	41
4.6.5 Penambatan <i>Molecular Docking</i>	41
4.6.6 Visualisasi Hasil Docking.....	41
4.7 Analisis Data.....	42
4.8 Alur Penelitian.....	43
BAB V HASIL.....	44
5.1 Analisis Farmakokinetik.....	44
5.2 Uji Fungsi Obat dengan <i>Prediction of Activity Spectra for Substance (PASS)</i>	45
5.3 Penambatan <i>Molecular Docking</i>	45
BAB VI PEMBAHASAN.....	52
6.1 Analisis Farmakokinetik.....	52
6.2 Uji Fungsi Obat dengan <i>Prediction of Activity Spectra for Substance (PASS)</i>	55
6.3 Penambatan <i>Molecular Docking</i>	56
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN.....	62
7.1 Kesimpulan.....	62
7.2 Saran.....	62
DAFTAR PUSTAKA.....	63
LAMPIRAN.....	74
RIWAYAT HIDUP.....	86



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Jalur Persinyalan PI3K.....	16
Gambar 2.2 Pathway HIF pada Keadaan Normoksia dan Hipoksia.....	20
Gambar 2.3 Struktur 7,8-Dihydroxyflavone.....	24
Gambar 2.4 Kerangka Teori.....	34
Gambar 3.1 Kerangka Konsep.....	35
Gambar 4.1 Alur Penelitian.....	43
Gambar 5.1 Metode BOILED-Egg Senyawa 7,8-Dihydroxyflavone.....	44
Gambar 5.2 Hasil Uji <i>Prediction of Activity Spectra for Substance (PASS)</i>	45
Gambar 5.3 Visualisasi Interaksi Molekuler antara Ligan dan Protein PI3K.....	48
Gambar 5.4 Visualisasi Jenis Ikatan Ligan dan Protein PI3K.....	48
Gambar 5.5 Visualisasi Interaksi Molekuler antara Ligan dengan Enzim <i>Prolyl Hydroxylase</i>	49
Gambar 5.6 Visualisasi Jenis Ikatan Ligan dan Enzim <i>Prolyl Hydroxylase</i>	50



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Senyawa Uji	38
Tabel 4.2 Reseptor pada Jalur Persinyalan Ekspresi HIF-1	38
Tabel 5.1 Uji Farmakokinetik Senyawa 7,8-Dihydroxyflavone.....	44
Tabel 5.2 Uji <i>Lipinski Rule of Five</i> Senyawa 7,8-Dihydroxyflavone	45
Tabel 5.3 Hasil <i>Molecular Docking</i> Ligan dan Protein Target.....	46
Tabel 5.4 Sisi Aktif dari Protein Target.....	47
Tabel 5.5 Interaksi protein PI3K dengan ligan.....	49
Tabel 5.6 Interaksi protein PHD dengan ligan.....	50



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 *Ethical Clearance* dari KEPK FK UB 74

Lampiran 2 Preparasi Ligan 75

Lampiran 3 Preparasi Protein Target 76

Lampiran 4 Analisis Farmakokinetik 79

Lampiran 5 Uji Fungsi Obat dengan *Prediction of Activity Spectra for Substance*
(PASS) 83

Lampiran 6 *Molecular Docking* 84



DAFTAR SINGKATAN

2OG	: 2-Oxoglutarate
4EBP1	: 4E-Binding Protein-1
7,8-DHF	: 7,8-Dihydroxyflavone
Akt	: RAC-Alpha Serine/Threonine-Protein Kinase
ADMET	: Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, Eksresi, dan Toksisitas
AMPA	: Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazole-Propionic Acid
ARNT	: Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ASN	: Alpha-Synuclein
BAD	: Bcl-2-Associated Agonist of Cell Death
Bcl-2	: B-Cell Lymphoma 2
BDNF	: Brain-Derived Neurotrophic Factor
CBP	: CREB Binding Protein
cGMP-PKG	: Cyclic Guanosine 3',5'-Monophosphate-Dependent Protein Kinase
CREB	: cAMP-Response Element Binding
C-TAD	: COOH Terminal Activation Domain
Cul	: Cullin Box 2
DAMP	: Damage-Associated Molecular Patterns
EPAS1	: Endothelial Per-ARNT-Sim Domain Protein1
EPO	: Erythropoietin
FADH ₂	: Flavin Adenine Dinucleotide
FDA	: Food and Drug Administration
FIH1	: Factor Inhibiting HIF-1
FoxO	: Forkhead box O
HDAC1	: Histone Deacetylase 1
HIF-1 α	: Hypoxia Inducible Factor-1 α
HMGB1	: High-mobility group box-1
HR	: Homolog Regio
HRE	: Hypoxia Response Elements



ICAM1 : *Intercellular Adhesion Molecule 1*

MAPK : *Mitogen Activated Protein Kinase*

mTOR : *Mammalian Target of Rapamycin*

NADH : *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*

NADPH : *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*

NDGR3 : *N-Myc Downstream Regulated Gene*

NGF : *Nerve Growth Factor*

NMDA : *N-methyl-D-aspartate receptor*

NOS : *Nitric Oxide Synthase*

NOX2 : *NADPH Oxydase 2*

NOX4 : *NADPH Oxydase 4*

N-TAD : *NH₂ Terminal Activation Domain*

ODDD : *Oxygen-Dependent Degradation Domain*

PA : *Probable Activity*

PASS : *Prediction of Activity Spectra for Substance*

PH : *Pleckstrin Homology*

PHD : *Prolyl Hydroxylase*

PI : *Probable Inactivity*

PI3K : *Phosphatidylinositol 3-Kinase*

PIP2 : *Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphate*

PIP3 : *Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphate*

PKM2 : *Pyruvate Kinase M1/2*

PLC- γ : *Phospholipase C- γ*

PtdIns : *Phosphatidylinositol*

PTEN : *Phosphatase and Tensin Homologue*

PUFA : *Polyunsaturated Fatty Acid*

pVHL : *Protein Von-Hippel Lindau*

Rbx1 : *RING Box Protein 1*

ROS : *Reactive Nitrogen Species*

RTK : *Receptor Tirosin Kinase*

rTPA : *Recombinant Tissue Plasminogen Activator*



S6K : *S6 Kinase*

SAP30 : *Secreted Aspartic Proteinase 3*

TLR : *Toll-like Receptor*

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

TOAST : *Trial Of Acute Stroke Treatment*

TrkA : *Tyrosine Kinase A*

TrkB : *Tyrosine Kinase B*

TrkC : *Tyrosine Kinase C*

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

VHL : *Von Hippel-Lindau*

WHO : *World Health Organization*



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Stroke merupakan perburukan keadaan klinis terkait fungsi otak, baik fokal maupun global secara cepat dan berlangsung ≥ 24 jam atau menyebabkan kematian sebagai akibat dari kerusakan vaskuler. Penyebab vaskuler yang terjadi adalah infark atau pecahnya pembuluh darah pada otak, retina, atau tulang belakang (Hankey, 2017). Gejala yang ditimbulkan akibat stroke adalah kelemahan salah satu sisi tubuh, baik pada wajah, ekstremitas atas, dan atau ekstremitas bawah. Selain itu pasien juga mungkin mengalami kesulitan melihat pada salah satu atau kedua mata, kebingungan, pusing, kehilangan keseimbangan dan koordinasi gerak tubuh, kesulitan berbicara atau memahami pembicaraan, kesulitan berjalan, serta sakit kepala mendadak dan berat tanpa diketahui penyebabnya (Osama *et al.*, 2019).

Data dari WHO menunjukkan bahwa setiap tahun terdapat kasus baru stroke sebesar 13,7 juta kasus dan 5,5 juta kasus kematian (Johnson *et al.*, 2016). Secara nasional, prevalensi stroke sebesar 10,9% pada penduduk berusia ≥ 15 tahun, terutama pada kelompok usia 55-64 tahun, dengan prevalensi sebesar 33,3%. Penderita stroke terbanyak dengan persentase sebesar 14% pada provinsi Kalimantan Timur dan terendah sebesar 4,1% pada Provinsi Papua dengan risiko yang hampir sama pada laki-laki (50,1%) maupun perempuan (49,9%) (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2018).

Stroke diklasifikasikan menjadi dua jenis berdasarkan penyebabnya, yaitu stroke iskemik dan stroke hemoragik. Stroke iskemik terjadi akibat sumbatan



pada pembuluh darah otak, sedangkan stroke hemoragik terjadi akibat ruptur pembuluh darah otak secara spontan, aneurisma atau akibat trauma. Stroke iskemik dialami sebanyak 87% penderita, stroke dengan tipe sumbatan aterosklerosis sebanyak 50%, embolik dan oklusi pembuluh darah kecil 25%, serta stroke lakunar sebanyak 25%. Inti iskemik merupakan daerah yang distribusi aliran darahnya sangat terganggu dan rentan terjadi kematian sel dalam waktu singkat. Di sekitar inti iskemik, aliran darah menurun hingga berada dibawah ambang fungsional, namun masih berada diatas ambang kematian sel, area ini disebut penumbra, dimana area ini menjadi target terapi neuroprotektif (Cheon *et al.*, 2018).

Patomekanisme yang terlibat dalam stroke iskemik adalah terjadinya penurunan aliran darah ekstrim yang menyebabkan hilangnya energi dan mengakibatkan ketidakseimbangan gradien ion transmembran serta kegagalan homeostasis (Khoshnam *et al.*, 2017). Ketidakseimbangan kebutuhan dan ketersediaan oksigen menyebabkan respon tubuh untuk mengatasi ketidakseimbangan oksigen dan mencegah terjadinya kematian sel.

Mekanisme yang terjadi adalah aktivasi jalur persinyalan *Phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) dan produksi faktor transkripsi *Hypoxia Inducible Factor-1 α* (HIF-1 α). Pada keadaan hipoksia, enzim *prolyl hydroxylase* (PHD) kehilangan aktivitas hidrosilasi sehingga tidak membentuk ikatan dengan *von Hippel-Lindau* (VHL), yaitu protein yang berfungsi untuk mendegradasi kelebihan HIF-1 α . Kejadian ini menyebabkan akumulasi protein HIF-1 α . Selain itu, *upregulasi* protein HIF-1 α juga terjadi melalui mekanisme aktivasi Reseptor Tirosin Kinase (RTK) sebagai mekanisme proteksi terhadap jantung dan neuron dari keadaan hipoksia. Aktivasi RTK menyebabkan fosforilasi tirosin subunit regulator p85 yang kemudian mengaktifasi subunit p110 dan terjadi konversi

Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphate (PIP₂) menjadi *Phosphatidylinositol*



(3,4,5)-Triphosphate (PIP3). *Phosphatidylinositol* (4,5)-Bisphosphate

kemudian mengaktifasi jalur persinyalan RAC-*Alpha Serine/Threonine-Protein*

Kinase (Akt) dan *Mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) yang

menyebabkan fosforilasi faktor inisiasi eIF-4E *binding protein* (4EBP1) dan S6

Kinase untuk memicu translasi protein *Hypoxia Inducible Factor-1 α* (HIF-1 α).

Selanjutnya, HIF-1 α bertranslokasi menuju nukleus, membentuk heterodimer

bersama HIF-1 β , dan membentuk kompleks HIF. Kompleks HIF bersama ko-

aktivator p300/CBP (*CREB Binding Protein*) membentuk kompleks transkripsi

aktif yang akan mengikat *Hypoxia Response Elements* (HRE) pada gen target

dan mengaktifkan faktor transkripsi sebagai respon adaptif terhadap hipoksia

(Yu *et al.*, 2017). Aktivasi faktor transkripsi menyebabkan peningkatan regulasi

gen yang mengkode protein yang berperan dalam angiogenesis, eritropoiesis,

metabolisme, mempertahankan tonus vaskuler, respon imun untuk

meningkatkan aliran oksigen ke jaringan, dan terlibat pula dalam

penghambatan apoptosis sel (Amalia *et al.*, 2020).

Tatalaksana farmakologis untuk stroke iskemik fase akut berdasarkan

rekomendasi *Food and Drug Administration* (FDA) adalah dengan pemberian

agen trombolitik berupa *recombinant tissue plasminogen activator* (rtPA)

secara intravena. Tujuan pemberian rtPA adalah untuk mengembalikan

reperfusion jaringan, sayangnya, pemberian rtPA terbatas pada onset terjadinya

iskemia, kontraindikasi trombolitik, dan tingkat rekanalisasi yang terbatas

(Powers *et al.*, 2019). Terapi neuroproteksi juga diberikan dengan tujuan untuk

menyelamatkan penumbra dan menghalangi meluasnya infark, bukan untuk

mereperfusion jaringan. Pemberian agen neuroprotektan seperti sitikolin dan

pirasetam rutin digunakan untuk memperbaiki fungsi neurologis. Pirasetam

terbukti memiliki aktivitas serebroprotektif dan memiliki efek samping yang

minimal, sedangkan sitikolin mampu memperbaiki fungsi kognitif,



meningkatkan kadar dopamin dan epinefrin, serta menurunkan kadar glutamat (Jasielski *et al.*, 2020; Sivalingam dan Samikkannu, 2020). Pada penelitian meta analisis membuktikan bahwa sitikolin aman digunakan dalam tatalaksana stroke iskemik, namun tidak bermanfaat dalam menurunkan tingkat mortalitas pasien (Shi *et al.*, 2016). Selain itu, pemberian sitikolin hanya efektif pada 24 jam pertama setelah onset stroke (Secades *et al.*, 2016). Maka dari itu, diperlukan bahan yang berpotensi menjadi agen neuroprotektan dengan memaksimalkan fungsi dari penumbra dan mencegah perluasan area iskemik serta memiliki efek samping yang minimal, seperti *7,8-Dihydroxyflavone* (DHF).

Senyawa *7,8-Dihydroxyflavone* (DHF) merupakan sintesis flavonoid yang utamanya dijumpai sebagai metabolit sekunder dalam sayur dan buah-buahan (Liu *et al.*, 2016). *7,8-Dihydroxyflavone* (DHF) diketahui berperan sebagai antioksidan, anti inflamasi, anti kanker, dan merupakan senyawa flavonoid agonis *Tropomyosin Related Kinase Receptor B* (TrkB) yang memicu fosforilasi dan aktivasi transkripsi gen yang berperan sebagai neuroprotektan. Suatu penelitian menunjukkan bahwa 7,8-DHF mampu mengaktivasi reseptor TrkB dan menginduksi aktivasi jalur persinyalan kaskade MAPK dan PI3K untuk mengaktivasi gen pro-survival seperti VEGF serta mampu mereduksi apoptosis (Chitranshi *et al.*, 2015). Senyawa 7,8-DHF juga mampu berinteraksi dengan asam amino pada sisi aktif BACE1 untuk menghambat defisit memori pada penyakit Alzheimer (Pandey *et al.*, 2018). Selain itu, 7,8-DHF diketahui berikatan secara kuat dengan asam amino yang menghambat agregasi protein *Alpha-synuclein* (ASN) sehingga melindungi dari kematian sel akibat penyakit Parkinson (Mohankumar *et al.*, 2020).

Potensi 7,8-DHF sebagai agen neuroprotektif telah dibuktikan dalam beberapa penelitian menggunakan pemodelan berbasis komputer. Namun,



belum dilakukan penelitian untuk membuktikan potensi 7,8 DHF sebagai terapi iskemia pada stroke iskemik. Perlu dilakukan penelitian secara *in silico* untuk mengetahui potensi 7,8-DHF sebagai aktivator jalur persinyalan PI3K/Akt serta inhibitor enzim PHD yang selanjutnya berperan dalam stimulasi protein HIF-1 α para reseptor HREs untuk membantu mengetahui aktivitas paling stabil pada target sehingga mendapat hasil yang paling baik dalam upaya penemuan obat baru yang berperan sebagai agen neuroprotektan (Kaur *et al.*, 2019).

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Rumusan Masalah Umum

Bagaimana potensi 7,8-*Dihydroxyflavone* sebagai agen neuroprotektan melalui stimulasi ekspresi HIF-1 α pada uji *in silico*

1.2.2 Rumusan Masalah Khusus

1. Bagaimana potensi *native ligand* dari protein PI3K dan enzim *Prolyl hydroxylase* dalam menstimulasi ekspresi HIF-1 α ?
2. Bagaimana potensi 7,8-*Dihydroxyflavone* dalam berikatan dengan protein PI3K dan enzim *Prolyl hydroxylase* dalam menstimulasi ekspresi HIF-1 α ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan potensi 7,8-*Dihydroxyflavone* sebagai agen neuroprotektan melalui stimulasi ekspresi HIF-1 α pada uji *in silico*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui potensi *native ligand* dari protein PI3K dan enzim *Prolyl hydroxylase* dalam menstimulasi ekspresi HIF-1 α



2. Membuktikan potensi 7,8-*Dihydroxyflavone* dalam berikatan dengan protein PI3K dan enzim *Prolyl hydroxylase* dalam menstimulasi ekspresi HIF-1 α

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat Akademis

1. Menambah khasanah keilmuan mengenai 7,8-*Dihydroxyflavone* sebagai agen neuroprotektif yang mampu menjadi alternatif terapi cedera serebral pada stroke iskemik
2. Dapat menjadi dasar untuk pengembangan penelitian bahwa agen neuroprotektif mampu berperan sebagai alternatif pengobatan cedera serebral pasca stroke iskemik

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Dapat menjadi dasar untuk pemanfaatan 7,8-*Dihydroxyflavone* sebagai agen neuroprotektan untuk alternatif pengobatan cedera serebral pasca stroke iskemik



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Stroke Iskemik

2.1.1 Definisi dan Klasifikasi

Stroke merupakan perburukan keadaan klinis terkait fungsi otak, baik fokal maupun global secara cepat dan berlangsung ≥ 24 jam atau menyebabkan kematian sebagai akibat dari kerusakan vaskuler. Umumnya, terjadi sumbatan atau pecahnya pembuluh darah otak, retina, atau tulang belakang sehingga aliran darah menuju jaringan otak tidak adekuat (Hankey, 2017). Otak merupakan organ yang sensitif terhadap keadaan iskemia, karena neuron memiliki laju metabolisme yang tinggi dan hanya mampu bertahan dalam beberapa menit pada keadaan kekurangan oksigen dan glukosa. Aliran darah yang tidak adekuat menyebabkan kematian jaringan dan menimbulkan infark pada jaringan tersebut (Amalia *et al.*, 2020).

Klasifikasi stroke berdasarkan penyebabnya adalah stroke iskemik dan stroke hemoragik. Stroke iskemik terjadi akibat berkurangnya aliran darah pada bagian tertentu dari otak dapat diklasifikasikan menjadi 5 kelompok berdasarkan *Trial Of Acute Stroke Treatment (TOAST)*, yaitu (Donkor, 2018):

1. Sumbatan aterosklerosis pada pembuluh darah besar otak yang menyebabkan iskemia
2. Stroke kardioemboli yang berkaitan dengan disritmia, penyakit katup jantung, dan trombi pada ventrikel kiri
3. Sumbatan 1 atau lebih pembuluh darah kecil di otak



4. Stroke yang berkaitan dengan penyebab lain yang dapat didefinisikan, seperti kelainan koagulasi, penyakit infeksi, kerusakan arteri, inflamasi, dan penggunaan obat-obatan yang dilarang

5. Stroke kriptogenik yang tidak diketahui penyebabnya.

Area yang terkena dampak dari berkurangnya aliran darah juga terbagi menjadi dua area, yaitu inti iskemik dan penumbra iskemik. Inti iskemik merupakan area tanpa suplai darah sehingga terjadi kematian neuron.

Sedangkan, penumbra iskemik merupakan jaringan yang mengalami hipoperfusi dan berisiko mengalami infark jika aliran darah tidak segera diperbaiki. Namun, dengan terapi yang baik akan menjadi jaringan yang *survive* dan tidak mengalami kematian sel neuron (Vagal *et al.*, 2018).

2.1.2 Epidemiologi

Stroke merupakan salah satu jenis penyakit sistem saraf dan bersifat tidak menular. Kejadian stroke mengalami peningkatan kasus tiap tahunnya, diketahui insiden stroke di negara maju 112-223/100.000 orang per tahun dan 73-165/100.000 orang per tahun pada negara berpenghasilan rendah-menengah.

Seiring dengan perkembangan ekonomi pada negara berkembang, insiden stroke meningkat, terutama stroke iskemik. Hal ini mungkin terjadi karena aterosklerosis akibat *intake* lemak, kadar kolesterol, diabetes, dan obesitas (Idris & Tan, 2018).

Kejadian stroke di Indonesia pada tahun 2013 sebesar 7% (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2013), dan mengalami peningkatan menjadi 10,9% pada tahun 2018 dengan prevalensi tertinggi di Kalimantan Timur sebesar 14,6% dan terendah di Papua sebesar 4,1% (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2018). Rata-rata, stroke dialami oleh 33,3% penduduk berusia 55-64 tahun dan 1,2% pada usia 15-24 tahun dengan perbandingan jenis kelamin penderita wanita 49,9% dan laki-laki 50,1%. Sebagian penderita stroke tinggal di



daerah perkotaan (63,9%) daripada pedesaan (36,1%). Latar belakang penduduk yang mengalami stroke rata-rata hanya menyelesaikan pendidikan hingga tamat SD (29,5%), hal ini berkaitan dengan insiden kecacatan akibat ketidakpatuhan kontrol ke fasilitas pelayanan kesehatan. Data menunjukkan hanya 39,4% penderita stroke yang berobat rutin, 38,7% tidak rutin memeriksakan keadaannya, dan 21,9% lainnya tidak pernah memeriksa ulang kesehatannya ke fasilitas pelayanan kesehatan (Aprianda *et al.*, 2019; Yew, 2015).

Prevalensi stroke di Provinsi Jawa Timur sebesar 36,3% atau 75.490 kasus, dengan kejadian tertinggi sebesar 14.585 orang dialami pada usia 35-44 tahun. Dari seluruh pasien stroke di Jawa Timur, sekitar 1073 kasus terjadi di kota Malang, dan hanya 35,98% yang rutin memeriksakan kesehatannya ke Fasilitas Pelayanan Kesehatan, sedangkan 39,54% lainnya hanya sesekali, dan 24,48% tidak pernah memeriksakan kesehatannya lebih lanjut (Tim Riskesdas, 2019).

Sejalan dengan data yang didapat dari INTERSTROKE, penelitian yang melibatkan 22 negara berpenghasilan tinggi didapatkan 91% populasi menderita stroke iskemik, sedangkan 9% sisanya terserang stroke hemoragik. Prevalensi stroke iskemik berdasar klasifikasi TOAST, yaitu (Donkor, 2018).

1. Sumbatan aterosklerosis pada pembuluh darah besar otak 20%
2. Stroke kardioemboli 15%
3. Sumbatan 1 atau lebih pembuluh darah kecil di otak (lacunar) 25%
4. Stroke yang berkaitan dengan penyebab lain yang dapat didefinisikan 20-25%
5. Stroke kriptogenik yang tidak diketahui penyebabnya 5-10%

2.1.3 Etiopatofisiologi

Setiap menitnya, pasokan darah menuju otak sebanyak 50 mL tiap 100 gram untuk memenuhi kebutuhan oksigen dan glukosa dalam proses metabolisme



jaringan saraf. Jika suplai darah menurun pada 30 mL/100 g/menit, perfusi oksigen dan glukosa mulai terganggu, namun neuron mampu mengurangi aktivitas elektrokimia dan meminimalisir energi. Namun, penurunan suplai darah lebih lanjut dan dalam jangka waktu yang lama menyebabkan kematian neuron dalam beberapa menit (Bernardo-Castro *et al.*, 2020). Kaskade iskemik yang terjadi adalah

2.1.3.1 Eksitotoksisitas Glutamat

Segera setelah berkurangnya pasokan oksigen dan glukosa ke dalam jaringan otak, terjadi kegagalan produksi ATP dan gangguan pada pompa Na^+/K^+ ATPase yang menyebabkan depolarisasi sel neuron dan sel glia serta aktivasi kanal *voltage dependent* Ca^{2+} dan memicu pelepasan glutamat (Bach, 2017). Pelepasan neurotransmitter glutamat yang terakumulasi pada ekstrasel memicu aktivasi reseptor *N-methyl-D-aspartate* (NMDA) dan *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid* (AMPA), sehingga terjadi depolarisasi membran dan influks ion kalsium dan natrium ke dalam sel neuron (Khoshnam *et al.*, 2017). Masuknya ion natrium yang diikuti dengan influks air ke dalam sel melalui proses osmosis menyebabkan pembengkakan sel yang bersifat sitotoksik (Mahmoud *et al.*, 2019). Mekanisme yang terjadi akan memicu aktivasi *nitric oxide synthase* (NOS) untuk memproduksi radikal bebas dan memicu kematian sel (Khoshnam *et al.*, 2017).

2.1.3.2 Stress Oksidatif

Berkurangnya pasokan nutrisi dan oksigen juga menyebabkan berkurangnya koenzim NADH dan FADH_2 pada mitokondria yang menyebabkan kegagalan produksi ATP. Akibatnya, transport elektron juga terganggu dan terjadi pembentukan superoksida oleh NADPH oksidase melalui aktivasi NOX2 dan NOX4. Ion Ca^{2+} yang masuk ke dalam neuron akan



diabsorpsi oleh mitokondria, menyebabkan depolarisasi, kegagalan transport elektron dan kegagalan pembentukan ATP lebih lanjut. Dalam keadaan yang parah, akan terjadi ruptur mitokondria dan terjadi pelepasan sitokrom C, ion kalsium, dan *Reactive Nitrogen Species* (ROS) menuju sitosol yang akan memicu terjadinya apoptosis. Selain itu, ROS juga meningkat setelah kejadian stroke akibat metabolisme asam arakhidonat melalui jalur siklooksigenase dan lipooksigenase (Bach, 2017; Khoshnam *et al.*, 2017).

Keadaan iskemia menginduksi reaksi *nitric oxide* dengan caspase dan metalloprotease yang menyebabkan penghambatan *cell survival* dan memicu terjadinya apoptosis. *Nitric oxide* juga mengganggu transport elektron pada mitokondria dengan memicu terbentuknya peroksinitrit yang memicu neurotoksisitas dengan pembentukan ROS (Bach, 2017)

2.1.3.3 Inflamasi

Iskemia yang terjadi akan mengaktifasi mikroglia dan leukosit menuju area iskemik, selanjutnya akan dilepaskan *damage-associated molecular patterns* (DAMP), seperti *High-mobility group box-1* (HMGB1) atau *Heat shock protein* (Nakamura *et al.*, 2020). DAMP kemudian dikenali oleh *Toll-like Receptor* (TLR) pada makrofag, mikroglia, dan sel endotel otak dan kemudian terjadi pelepasan sitokin IL-1 β , IL-6 dan TNF, kemokin, *nitric oxide*, dan ROS yang memicu kematian sel dan disfungsi sawar darah otak. Sitokin yang diproduksi juga mampu menginduksi peningkatan molekul adhesi seperti P-*selectin*, E-*selectin*, dan ICAM1 menuju endotel pembuluh darah dan memicu migrasi leukosit menuju parenkim otak (Battaglini *et al.*, 2020; Khoshnam *et al.*, 2017).

2.1.3.4 Disfungsi Sawar Darah Otak

Otak mengandung banyak lipid *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) dan ion logam transisi, sehingga mengonsumsi banyak oksigen. Sawar darah



otak merupakan penghubung antara sistem vaskuler dan jaringan saraf yang berperan dalam homeostasis sistem saraf pusat. Sel endotel dari sawar darah otak mengandung banyak mitokondria untuk mempertahankan integritas dari sawar darah otak (Bernardo-Castro *et al.*, 2020). Maka dari itu, jaringan ini sensitif terhadap iskemia. Ketiadaan ATP, akumulasi asam laktat, dan keadaan lingkungan yang asam menyebabkan diproduksinya ROS dan pelepasan Fe^{3+} ke dalam neuron. Kemudian, superoksida mengubah Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} melalui reaksi fenton, hasilnya adalah terbentuknya radikal hidroksil yang bersifat toksik (Bach, 2017).

Pembentukan ROS mengaktifasi sitokin melalui jalur NFKB dan aktivasi metalloproteinase menyebabkan perubahan struktur vaskuler, kebocoran sawar darah otak dan aktivasi mikroglia. Hal ini menyebabkan invasi dari sel imun menuju parenkim otak dan menyebabkan inflamasi pada otak. Inflamasi berkontribusi pada keberlanjutan degradasi sawar darah otak, produksi sitokin, edema, dan kerusakan otak (Bach, 2017; Nakamura *et al.*, 2020).

2.1.4 Tanda dan Gejala

Tanda dan gejala stroke secara umum adalah kelemahan lengan, kaki, wajah, gangguan berbicara, pusing, bingung, gerakan mata abnormal, dan defek lapang pandang secara mendadak (Yew, 2015). Namun, sumbatan pada pembuluh darah menuju otak dapat menghasilkan tanda gejala yang berbeda (Hui *et al.*, 2020; Hurford *et al.*, 2020):

- a. Sumbatan pada arteri karotis internal menyebabkan kehilangan pengelihatn pada sebelah mata akibat oklusi arteri retina sentral.



- b. Sumbatan pada arteri serebri anterior menyebabkan kebas dan kelemahan kaki di sisi kontralateral, kekakuan otot pada sisi ipsilateral atau kontralateral, tidak memahami pembicaraan, dan inkontinensia urin.
- c. Sumbatan yang terjadi pada arteri serebri media umumnya menyebabkan infark di sisi lateral lobus frontal dan lobus parietal menyebabkan kelemahan wajah, lengan, dan kaki, *homonymous hemianopia*, afasia, dan apraksia.
- d. Sumbatan arteri serebri posterior menyebabkan *homonymous hemianopia* total atau parsial, dan jika mengenai nervus 3 akan menyebabkan midriasis dan hemiparesis kontralateral
- e. Sumbatan arteri vertebralis menyebabkan ataksia, vertigo, sakit kepala, muntah, disfungsi orofaring, deficit lapang pandang, dan gerakan mata abnormal
- f. Sumbatan arteri serebelum menyebabkan ataksia, muntah, sakit kepala, disartria, vertigo, kelemahan wajah pada sisi ipsilateral, serta tuli pada sisi ipsilateral
- g. Sumbatan arteri-arteri kecil (infark lakunar) menyebabkan defisit sensorimotor, ataksia, hemiparesis.

2.1.5 Jalur Persinyalan yang Terlibat dalam Patofisiologi Stroke

2.1.5.1 *Brain-derived Neurotrophic Factor* (BDNF)

Neurotrophin merupakan protein yang terdapat dalam jaringan otak dan berperan dalam *cell survival*, diferensiasi, pertumbuhan, regulasi sel saraf, dan berperan dalam fungsi belajar dan memori (Liu *et al.*, 2020). Neurotrophin pada mamalia diantaranya adalah *Brain-derived Neurotrophic Factor* (BDNF), *Nerve Growth Factor* (NGF), Neurotrophin 3, dan Neurotrophin 4- 5. Diantara berbagai jenis neurotrophin, BDNF paling banyak ditemukan pada sistem saraf pusat,



seperti hipokampus, korteks serebri, bulbus olfaktorius, hipotalamus, batang otak, dan tulang belakang (Bathina & Das, 2015; Liu *et al.*, 2020). Ekspresi BDNF pada neuron sel otak distimulasi oleh stroke akut, sehingga diketahui bahwa BDNF memiliki efek neuroprotektif pada berbagai kelainan neurodegeneratif dan trauma otak (Phillips, 2017; Pöyhönen *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020). Pada sel otot skelet, BDNF berperan dalam diferensiasi myoblast, regenerasi, dan metabolisme otot (Halievski *et al.*, 2020). Sedangkan pada mukosa intestine, BDNF berperan dalam meregulasi protein *tight-junction* yang berkaitan dengan fungsi *barrier* mukosa colon (Li *et al.*, 2018).

Brain-derived Neurotrophic Factor berkaitan dengan reseptor afinitas tinggi seperti *Tyrosine Kinase A* (TrkA), *Tyrosine Kinase B* (TrkB), *Tyrosine Kinase C* (TrkC), serta reseptor afinitas rendah p75^{NTR}. Ikatan neurotropin dan Trk menyebabkan pembentukan homodimer dan autofosforilasi reseptor tirosin domain kinase interseluler untuk selanjutnya mengaktifasi kaskade persinyalan melalui jalur *Ras-mitogen-activated protein kinase* (MAPK), *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K)-Akt, dan *phospholipase C-γ* (PLC-γ), berperan dalam produksi *cAMP-Response Element Binding* (CREB) dan *CREB Binding Protein* (CBP) yang mengkode protein yang berperan dalam *cell survival* (Bathina & Das, 2015; Liu *et al.*, 2020).

2.1.5.2 Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)

Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) merupakan anggota dari famili lipid kinase yang teraktivasi akibat fosforilasi grup 3-*hydroxyl* pada cincin inositol dari lipid *phosphatidylinositol* (PtdIns) pada plasma membran. Keterlibatan PI3K diantaranya adalah dalam proliferasi, diferensiasi, mobilitas sel, dan *cell survival*. PI3K terbagi menjadi tiga sub tipe berdasarkan struktur dan spesifisitas substratnya, yaitu PI3K kelas I, kelas II, dan kelas III (Shi *et al.*, 2019). Dari ketiga



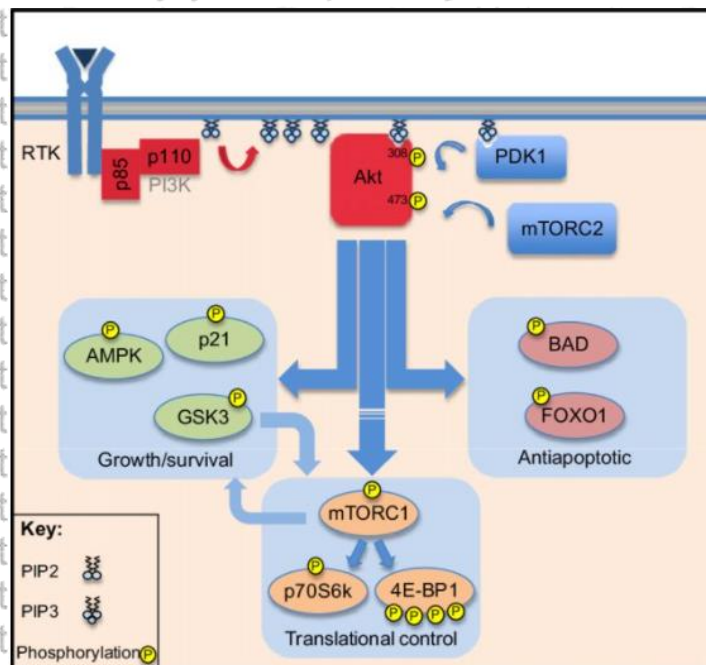
struktur, yang paling sering dipelajari adalah PI3K kelas I. Selanjutnya, PI3K kelas I terbagi menjadi kelas IA dan IB, kelas IA yang diaktivasi oleh reseptor tirosin kinase (RTK), G protein-coupled receptor, dan *small G protein RAS*. Sedangkan, PI3K kelas IB hanya diaktivasi oleh G *protein-coupled receptor*. PI3K kelas I terdiri dari p85 α , p85 β , dan p85 γ , p55 α , p55 γ , p50 α , p101 dan p87 yang merupakan subunit regulator, dan p110 α , p110 β , p110 δ , dan p110 γ yang merupakan subunit katalitik (Xu *et al.*, 2020)

Subunit p110 katalitik dari PI3K kelas IA terdiri dari N-terminal p85-*binding domain*, Ras *binding domain*, *proline-rich region*, *homolog regio* (HR) C-terminal (HR)3, regio HR2, dan regio C-terminal HR1. Regio HR3, HR2 dan HR1 merupakan HR PI3K yang berperan dalam *membrane binding*, presentasi substrat dan domain kinase, serta *catalytic inositol lipid 3-hydroxy-phosphorylated*. Sedangkan subunit regulator p85 terdiri dari domain SH3, RHO-*binding domain*, C-terminal SH2 domain dan *connecting region*. Struktur PI3K kelas 2 terdiri dari isoform katalitik yang memiliki *proline-rich region*, Ras *binding domain*, dan C2 domain. PI3K kelas II mengkatalisis produksi PIP3 dari PI dan PIP2. Sedangkan PI3K kelas III hanya memiliki Vps34 sebagai heterodimer yang tersusun atas subunit regulator p150 dan subunit katalitik p100 *myristoyl-flower*, fungsinya untuk memfosforilasi PI menjadi PIP3 (Shi *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2020).

Regulasi jalur PIP3 terjadi melalui interaksi spesifik dengan domain *pleckstrin homology* (PH) yang mengandung protein Akt, dimana Akt merupakan mediator utama dari jalur persinyalan PI3K/Akt. Dalam keadaan normal, PI3K teraktivasi akibat adanya sinyal ekstraseluler pada kondisi fisiologis, seperti *growth factor*, sitokin, dan hormon (Shi *et al.*, 2019). Stimulasi menyebabkan *growth factor* berikatan dengan RTK transmembran pada domain ekstraseluler dari N-terminal. Akibatnya, terjadi fosforilasi tirosin pada reseptor permukaan sel, yaitu subunit regulator p85 pada domain SH2 dan SH3. Subunit p85 kemudian berikatan



dengan reseptor tirosin pada membran sel. Ikatan ini mengaktifasi p110 yang kemudian mengkatalisis konversi *phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate* (PIP2) menjadi *phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate* (PIP3) dan PIP3 meregulasi berbagai jalur persinyalan dibawahnya yang berperan dalam pertumbuhan, diferensiasi, dan kelangsungan hidup sel, transport glukosa, serta metabolisme sel (Zhang *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2020). *Feedback* negatif pada jalur persinyalan PI3K/Akt diantaranya adalah *phosphatase and tensin homologue* (PTEN) yang merupakan lipid fosfatase dan bekerja dengan menghidrolisis PIP3 menjadi PIP2 pada jalur persinyalan PI3K/Akt (Xu *et al.*, 2020).



Gambar 2.1. Jalur Persinyalan PI3K

Sumber: *The PI3K/AKT Pathway in Virus Replication and Pathogenesis* (2020)

Keadaan hipoksia memicu tubuh untuk menjalankan mekanisme untuk melindungi jantung dan neuron supaya tidak mengalami kekurangan oksigen.

Salah satu mekanisme protektif yang terjadi adalah melalui aktivasi RTK yang kemudian memicu *upregulasi* protein HIF-1 α dan melalui jalur persinyalan *Growth factor/PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 α* yang kemudian mengaktifasi gen target yang



memicu transport oksigen melalui ekspresi protein *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dan *Erythropoietin* (EPO) yang menginduksi angiogenesis, eritropoiesis, pertumbuhan akson, dan percabangan sel dendrit. Selain itu, HIF-1 menghambat terjadinya apoptosis dengan menghambat keluarnya sitokrom C, menghambat aktivasi caspase, serta menghambat aktivasi p53. Mekanisme proteksi ini terjadi melalui jalur persinyalan PI3K/Akt, dan memerlukan p110 α (Sun et al., 2013; Zhang et al., 2018).

2.1.5.3 *Prolyl hydroxylase* (PHD)

Prolyl hydroxylase (PHD) merupakan enzim yang berkaitan dengan *pro-collagen prolyl hydroxylase* dan merupakan bagian dari subfamily *2-oxoglutarate (2-OG)-dependent oxygenase* (2OG oksigenase) yang berperan dalam merespon keadaan hipoksia. Pada manusia, terdapat 3 tipe PHD, yaitu PHD 1, PHD2, dan PHD3 (Frost et al., 2021). Ketiga PHD terkait dengan ketersediaan oksigen seluler dan kadar *Hypoxia Inducible Factor* (HIF). Ekspresi mRNA pada isoform PHD menunjukkan bahwa PHD2 diekspresikan hampir pada seluruh bagian tubuh, sedangkan PHD1 banyak diekspresikan di testis, dan PHD 3 pada jantung. Distribusi intraseluler PHD juga bervariasi, PHD2 terekspresi pada sitoplasma, PHD1 pada nucleus, dan PHD 3 dapat terekspresi pada sitoplasma maupun nukleus (Wilkins et al., 2016). Struktur PHD2 banyak dipelajari dan diketahui bahwa PHD2 terdiri atas domain C-terminus dan N-terminus. Domain C-terminus merupakan domain katalitik dengan struktur *double-stranded β -helix*. Sedangkan, domain N-terminus mengandung domain *Myeloid-Nervy* dan DEAF-1 (MYND) yang berperan dalam fungsi fisiologis mamalia (Lippl et al., 2018)

Prolyl hydroxylase diketahui mampu menghidroksilasi residu Proline pada HIF- α , secara spesifik, PHD2 aktif menghidroksilasi HIF-1 α , sedangkan PHD1 dan PHD3 lebih aktif menghidroksilasi HIF-2 α . *Prolyl hydroxylase 2* (PHD2) diketahui



mengandung *hypoxia-response element* (HRE) yang mampu dikenali HIF-1 α , sedangkan PHD3 mengandung HRE yang mampu dikenali oleh HIF-2 α (Fan et al., 2014). Aktivitas hidroksilasi PHD bergantung terhadap ketersediaan oksigen, besi Fe(II), α -ketoglutarate (2-oxaloglutarate; 2-OG), dan asam askorbat atau vitamin C. *Prolyl hydroxylase* menggunakan satu atom oksigen dari O₂ selama dekarboksilasi oksidatif 2-OG. Tanpa oksigen, 2-OG, dan besi yang cukup dalam sel, PHD tidak mampu menghidroksilasi subunit HIF- α dan menandai untuk dilakukan degradasi (Strowitzki et al., 2019). *Prolyl hydroxylase* akan membentuk struktur yang stabil saat berikatan dengan Fe(II) dan 2OG oksigenase. 2OG oksigenase kemudian mengkatalisis hidroksilasi *asparaginyl* pada domain CTAD sehingga terjadi inhibisi interaksi HIF dan koaktivator transkripsi, yaitu p300/CBP (Lippl et al., 2018).

Penelitian pada hewan coba dengan penghapusan gen PHD menunjukkan bahwa PHD2 merupakan isoform paling penting dalam mekanisme stabilisasi HIF-1 α dan memiliki respon yang sensitif terhadap keadaan hipoksia, hal ini dibuktikan dengan kematian tikus yang mengalami penghapusan gen PHD1, sedangkan tikus yang mengalami penghapusan PHD2 dan PHD3 tetap mampu bertahan hidup hingga usia dewasa. Peningkatan kadar PHD2 dan PHD3 terjadi akibat ekspresi HIF pada keadaan hipoksia, menimbulkan efek *feedback* negatif sejalan dengan penurunan kadar HIF setelah terjadi reoksigenasi (Wilkins et al., 2016).

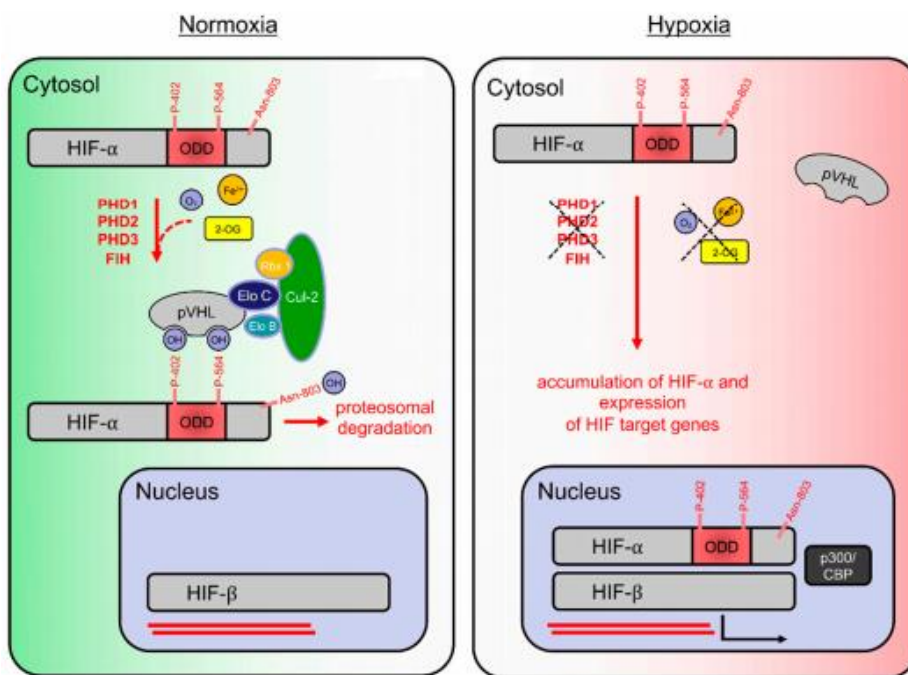
2.1.5.4 Hypoxia-Inducible Factor (HIF)

Hypoxia-Inducible Factor (HIF) merupakan protein yang sensitif terhadap oksigen dan berperan dalam mempertahankan homeostasis oksigen (Wilkins et al., 2016). *Hypoxia-Inducible Factor* tersusun atas heterodimer HIF- α yang terdiri dari tiga isoform yang dikode oleh gen yang berbeda, yaitu HIF-1 α , HIF-2 α , dan HIF-3 α dan HIF-1 β (Fan et al., 2014; Kietzmann et al., 2016). HIF-1 α dan HIF-2 α



merupakan subunit yang paling banyak dipelajari, diketahui kedua subunit ini memiliki struktur dan fungsi yang hampir mirip, namun memiliki beberapa perbedaan ekspresi pada beberapa tipe sel. Sedangkan pada HIF-3 α , masih sedikit penelitian mengenai subunit HIF-3 α , namun telah diketahui fungsinya sebagai *negative regulator* pada respon terhadap hipoksia (Kietzmann et al., 2016).

Gen HIF-1 α terletak pada kromosom 14q21-24, sedangkan gen HIF-1 β terletak pada kromosom 1q21, dan terekspresi secara stabil. Kedua subunit ini memiliki domain transaktivasi yang terletak pada NH₂ *terminal activation domain* (N-TAD) dan COOH *terminal activation domain* (C-TAD) (Xie et al., 2018). C-TAD memiliki dua domain transaktivasi, yaitu TAD-N dan TAD-C dan domain inhibisi yang terletak diantara kedua domain transaktivasi. C-TAD akan berinteraksi dengan p300/CBP, yaitu ko-aktivator untuk memicu transkripsi gen jika terjadi hipoksia. Sementara N-TAD berperan dalam stabilisasi HIF-1 α dalam proses degradasi pada saat normoksia. Subunit HIF-1 α memiliki domain untuk mendegradasi dirinya sendiri dalam keadaan normoksia, yang disebut dengan *oxygen-dependent degradation domain* (ODDD), yang kaya dengan asam amino *proline-serine-threonine* dan berperan dalam memediasi stabilitas regulasi oksigen (Strowitzki et al., 2019). Tidak seperti kedua isoform lainnya, HIF-3 α tidak memiliki *C-terminal domain*, namun memiliki *leucine zipper C-terminal domain* (Kietzmann et al., 2016).



Gambar 2.2. Pathway HIF pada Keadaan Normoksia dan Hipoksia

Sumber: Protein Hydroxylation by Hypoxia-Inducible Factor (HIF) Hydroxylases: Unique or Ubiquitous? (2019)

Dari ketiga isoform HIF, HIF-1 α berperan pada respon cepat terhadap kondisi hipoksia, HIF-2 α berperan dalam respon terhadap hipoksia kronis, dan HIF-3 α berperan dalam mekanisme *feedback* negatif. Regulasi HIF-1 α oleh berbagai faktor pertumbuhan dan *upstream cellular signaling pathway*. Ekspresi HIF-1 α dimediasi oleh jalur PI3K dan MAPK, pada jalur ini terjadi fosforilasi 4E-binding protein-1 (4EBP1) dan ribosomal S6 kinase (S6K), dimana kedua protein ini merupakan faktor penting dalam proses translasi protein HIF-1 α (Masoud & Li, 2015; Xie *et al.*, 2018)

2.1.5.5 Mekanisme Regulasi HIF-1

Protein HIF-1 α secara terus menerus ditranskripsi, translasi dan disintesis untuk mempertahankan keseimbangan sintesis dan dekomposisinya pada keadaan normoksia. Pada keadaan normoksia, dimana ketersediaan oksigen sama dengan atau lebih banyak dari kebutuhan, maka HIF- α akan didegradasi



dalam waktu yang cepat melalui mekanisme ubiquitinasi. Mekanisme yang terjadi adalah Fe(II) dan 2OG-oxygenase mengkatalisis aktivitas *Prolyl-4-hydroxylase* dalam menghidroksilasi subunit HIF- α pada salah satu atau kedua residu proline, HIF1- α pada Pro402 dan Pro564, HIF-2 α pada Pro405 dan Pro531. Hidroksilasi ini menyebabkan terjadinya ikatan HIF- α dengan kompleks protein *Von-Hippel Lindau* (pVHL) yang tersusun atas elongin B, elongin C, *Cullin box 2* (Cul2), dan *RING box protein 1* (Rbx1). Ikatan HIF- α dengan pVHL memicu pengenalan kompleks dengan E3 ubiquitin ligase, dibantu dengan dan menyebabkan degradasi HIF- α melalui *ubiquitin proteasome degradation pathway* (Chowdhury et al., 2016; Frost et al., 2021).

Sedangkan dalam keadaan hipoksia, dimana kebutuhan oksigen lebih banyak daripada ketersediaan, stabilitas dan transkripsi HIF-1 α meningkat akibat regulasi *factor inhibiting* HIF-1 (FIH1) dan *prolyl hydroxylase* (Lippl et al., 2018).

Aktivitas PHD untuk menghidroksilasi protein HIF-1 α akan berkurang atau bahkan menghilang, hal ini menyebabkan kegagalan ikatan HIF-1 α dengan pVHL. Protein HIF-1 α akan terakumulasi dan kemudian bertranslokasi menuju nukleus, membentuk heterodimer dengan berikatan dengan HIF-1 β dan membentuk kompleks HIF. Selanjutnya kompleks HIF akan berinteraksi dengan ko-aktivator transkripsi p300/CPB dan membentuk kompleks transkripsi. Selanjutnya, kompleks transkripsi akan berikatan dengan *Hypoxia-response Elements* (HRE) pada sekuens DNA 5'-G/ACGTG-3' pada promotor gen *hypoxia-response* dan memicu transkripsi gen *hypoxia-response* untuk kemudian meregulasi respon adaptif terhadap hipoksia. Aktivasi transkripsi menyebabkan upregulasi dari berbagai gen yang mengkode eritropoiesis, angiogenesis, proliferasi, diferensiasi, inflamasi, metabolisme, dan apoptosis sel (Chowdhury et al., 2016; Fan et al., 2014; Herawati et al., 2017; Yu et al., 2017).



2.1.6 Tatalaksana

Terapi stroke iskemik terutama pada waktu awal terjadinya onset merupakan kesempatan dalam untuk menyelamatkan penumbra, yaitu area di sekitar inti iskemik yang mengalami hipoperfusi. Tujuan penyelamatan penumbra adalah untuk mencegah kecacatan permanen akibat kematian sel otak dengan mengembalikan perfusi darah pada area tersebut. Penatalaksanaan umum adalah dengan stabilisasi jalan nafas, pernafasan, dan hemodinamik. Pemeriksaan fisik seperti pemeriksaan tekanan darah, jantung, dan pemeriksaan neurologi yang meliputi kesadaran dan fungsi anggota tubuh untuk menentukan keparahan hemiparesis. Selain itu tekanan intra kranial, suhu tubuh, kadar glukosa darah juga perlu dimonitor (Perhimpunan Dokter Spesialis Saraf Indonesia, 2011). Terapi trombolisis intravena menggunakan *recombinant Tissue Plasminogen Activator* (rTPA) masih menjadi satu-satunya terapi farmakologis yang disetujui *Food and*

Drug Administration di Amerika Serikat. Tujuan dari terapi ini adalah untuk membatasi cedera saraf sekunder dan memicu terjadinya revaskularisasi pada area iskemik, sehingga mampu menurunkan kemungkinan terjadinya kecacatan dan bahkan kematian. Salah satu contoh obat yang digunakan adalah alteplase. Mekanisme kerja alteplase adalah dengan memecah plasminogen menjadi plasmin, mendegradasi fibrin, dan melarutkan thrombus (Campbell *et al.*, 2019).

Sayangnya, rTPA hanya bisa diberikan dalam celah waktu yang sempit, yaitu <4,5 jam dari awal onset. Hal ini diakibatkan oleh inaktivasi plasmin oleh antiplasmin, sehingga plasmin memiliki paruh waktu yang pendek diluar thrombus. Jika pasien datang setelah lebih dari 4,5 jam, maka dilakukan trombektomi endovaskuler.

Obat-obatan lain yang diberikan adalah antikoagulan untuk mencegah terjadinya kembali stroke emboli, sayangnya pemberian heparin mampu meningkatkan risiko perdarahan. Pemberian antiplatelet seperti aspirin juga berguna untuk mencegah terjadinya stroke kembali (Powers *et al.*, 2019). Pemberian antihipertensi



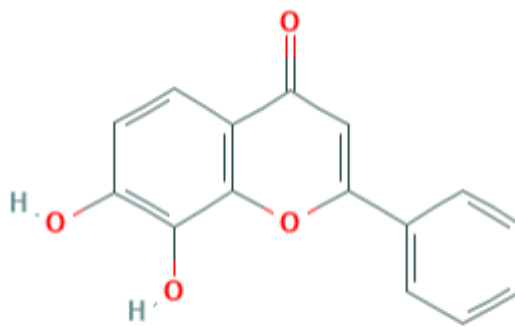
diperlukan untuk menormalkan kembali tekanan darah, namun pemberian antihipertensi tidak menjadi prioritas awal pada 24 jam pertama karena dinilai mampu membantu memperbaiki perfusi darah ke jaringan iskemik. Pemberian neuroprotektan juga diperlukan untuk mencegah perluasan infark pada penumbra iskemik, tidak bertujuan untuk memperbaiki reperfusi jaringan. Agen neuroprotektan yang umum digunakan saat ini adalah sitikolin dan serebrolisin (Mehta *et al.*, 2019).

2.2 Senyawa 7,8-Dihydroxyflavone

Senyawa 7,8-Dihydroxyflavone (7,8-DHF) merupakan sintesis flavonoid yang utamanya dijumpai sebagai metabolit sekunder dari tanaman *Godmania aesculifolia*, *Tridax procumbens*, dan daun primula (Du & Hill, 2015). Flavonoid menunjukkan berbagai efek biologis dan berperan sebagai antioksidan, anti inflamasi, anti kanker, dan neurotropik yang mampu melindungi sistem saraf pusat karena mampu menembus sawar darah otak (Liu *et al.*, 2016).

2.2.1 Struktur dan Karakteristik 7,8-Dihydroxyflavone

Flavonoid merupakan golongan senyawa polifenol yang mengandung inti flavan dan dua cincin benzena yang terhubung oleh cincin heterosiklik tiga atom karbon (Gambar 2.3). Flavonoid terdiri dari senyawa flavon, flavonol, flavanone, flavanonol, flavans, antosianidin, dan isoflavonoid. Struktur 5,7-dihidroksilasi biasanya ditemukan pada cincin A, sedangkan cincin 7-hidroksi umumnya ditemukan pada sub kelompok isoflavonoid. Cincin B pada umumnya memiliki pola 4', 3', 4'- atau 3'4'5'-hidroksilasi. Senyawa 7,8-DHF merupakan flavonoid langka yang mengalami kekurangan oksigenasi pada cincin B (Liu *et al.*, 2016).



Gambar 2.3 Struktur 7,8 -Dihydroxyflavone

Sumber: PubChem Compound Summary for CID 1880, 7,8-Dihydroxyflavone (2020)

2.2.2 Aktivitas Biologis 7,8-Dihydroxyflavone

Senyawa 7,8 DHF mampu bekerja menyerupai BDNF dengan berikatan dengan reseptor *tropomyosin-related kinase B* (TrkB). Ikatan BDNF dan TrkB memicu dimerisasi dan autofosforilasi yang kemudian mengaktifasi berbagai jalur persinyalan seperti PI3K/Akt, MAPK/ERK, dan Fosfolipase C- γ (Wang *et al.*, 2019). Aktivasi berbagai jalur ini menyebabkan peningkatan kerja protein anti-apoptosis, seperti Bcl-2 dan inhibisi faktor proapoptosis, seperti Bax dan Bad, aktivasi faktor transkripsi CREB yang berperan dalam regulasi berbagai gen yang berkaitan dengan kognisi. Kaskade persinyalan yang terjadi mirip dengan persinyalan yang dihasilkan oleh ikatan BDNF dan reseptor TrkB (Du & Hill, 2015).

Peran 7,8-DHF sebagai neurotropik adalah meningkatkan fungsi kognitif dengan melindungi neuron yang rentan, meningkatkan fungsi neuron, dan merangsang regenerasi neuron. Aktivasi TrkB memberikan efek neuroprotektif dengan menunjukkan kemampuan sel dendrit mencapai sinaps untuk memperbaiki komunikasi antar neuron pada tikus model Alzheimer (Liu *et al.*, 2016). Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa senyawa 7,8-DHF mengurangi kerusakan otak dan menghambat kematian sel akibat iskemia dengan



mengaktivasi reseptor TrkB. Senyawa ini juga mampu menghambat pembentukan hidrogen peroksida yang berperan dalam stress oksidatif pada sel endotel (Wang *et al.*, 2015)

Administrasi 7,8-DHF per oral memberikan efek aktivasi TrkB pada sel neuron jaringan otak secara kuat, hasil ini menunjukkan bahwa senyawa 7,8-DHF memiliki bioavailabilitas oral yang baik. 7,8-DHF berikatan secara spesifik dengan reseptor TrkB pada domain ekstraselular dengan ikatan konstan $K_d=320$ nM dan bekerja sebagai agonis TrkB selektif dan menyerupai aktivitas fisiologis BDNF. Mirip dengan BDNF, 7,8-DHF menginduksi fosforilasi TrkB pada Tyr515, Tyr706, dan Tyr816 walaupun fosforilasi Tyr515 dan Tyr816 oleh 7,8-DHF tidak sekuat jika diinduksi oleh BDNF. Fosforilasi ini kemudian memicu aktivasi kaskade persinyalan MAPK, PI3K/Akt, dan ERK1/2 (Emili *et al.*, 2020).

2.2.3 Farmakokinetik 7,8-Dihydroxyflavone

Analisis Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, Eksresi, dan Toksisitas (ADMET) menunjukkan bahwa administrasi 5 mg/kgBB senyawa 7,8-DHF mencapai konsentrasi puncaknya setelah 10 menit, diketahui konsentrasi tertinggi sebesar 70 ng/ml pada plasma dan 50 ng/g pada otak. Senyawa 7,8-DHF masih dapat terdeteksi pada plasma setelah 8 jam pasca administrasi dengan konsentrasi 5 ng/ml (Nie *et al.*, 2019). Senyawa 7,8-DHF stabil dalam liver dan mampu menembus sawar darah otak. Metabolisme 7,8-DHF terjadi pada pada traktus gastrointestinal melalui glukoronidasi, sulfasi, dan metilasi 7,8-DHF menyebabkan distribusi pada sirkulasi hanya sedikit. Waktu paruh 7,8-DHF pada plasma hewan coba monyet sekitar 4-8 jam, mudah diekskresikan, serta tidak menyebabkan toksisitas. Pemberian 7,8-DHF dalam jangka panjang (7 bulan) dengan dosis 30 mg/kgBB/hari tidak menunjukkan adanya efek toksik, hal ini karena senyawa flavonoid cenderung memiliki toksisitas yang rendah



dibandingkan dengan bahan aktif lain dari tumbuhan, sehingga dinilai aman jika dikonsumsi oleh hewan dan bahkan manusia (Liu *et al.*, 2016).

2.2.4 Farmakodinamik 7,8-Dihydroxyflavone

Senyawa 7,8-DHF memicu aktivasi TrkB pada 2 jam awal setelah administrasi dan efek stimulasinya masih bertahan hingga 4 jam pada otak tikus. Metabolit hasil metilasi 7,8-DHF masih aktif memicu aktivasi TrkB pada neuron tikus karena stabilitasnya yang tinggi dan meningkatkan transport membran yang memicu absorpsi serta peningkatan bioavailabilitas oral. Pemberian 7,8 DHF pada mencit dengan dosis 5mg/kgBB selama 3 minggu tidak mengakibatkan kelainan patologis pada organ ginjal, hati, paru-paru, otot, limpa, jantung, korteks, hipokampus, usus dan testis. Penelitian jangka panjang dengan memberikan 7,8-DHF dengan dosis 2,4 µg selama 20 minggu menunjukkan tidak ada kelainan pada hitung darah lengkap (Liu *et al.*, 2016; Nie *et al.*, 2019). Penelitian oleh Huang *et al.* (2018) membuktikan bahwa senyawa 7,8-DHF dapat mengaktifasi TrkB dengan memicu konversi dan proliferasi sel retina dari *inner nuclear layer* menjadi sel *Muller glia*, sel bipolar, dan neuron retina. Aktivasi jalur MAPK/ERK yang diinduksi TrkB berperan dalam proteksi neuron dan proses regenerasi pada retina imatur yang iskemik (Huang *et al.*, 2018).

2.3 Metode *In Silico*

2.3.1 Definisi

Studi *in silico* merupakan teknik eksperimental dengan melakukan pemodelan dan simulasi melalui komputer untuk mengidentifikasi peran suatu struktur dalam kondisi fisiologis maupun patologis yang berkaitan dengan penemuan dan pengembangan obat baru. Metode *in silico* digunakan untuk mengidentifikasi ligan yang memiliki potensi ikatan dengan target reseptor,



mengetahui mekanisme kerja suatu obat, mengidentifikasi efek samping yang mungkin muncul dan mengetahui interaksi yang terjadi antar molekul (Ferreira *et al.*, 2015; Viceconti *et al.*, 2020).

Tujuan penelitian dengan metode *in silico* adalah untuk mendukung penelitian klinis melalui mekanisme detail yang tidak mungkin dilakukan dengan metode yang lain. Metode ini dilakukan dengan membuat model manusia dan mensimulasikan suatu bahan uji dengan reseptor sebagai kandidat obat secara virtual. Pemodelan dilakukan dengan berbagai tujuan, diantaranya adalah (Viceconti *et al.*, 2020)

- a. Mengurangi penggunaan, kesakitan dan penderitaan, serta menggantikan hewan coba dalam penelitian eksperimental
- b. Membantu memprediksi aktivitas senyawa dengan memvisualisasikan mekanisme kandidat obat terhadap targetnya dan melakukan optimasi guna mendapat hasil yang paling baik
- c. Membangun database biokimia terkait dengan efek penambatan ligan tertentu pada target untuk mengidentifikasi dan mengoptimalkan fungsi obat baru
- d. Prediksi dan pengetahuan baru tentang cara kerja obat dan mekanisme yang mendasari terjadinya efek samping untuk membantu mengurangi biaya pengembangan obat.
- e. Mengetahui sifat farmakokinetik senyawa sebelum skrining untuk memungkinkan deteksi dini senyawa yang lebih mungkin gagal dalam tahap klinis dan selanjutnya untuk meningkatkan deteksi senyawa yang menjanjikan. Memperbaiki uji klinis melalui informasi yang lebih jelas dan rinci tentang hasil potensial dan mampu menjelaskan efek samping yang mungkin muncul, memprediksi efek jangka panjang yang tidak diketahui dari uji klinis.



2.3.2 Molecular Docking

Molecular docking merupakan metode yang dilakukan untuk memvisualisasikan interaksi ligan pada *binding site* reseptor target. Reseptor target umumnya berupa makromolekul protein. Analisis *molecular docking* dilakukan untuk mengevaluasi ketepatan ikatan ligan pada target, mengidentifikasi komponen yang berikatan dengan target secara efisien, serta memprediksi kestabilan ikatan ligan dan reseptor melalui hasil *binding affinity* (Ferreira *et al.*, 2015; Shivanika *et al.*, 2020). *Molecular docking* dapat dibagi menjadi tiga tipe, yaitu (Tao *et al.*, 2020).

a. Rigid docking

Merupakan metode *docking* yang tanpa merubah konformasi dari ligan maupun reseptor. Umumnya digunakan pada penambatan antar protein atau protein dengan asam nukleat.

b. Semi-flexible docking

Proses penambatan molekul pada metode ini melibatkan reseptor yang tidak diubah konformasinya, namun konformasi dari ligan dirubah untuk memperbaiki struktur ligan. Umumnya, metode ini digunakan untuk penambatan molekul kecil dengan makromolekul. Dengan metode ini, maka perlu memperhitungkan pengaruh perubahan pada struktur ligan.

c. Flexible docking

Pada metode *flexible docking*, peneliti dapat memodifikasi ligan maupun reseptor sesuai dengan kebutuhan. Umumnya, metode ini digunakan untuk mengetahui interaksi antara molekul yang ditambatkan.



2.3.3 Perangkat Lunak

Penambatan molekul ligan dan reseptor memerlukan beberapa situs dan *software* pendukung, diantaranya adalah

1. PASS Online

Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS) adalah sebuah situs yang didesain sebagai alat untuk memprediksi potensi biologis dari suatu molekul organik yang mirip dengan obat. PASS mampu memprediksi berbagai aktivitas biologis secara simultan berdasar struktur senyawa sebelum dilakukan sintesis secara kimiawi dan pengujian biologis untuk menjadi obat (Druzhilovskiy *et al.*, 2017). Hasil dari PASS menunjukkan aktivitas biologi pada suatu senyawa berkemungkinan aktif atau *Probable Activity* (pa) dan tidak aktif atau *Probable Inactivity* (pi). Jumlah pa dan pi \neq 1 dengan nilai pa dan pi beragam, dalam rentang dari 0,000-1,000.

Interpretasi dari PASS adalah sebagai berikut (Chinnasamy & Arumugam, 2018; Kumarachari *et al.*, 2016):

- Senyawa dengan aktivitas biologis baik ditandai dengan nilai pa yang lebih besar dibandingkan pi
- Senyawa dengan aktivitas biologis yang mirip dengan obat yang telah beredar memiliki nilai pa $>0,7$, dan
- Senyawa dengan nilai pa $<0,5$ mungkin merupakan senyawa kimia baru karena memiliki aktivitas biologis yang rendah

2. Pre-ADMET Online

Pre ADMET adalah situs yang diakses secara online dan berguna dalam memprediksi kemiripan suatu senyawa dengan obat yang ditinjau dari sifat kimia maupun fisika dari suatu senyawa. Selain itu, PreADMET juga digunakan untuk memprediksi data absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi serta toksisitas suatu senyawa. (Shin *et al.*, 2016).



3. *Lipinski Rule of Five*

Prediksi kemiripan obat dengan senyawa kimia tertentu dilakukan pada situs *Lipinski Rule of Five*. Hasil prediksi menunjukkan ada atau tidaknya kemiripan aktivitas biologis tertentu antara senyawa kimia tertentu dan obat saat diberikan secara oral. Senyawa kimia harus memenuhi minimal 2 aturan untuk bisa diberikan secara oral. Syarat yang harus dipenuhi yaitu (Ge and Li, 2019; Huang *et al.*, 2019; Shivanika *et al.*, 2020):

- a. Berat molekul <500 Dalton
- b. Lipofilisitas tinggi, yang dinyatakan dengan $\text{LogP} < 5$
- c. Donor ikatan hidrogen <5, dan
- d. Akseptor ikatan hidrogen <10

Lebih lanjut penelitian Huang *et al.*, (2019) mengemukakan dua kondisi lain, yaitu luas permukaan kutub $\leq 140 \text{ \AA}^2$ dan ikatan yang dapat diputar berjumlah <10. Hal ini berkaitan dengan permeabilitas dan fleksibilitas obat. Jika suatu senyawa memenuhi lima prinsip, maka akan meningkatkan sifat farmakokinetik dan bioavailabilitas dalam proses metabolisme organisme (Chen *et al.*, 2020).

Lipinski Rule of Five dimanfaatkan dalam (Shivanika *et al.*, 2020)

- a. Memprediksi tingkat keberhasilan dan menentukan apakah suatu komponen layak sebagai kandidat obat.
- b. Melakukan screening awal pada molekul kecil, mengeliminasi kandidat molekul yang tidak memenuhi aturan, mempersempit ruang lingkup screening obat, dan menghemat biaya penelitian serta pengembangan obat.
- c. Menjadikan *Lipinski Rule of Five* sebagai standar untuk sintesis senyawa dalam menyusun database obat, dan
- d. Memberi panduan untuk pemilihan obat dalam praktik klinis.



4. BIOVIA *Discovery Studio Visualizer*

BIOVIA *Discovery Studio Visualizer* adalah *software* yang bermanfaat dalam visualisasi molekul dan target guna mengamati sifat-sifat fisika maupun kimia dari molekul (Shivanika *et al.*, 2020).

5. PyRx

PyRx adalah perangkat lunak yang digunakan untuk *screening* penemuan obat baru melalui metode komputasi dengan melakukan *screening* berbagai senyawa terhadap target obat yang potensial. Dalam *software* Pyrx terdapat *software* lain, diantaranya adalah *Autodock Vina* yang digunakan untuk menambatkan ligan dan protein target dengan menentukan sendiri *grid box* agar sesuai dengan sisi aktif reseptor.

Autodock Vina digunakan karena memiliki kecepatan dan akurasi tinggi dalam memprediksi ikatan serta melakukan kalkulasi energi ikatan yang terbentuk. Selain itu, *software* OpenBabel yang digunakan untuk meminimalisir energi dari suatu senyawa yang akan digunakan sebagai ligan dalam *molecular docking* (Kulkarni *et al.*, 2020).

6. Pymol

PyMOL adalah *software* yang digunakan sebagai alat untuk memvisualisasi molekul secara 3D. PyMOL berfungsi dalam menganalisis makromolekul, melakukan pemodelan homologi, mengikatkan protein dan ligan, mengidentifikasi susunan 3D suatu atom dalam molekul obat dan memprediksi letak ikatan dengan reseptor tertentu, melakukan *screening* secara virtual, dan simulasi dinamika molekuler. Fitur-fitur yang tersedia ini memungkinkan untuk melakukan desain obat secara komputasi (Yuan *et al.*, 2017).



2.3.4 Interaksi ligan dan protein reseptor

Interaksi yang terjadi akibat penambatan ligan pada reseptor target terjadi untuk menjalankan fungsi biologis, seperti persinyalan, menghasilkan suatu produk, dan lain-lain. Interaksi antara ligan dan reseptor terjadi akibat adanya ikatan, diantara ikatan-ikatan yang terbentuk adalah:

1. Ikatan kovalen

Ikatan kovalen terbentuk akibat adanya pasangan elektron bebas yang digunakan bersama oleh atom pada ligan dan atom pada reseptor yang berikatan. Umumnya, katan kovalen terbentuk dari unsur-unsur non logam yang sejenis, misalnya H_2 , N_2 , O_2 , Cl_2 , F_2 , Br_2 , I_2 . Namun, ikatan kovalen juga dapat terbentuk dari unsur yang tidak sejenis seperti molekul karbon dioksida (CO_2), air (H_2O), dan lain-lain. Terbentuknya ikatan kovalen dalam interaksi ligan dan reseptor menyebabkan kompleks ligan menjadi stabil dan berpengaruh terhadap farmakokinetik senyawa ligan (Gilbert, 2017).

2. Ikatan ionik

Ikatan ionik terbentuk dari donor elektron antar atom, sehingga jumlah elektron pada tiap permukaan luar atom menjadi stabil (Gilbert, 2017). Hal ini menunjukkan bahwa ikatan antara anion dan kation melibatkan interaksi elektrostatik (Senami & Ito, 2020).

3. Ikatan hidrogen

Ikatan hidrogen terbentuk akibat interaksi elektrostatik antara atom hidrogen dan atom akseptor yang memiliki elektronegativitas lebih besar dari senyawa yang sama (Senami & Ito, 2020). Atom hidrogen sebagai donor umumnya mengandung gugus karboksil, hidroksil, amin, atau amida.

Sedangkan sebagai akseptor proton misanya oksigen dalam kelompok karboksil, eter, hidroksil, atau ataom hidroksil dan nitrogen dalam amina atau amida (Gilbert, 2017).



4. Ikatan Van der Waal's

Ikatan Van der Waal's sering dijumpai pada berbagai zat kimia, terutama gas. Ikatan Van der Waal's merupakan jenis ikatan lemah yang terjadi akibat daya tarik menarik antar molekul atom yang tidak memiliki muatan dengan letak yang berdekatan. Ikatan Van der Waal's terbentuk karena sifat kepolaran molekul atom (Klebe, 2013).

2.3.5 Sumber Informasi Database

1. PubChem

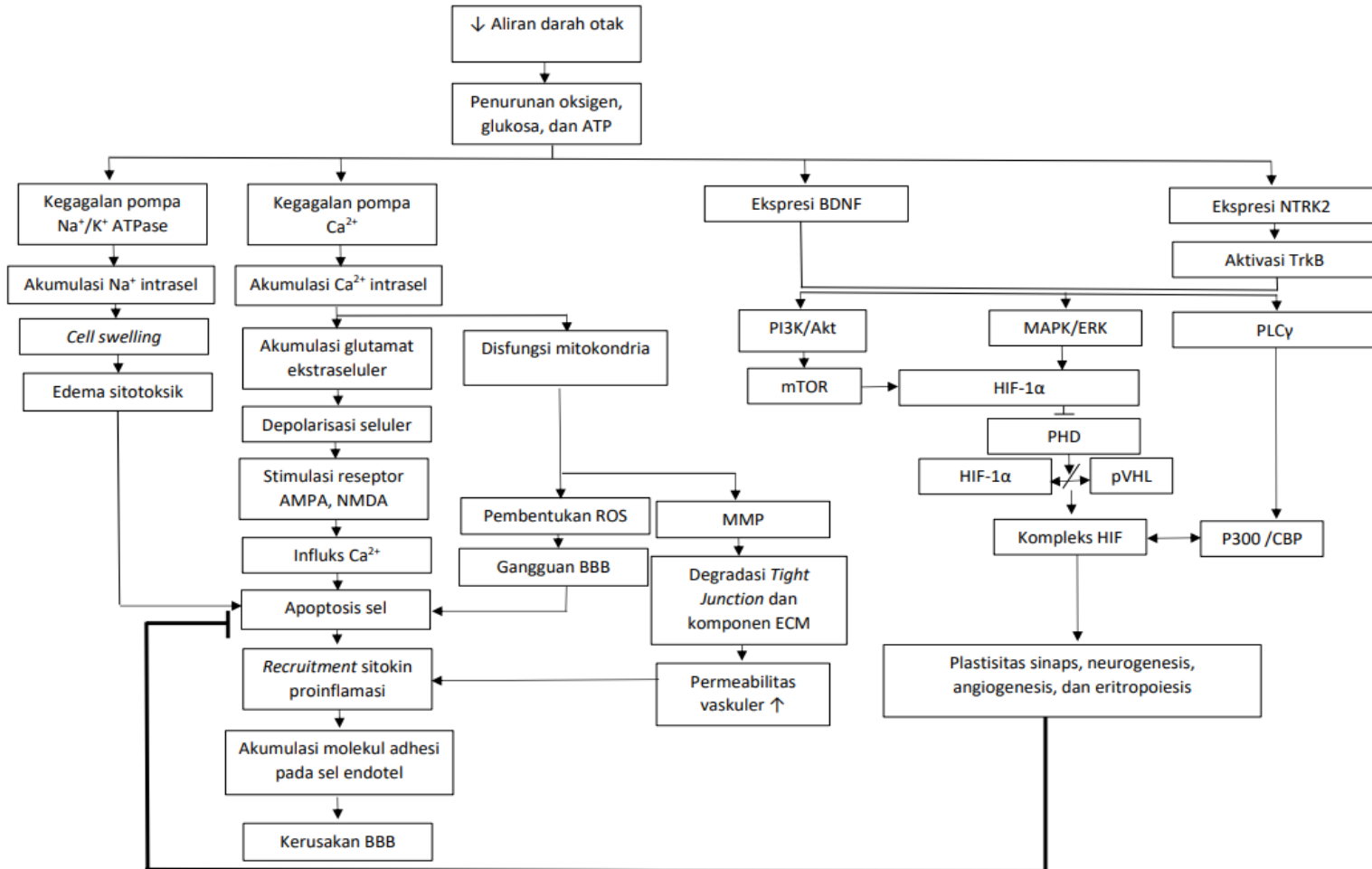
PubChem merupakan pusat informasi mengenai berbagai molekul, seperti nukleotida, karbohidrat, lemak, peptida, dan molekul kimia modifikasi.

Informasi mengenai struktur kimia, identifikasi, ciri fisik dan kimia, aktivitas biologis, keamanan dan toksisitas dari senyawa yang akan digunakan sebagai ligan bisa didapatkan melalui situs PubChem (Kim *et al.*, 2019).

2. Protein Data Bank

Protein Data Bank merupakan pusat informasi mengenai struktur 3D makromolekul biologi, mulai dari asam nukleat hingga protein kompleks. Struktur molekul didapat dan dikembangkan melalui penelitian yang menggunakan bahan berupa ragi, bakteri, lalat, hingga manusia. Struktur molekul yang didapatkan dari *Protein Data Bank* dapat digunakan sebagai reseptor pada proses *molecular docking* (Burley *et al.*, 2019).

2.4 Kerangka Teori

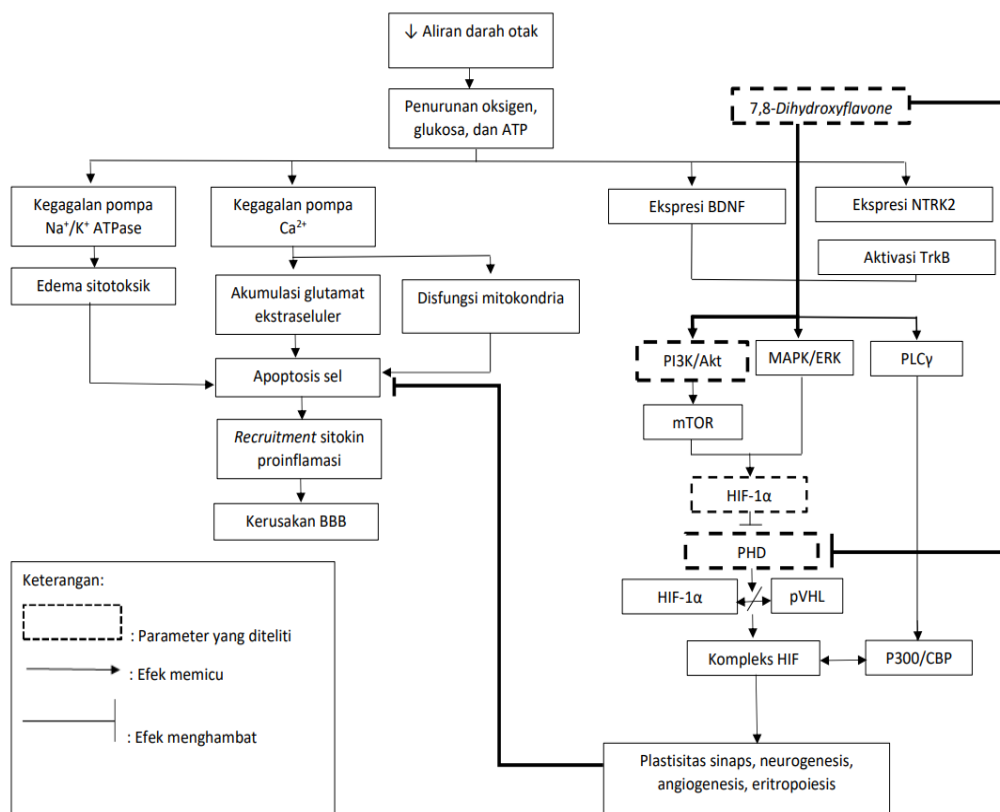




BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan:
 [Dashed box] : Parameter yang diteliti
 → : Efek memicu
 — : Efek menghambat

Keterangan

Penurunan aliran darah serebral akibat stroke iskemik menyebabkan aktivasi kaskade inflamasi yang menyebabkan kematian sel dan kerusakan sawar darah otak. *Brain Derived Neurothropic Factor* (BDNF) yang teraktivasi pada keadaan iskemia berikatan dengan *Tropomyosin kinase B* (TrkB) untuk memicu efek neuroproteksi dan mencegah apoptosis sel melalui jalur signaling MAPK/ERK, PI3K, dan PLCγ. Jumlah BDNF endogen akan semakin berkurang seiring dengan waktu iskemia yang



terjadi. Senyawa 7,8-DHF bekerja mirip dengan BDNF, 7,8-DHF akan berikatan dengan reseptor TrkB dan mengaktifasi jalur MAPK/ERK, PI3K, dan PLCy. Aktivasi jalur ini menyebabkan translasi protein HIF-1 α dan penurunan aktivitas enzim *prolyl hydroxylase* yang menyebabkan kegagalan ikatan protein HIF-1 α dengan protein von Hippel Lindau (VHL). Sehingga HIF-1 α akan membentuk dimer dengan HIF-1 β membentuk kompleks HIF, yang kemudian dengan bantuan ko-aktivator p300/CBP akan mengaktifkan faktor transkripsi untuk memperbaiki keadaan hipoksia dengan mekanisme reperfusi jaringan iskemik serta mencegah terjadinya apoptosis.

3.2 Hipotesis

1. *Native ligand* dari protein PI3K dan enzim *prolyl hydroxylase* memiliki potensi untuk menstimulasi ekspresi HIF-1 α
2. Senyawa 7,8-*Dihydroxyflavone* memiliki potensi untuk meningkatkan interaksi protein PI3K dan enzim *prolyl hydroxylase* dalam menstimulasi ekspresi HIF-1 α .



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian eksperimental berbasis komputer dengan melakukan penambatan kandidat agen neuroprotektan, 7,8-*Dihydroxiflavone* (DHF) sebagai ligan pada reseptor protein *Phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) dan enzim *prolyl hydroxylase* (PHD) yang akan bekerja melalui beberapa mekanisme persinyalan untuk mengekspresikan protein HIF-1 α . Senyawa pembanding yang digunakan adalah *Adenosine-5'-Triphosphate* dan *Vadadustat*. Skor *docking* senyawa 7,8-DHF kemudian dibandingkan dengan skor *docking* senyawa pembanding.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Maret 2021 – Mei 2021 di Program Studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.3 Penjelasan Variabel

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian *in silico* adalah ligan 7,8-DHF yang telah diunduh melalui situs PubChem dalam bentuk file .sdf.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian *in silico* adalah nilai energi ikatan (*binding affinity*) dari hasil interaksi ligan 7,8 DHF dengan protein PI3K dan enzim PHD.



4.4 Alat dan Bahan Penelitian

4.4.1 Alat

Alat yang digunakan berupa laptop Asus X441N yang dilengkapi system operasi Windows 10 pro 64-bit dan software pendukung digunakan adalah BIOVIA *Discovery studio*, PyRx dan Pymol.

4.4.2 Bahan

4.4.2.1 Senyawa Uji

Tabel 4.1: Senyawa Uji

Nama Senyawa	Rumus Kimia	Nama IUPAC	Massa molar
7,8-Dihydroxyflavone	C₁₅H₁₀O₄	7,8-dihydroxy-2-phenylchromen-4-one	254.24 g/mol

4.4.2.2 Reseptor

Tabel 4.2: Reseptor pada Jalur Persinyalan Ekspresi HIF-1

Nama Reseptor	Kode Reseptor (PDB ID)	Native Ligand
Phosphoinositide 3-Kinase	1E8X	Adenosine-5'-Triphosphate
HIF <i>Prolyl hydroxylase</i>	5OX6	Vadadustat

4.5 Definisi Operasional

a. Ligan adalah molekul sederhana yang dapat mengikat sisi aktif reseptor untuk menghantarkan sinyal dan memicu aktivitas biologis. Ligan pada penelitian ini adalah 7,8-DHF yang didapatkan dari situs PubChem.

b. *Native ligand* merupakan substansi biologis yang membentuk kompleks biomolekuler dengan target protein yang telah melewati proses pengujian sebelumnya dan terbukti mampu menimbulkan respon biologis tertentu.



c. Protein Target adalah molekul protein pada sel yang berfungsi untuk menerima rangsangan berupa sinyal kimia tertentu dari ligan yang memiliki struktur tertentu sehingga dapat berikatan secara spesifik. Protein target pada penelitian ini adalah protein PI3K (PDB ID: 1E8X) dan enzim PHD (PDB ID: 5OX6) yang didapatkan dengan mengunduh strukturnya dari situs Protein Data Bank (PDB).

d. *Binding affinity* adalah kekuatan ikatan yang dihasilkan dari proses *molecular docking* antara ligan dan reseptor. Nilai *binding affinity* dipresentasikan dalam bentuk skor dalam satuan kcal/mol yang mampu menunjukkan kestabilan ikatan yang terjadi pada *binding site*.

e. *Hypoxia Inducible Factor-1 α* (HIF-1 α) merupakan marker penanda hipoksia jaringan yang terekspresi akibat aktivasi jalur persinyalan PI3K yang menghambat aktivitas enzim PHD, sehingga terjadi akumulasi protein HIF-1 α yang kemudian akan mengaktifkan *downstream signaling pathway* sebagai respon adaptif terhadap keadaan hipoksia.

4.6 Prosedur Penelitian

Tahapan yang dilakukan pada penelitian secara *In Silico* adalah

4.6.1 Preparasi Ligan

Struktur tiga dimensi senyawa 7,8-DHF sebagai ligan didapatkan dengan mengunduh melalui situs PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dalam format file .sdf. Setelah itu, senyawa 7,8-DHF diinput dalam PyRx untuk meminimalisir energi ikatan, diubah dalam bentuk *conformer* 3D, dan disimpan dalam bentuk *.pdbqt.



4.6.2 Preparasi Protein Target

Protein target ditentukan melalui metode *screening* data protein target melalui website data protein Uniprot (<http://uniprot.org/>). Karakteristik protein target yang akan digunakan adalah:

- a. Telah dilakukan *review* pada protein
- b. Data protein target tersedia dalam bentuk 3 Dimensi dengan amplitudo bernilai $<4 \text{ \AA}$

Protein target yang telah dipilih kemudian diunduh melalui RSCB PDB dengan format **pdb*. Struktur tiga dimensi dari protein target yaitu protein PI3K (PDB ID: 1E8X) dan enzim PHD (PDB ID: 5OX6)

Protein target yang telah diunduh dibuka pada *software* BIOVIA *Discovery Studio* untuk menghapus ligan, molekul air, atom hidrogen, serta mengetahui sisi aktif dari protein tersebut. Selanjutnya, protein target yang telah dimodifikasi disimpan dalam format *.pdb*

4.6.3 Analisis Farmakokinetik

Pengujian prediksi kerja senyawa 7,8-DHF pada sel spesifik sebagai kandidat obat dengan pemberian secara peroral. Analisis struktur 3D dari 7,8-DHF dalam format *.mol* dilakukan pada SwissADME (<http://swissadme.ch/>), PreADMET Online (<http://preadmet.bmdrc.org/>), dan kemudian dilanjutkan dengan pengujian *Lipinski Rule of Five* dengan mengunggah senyawa 7,8-DHF dalam format *.pdb* pada situs ([Lipinski Rule of Five \(scbio-iiitd.res.in\)](http://lipinski-rule-of-five.scbio-iiitd.res.in)).



4.6.4 Uji Fungsi Obat dengan *Prediction of Activity Spectra for Substance (PASS)*

Prediksi aktivitas biologis senyawa 7,8-DHF dilakukan dengan mengunggah SMILES senyawa 7,8-DHF yang dapat diperoleh dari situs PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) pada situs PASS online (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline>).

4.6.5 Penambatan *Molecular Docking*

Proses *molecular docking* dilakukan melalui software Pyrx. Langkah-langkah yang perlu dilakukan adalah

- a. Membuka ligan dan protein target yang sudah diunduh dalam format PDB pada software Pyrx
- b. Melakukan pengubahan protein target menjadi makromolekul dan 7,8-DHF menjadi ligan. Apabila berhasil maka kedua komponen ini akan berubah format menjadi *pdbqt*.
- c. Melakukan proses *docking* dengan subprogram *Autodock Vina* pada PyRx dengan memaksimalkan grid target pada struktur protein target sehingga seluruh residu asam amino yang telah diketahui menjadi *active site* terlindungi oleh grid target.
- d. Hasil penambatan ligan dan protein target disimpan dalam format *.pdb* dan dilakukan pencatatan data nilai *binding affinity*.

4.6.6 Visualisasi Hasil Docking

Hasil penambatan ligan dan protein target ditampilkan dalam bentuk tiga dimensi menggunakan software PyMol dan BIOVIA *Discovery studio* yang mampu memvisualisasikan interaksi dalam bentuk 3D serta menganalisis ikatan yang terbentuk antara ligan dan reseptor.

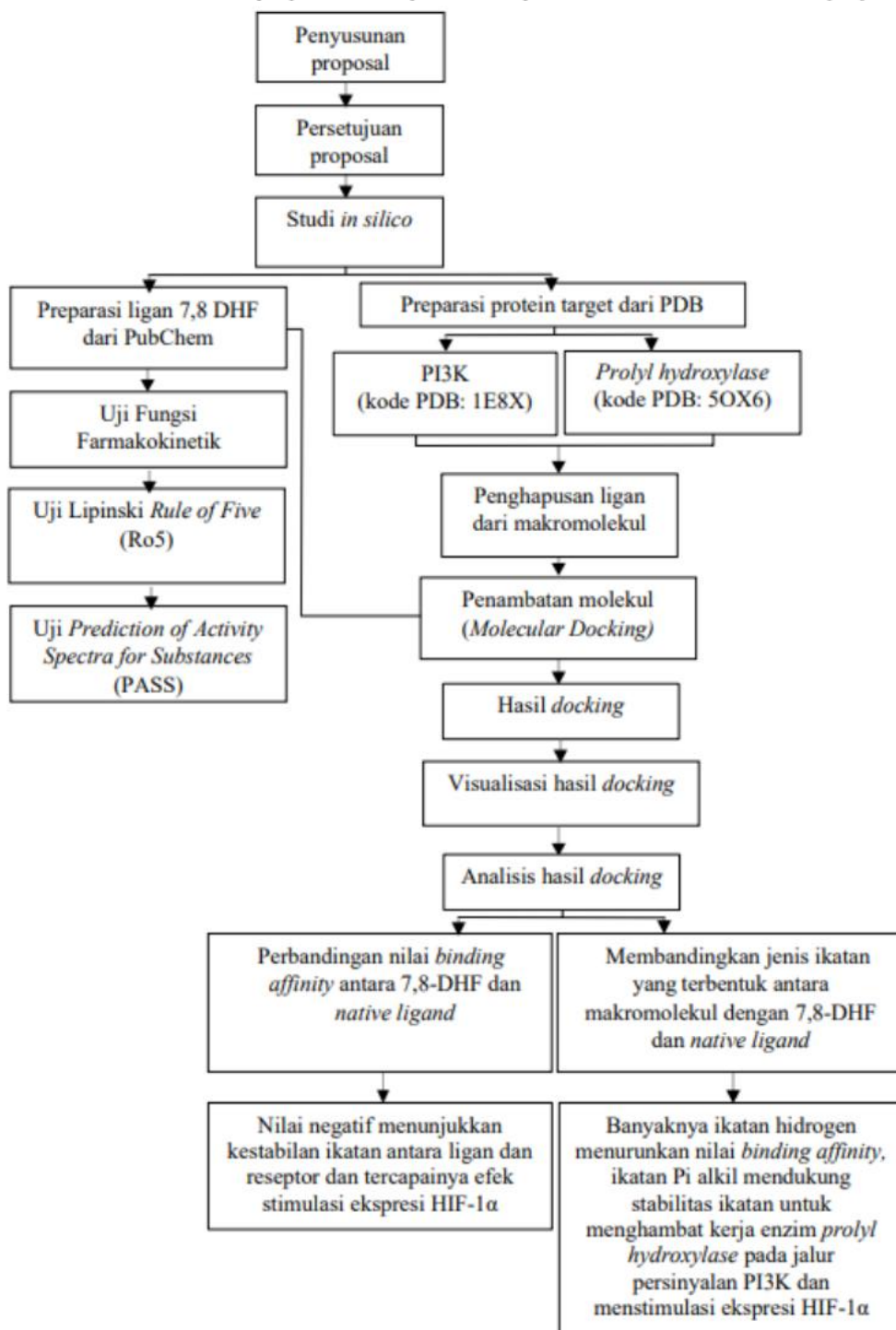


4.7 Analisis Data

Analisis data hasil uji Farmakokinetik dengan mengkategorisasi senyawa ligan yang menunjukkan tingkat absorpsi pada *intestine* dan kemampuan menembus sawar darah otak serta memenuhi minimal 2 dari kriteria Lipinski *Rule of Five*. Analisis data hasil uji PASS dilakukan dengan mengkategorisasi nilai *probable activity* (pa) dari hasil aktivitas senyawa 7,8 DHF sebagai agen neuroprotektan melalui mekanismenya dalam stimulasi protein PI3K. Analisis data secara deskriptif dilakukan pada hasil penambatan *molecular docking* dengan menyajikan data hasil *binding affinity* untuk kemudian dilakukan analisis jenis ikatan yang terbentuk serta asam amino yang terlibat antara ligan dan reseptor pada proses *docking*.



4.8 Alur Penelitian

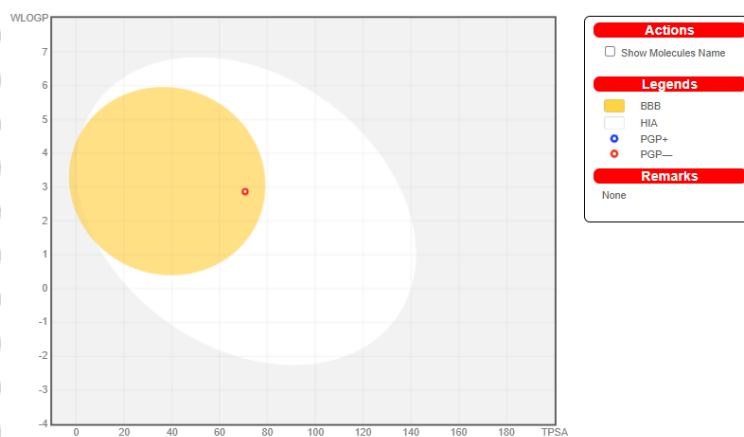




BAB V HASIL

5.1 Analisis Farmakokinetik

Studi farmakokinetik yang dilakukan menggunakan SwissADME (<http://swissadme.ch/>) menunjukkan visualisasi tingkat absorpsi 7,8-*Dihydroxyflavone* (DHF) dalam *intestine* serta kemampuannya dalam menembus sawar darah otak (Gambar 5.1)



Gambar 5.1 Metode BIOLED-Egg Senyawa 7,8-*Dihydroxyflavone*

Secara spesifik, uji farmakokinetik terhadap senyawa 7,8-DHF juga dilakukan pada situs PreADMET Online (<http://preadmet.bmdrc.org/>) untuk mengetahui nilai absorpsi, kemampuan menembus sawar darah otak dan *plasma binding protein* disajikan dalam tabel 5.1.

Tabel 5.1. Uji Farmakokinetik Senyawa 7,8-*Dihydroxyflavone*

HIA	BBB	Plasma Protein Binding
92.63%	0.93	93.02%

Selanjutnya, uji *Lipinski Rule of Five* dilakukan untuk mengetahui kemiripan suatu senyawa yang memiliki aktivitas biologis tertentu untuk kemudian ditentukan kelayakannya sebagai kandidat obat baru menunjukkan hasil sebagai berikut:

Tabel 5.2. Uji *Lipinski Rule of Five* Senyawa 7,8-Dihydroxyflavone

Senyawa	Berat Molekul	Donor Ikatan Hidrogen	Akseptor Ikatan Hidrogen	LogP	Refraktivitas Molar	Lipinski Rule
7,8-DHF	254 g/mol	2	4	2.71	69.15	Ya

5.2 Uji Fungsi Obat dengan *Prediction of Activity Spectra for Substance* (PASS)

Uji *Prediction of Activity Spectra for Substance* (PASS) dilakukan pada situs <http://www.pharmaexpert.ru/passonline> dengan mengunggah SMILES senyawa 7,8-DHF. Hasil menunjukkan nilai *probable activity* (pa) senyawa 7,8-DHF dalam perannya sebagai agen yang menstimulasi aktivasi jalur persinyalan protein kinase sebesar 0,377 dikategorikan sebagai senyawa eksperimental rendah dan nilai *probable inactivity* (pi) 0,004 (Gambar 5.2)

0,377 0,004 Protein kinase stimulant

Gambar 5.2 Hasil Uji *Prediction of Activity Spectra for Substance* (PASS)

5.3 Penambatan *Molecular Docking*

Interaksi antara ligan 7,8-DHF pada protein reseptor PI3K dan enzim *prolyl hydroxylase* (PHD) dan dibandingkan dengan *native ligand* diketahui dari proses *molecular docking* menunjukkan nilai *binding affinity* yang ditampilkan pada tabel

5.3

Tabel 5.3. Hasil *Molecular Docking* Ligan dan Protein Target

Protein Target	RSCB ID	Binding Affinity (Kcal/mol)	
		Native Ligand	7,8-DHF
PI3K	1E8X	-7,5	-8,6
HIF <i>Prolyl hydroxylase</i>	5OX6	-7,5	-7,5

Uji penambatan senyawa ligan pada protein PI3K menunjukkan energi ikatan yang dihasilkan dari 7,8-DHF lebih kecil daripada *native ligand* dari protein itu sendiri, sedangkan pada enzim PHD menunjukkan energi ikatan yang dihasilkan oleh 7,8-DHF sama dengan energi ikatan dari *native ligand*nya. Hasil tersebut (Tabel 5.3) didapatkan melalui penambatan ligan, yaitu 7,8-DHF pada domain fungsional dari protein target. Domain fungsional atau sisi aktif diketahui dari ikatan protein dengan *native ligand*. Sisi aktif pada protein PI3K dan *prolyl hydroxylase* ditunjukkan pada tabel 5.4.

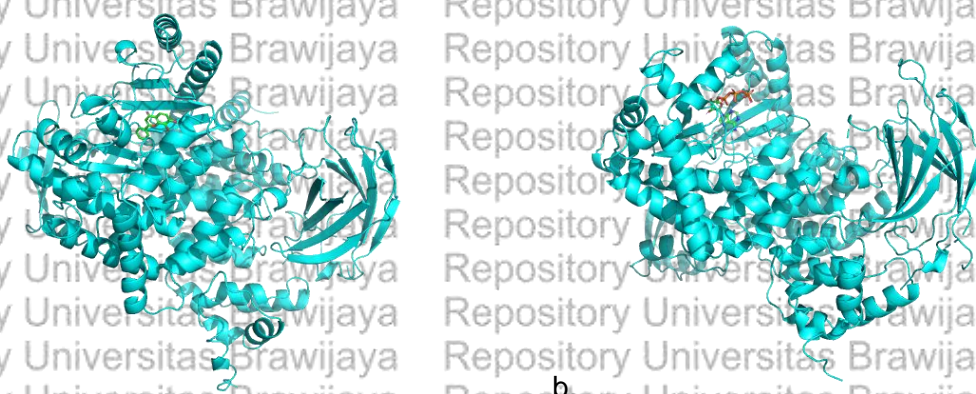


Tabel 5.4. Sisi Aktif dari Protein Target

Protein Target	Active Site	Dimension	Docking Centre Grid
PI3K	Asp161	X: 25 Å	X: 21.441
	Asp164	Y: 25 Å	Y: 61.673
	Asp358	Z: 25 Å	Z: 20.633
	Met804		
	Ser806		
	Lys807		
	Lys808		
	Pro810		
	Ile831		
	Lys833		
	Asp836		
	Tyr867		
	Glu880		
	Val882		
	Asp884		
	Asn951		
	Met953		
Ile963			
Asp964			
HIF <i>Prolyl hydroxylase</i>	Gln243	X: 50 Å	X: 14.196
	Ser247	Y: 50 Å	Y: 123.269
	Asp250	Z: 50 Å	Z: -0.296
	Trp258		
	Lys262		
	Gly288		
	Ser289		
	Tyr290		
	Met299		
	Tyr303		
	Tyr310		
	Arg312		
	His313		
	Asp315		
	Tyr329		
	Leu343		
	Glu357		
Lys359			
Trp367			
Arg371			
Pro373			
His374			
Val376			
Arg383			
Arg396			
Arg398			
Val401			
Gly409			

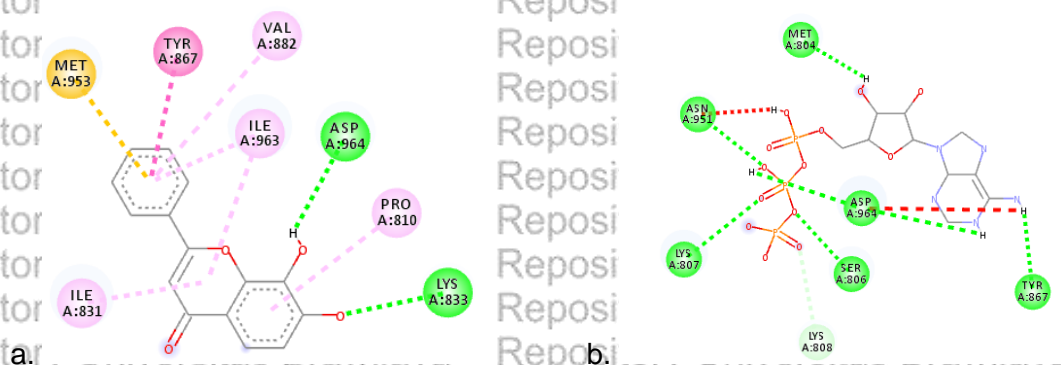


Hasil dari *molecular docking* divisualisasikan pada software Pymol dan BIOVIA *Discovery Studio* untuk melihat jenis ikatan yang terbentuk serta asam amino yang terlibat antara ligan dan protein reseptor.



Gambar 5.3 Visualisasi Interaksi Molekuler antara Ligan dengan Protein PI3K

Keterangan: (a) Ikatan 7,8-DHF dengan 1E8X
(b) Ikatan *native ligand* dengan 1E8X



Gambar 5.4 Visualisasi Jenis Ikatan Ligan dan Protein PI3K

Keterangan: (a) Ikatan 7,8-DHF dengan 1E8X
(b) Ikatan *native ligand* dengan 1E8X

Dari gambar diatas, diketahui bahwa senyawa 7,8-DHF dan *native ligand* berikatan dengan protein PI3K pada sisi aktif dan secara spesifik seperti diuraikan dalam tabel 5.5. analisis ini dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat kesamaan jenis maupun lokasi ikatan antara protein target dan ligan dengan *native ligand*.

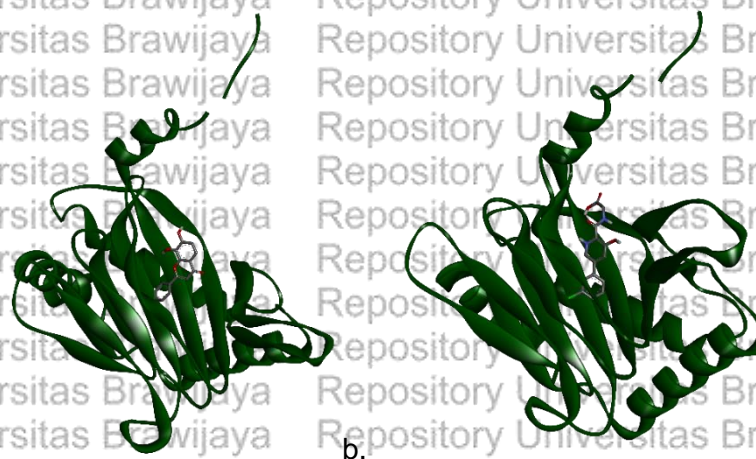


Tabel 5.5 Interaksi protein PI3K dengan Ligan

Protein-ligan	Residu asam amino	Ikatan kimia
1E8X – 7,8-DHF	Met953	Pi sulfur
	Pro810	Ikatan hidrogen
	Ile831	Ikatan hidrogen
	Val882	Ikatan hidrogen
	Ile963	Ikatan hidrogen
	Aso964	Ikatan hidrogen
1E8X – Vadadustat	Met804	Ikatan hidrogen
	Ser806	Ikatan hidrogen
	Lys807	Ikatan hidrogen
	Tyr867	Ikatan hidrogen
	Asn951	Ikatan hidrogen
	Aso964	Ikatan hidrogen
	Lys808	Ikatan karbon-hidrogen

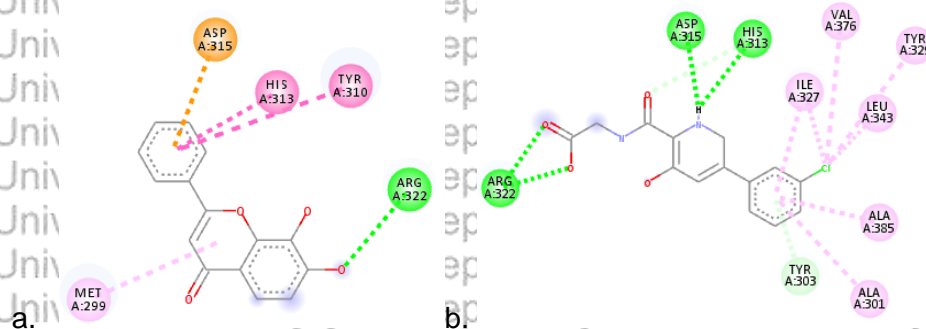
Dari hasil diatas diketahui bahwa ikatan antara 7,8-DHF dengan protein target PI3K dan protein terget dengan *native ligand* Vadadustat memiliki kesamaan lokasi dan jenis ikatan, yaitu pada residu asam amino Aso964. Hal ini mendukung hasil nilai *binding affinity* yang menunjukkan bahwa senyawa 7,8-DHF memiliki kemampuan dalam menstimulasi jalur persinyalan PI3K yang selanjutnya akan memicu efek neuroproteksi, salah satunya dengan transkripsi protein HIF-1 α yang lebih baik daripada *native ligand*.

Sedangkan, visualisasi ikatan ligan dan protein *prolyl hydroxylase* adalah



Gambar 5.5 Visualisasi Interaksi Molekuler antara Ligan dengan Enzim *Prolyl Hydroxylase*

Keterangan: (a) Ikatan 7,8-DHF dengan 5OX6
(b) Ikatan *native ligand* dengan 5OX6



Gambar 5.6 Visualisasi Jenis Ikatan Ligan dan Enzim *Prolyl Hydroxylase*

Keterangan: (a) Ikatan 7,8-DHF dengan 5OX6
(b) Ikatan *native ligand* dengan 5OX6

Berdasar hasil visualisasi interaksi molekuler antara ligan dan protein target diketahui ikatan pada sisi aktif dan secara spesifik seperti diuraikan dalam table 5.6, yaitu

Tabel 5.6 Interaksi protein PHD dengan ligan

Protein-ligan	Residu asam amino	Ikatan kimia
5OX6 – 7,8 DHF	Met299	Pi alkil
	Tyr310	Pi-pi T shaped
	Asp315	Pi anion
	Arg322	Ikatan hidrogen
5OX6 – Adenosine-5'-Triphosphate	His313	Ikatan hidrogen
	Asp315	Ikatan hidrogen
	Arg322	Ikatan hidrogen
	Tyr303	Ikatan karbon-hidrogen
	Ala301	Pi-donor hidrogen
	Ile327	Ikatan alkil
	Tyr329	Ikatan alkil
	Leu343	Ikatan alkil
	Val376	Ikatan alkil
	Ala385	Ikatan alkil
Lys808	Ikatan alkil	

Dari hasil diatas diketahui bahwa ikatan antara 7,8-DHF dengan protein target *prolyl hydroxylase* dan *native ligand* Adenosine-5'-Triphosphate dengan protein target memiliki kesamaan lokasi pada residu asam amino Asp315 serta kesamaan lokasi dan jenis ikatan pada residu asam amino Arg322. Hal ini mendukung hasil



nilai *binding affinity* yang menunjukkan bahwa senyawa 7,8-DHF memiliki kemampuan yang sama besar dengan *native ligand* dalam menghambat kerja enzim *prolyl hydroxylase* sehingga memiliki efek menstimulasi transkripsi protein HIF-1 α yang sama besar dalam mencegah perluasan area infark.



BAB VI PEMBAHASAN

6.1 Analisis Farmakokinetik

Uji farmakokinetik yang dilakukan melalui PreADMET digunakan untuk memprediksi tingkat penyerapan pada usus halus manusia menunjukkan bahwa 7,8-DHF diserap secara efisien. Penyerapan senyawa dikategorikan menjadi 3, yaitu rendah (0-20%), sedang (20-70%), dan tinggi (70-100%). Senyawa 7,8-DHF menunjukkan hasil 92.63% yang berarti senyawa 7,8-DHF mampu diserap dengan sangat baik dalam usus. Hal ini menandakan bahwa, ketika senyawa 7,8-DHF dikembangkan menjadi obat yang berfungsi sebagai neuroprotektan dan diberikan secara per oral, maka obat ini akan terabsorpsi dengan baik dan mampu berdifusi secara pasif menuju pembuluh darah untuk kemudian didistribusikan ke seluruh tubuh dan menembus membran sel hingga mencapai *site of action* untuk menghasilkan efek yang diinginkan (Gunawan, 2017).

Setelah diabsorpsi, suatu senyawa akan menembus berbagai *barrier*, metode evaluasi *The Brain or Intestinal Estimated Permeation Method* (BOILED-Egg) dilakukan untuk mengetahui secara spesifik sifat lipofilitas dan polaritas suatu senyawa. Regio berwarna putih menandakan bahwa suatu senyawa mampu diabsorpsi pada gastrointestinal dan regio berwarna kuning menandakan suatu senyawa mampu menembus sawar darah otak (G *et al.*, 2020). Senyawa 7,8-DHF menunjukkan absorpsinya dalam usus halus yang baik dan kemampuannya menembus sawar darah otak tergolong sedang. Prediksi senyawa 7,8-DHF mampu menembus sawar darah otak menunjukkan hasil kemampuan sedang dengan nilai 0.93. Kemampuan suatu senyawa dalam menembus sawar darah otak diklasifikasikan menjadi 3 kategori, senyawa dengan nilai prediksi >2 adalah senyawa dengan kemampuan menembus sawar darah otak yang tinggi, nilai 0.1-



2.0 menunjukkan kemampuan sedang, dan nilai <0.1 menunjukkan nilai yang lemah. Sawar darah otak terdiri atas sel-sel endotel kapiler yang membentuk *tight-junction* dan terbungkus astrosit yang terdiri dari membran sel. Senyawa yang mampu menembus sawar darah otak hanyalah senyawa dengan berat molekul rendah dan memiliki sifat lipofilik atau larut lemak dengan baik. Dapat diketahui bahwa senyawa 7,8-DHF merupakan senyawa dengan berat molekul yang rendah, sebesar 254 g/mol, dimana hanya molekul dengan berat dibawah 400 g/mol yang dapat melintasi sawar darah otak. Selain itu, 7,8-DHF juga bersifat lipofilik, yaitu senyawa yang larut lemak dengan baik karena memiliki kemampuan sedang untuk menembus sawar darah otak melalui mekanisme difusi, hal ini mampu meningkatkan kemampuan 7,8-DHF sebagai agen neuroprotektan (Gunawan, 2017; Wanat, 2020). Potensi 7,8-DHF dalam menembus sawar darah otak dapat ditingkatkan dengan memodifikasi protein menjadi bermuatan lebih positif dan dengan menambahkan molekul transport endogen yang mampu membantu untuk menembus sawar darah otak dan memaksimalkan peran 7,8-DHF sebagai agen neuroprotektan (Bellettato & Scarpa, 2018).

Pengujian *plasma binding protein* dilakukan untuk mengetahui kekuatan ikatan ligan dan protein plasma. Nilai $>90\%$ menunjukkan ikatan yang kuat dan nilai $<90\%$ menunjukkan nilai yang lemah. Senyawa 7,8-DHF menunjukkan nilai 93.02% yang berarti kemampuan ikatan senyawa 7,8-DHF dengan protein plasma tinggi dan menunjukkan kemampuan senyawa untuk melindungi senyawa tersebut dari oksidasi, meminimalisir toksisitas, dan meningkatkan *half-life* senyawa itu sendiri (Wanat, 2020). Ikatan yang terbentuk antara senyawa 7,8-DHF dan protein plasma yang kuat menandakan senyawa 7,8-DHF merupakan senyawa lipofilik, dimana ikatan ini berperan untuk membawa senyawa 7,8-DHF dalam darah menuju seluruh tubuh supaya tidak berdifusi keluar pembuluh darah dan melintasi membrane sel endotel dan diabsorpsi untuk kemudian bekerja diluar *site of action*



(Gunawan, 2017). Ikatan yang terbentuk antara senyawa 7,8-DHF dengan protein plasma adalah ikatan hidrogen yang tergolong ikatan lemah dan reversibel (Pantsar & Poso, 2018).

Uji *Lipinski Rule of Five* dilakukan untuk mengetahui kemiripan aktivitas biologis pada suatu senyawa kimia dengan obat tertentu ketika dilakukan pemberian secara oral. Suatu senyawa dapat dikatakan layak dijadikan kandidat obat jika memenuhi minimal 2 dari 5 kriteria, yaitu memiliki berat molekul <500 Dalton, donor ikatan hidrogen <5, akseptor ikatan hidrogen <10, logP atau koefisien partisi air <5, dan reaktivitas molar diantara 40-130 Å (Jayaram *et al.*,

2012). Senyawa 7,8 DHF memenuhi kriteria *Lipinski Rule of Five*, berat molekul 254 g/mol menunjukkan senyawa ini mampu berdifusi dan menembus membran

sel. Nilai LogP sebesar 2.71 menunjukkan keamanan senyawa jika dijadikan sebagai kandidat agen neuroprotektan serta kemampuannya menembus lapisan lipid bilayer membran sel. Nilai LogP <5 menandakan senyawa 7,8-DHF memiliki lipofilitas yang tinggi. Nilai LogP yang lebih >5 menandakan kecenderungan suatu

senyawa memiliki tingkat toksisitas tinggi, suatu senyawa akan tertahan lebih lama pada membran lipid bilayer dan distribusi yang lebih luas di dalam tubuh menyebabkan penurunan selektivitas ikatan terhadap enzim target, sedangkan nilai LogP yang terlalu kecil menyebabkan suatu senyawa tidak dapat melewati

membran lipid bilayer, sehingga kerja obat tidak berfungsi secara baik. Berat molekul yang relatif rendah dan lipofilitas yang cukup tinggi diketahui mendukung kemampuan suatu senyawa melewati sawar darah otak dengan cara difusi, masuk ke otak untuk menuju *site of action* dan menyebabkan keberhasilan terapi (La Kilo

et al., 2019). Selain dua kriteria yang telah disebutkan sebelumnya, jumlah donor dan akseptor ikatan hidrogen juga dapat mempengaruhi suatu senyawa dalam mencapai sel targetnya. Semakin banyak jumlah donor dan akseptor ikatan hidrogen, maka semakin banyak energi yang dibutuhkan agar terjadi proses



absorpsi, senyawa tersebut juga menjadi sulit untuk menembus membran sel dan menyebabkan semakin lamanya waktu yang dibutuhkan suatu senyawa untuk mencapai *site of action*. (Chiong *et al.*, 2021; La Kilo *et al.*, 2019).

6.2 Uji Fungsi Obat dengan *Prediction of Activity Spectra for Substance (PASS)*

Uji *Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS)* dilakukan untuk memprediksi aktivitas senyawa 7,8-DHF dalam memicu *cell survival* dengan mekanisme aktivasi jalur persinyalan protein kinase sehingga dapat diusulkan untuk menjadi kandidat obat neuroprotektan. Hasil uji PASS menunjukkan nilai *probable activity (pa)* sebesar 0,377 dan nilai *probable inactivity (pi)* 0,004. Nilai $pa > pi$ menunjukkan 7,8-DHF merupakan senyawa yang memiliki aktivitas biologis baik. Namun nilai $pa < 0,5$ menunjukkan skala eksperimen rendah. Nilai pa yang rendah kemungkinan dikarenakan 7,8-DHF merupakan senyawa baru dengan aktivitas biologis yang masih tergolong rendah (Kumarachari *et al.*, 2016). Selain itu, senyawa yang memiliki nilai pa rendah dalam skala eksperimen belum tentu memiliki aktivitas biologis yang rendah karena belum banyak yang melakukan penelitian terhadap efek senyawa 7,8-DHF sebagai agen neuroprotektan, senyawa 7,8-DHF telah banyak dikembangkan dalam penelitian untuk terapi kanker. Sehingga, dari hasil ini diketahui bahwa senyawa 7,8-DHF memiliki potensi yang baik sebagai agen neuroprotektan melalui jalur stimulasi protein kinase dan menginduksi *downstream signaling*, misalnya dengan stimulasi angiogenesis dan inhibisi apoptosis untuk meningkatkan *cell survival*, namun hal ini tidak sejalan dengan jumlah eksperimen dan publikasi terkait dengan efek neuroprotektan, sehingga masih tergolong dalam senyawa dengan aktivitas biologis yang rendah.



6.3 Penambatan *Molecular Docking*

Penambatan ligan atau senyawa aktif, dalam penelitian ini adalah senyawa 7,8-DHF dengan protein target dilakukan menggunakan software PyRx.

Penambatan spesifik dilakukan dengan menambatkan senyawa 7,8-DHF pada sisi aktif protein target yang digunakan untuk berikatan dengan *native ligand*.

Penambatan ligan dan reseptor pada sisi aktif spesifik ini dilakukan di dalam *grid box* dengan ukuran dan posisi tertentu sesuai dengan koordinat x, y dan z (Tabel 5.4). Hasil dari penambatan dua molekul yaitu 7,8-DHF dan protein targetnya adalah nilai *binding affinity*. Nilai *binding affinity* yang semakin negatif menandakan makin stabilnya ikatan yang terbentuk antara ligan dan reseptor. Berdasarkan hasil

pada Tabel 5.3, diketahui bahwa energi ikatan yang dihasilkan antara senyawa 7,8-DHF dan protein target PI3K lebih rendah, yaitu -8.6 Kcal/mol dibandingkan saat PI3K berikatan dengan *native ligand*, yaitu -7.5 Kcal/mol. Energi ikatan yang rendah menunjukkan perannya dalam stimulasi protein kinase dan jalur persinyalan dibawahnya, terutama transkripsi protein HIF-1 α untuk selanjutnya memicu efek neuroproteksi dengan berbagai mekanisme *cell survival* untuk mencegah terjadinya perluasan area infark setelah kejadian stroke iskemik.

Sejalan dengan hasil penelitian ini, beberapa studi menjelaskan tentang mekanisme jalur persinyalan PI3K dalam perannya sebagai agen neuroprotektan, diantaranya adalah studi *in silico* untuk mengetahui interaksi molekuler antara 7,8-DHF dan reseptor TrkB dan VEGFR2 menunjukkan bahwa 7,8-DHF berperan dalam memproteksi sel ganglion retina dari eksitotoksisitas dan stress oksidatif yang menyebabkan degenerasi melalui aktivasi TrkB dan induksi kaskade pro-survival yaitu PI3K/Akt dan MAPK/Erk (Chitranshi *et al.*, 2015). Penelitian Han *et al* (2014) menggunakan metode kultur sel model penyakit Parkinson menunjukkan



bahwa 7,8-DHF memiliki efek neuroprotektif melalui mekanisme aktivasi jalur persinyalan PI3K/Akt sehingga mencegah kematian sel (Han *et al.*, 2014). Pada penelitian dengan menggunakan hewan coba model *traumatic brain injury*, pemberian 7,8-DHF terbukti memicu aktivasi jalur persinyalan PI3K dan fosforilasi Akt pada residu Ser473 dan Thr308 sehingga terjadi inhibisi apoptosis. Selain itu, 7,8-DHF juga berperan dalam menstimulasi sintesis BDNF melalui CREB sehingga terjadi peningkatan produksi BDNF endogen dan aktivasi jalur persinyalan TrkB/Akt dan yang berperan dalam efek neuroprotektif (Wu *et al.*, 2014). Selain itu, penelitian pada mencit yang diinduksi kolagen untuk menyebabkan *intracerebral hemorrhage* menunjukkan bahwa 7,8-DHF berperan dalam peningkatan fosforilasi TrkB dan Akt pada residu Ser473 dan Thr308 untuk mencegah terjadinya apoptosis dan edema otak (Wu *et al.*, 2019).

Penelitian Zhang *et al.* (2020) dengan melakukan analisis mekanisme efek obat pada beberapa target gen atau protein melalui jalur persinyalan spesifik untuk menghasilkan fungsi biologis tertentu secara komputasi menjelaskan bahwa komponen senyawa *Moschus*, yaitu pengobatan herbal tradisional China mampu memengaruhi jalur persinyalan cGMP-PKG, HIF-1, FoxO, MAPK, kalsium, kontraksi otot polos pembuluh darah, siklus sel, dan berbagai mekanisme lain. Secara spesifik, target terapi stroke iskemik bekerja melalui jalur persinyalan AKT1, MAPK1/3, TNF, estrogen, prolaktin, neurotropin, *T-cell receptor*, cAMP, FoxO, dan HIF-1 (C. Zhang *et al.*, 2020). Sejalan dengan penelitian ini, senyawa 7,8-DHF bekerja pada jalur persinyalan HIF-1 melalui aktivasi PI3K/AKT. Aktivasi jalur persinyalan AKT meminimalkan volume infark pasca iskemia dan meningkatkan keseimbangan ketersediaan dan kebutuhan oksigen pada jaringan otak dengan meregulasi ekspresi protein yang berkaitan dengan apoptosis, misalnya Bcl2 sebagai antiapoptosis (Xin Du *et al.*, 2020). Selain itu, aktivasi jalur persinyalan AKT juga mampu memicu angiogenesis melalui ekspresi protein



Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) pada jalur persinyalan HIF-1. Angiogenesis yang melibatkan HIF-1 menghasilkan pembuluh darah yang sempurna dan stabil (C. Zhang *et al.*, 2020).

Perbedaan nilai *binding affinity* dapat dipengaruhi oleh ikatan yang terbentuk antara ligan dan reseptor. Dari gambar 5.4 diketahui bahwa senyawa 7,8-DHF berikatan dengan protein PI3K pada sisi aktif dan secara spesifik pada residu Met953 dengan ikatan Pi-sulfur, Pro810, Ile831, Val882, dan Ile963 dengan ikatan Pi-Alkyl, Tyr867 dengan ikatan Pi-Pi T-shaped, serta residu Lys833 dan Asp964 yang membentuk ikatan hidrogen. Ikatan Pi-sulfur dengan residu Met953 terjadi akibat adanya ikatan hidrogen dan interaksi yang melibatkan π -system dengan molekul asam amino di sekitarnya, ikatan ini berperan dalam mendukung stabilitas struktur yang dibentuk oleh ikatan ligan dan protein target yang mungkin berkaitan dengan aktivitas biologis, serta memudahkan ikatan ligan pada protein target (Silva *et al.*, 2018). Ikatan Pi-alkil berperan dalam stabilitas struktur ikatan. Ikatan pi-pi T-shaped umumnya terjadi pada interaksi antara cincin fenil pada unsur benzena dari ligan dan protein target (Zhao *et al.*, 2015). Interaksi antara Pi-sulfur, Pi-Alkil, dan Pi-sigma mendukung stabilitas ikatan ligan dan reseptor dan menormalkan momen dipol saat terjadi transfer energi dengan asam amino di sekitarnya (Arthur & Uzairu, 2019). Selanjutnya, ikatan hidrogen merupakan ikatan non-kovalen dan berperan besar dalam menentukan nilai *binding affinity* dan reaktivitas senyawa, banyak atau sedikitnya ikatan hidrogen menentukan lipofilitas senyawa dan kemampuannya dalam menembus sel darah otak untuk kemudian bekerja pada *site of action* (Bernaldez *et al.*, 2018). Sedangkan, ikatan *native ligand* pada protein PI3K pada residu Met804, Ser806, Lys807, Tyr 867, Asn951, dan Asp964 dengan ikatan hidrogen serta Lys808 yang membentuk ikatan karbon-hidrogen. Ikatan hidrogen pada hasil *molecular docking* antara *native ligand* dan PI3K menunjukkan banyaknya ikatan hidrogen, hal ini berkaitan dengan lipofilitas



yang tinggi dan berbanding terbalik dengan nilai *binding affinity* yang dihasilkan.

Ikatan karbon-hidrogen merupakan ikatan kovalen yang membantu stabilitas struktur dan berkaitan dengan ikatan hidrogen (Bernaldez *et al.*, 2018).

Ikatan antara enzim *prolyl hydroxylase* dengan senyawa 7,8-DHF dan *native ligand* menunjukkan hasil yang sama, yaitu -7,5 Kcal/mol yang menunjukkan aktivitas 7,8-DHF dalam menghambat kerja enzim PHD sama kuat

dengan efek penghambatan yang diberikan oleh *native ligand*. Sejalan dengan penelitian ini, studi lain juga menjelaskan efek inhibisi dari enzim PHD untuk memicu transkripsi protein HIF-1 α dan memicu aktivasi dari berbagai mekanisme

cell survival untuk mencegah terjadinya perluasan area infark setelah kejadian stroke iskemik. Salah satu penelitian secara *in silico* menjelaskan mekanisme 7,8-DHF sebagai pengkelat besi yang poten untuk menginhibisi enzim *prolyl hydroxylase*, sehingga menghambat reaksi redoks dan kematian pada penyakit

Parkinson (Smirnova *et al.*, 2016). Selain itu, penelitian *in silico* dan *in vitro* dilakukan dengan menginhibisi HIF *prolyl hydroxylase* menyebabkan peningkatan ekspresi HIF dan mampu meningkatkan eritropoiesis sebagai salah satu mekanisme *cell survival* dalam terapi anemia (Yeh *et al.*, 2017).

Analisis mekanisme yang terjadi akibat keadaan hipoksia menunjukkan bahwa enzim *prolyl hydroxylase* berperan dalam regulasi transkripsi gen PKM2,

AKT, HIF-1 α , ARNT, EPAS1 dan aktivitas protein regulator seperti SAP30, HDAC1, NDGR3, dan FoxO (Erber *et al.*, 2019; Ono & Bono, 2021). Sejalan

dengan penelitian ini, senyawa 7,8-DHF mampu menginhibisi kerja enzim PHD pada jalur persinyalan PI3K/AKT untuk mengaktivasi gen HIF-1 α dan jalur persinyalan dibawahnya untuk mengaktifkan mekanisme adaptasi terhadap

keadaan hipoksia dan meminimalkan volume infark pasca iskemia. Fosforilasi Akt menyebabkan aktivasi Bcl-2, FoxO3a, mTOR, dan *glycogen synthase kinase-3* untuk menghambat terjadinya apoptosis (Zhang *et al.*, 2018).



Dari gambar 5.6 diketahui bahwa senyawa 7,8-DHF berikatan dengan enzim PHD pada sisi aktif dan secara spesifik pada residu Met299 dengan ikatan Pi-alkil, Tyr310, His313 dengan ikatan Pi-Pi T-shaped, Asp315 dengan ikatan Pi-anion, dan Arg322 dengan ikatan hidrogen. Ikatan Pi-alkil berperan dalam stabilitas struktur ikatan dan meningkatkan interaksi hidrofobik dari ligan dan reseptor yang kemungkinan berperan dalam kerjanya sebagai inhibitor (Zhao *et al.*, 2015). Ikatan Pi-anion digunakan sebagai reseptor untuk berikatan dengan ligan, misalnya kanal ion sintetis dan sebagai tempat yang mudah dimodifikasi, misalnya dengan penambahan atau pengurangan ion untuk memaksimalkan efek dari suatu senyawa yang ditambahkan (Wang & Wang, 2013). Selanjutnya, ikatan hidrogen berperan dalam menentukan nilai *binding affinity* dan reaktivitas senyawa, banyak atau sedikitnya ikatan hidrogen menentukan lipofilitas senyawa dan kemampuannya dalam menembus sel darah otak untuk kemudian bekerja pada *site of action* (Bernaldez *et al.*, 2018).

Sedangkan *native ligand* mengikat *prolyl hydroxylase* pada residu His313, Asp315, dan Arg322 dengan ikatan hidrogen, Tyr303 dengan ikatan karbon-hidrogen, serta Ala301, Ile327, Tyr329, Leu343, Val376, dan Ala385 Lys808 yang membentuk ikatan alkil. Ikatan hidrogen berperan dalam menentukan nilai *binding affinity*, reaktivitas senyawa, lipofilitas senyawa serta kemampuan menembus sel darah otak untuk kemudian bekerja pada *site of action*. Ikatan karbon-hidrogen merupakan ikatan kovalen yang membantu stabilitas struktur dan berkaitan dengan ikatan hidrogen (Bernaldez *et al.*, 2018). Ikatan Pi-alkil berperan dalam stabilitas struktur ikatan serta meningkatkan interaksi hidrofobik dari ligan dan reseptor yang kemungkinan berperan dalam kerjanya sebagai inhibitor (Zhao *et al.*, 2015). Jumlah ikatan hidrogen dan ikatan Pi-alkil pada senyawa 7,8-DHF lebih sedikit daripada *native ligand*, namun mampu menghasilkan nilai *binding affinity* yang sama besar dengan *native ligand* menunjukkan 7,8-DHF merupakan



senyawa poten yang dapat menghambat kerja enzim *prolyl hydroxylase* dan memicu transkripsi protein HIF-1 α dan aktivasi berbagai *downstream signaling* yang berperan dalam *cell survival*. Maka, 7,8-DHF dapat digunakan sebagai kandidat agen neuroprotektan, terutama pada kasus stroke iskemik melalui mekanisme stimulasi protein kinase, terutama jalur persinyalan PI3K dan menghambat kerja enzim *prolyl hydroxylase*.

Keterbatasan dari penelitian ini adalah dalam aplikasi yang digunakan belum mampu memuat molekul yang lebih kompleks, sehingga saat proses *screening*, jumlah protein yang akan ditambatkan pada molekul 7,8-DHF terbatas.

Selain itu, peneliti juga melakukan modifikasi sederhana pada ligan yang digunakan, modifikasi sederhana dengan menghilangkan beberapa molekul untuk memaksimalkan efek dari ligan belum dilakukan secara maksimal, seperti dengan menambahkan molekul transpor, hal ini dikarenakan makromolekul tidak dapat dimuat dalam aplikasi yang digunakan oleh peneliti.



BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. *Native ligand* dari protein PI3K dan enzim *prolyl hydroxylase* berpotensi menstimulasi ekspresi HIF-1 α melalui mekanisme aktivasi protein kinase pada jalur persinyalan PI3K dan inhibisi enzim *prolyl hydroxylase*.
2. *7,8-Dihydroxyflavone* memiliki potensi yang lebih baik dalam menstimulasi ekspresi HIF-1 α melalui ikatan dengan protein PI3K daripada ikatan dengan *native ligand* dan potensi sama besar melalui ikatan dengan enzim *prolyl hydroxylase* dibandingkan dengan *native ligand*.

7.2 Saran

1. Dilakukan pengujian *in silico* dengan memodifikasi senyawa 7,8-DHF dengan menjadikan muatan lebih positif dan menambahkan molekul transport untuk membantu menembus sawar darah otak dan memaksimalkan efek sebagai agen neuroprotektan
2. Dilakukan pengujian *in silico* mengenai mekanisme *cell survival* melalui jalur persinyalan lain yang berkaitan dengan patofisiologi stroke iskemik.
3. Penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek 7,8-DHF pada uji *in vitro* dan *in vivo* menggunakan model stroke iskemik.



DAFTAR PUSTAKA

- Amalia, L., Sadeli, H. A., Parwati, I., Rizal, A., & Panigoro, R. (2020). Hypoxia-Inducible Factor-1 α in Acute Ischemic Stroke: Neuroprotection for better clinical outcome. *Heliyon* 6(6): e04286.
- Aprianda, R., Budijanto, D., Kurniawan, R., Widiyanti, W., Mulya, D., Suryani, E., & Indrawati, L. (2019). *Stroke. Don't Be The One*. Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI.
- Arthur, D. E., & Uzairu, A. (2019). Molecular Docking Studies on the Interaction of NCI Anticancer Analogues with Human Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit. *Journal of King Saud University - Science* 31(4): 1151–1166.
- Bach, A. (2017). Targeting Oxidative Stress in Stroke. In P. A. Lapchak & J. H. Zhang (Eds.), *Neuroprotective Therapy for Stroke and Ischemic Disease* (pp. 203–250). Springer International Publishing.
- Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, K. K. R. (2013). *Riset Kesehatan Dasar 2013* (2913th ed.). Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI.
- Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, K. K. R. (2018). *Laporan Nasional RISKESDAS 2018*. Lembaga Penerbit Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Bathina, S., & Das, U. N. (2015). Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Archives of Medical Science* 6: 1164–1178.
- Battaglini, D., Robba, C., Lopes da Silva, A., dos Santos Samary, C., Leme Silva, P., Dal Pizzol, F., Pelosi, P., & Rocco, P. R. M. (2020). Brain–heart Interaction After Acute Ischemic Stroke. *Critical Care* 24(1): 163.
- Bellettato, CM & Scarpa, M. (2018) Possible Strategies to Cross the Blood-brain Barrier. *Italian Journal of Pediatrics* 131
- Bernaldez, M. J. A., Billones, J. B., & Magpantay, A. (2018). *In Silico Analysis of Binding Interactions Between GSK983 and Human DHODH through Docking and Molecular Dynamics*. <https://doi.org/10.1063/1.5080886>
- Bernardo-Castro, S., Sousa, J. A., Brás, A., Cecília, C., Rodrigues, B., Almendra, L., Machado, C., Santo, G., Silva, F., Ferreira, L., Santana, I., & Sargento-Freitas, J. (2020). Pathophysiology of Blood–Brain Barrier Permeability



Throughout the Different Stages of Ischemic Stroke and Its Implication on Hemorrhagic Transformation and Recovery. *Frontiers in Neurology* 11: 594672. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.594672>

Burley, S. K., Berman, H. M., Bhikadiya, C., Bi, C., Chen, L., Di Costanzo, L., Christie, C., Dalenberg, K., Duarte, J. M., Dutta, S., Feng, Z., Ghosh, S., Goodsell, D. S., Green, R. K., Guranović, V., Guzenko, D., Hudson, B. P., Kalro, T., Liang, Y., ... Zardecki, C. (2019). RCSB Protein Data Bank: Biological Macromolecular Structures Enabling Research and Education in Fundamental Biology, Biomedicine, Biotechnology and Energy. *Nucleic Acids Research* 47(1) 464–474

Campbell, B. C. V., De Silva, D. A., Macleod, M. R., Coutts, S. B., Schwamm, L. H., Davis, S. M., & Donnan, G. A. (2019). Ischaemic stroke. *Nature Reviews Disease Primers* 5(1): 70.

Chen, X., Li, H., Tian, L., Li, Q., Luo, J., & Zhang, Y. (2020). Analysis of the Physicochemical Properties of Acaricides Based on Lipinski's Rule of Five. *Journal of Computational Biology* 27(9): 1397–1406.

Cheon, S. Y., Kim, E. J., Kim, J. M., & Koo, B.-N. (2018). Cell Type-Specific Mechanisms in the Pathogenesis of Ischemic Stroke: The Role of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018: 1–9.

Chinnasamy, P., & Arumugam, R. (2018). *In silico* Prediction of Anticarcinogenic Bioactivities of Traditional Anti-Inflammatory Plants Used by Tribal Healers in Sathyamangalam Wildlife Sanctuary, India. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences* 5(4): 265–279.

Chiong, S. W., Ng, C. H., & Shaari, K. (2021). In Silico Studies on Diacyl Derivatives of Phloroglucinol to Enhance Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Profiles of 2,4,6-Trihydroxy-3-Geranyl-Acetophenone. *International Journal of Applied Pharmaceutics*: 173–179.

Chitranshi, N., Gupta, V., Kumar, S., & Graham, S. (2015). Exploring the Molecular Interactions of 7,8-Dihydroxyflavone and Its Derivatives with TrkB and VEGFR2 Proteins. *International Journal of Molecular Sciences* 16(9): 21087–21108

Chowdhury, R., Leung, I. K. H., Tian, Y.-M., Abboud, M. I., Ge, W., Domene, C., Cantrelle, F.-X., Landrieu, I., Hardy, A. P., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., Claridge, T. D. W., & Schofield, C. J. (2016). Structural Basis for Oxygen



Degradation Domain Selectivity of The HIF Prolyl Hydroxylases. *Nature Communications* 7(1): 12673

Donkor, E. S. (2018). Stroke in the 21st Century: A Snapshot of the Burden, Epidemiology, and Quality of Life. *Stroke Research and Treatment* 2018: 1–10.

Druzhilovskiy, D. S., Rudik, A. V., Filimonov, D. A., Glorizova, T. A., Lagunin, A. A., Dmitriev, A. V., Pogodin, P. V., Dubovskaya, V. I., Ivanov, S. M., Tarasova, O. A., Bezhentsev, V. M., Murtazaliev, K. A., Semin, M. I., Maiorov, I. S., Gaur, A. S., Sastry, G. N., & Poroikov, V. V. (2017). Computational Platform Way2Drug: From The Prediction of Biological Activity to Drug Repurposing. *Russian Chemical Bulletin* 66(10): 1832–184

Du, X., & Hill, R. A. (2015). 7,8-Dihydroxyflavone as a Pro-neurotrophic Treatment for Neurodevelopmental Disorders. *Neurochemistry International* 89: 170–180

Du, Xin, Li, C., Ren, B., Deng, N., Chen, C., Wang, X., Cheng, F., & Qingguo Wang, M. L. (2020). *Exploring the Pharmacological Mechanism of Bezoar on Cerebral Ischemic Stroke using a Network Pharmacology Approach* [Preprint]. Neuroscience. <https://doi.org/10.1101/2020.02.28.969436>

Emili, M., Guidi, S., Uguagliati, B., Giacomini, A., Bartesaghi, R., & Stagni, F. (2020). Treatment with the flavonoid 7,8-Dihydroxyflavone: A promising strategy for a constellation of body and brain disorders. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*: 1–38.

Erber, L., Luo, A., & Chen, Y. (2019). Targeted and Interactome Proteomics Revealed the Role of PHD2 in Regulating BRD4 Proline Hydroxylation. *Molecular & Cellular Proteomics* 18(9): 1772–1781.

Fan, L., Li, J., Yu, Z., Dang, X., & Wang, K. (2014). The Hypoxia-Inducible Factor Pathway, Prolyl Hydroxylase Domain Protein Inhibitors, and Their Roles in Bone Repair and Regeneration. *BioMed Research International* 2014: 1–11

Ferreira, L., dos Santos, R., Oliva, G., & Andricopulo, A. (2015). Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules* 20(7): 13384–13421

Frost, J., Frost, M., Batie, M., Jiang, H., & Rocha, S. (2021). Roles of HIF and 2-Oxoglutarate-Dependent Dioxygenases in Controlling Gene Expression in Hypoxia. *Cancers* 13(2): 350



G, K. swamy, Ramesh, G., K, P., Banu, S., B, R., Preritha, H. J., Rajeshwari, B. S., Ravikumar, M., Raghuram Shetty, P., Aruna Kumar, D. B., & Sreenivasa, S. (2020). Synthesis, Characterization, Pass prediction, In-silico ADME, Molecular docking and Cyclic voltammetry studies of 1, 4, 5-trisubstituted 1, 2, 3-triazole ethanone and ethanol derivatives via Metal free approach. *Chemical Data Collections*, 28: 100452.

<https://doi.org/10.1016/j.cdc.2020.100452>

Ge, X., & Li, C. (2019). Savaging brain ischemia by increasing brain uptake of neuroprotectants. In *Brain Targeted Drug Delivery System* (pp. 357–374). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814001-7.00014-7>

Gilbert, M. (2017). Relation of Structure to Chemical Properties. In *Brydson's Plastics Materials* (pp. 75–102). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35824-8.00005-0>

Gunawan, S. G. (2017). *Farmakologi dan Terapi* (Vol. 6). Balai Penerbit FKUI.

Halleviski, K., Xu, Y., Haddad, Y. W., Tang, Y. P., Yamada, S., Katsuno, M., Adachi, H., Sobue, G., Breedlove, S. M., & Jordan, C. L. (2020). Muscle BDNF Improves Synaptic and Contractile Muscle Strength in Kennedy's Disease Mice in a Muscle-type specific Manner. *The Journal of Physiology* 598(13): 2719–2739

Han, X.-H., Cheng, M.-N., Chen, L., Fang, H., Wang, L.-J., Li, X.-T., & Qu, Z.-Q. (2014). 7,8-Dihydroxyflavone Protects PC12 Cells Against 6-Hydroxydopamine-Induced Cell Death Through Modulating PI3K/Akt and JNK Pathways. *Neuroscience Letters* 581: 85–88.

Hankey, G. J. (2017). Stroke. *The Lancet* 389(10069): 641–654.

Herawati, M., Wardaya, Mulyawan, W., Farhan, F. S., Ferdinal, F., Jusman, S. W. A., & Sadikin, M. (2017). Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 α and Myoglobin in Rat Heart as Adaptive Response to Intermittent Hypobaric Hypoxia Exposure. *HAYATI Journal of Biosciences* 24(3): 131–135

Huang, H., Chu, C.-L., Chen, L., & Shui, D. (2019). Evaluation of potential inhibitors of squalene synthase based on virtual screening and in vitro studies. *Computational Biology and Chemistry* 80: 390–397.

Huang, H.-M., Huang, C.-C., Tsai, M.-H., Poon, Y.-C., & Chang, Y.-C. (2018). Systemic 7,8-Dihydroxyflavone Treatment Protects Immature Retinas Against Hypoxic-Ischemic Injury via Müller Glia Regeneration and



MAPK/ERK Activation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 59(7): 3124

Hui, C., Tadi, P., & Patti, L. (2020). Ischemic Stroke. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499997/>

Hurford, R., Sekhar, A., Hughes, T. A. T., & Muir, K. W. (2020). Diagnosis and management of acute ischaemic stroke. *Practical Neurology* 20(4): 304–316

Idris, M. I., & Tan, C. T. (2018). Asia. In *Neuroepidemiology in Tropical Health* (pp. 71–85). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804607-4.00007-1>

Jasielski, P., Piędel, F., Piwek, M., Rocka, A., Petit, V., & Rejdak, K. (2020). Application of Citicoline in Neurological Disorders: A Systematic Review. *Nutrients* 12(10): 3113

Jayaram, B., Singh, T., Mukherjee, G., Mathur, A., Shekhar, S., & Shekhar, V. (2012). Sanjeevini: A freely Accessible Web-Server For Target Directed Lead Molecule Discovery. *BMC Bioinformatics* 13(17): 7.

Jin, J. (2014). Warning Signs of a Stroke. *JAMA* 311(16): 1704. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.2296>

Johnson, W., Onuma, O., Owolabi, M., & Sachdev, S. (2016). Stroke: A global response is needed. *Bulletin of the World Health Organization* 94(9): 634

Kaur, T., Madgulkar, A., Bhalekar, M., & Asgaonkar, K. (2019). Molecular Docking in Formulation and Development. *Current Drug Discovery Technologies* 16(1): 30–39

Khoshnam, S. E., Winlow, W., Farzaneh, M., Farbood, Y., & Moghaddam, H. F. (2017). Pathogenic Mechanisms Following Ischemic Stroke. *Neurological Sciences* 38(7): 1167–1186

Kietzmann, T., Mennerich, D., & Dimova, E. Y. (2016). Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) and Phosphorylation: Impact on Stability, Localization, and Transactivity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 4.

Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E. E. (2019). PubChem 2019 update: Improved access to chemical data. *Nucleic Acids Research* 47(1): 1102–1109

Klebe, G. (2013). Protein–Ligand Interactions as the Basis for Drug Action. In G. Klebe (Ed.), *Drug Design* (pp. 61–88). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-17907-5_4



Kulkarni, S. A., Nagarajan, S. K., Ramesh, V., Palaniyandi, V., Selvam, S. P., & Madhavan, T. (2020). Computational Evaluation of Major Components from Plant Essential Oils as Potent Inhibitors of SARS-CoV-2 Spike Protein. *Journal of Molecular Structure* 1221: 128823.

Kumarachari, R., Peta, S., Surur, A., & Mekonnen, Y. (2016). Synthesis, Characterization and In Silico Biological Activity of Some 2-(N,N-dimethyl guanidiny)-4,6-diaryl pyrimidines. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 8(3): 181

La Kilo, A., Aman, L. O., Sabihi, I., & La Kilo, J. (2019). Studi Potensi Pirazolin Tersubstitusi 1-N dari Thiosemicarbazone sebagai Agen Antiamuba melalui Uji In Silico. *Indo. J. Chem. Res* 7(1): 9–24.

Li, C., Cai, Y.-Y., & Yan, Z.-X. (2018). Brain-Derived Neurotrophic Factor Preserves Intestinal Mucosal Barrier Function and Alters Gut Microbiota in Mice. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences* 34(3): 134–141.

Lippl, K., Boleininger, A., McDonough, M., Abboud, M. I., Tarhonskaya, H., Chowdhury, R., Loenarz, C., & Schofield, C. J. (2018). Born to Sense: Biophysical Analyses of The Oxygen Sensing Prolyl Hydroxylase from The Simplest Animal *Trichoplax Adhaerens*. *Hypoxia* 6: 57–71

Liu, C., Chan, C. B., & Ye, K. (2016). 7,8-dihydroxyflavone, a Small Molecular TrkB Agonist, is Useful for Treating Various BDNF-implicated Human Disorders. *Translational Neurodegeneration* 5(1): 2

Liu, H., Wei, H., Wu, L., Liu, S., Tang, Y., Zou, W., Wang, C., Zhang, P., & Tang, X. (2020). BDNF-TrkB Pathway Mediates Antidepressant-Like Roles Of H₂S In Diabetic Rats Via Promoting Hippocampal Autophagy. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 47(2): 302–312.

Liu, W., Wang, X., O'Connor, M., Wang, G., & Han, F. (2020). Brain-Derived Neurotrophic Factor and Its Potential Therapeutic Role in Stroke Comorbidities. *Neural Plasticity* 2020: 1–13.

Mahmoud, S., Gharagozloo, M., Simard, C., & Gris, D. (2019). Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. *Cells* 8(2): 184.

Masoud, G. N., & Li, W. (2015). HIF-1 α pathway: Role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 5(5): 378–389.



Mehta, A., Mahale, R., Buddaraju, K., Javali, M., Acharya, P., & Srinivasa, R. (2019). Efficacy of Neuroprotective Drugs in Acute Ischemic Stroke: Is It Helpful? *Journal of Neurosciences in Rural Practice* 10(04): 576–581.

Mohankumar, T., Chandramohan, V., Lalithamba, H. S., Jayaraj, R. L., Kumaradhas, P., Sivanandam, M., Hunday, G., Vijayakumar, R., Balakrishnan, R., Manimaran, D., & Elangovan, N. (2020). Design and Molecular Dynamic Investigations of 7,8-Dihydroxyflavone Derivatives as Potential Neuroprotective Agents Against Alpha-synuclein. *Scientific Reports* 10(1): 599

Nakamura, A., Otani, K., & Shichita, T. (2020). Lipid Mediators and Sterile Inflammation in Ischemic Stroke. *International Immunology* 32(11): 719–725

Nie, S., Ma, K., Sun, M., Lee, M., Tan, Y., Chen, G., Zhang, Z., Zhang, Z., & Cao, X. (2019). 7,8-Dihydroxyflavone Protects Nigrostriatal Dopaminergic Neurons from Rotenone-Induced Neurotoxicity in Rodents. *Parkinson's Disease* 2019: 1–10

Ono, Y., & Bono, H. (2021). Multi-Omic Meta-Analysis of Transcriptomes and the Bibliome Uncovers Novel Hypoxia-Inducible Genes. *Biomedicines* 9(5): 582

Osama, A., Ashour, Y., El-Razek, R. A., & Mostafa, I. (2019). Public knowledge of warning signs and risk factors of cerebro-vascular stroke in Ismailia Governorate, Egypt. *The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery* 55(1): 31

Pandey, R. P., Parajuli, P., Pokhrel, A. R., & Sohng, J. K. (2018). Biosynthesis of Novel 7,8-Dihydroxyflavone Glycoside Derivatives and *In Silico* Study of Their Effects on BACE1 Inhibition: Biosynthesis of Novel 7,8-DHE Derivatives. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 65(2): 128–137

Pantsar, T., & Poso, A. (2018). Binding Affinity via Docking: Fact and Fiction. *Molecules* 23(8): 1899

Perhimpunan Dokter Spesialis Saraf Indonesia. (2011). *Guideline Stroke*.

Phillips, C. (2017). Brain-Derived Neurotrophic Factor, Depression, and Physical Activity: Making the Neuroplastic Connection. *Neural Plasticity* 2017: 1–17.

Powers, W. J., Rabinstein, A. A., Ackerson, T., Adeoye, O. M., Bambakidis, N. C., Becker, K., Biller, J., Brown, M., Demaerschalk, B. M., Hoh, B., Jauch, E. C., Kidwell, C. S., Leslie-Mazwi, T. M., Ovbiagele, B., Scott, P. A., Sheth,



K. N., Southerland, A. M., Summers, D. V., Tirschwell, D. L., & on behalf of the American Heart Association Stroke Council. (2019). Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: 2019 Update to the 2018 Guidelines for the Early Management of Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 50(12).

Pöyhönen, S., Er, S., Domanskyi, A., & Airavaara, M. (2019). Effects of Neurotrophic Factors in Glial Cells in the Central Nervous System: Expression and Properties in Neurodegeneration and Injury. *Frontiers in Physiology* 10: 486

Presley, B. (2014). Penatalaksanaan Farmakologi Stroke Iskemik Akut. *Buletin Rasional* 12(1).

Secades, J. J., Alvarez-Sabín, J., Castillo, J., Díez-Tejedor, E., Martínez-Vila, E., Ríos, J., & Oudovenko, N. (2016). Citicoline for Acute Ischemic Stroke: A Systematic Review and Formal Meta-analysis of Randomized, Double-Blind, and Placebo-Controlled Trials. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 25(8): 1984–1996.

Senami, M., & Ito, K. (2020). Identification of Hydrogen Bonds Using Quantum Electrodynamics. *International Journal of Quantum Chemistry* 120(14). <https://doi.org/10.1002/qua.26237>

Shi, P., Zhou, X., Yin, X., Xu, L., Zhang, X., & Bai, H. (2016). Early Application of Citicoline in The Treatment of Acute Stroke: A meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]* 36(2): 270–277.

Shi, X., Wang, J., Lei, Y., Cong, C., Tan, D., & Zhou, X. (2019). Research Progress on The PI3K/AKT Signaling Pathway In Gynecological Cancer (Review). *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10121>

Shin, H. K., Kang, Y.-M., & No, K. T. (2016). Predicting ADME Properties of Chemicals. In J. Leszczynski (Ed.), *Handbook of Computational Chemistry* (pp. 1–37). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6169-8_59-1

Shivanika, G., Deepak Kumar, S., Ragunathan, V., Tiwari, P., A., S., & P, B. D. (2020). Molecular Docking, Validation, Dynamics Simulations, and Pharmacokinetic Prediction of Natural Compounds Against the SARS-Cov-2 Main-protease. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*: 1–27.



Silva, R. F. N., Sacco, A. C. S., Caracelli, I., Zukerman-Schpector, J., & Tiekink, E. R. T. (2018). Sulfur(II)-pair... π interactions with FAD in flavoenzymes. *Zeitschrift Für Kristallographie - Crystalline Materials* 233(8): 531–537.

Sivalingam, K., & Samikkannu, T. (2020). Neuroprotective Effect of Piracetam Against Cocaine-Induced Neuro Epigenetic Modification of DNA Methylation in Astrocytes. *Brain Sciences* 10(9): 611.

Smirnova, N. A., Kaidery, N. A., Hushpilian, D. M., Rakhman, I. I., Polozhnikov, A. A., Tishkov, V. I., Karuppagounder, S. S., Gaisina, I. N., Pekcec, A., Leyen, K. V., Kazakov, S. V., Yang, L., Thomas, B., Ratan, R. R., & Gazaryan, I. G. (2016). Bioactive Flavonoids and Catechols as Hif1 and Nrf2 Protein Stabilizers—Implications for Parkinson's Disease. *Ageing and Disease* 7(6): 745

Strowitzki, M., Cummins, E., & Taylor, C. (2019). Protein Hydroxylation by Hypoxia-Inducible Factor (HIF) Hydroxylases: Unique or Ubiquitous? *Cells* 8(5): 384

Sun, T., Kim, B., & Kim, L. W. (2013). Glycogen Synthase Kinase 3 Influences Cell Motility and Chemotaxis by Regulating PI3K Membrane Localization in *Dictyostelium*. *Development, Growth & Differentiation* 55(8): 723–734.

Tao, X., Huang, Y., Wang, C., Chen, F., Yang, L., Ling, L., Che, Z., & Chen, X. (2020). Recent Developments in Molecular Docking Technology Applied in Food Science: A Review. *International Journal of Food Science & Technology* 55(1): 33–45

Tim Riskasdas. (2019). *Laporan Provinsi Jawa Timur RISKESDAS 2018*. Lembaga Penerbit Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. diakses di: https://drive.google.com/file/d/1MDq_khDmZYBFWXc_o4ddfwb6Uu5Qth-/view

Vagal, A., Aviv, R., Sucharew, H., Reddy, M., Hou, Q., Michel, P., Jovin, T., Tomsick, T., Wintermark, M., & Khatri, P. (2018). Collateral Clock is More Important than Time Clock for Tissue Fate: A Natural History Study of Acute Ischemic Strokes. *Stroke* 49(9): 2102–2107.

Viceconti, M., Pappalardo, F., Rodriguez, B., Horner, M., Bischoff, J., & Musuamba Tshinanu, F. (2020). In silico trials: Verification, Validation and Uncertainty Quantification of Predictive Models Used in The Regulatory Evaluation of Biomedical Products. *Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.01.011>



Wanat, K. (2020). Biological Barriers, and the Influence of Protein Binding on the Passage of Drugs Across Them. *Molecular Biology Reports* 47(4): 3221–3231

Wang, B., Zhang, Q., Yao, R., Liu, X., & Qu, Z. (2015). 7, 8-Dihydroxyflavone Protects an Endothelial Cell Line from H₂O₂ Damage. *PLOS ONE* 10(8): e0135345. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135345>

Wang, D.-X., & Wang, M.-X. (2013). Anion- π Interactions: Generality, Binding Strength, and Structure. *Journal of the American Chemical Society* 135(2): 892–897

Wang, Z., Wang, S., Shao, Q., Li, P., Sun, Y., Luo, L., Yan, X., Fan, Z., Hu, J., Zhao, J., Hang, P., & Du, Z. (2019). Brain-Derived Neurotrophic Factor Mimetic, 7,8-Dihydroxyflavone, Protects Against Myocardial Ischemia by Rebalancing Optic Atrophy 1 Processing. *Free Radical Biology and Medicine* 145: 187–197.

Wilkins, S. E., Abboud, M. I., Hancock, R. L., & Schofield, C. J. (2016). Targeting Protein-Protein Interactions in the HIF System. *ChemMedChem* 11(8): 773–786

Wu, C.-H., Chen, C.-C., Hung, T.-H., Chuang, Y.-C., Chao, M., Shyue, S.-K., & Chen, S.-F. (2019). Activation of TrkB/Akt Signaling by a TrkB Receptor Agonist Improves Long-Term Histological and Functional Outcomes in Experimental Intracerebral Hemorrhage. *Journal of Biomedical Science* 26(1): 53

Wu, C.-H., Hung, T.-H., Chen, C.-C., Ke, C.-H., Lee, C.-Y., Wang, P.-Y., & Chen, S.-F. (2014). Post-Injury Treatment with 7,8-Dihydroxyflavone, a TrkB Receptor Agonist, Protects Against Experimental Traumatic Brain Injury via PI3K/Akt Signaling. *PLoS ONE* 9(11): e113397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113397>

Xie, Y., Shi, X., Sheng, K., Han, G., Li, W., Zhao, Q., Jiang, B., Feng, J., Li, J., & Gu, Y. (2018). PI3K/Akt signaling transduction pathway, erythropoiesis and glycolysis in hypoxia (Review). *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9713>

Xu, F., Na, L., Li, Y., & Chen, L. (2020). Roles of the PI3K/AKT/mTOR Signalling Pathways in Neurodegenerative Diseases and Tumours. *Cell & Bioscience* 10(1): 54



Yeh, T.-L., Leissing, T. M., Abboud, M. I., Thinnies, C. C., Atasoylu, O., Holt-Martyn, J. P., Zhang, D., Tumber, A., Lippl, K., Lohans, C. T., Leung, I. K. H., Morcrette, H., Clifton, I. J., Claridge, T. D. W., Kawamura, A., Flashman, E., Lu, X., Ratcliffe, P. J., Chowdhury, R., ... Schofield, C. J. (2017).

Molecular and Cellular Mechanisms of HIF Prolyl Hydroxylase Inhibitors in Clinical Trials. *Chem. Sci.* 8(11): 7651–7668.

Yew, K. S. (2015). *Diagnosis of Acute Stroke*. 91(8): 9.

Yu, T., Tang, B., & Sun, X. (2017). Development of Inhibitors Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1 and 2 for Cancer Therapy. *Yonsei Medical Journal* 58(3): 489

Yuan, S., Chan, H. C. S., & Hu, Z. (2017). Using PYMOL as a Platform for Computational Drug Design. *WIREs Computational Molecular Science* 7(2). <https://doi.org/10.1002/wcms.1298>

Zhang, C., Liao, Y., Liu, L., Sun, Y., Lin, S., Lan, J., Mao, H., Chen, H., & Zhao, Y. (2020). A Network Pharmacology Approach to Investigate the Active Compounds and Mechanisms of Musk for Ischemic Stroke. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2020: 1–14.

Zhang, Z., Yao, L., Yang, J., Wang, Z., & Du, G. (2018). PI3K/Akt and HIF-1 Signaling Pathway in Hypoxia-Ischemia (Review). *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9375>

Zhao, Y., Li, J., Gu, H., Wei, D., Xu, Y., Fu, W., & Yu, Z. (2015). Conformational Preferences of π - π Stacking Between Ligand and Protein, Analysis Derived from Crystal Structure Data Geometric Preference of π - π Interaction. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences* 7(3): 211–220



Lampiran 2. Preparasi Ligan

1. Mengunduh makromolekul senyawa 7,8-Dihydroxyflavone (DHF) dari situs Pubchem

PubChem About Blog Submit Contact

Search PubChem

COMPOUND SUMMARY

7,8-Dihydroxyflavone

PubChem CID 1880

Structure

2D 3D

Find Similar Structures

Chemical Safety

Irritant

Laboratory Chemical Safety Summary (LCSS) Datasheet

Molecular Formula $C_{15}H_{10}O_4$

Cite Download

CONTENTS

- Title and Summary
- 1 Structures
- 2 Names and Identifiers
- 3 Chemical and Physical Properties
- 4 Spectral Information
- 5 Related Records
- 6 Chemical Vendors
- 7 Food Additives and Ingredients
- 8 Use and Manufacturing
- 9 Safety and Hazards
- 10 Associated Disorders and Diseases
- 11 Literature

2. Minimalisasi energi ikatan pada software PyRx dan menyimpan dalam bentuk .pdbqt

PyRx - Virtual Screening Tool

File Edit View Help

Navigator

Molecules AutoDock TVTK Mayavi

View

3D Scene 2D Plots Documents Tables Open Babel

dhf_uff_E=201.56

Controls

Vina Wizard AutoDock Wizard Open Babel Python Shell Logger

View: No filter Results: All 1 items

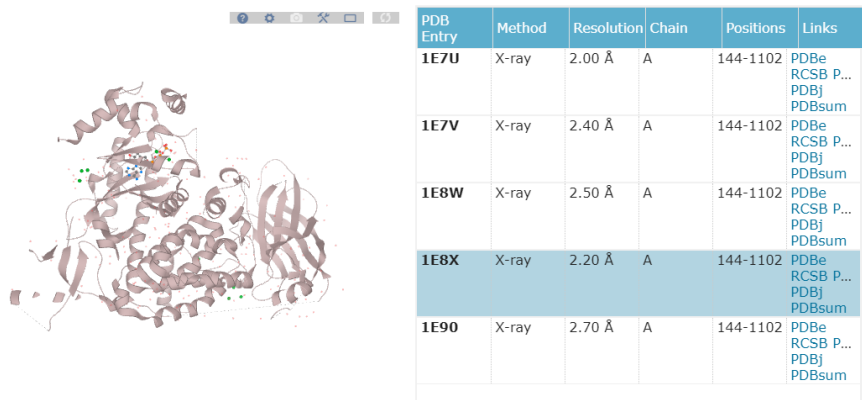
Title	Formula	Weight	Number of atoms
dhf_uff_E=201.56	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254.2375	29



Lampiran 3. Preparasi Protein Target

1. Preparasi Protein PI3K
 - a. Skrining dari situs Uniprot

Structure¹



PDB Entry	Method	Resolution	Chain	Positions	Links
1E7U	X-ray	2.00 Å	A	144-1102	PDBe RCSB P... PDBj PDBsum
1E7V	X-ray	2.40 Å	A	144-1102	PDBe RCSB P... PDBj PDBsum
1E8W	X-ray	2.50 Å	A	144-1102	PDBe RCSB P... PDBj PDBsum
1E8X	X-ray	2.20 Å	A	144-1102	PDBe RCSB P... PDBj PDBsum
1E90	X-ray	2.70 Å	A	144-1102	PDBe RCSB P... PDBj PDBsum

- b. Mengunduh protein target dari situs *Protein Data Bank* (PDB) dengan PDB ID: 1E8X



RCSB PDB Deposit Search Visualize Analyze Download Learn More Documentation MyPDB

Structure Summary 3D View Annotations Experiment Sequence Genome Versions

Biological Assembly 1

1E8X

STRUCTURAL INSIGHTS INTO PHOSPHOINOSITIDE 3-KINASE ENZYMATIC MECHANISM AND SIGNALLING

DOI: 10.2210/pdb1E8X/pdb Entry: 1E8X supersedes: 1QM6

Classification: PHOSPHOINOSITIDE 3-KINASE GAMMA

Organism(s): *Sus scrofa*

Expression System: *Spodoptera frugiperda*

Mutation(s): No

Deposited: 2000-10-03 Released: 2000-10-26

Deposition Author(s): Walker, E.H., Persic, O., Ried, C., Stephens, L., Williams, R.L.

Experimental Data Snapshot

Method: X-RAY DIFFRACTION

Resolution: 2.20 Å

R-Value Free: 0.306

R-Value Work: 0.255

R-Value Observed: 0.255

wwPDB Validation

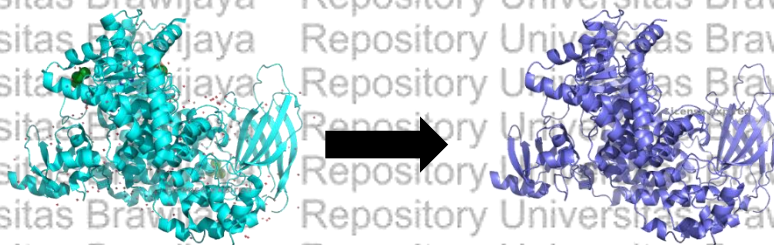
Metric	Percentile Ranks	Value
Rfcore		0.298
Clashscore		30
Ramachandran outliers		2.8%
Sidechain outliers		8.1%
RSRZ outliers		10.6%

3D View: Structure | Electron Density | Ligand Interaction

Global Symmetry: Asymmetric - C1

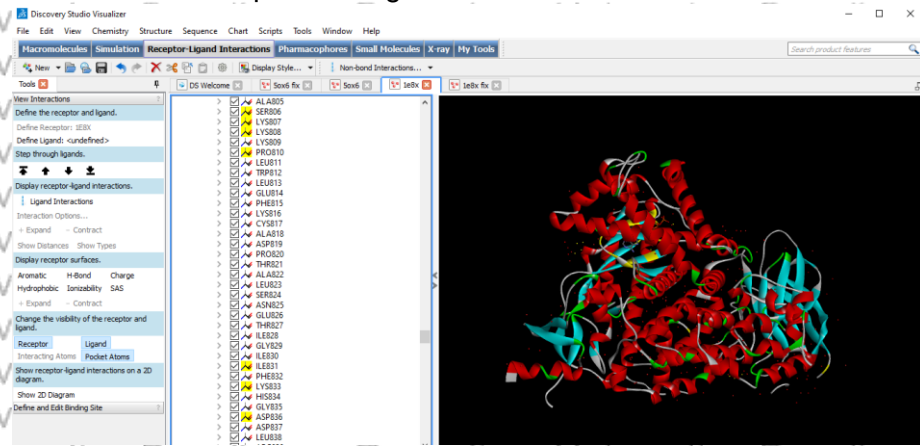
Global Stoichiometry: Monomer - A1

- c. Menghapus ligan, molekul air, dan atom hidrogen





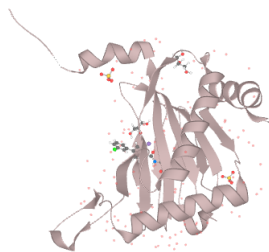
d. Melihat active site protein target



2. Preparasi Enzim *prolyl hydroxylase*

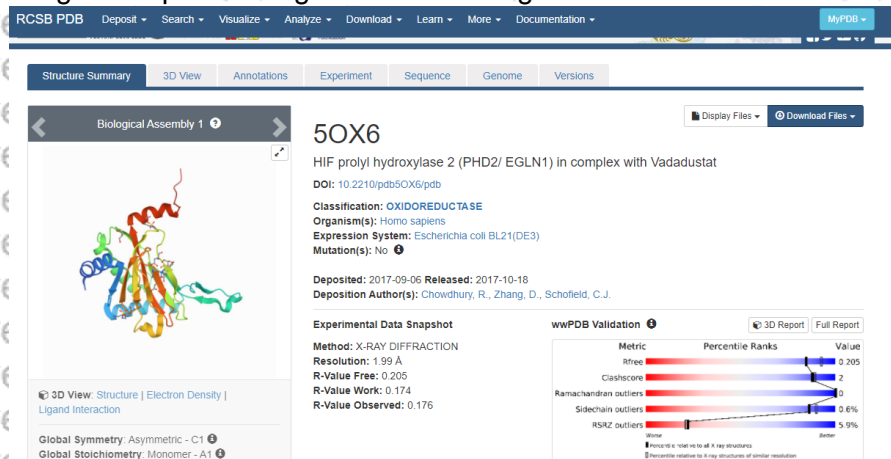
a. Skrining dari situs Uniprot

Structure



PDB Entry	Method	Resolution	Chain	Positions	Links
5LBE	X-ray	1.75 Å	A	181-426	PDBj PDBsum
5LBF	X-ray	1.90 Å	A	181-426	PDBe RCSB P... PDBj PDBsum
5OX5	X-ray	2.25 Å	A	181-426	PDBe RCSB P... PDBj PDBsum
5OX6	X-ray	1.99 Å	A	181-426	PDBe RCSB P... PDBj PDBsum
5V18	X-ray	2.15 Å	A	181-416	PDBe RCSB P... PDBj

b. Mengunduh protein target dari PDB dengan PDB ID: 5OX6



5OX6
HIF prolyl hydroxylase 2 (PHD2/ EGLN1) in complex with Vadadustat

DOI: 10.2210/pdb5OX6/pdb

Classification: OXIDOREDUCTASE
Organism(s): Homo sapiens
Expression System: Escherichia coli BL21(DE3)
Mutation(s): No

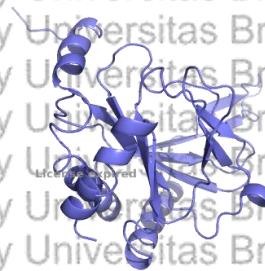
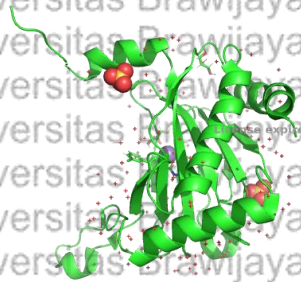
Deposited: 2017-09-06 Released: 2017-10-18
Deposition Author(s): Chowdhury, R., Zhang, D., Schofield, C.J.

Experimental Data Snapshot
Method: X-RAY DIFFRACTION
Resolution: 1.99 Å
R-Value Free: 0.205
R-Value Work: 0.174
R-Value Observed: 0.176

wwPDB Validation
Metric Percentile Ranks Value
R-fact_{0.5} 0.205
Clashscore 2
Ramachandran outliers 0.0
Sidechain outliers 0.6%
RSRZ outliers 5.9%



c. Menghapus ligan, molekul air, dan atom hidrogen



d. Melihat active site protein target



Lampiran 4. Analisis Farmakokinetik

1. PreADMET

a. File senyawa 7,8-DHF dalam format .mol disimpan pada *notepad*

pre adme - Notepad

File Edit Format View Help

1880

-OEChem-03112121133D

```

29 31 0 0 0 0 0 0 0999 V2000
0.0531 0.5691 0.0328 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-1.7445 2.5937 0.1633 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-1.1001 -3.3322 -0.1882 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-4.4597 2.0661 0.1469 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-1.7442 -1.0624 -0.0555 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-1.2811 0.2501 0.0205 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0.9790 -0.4602 -0.0422 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-0.7647 -2.1576 -0.1249 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
2.3841 -0.0064 -0.0165 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0.6581 -1.7619 -0.1118 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-2.1892 1.3068 0.0894 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-3.1154 -1.3284 -0.0639 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-3.5596 1.0454 0.0811 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-4.0214 -0.2694 0.0045 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
3.3735 -0.8167 0.5463 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
2.7308 1.2356 -0.5548 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
4.7006 -0.3880 0.5709 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
4.0580 1.6642 -0.5303 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
5.0428 0.8523 0.0325 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
1.3836 -2.5638 -0.1825 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-3.4933 -2.3451 -0.1226 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-5.0885 -0.4756 -0.0021 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
3.1448 -1.7795 0.9955 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
1.9851 1.8850 -1.0069 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
5.4670 -1.0175 1.0135 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
4.3252 2.6293 -0.9508 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
6.0761 1.1865 0.0524 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-0.7716 2.5824 0.1559 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-3.9683 2.9045 0.1947 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0

```

b. Membuka situs PreADME dan menempelkan angka-angka yang terdapat pada *notepad* dengan cara *copy-paste* dan *submit* hingga muncul struktur senyawa 7,8-DHF

PreADMET Home About Druglikeness ADME Toxicity Community Commercial

Load Molecule

Copy and paste the contents of a MOL file (.mol) or ChemDoodle JSON in the textarea below and then press the Load button.

```

29 31 0 0 0 0 0 0 0999 V2000
0.0531 0.5691 0.0328 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-1.7445 2.5937 0.1633 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-1.1001 -3.3322 -0.1882 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-4.4597 2.0661 0.1469 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-1.7442 -1.0624 -0.0555 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-1.2811 0.2501 0.0205 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0.9790 -0.4602 -0.0422 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-0.7647 -2.1576 -0.1249 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
2.3841 -0.0064 -0.0165 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0.6581 -1.7619 -0.1118 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-2.1892 1.3068 0.0894 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-3.1154 -1.3284 -0.0639 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-3.5596 1.0454 0.0811 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-4.0214 -0.2694 0.0045 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
3.3735 -0.8167 0.5463 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
2.7308 1.2356 -0.5548 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
4.7006 -0.3880 0.5709 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
4.0580 1.6642 -0.5303 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
5.0428 0.8523 0.0325 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
1.3836 -2.5638 -0.1825 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-3.4933 -2.3451 -0.1226 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-5.0885 -0.4756 -0.0021 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
3.1448 -1.7795 0.9955 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
1.9851 1.8850 -1.0069 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
5.4670 -1.0175 1.0135 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
4.3252 2.6293 -0.9508 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
6.0761 1.1865 0.0524 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-0.7716 2.5824 0.1559 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
-3.9683 2.9045 0.1947 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0

```

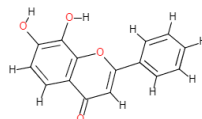
Where do I get MOL files or ChemDoodle JSON?

Submit

Go to Settings to activate Windows.



Pre ADMET

Home About Druglikeness **ADME** Toxicity Community Commercial

ChemDoodle®

Submit

c. Kemudian klik lagi tombol **submit** hingga keluar hasil prediksi

ADME – PreADMET | Prediction of ADME/Tox

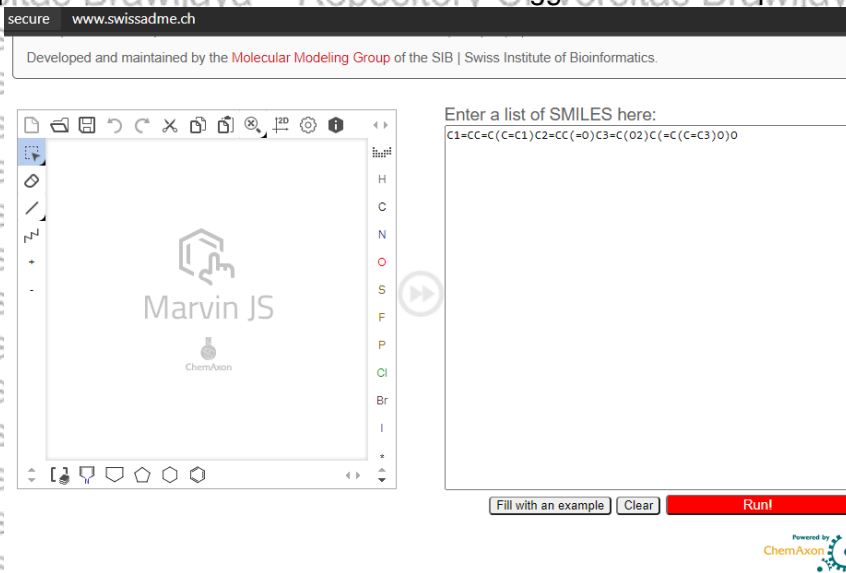
ID	Value
BBB	0.934576
Buffer_solubility_mg_L	935.722
Caco2	4.78552
CYP_2C19_inhibition	Inhibitor
CYP_2C9_inhibition	Inhibitor
CYP_2D6_inhibition	Non
CYP_2D6_substrate	Non
CYP_3A4_inhibition	Inhibitor
CYP_3A4_substrate	Non
HIA	92.637084
MDCK	289.757
Pgp_inhibition	Non
Plasma_Protein_Binding	93.019905
Pure_water_solubility_mg_L	96.6889
Skin_Permeability	-3.41557
SKlogD_value	2.933450
SKlogP_value	2.933450
SKlogS_buffer	-2.434100
SKlogS_pure	-3.419870

2. SwissADME

- a. Masuk ke situs SwissADME dan memasukkan SMILES 7,8-DHF yang didapat dari situs PubChem lalu klik *Run!* Hingga muncul hasil prediksi

secure www.swissadme.ch

Developed and maintained by the [Molecular Modeling Group](#) of the SIB | Swiss Institute of Bioinformatics.

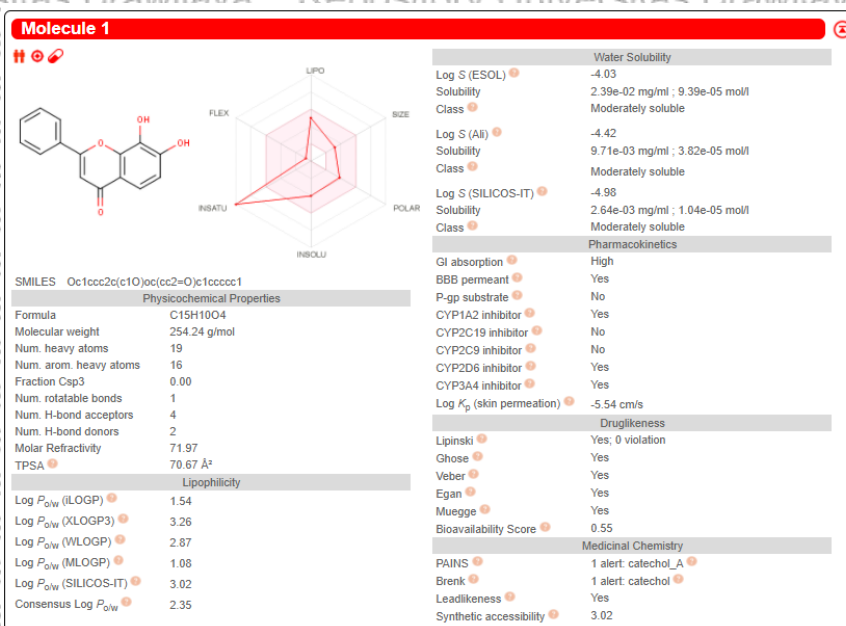


Enter a list of SMILES here:
c1=cc-c(c=c1)c2=cc(=O)c3=c(O)c2c(=c(c=c3)O)

Fill with an example Clear Run!

Powered by ChemAxon

Molecule 1



SMILES Oc1ccc2c(c1O)c(=O)c1ccccc1

Physicochemical Properties	
Formula	C ₁₅ H ₁₀ O ₄
Molecular weight	254.24 g/mol
Num. heavy atoms	19
Num. arom. heavy atoms	16
Fraction Csp ³	0.00
Num. rotatable bonds	1
Num. H-bond acceptors	4
Num. H-bond donors	2
Molar Refractivity	71.97
TPSA	70.67 Å ²
Lipophilicity	
Log P _{ow} (ILOGP)	1.54
Log P _{ow} (XLOGP3)	3.26
Log P _{ow} (WLOGP)	2.87
Log P _{ow} (MLOGP)	1.08
Log P _{ow} (SILICOS-IT)	3.02
Consensus Log P _{ow}	2.35

Water Solubility	
Log S (ESOL)	-4.03
Solubility	2.39e-02 mg/ml ; 9.39e-05 mol/l
Class	Moderately soluble
Log S (All)	-4.42
Solubility	9.71e-03 mg/ml ; 3.82e-05 mol/l
Class	Moderately soluble
Log S (SILICOS-IT)	-4.98
Solubility	2.64e-03 mg/ml ; 1.04e-05 mol/l
Class	Moderately soluble
Pharmacokinetics	
GI absorption	High
BBB permeant	Yes
P-gp substrate	No
CYP1A2 inhibitor	Yes
CYP2C9 inhibitor	No
CYP2D6 inhibitor	Yes
CYP3A4 inhibitor	Yes
Log K _p (skin permeation)	-5.54 cm/s
Druglikeness	
Lipinski	Yes, 0 violation
Ghose	Yes
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes
Bioavailability Score	0.55
Medicinal Chemistry	
PAINS	1 alert: catechol_A
Brenk	1 alert: catechol
Leadlikeness	Yes
Synthetic accessibility	3.02



3. Lipinski Rule of Five

- a. Masuk ke situs *Lipinski Rule of Five* dan memasukkan file 7,8-DHF dalam format .pdb lalu klik *Submit* hingga muncul hasil prediksi

scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp

Lipinski Rule of Five

Lipinski rule of 5 helps in distinguishing between drug like and non drug like molecules. It predicts high probability of success or failure due to drug likeness for molecules complying with 2 or more of the following rules

- Molecular mass less than 500 Dalton
- High lipophilicity (expressed as LogP less than 5)
- Less than 5 hydrogen bond donors
- Less than 10 hydrogen bond acceptors
- Molar refractivity should be between 40-130

These filters help in early preclinical development and could help avoid costly late-stage preclinical and clinical failures .To draw a chemical structure [Click Here](#) and follow the instructions given.

Step 1: Input Drug File.

Input PDB file dhf.pdb

Step 2 : Input pH Value

pH Value [Value ranges from 0.0 to 14.0]

Step 3: Click on 'Submit' to submit your job

How to Use the Tool

OPTION 1:-

- The input File should be in the following formats[*.pdb, *.mol, *.mol2, *.xyz, *.sdf, *.smi]
- The input file name should not contain whitespace(s).
- Browse and Upload the file.
- Click on Submit.

- b. Hasil prediksi *Lipinski Rule of Five*

mass: 254.000000

hydrogen bond donor: 2

hydrogen bond acceptors: 4

LOGP: 2.713999

Molar Refractivity: 69.149078



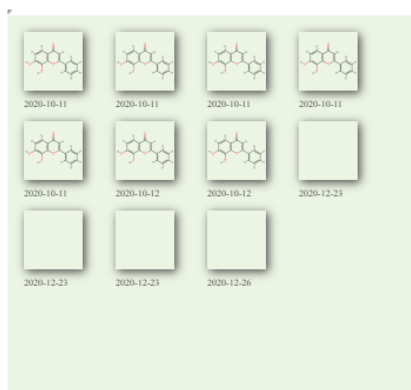
Lampiran 5. Uji Fungsi Obat dengan *Prediction of Activity Spectra for Substance (PASS)*

1. Masuk ke situs PASS Online dan pilih *GO for Prediction* di halaman utama
2. Pilih *predict new compound* dan memasukkan SMILES 7,8-DHF yang didapat dari PubChem dan pilih *Get prediction*

PASSonline

Safira Dita Arviana ([Log out](#)) [Go](#)

» Home | » Definitions | » Products | » Services | » FAQ | » Contacts

[Predict new compound](#)[View old results](#)[View/change profile](#)

The date of prediction is 2020-10-11

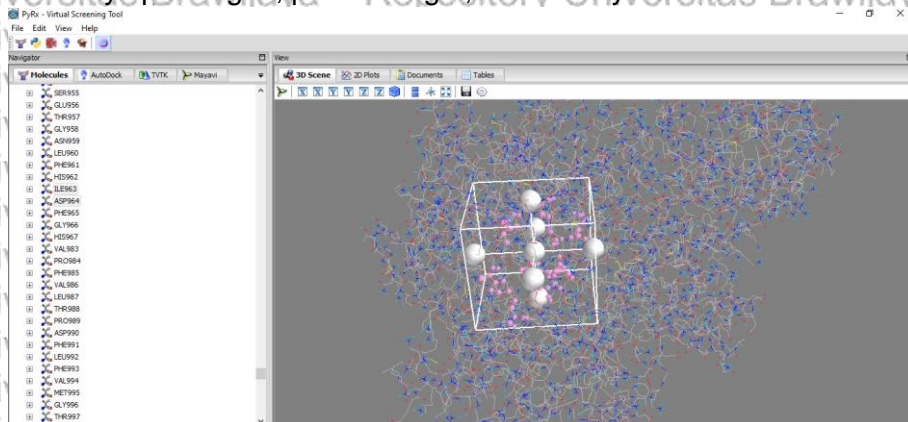
Pa	Pi	Activity name
0,970	0,002	HIF1A expression inhibitor
0,961	0,002	Chlordecone reductase inhibitor
0,958	0,003	Membrane integrity agonist
0,950	0,002	Kinase inhibitor
0,948	0,002	Membrane permeability inhibitor
0,940	0,001	Aryl-alcohol dehydrogenase (NADP ⁺) inhibitor
0,933	0,001	P-benzoquinone reductase (NADPH) inhibitor
0,930	0,002	2-Dehydropanoate 2-reductase inhibitor
0,928	0,002	Peroxidase inhibitor
0,924	0,002	Antimutagenic
0,917	0,002	CYP1A inducer
0,912	0,001	MAP kinase stimulant
0,915	0,009	CYP2C12 substrate



Lampiran 6. Molecular Docking

1. Senyawa 7,8-DHF dan Protein PI3K

a. Menyiapkan ligan, protein target, serta menyesuaikan *active site*



b. Menyesuaikan *grid box*

Vina Search Space

Center X: 21.441 Y: 61.673 Z: 20.633

Dimensions (Angstrom) X: 25 Y: 25 Z: 25

Reset

c. Hasil dari penambatan molekuler

a. *Native ligand* dan protein target

Index	Name	Visible	Tagged	Visibility Locked	Vina Binding Affinity
1	1e8x_fix_atp_uff_e=1402.81_0	<input checked="" type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-7,5
2	1e8x_fix_atp_uff_e=1402.81_1	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-7,5
3	1e8x_fix_atp_uff_e=1402.81_2	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-7,4
4	1e8x_fix_atp_uff_e=1402.81_3	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-7,3
5	1e8x_fix_atp_uff_e=1402.81_4	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-7,3
6	1e8x_fix_atp_uff_e=1402.81_5	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-7,2
7	1e8x_fix_atp_uff_e=1402.81_6	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-7,2
8	1e8x_fix_atp_uff_e=1402.81_7	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-7,1
9	1e8x_fix_atp_uff_e=1402.81_8	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-7,1

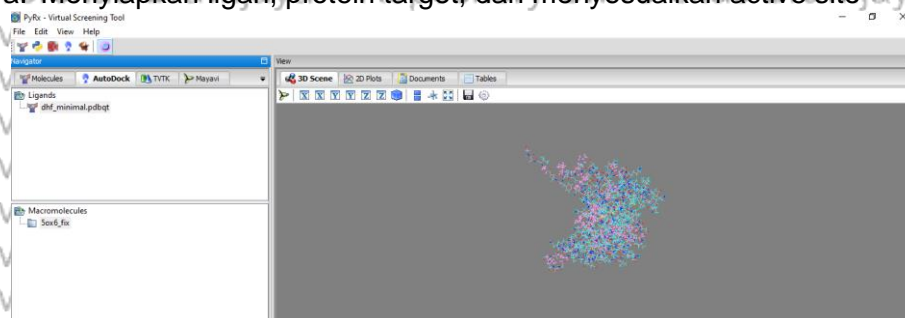
b. Senyawa 7,8-DHF dan protein target

Index	Name	Visible	Tagged	Visibility Locked	Vina Binding Affinity
1	1e8x_fix_1880_uff_e=185.12_0	<input checked="" type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-8,6
2	1e8x_fix_1880_uff_e=185.12_1	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-8,5
3	1e8x_fix_1880_uff_e=185.12_2	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-8
4	1e8x_fix_1880_uff_e=185.12_3	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-8
5	1e8x_fix_1880_uff_e=185.12_4	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-7,7
6	1e8x_fix_1880_uff_e=185.12_5	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-7,6
7	1e8x_fix_1880_uff_e=185.12_6	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-7,5
8	1e8x_fix_1880_uff_e=185.12_7	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-7,5
9	1e8x_fix_1880_uff_e=185.12_8	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-7,4



2. Senyawa 7,8-DHF dan enzim *prolyl hydroxylase*

a. Menyiapkan ligan, protein target, dan menyesuaikan active site



b. Menyesuaikan *grid box*

5ox6_fix

Vina Search Space

Center X: 14.196 Y: 123.269 Z: -0.296

Dimensions (Angstrom) X: 50 Y: 50 Z: 50

Reset

c. Hasil dari penambatan molekuler

a. *Native ligand* dan protein target

Index	Name	Visible	Tagged	Visibility Locked	Vina Binding Affinity
1	5ox6_fix...	<input checked="" type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-7,5
2	5ox6_fix...	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-7,4
3	5ox6_fix...	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-7
4	5ox6_fix...	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-6,9
5	5ox6_fix...	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-6,6
6	5ox6_fix...	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-6,4
7	5ox6_fix...	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-6,4
8	5ox6_fix...	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-6,3
9	5ox6_fix...	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-6,2

b. Senyawa 7,8-DHF dan protein target

Index	Name	Visible	Tagged	Visibility Locked	Vina Binding Affinity
1	5ox6_fix...	<input checked="" type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-7,5
2	5ox6_fix...	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-7,4
3	5ox6_fix...	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-7,2
4	5ox6_fix...	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-7,1
5	5ox6_fix...	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-6,4
6	5ox6_fix...	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-6,4
7	5ox6_fix...	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-6,4
8	5ox6_fix...	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-6,3
9	5ox6_fix...	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-6,1

**RIWAYAT HIDUP**

Safira Dita Arviana, lahir di Malang, 6 Maret 1998. Putri dari bapak Wahyudi Irawanto dan ibu Sriatiningsih. Lulus dari MIN Malang 1 pada tahun 2010, MTsN Malang 1 tahun 2013, SMAN 8 Malang pada tahun 2016, dan menyelesaikan pendidikan sarjana kedokteran di UIN Maulana Malik Ibrahim Malang pada tahun 2020. Pada tahun yang sama, mengambil pendidikan Magister Ilmu Biomedik di Universitas Brawijaya Malang.

