

**JURNAL METAMORFOSA**  
**Journal of Biological Sciences** ISSN:  
2302-5697  
<http://ojs.unud.ac.id/index.php/metamorfosa>

**Mekanisme Kerja Penghambatan Antibiotik Ceftriaxone, Clarithromycin, dan Quercetin terhadap ezim Pneumolysin pada *Streptococcus pneumoniae* Metoda secara *Docking In Silico***

**Inhibitor Mechanism of Ceftriaxone, Clarithromycin, and Quercetin to Pneumolysin Enzyme on *Streptococcus pneumonia* with Docking *In Silico* Method**

**Irma Damayanti<sup>1\*</sup>, Yan Ramona<sup>1</sup>, Sentot Joko Raharjo<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Biologi, FMIPA, Universitas Udayana*

<sup>2</sup> *Analisis Farmasi dan Makanan, Akademi Analis Farmasi dan Makanan Putera Indonesia Malang*

\*Email: [irmadmy99@gmail.com](mailto:irmadmy99@gmail.com)

## INTISARI

*Pneumolysin* adalah protein dari bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang berperan penting dalam kematian sel dan kolonisasi bakteri. Ceftriaxone, clarithromycin, dan quercetin terbukti secara *in vivo* dan *in vitro* dapat menghambat aktivitas dari *pneumolysin*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi interaksi penghambatan ceftriaxone, clarithromycin, dan quercetin terhadap aktivitas *pneumolysin* secara *in silico*. Struktur 3D *pneumolysin* diunduh melalui RCSB PDB (PDB ID:PQQA). Struktur 3D ceftriaxone (ID:5479530), clarithromycin (ID:84029), dan quercetin (ID:5280343) diunduh melalui PubChem. Preparasi protein dengan Discovery Studio dan ligan dengan OpenBabel. Proses *docking* menggunakan HEX 8.0.0 dan analisis visualisasi dengan Discovery Studio. Interaksi *pneumolysin*-ceftriaxone menghasilkan 4 ikatan hidrogen, 5 ikatan hidrofobik, 1 ikatan elektrostatik, dan 2 ikatan *unfavourable* dengan nilai energi ikatan sebesar -329,98kJ/mol. Interaksi *pneumolysin*-clarithromycin menghasilkan 3 ikatan hidrogen, 1 ikatan elektrostatik, dan 3 ikatan *unfavourable* dengan nilai energi ikatan sebesar -311,12kJ/mol. Interaksi *pneumolysin*-quercetin menghasilkan 2 ikatan hidrogen, 4 ikatan hidrofobik, dan 2 ikatan elektrostatik dengan nilai energi ikatan sebesar -246,52kJ/mol. Kesimpulan penelitian ini adalah Ceftriaxone, Clarithromycin, and Quercetin memiliki kemampuan sebagai penghambat *Pneumolysin* enzyme pada *Streptococcus pneumonia*.

Kata kunci: *S. pneumonia*, *pneumolysin*, ceftriaxone, clarithromycin, quercetin, *in silico*.

## ABSTRACT

Pneumolysin is a protein that plays an important role in cell death and bacterial colonization of *Streptococcus pneumoniae*. Ceftriaxone, clarithromycin, dan quercetin has been proven (*in vivo* and *in vitro*) to prevent the action of *pneumolysin*. The purpose of this study was to identify inhibitor interactions of ceftriaxone, clarithromycin, and quercetin in inhibiting the *pneumolysin* activity through *in silico*. The 3D structure of *pneumolysin* was downloaded via RCSB PDB (PDB ID:PQQA), while 3D structure of ceftriaxone (ID:5479530), clarithromycin (ID:84029), and quercetin (ID:5280343) were downloaded via PubChem. Protein preparations were done with Discovery Studio, while ligands were prepared with OpenBabel. The docking process used HEX 8.0.0 and visualization analysis with Discovery Studio. Pneumolysin-ceftriaxone interaction produces 4 hydrogen bonds, 5 hydrophobic bonds, 1 electrostatic bond, and 2 unfavorable residue bonds with a bond energy value -329.98kJ/mol. Pneumolysin-clarithromycin interaction produces 3 hydrogen bonds, 1 electrostatic bond, and 3 unfavorable residue bonds with a bond energy value -311.12kJ/mol. Pneumolysin-quercetin interaction produces 2 hydrogen bonds, 4 hydrophobic bonds, and 2 electrostatic bonds with a bond energy value -246.52kJ/mol. The

conclusion of research is Ceftriaxone, Clarithromycin, and Quercetin have a candidate as *Pneumolysin* enzyme on *Streptococcus pneumonia*.

**Keyword:** *S. pneumonia*, *pneumolysin*, ceftriaxone, clarithromycin, quercetin, *in silico*.

## PENDAHULUAN

*Streptococcus pneumoniae* merupakan bakteri utama yang bertanggung jawab terhadap *Invasive Pneumococcal Disease* (IPD) seperti meningitis dan bakterimia, dan juga infeksi non-IPD seperti pneumonia, otitis media, dan sinusitis (Smith *et al.*, 2020). WHO (2020) melaporkan bahwa terdapat 14,5 juta kasus infeksi pneumonia yang disebabkan oleh bakteri pneumokokus dengan total kematian 826.000 di dunia setiap tahunnya (Jimbo-Sotomayor *et al.*, 2020) dan diantaranya 500.000 kematian adalah anak dengan usia di bawah 5 tahun (Ezaji *et al.*, 2019).

*Streptococcus pneumoniae* dilaporkan memiliki lebih dari 10 protein yang berperan sebagai faktor virulensi utama, salah satunya adalah protein *pneumolysin* (Hu *et al.*, 2015). *Pneumolysin* adalah protein jenis *pore-forming* toksin yang termasuk ke dalam *cholesterol-binding cytolysin*, protein ini diekspresikan oleh gen *ply* dan ditemukan pada hampir semua isolat klinis dari bakteri *Streptococcus pneumonia* (Vögele *et al.*, 2019). *Pneumolysin* memiliki berat molekul 53 kilo Dalton (kD) dan bertanggung jawab pada hampir semua tahap virulensi (Tettlin *et al.*, 2015). *Pneumolysin* dapat menyebabkan kerusakan pada sel, kematian sel, dan dapat mengubah komponen dan fungsi sel untuk memodulasi dan memfasilitasi proses transmisi, invasi, dan kolonisasi bakteri (Nishimoto *et al.*, 2020).

Kristal struktur dari *pneumolysin* (PLY) merupakan protomers yang memanjang dan terdiri dari 4 domain, yaitu domain 1 (D1), domain 2 (D2), domain 3 (D3), dan domain 4 (D4) (Lawrence *et al.*, 2015). Proses *binding* dengan membran sel dimediasi oleh domain 4 melalui Trp-rich *undecapeptide* (residu Trp433, Trp435, Trp436) dan Loop L1 (Thr459, Leu460, Tyr461) (Faraj *et al.*, 2020).

Aktivitas utama *pneumolysin* adalah kemampuannya untuk membentuk pori-pori pada membran kolesterol melalui proses

oligomerisasi domain 4 dan mengaktivasi komplemen jalur klasik dengan pengikatan bagian Fc dari imunoglobulin dan C1q yang menyebabkan turunnya aktivitas opsonisasi C3, sehingga mengganggu proses fagositosis bakteri (Sánchez-Tarjuelo *et al.*, 2020).

Terapi antibakteri dengan kombinasi antibiotik ceftriaxone dan clarithromycin terbukti secara *in vivo* dan *in vitro* mampu mengurangi kerusakan yang disebabkan oleh protein *pneumolysin* (Toromkuney *et al.*, 2020), namun pengobatan dengan antibiotik dapat menimbulkan resistensi terhadap bakteri, sehingga diperlukan senyawa aktif lain yang memiliki potensi sebagai agen antibakterial (Leyeenar *et al.*, 2015).

Senyawa aktif quercetin telah terbukti dapat menghambat aktivitas *pneumolysin* secara *in vivo* dan *in vitro*. Penelitian yang dilakukan Wang *et al.* (2018) dan Nishimoto *et al.* (2020) menggunakan quercetin sebagai kandidat agen antibakterial secara *in vitro*, sedangkan penelitian oleh Qianghua *et al.* (2020) dilakukan secara *in vivo* dengan menggunakan tikus sebagai hewan uji. Hasil penelitian menunjukkan bahwa quercetin secara signifikan mengurangi sitotoksitas yang diinduksi oleh *pneumolysin* melalui penekanan pembentukan oligomer. Pengobatan dengan quercetin dapat mengurangi cedera sel yang dimediasi *pneumolysin*, meningkatkan tingkat kelangsungan hidup tikus yang telah terinfeksi dosis mematikan dari bakteri *Streptococcus pneumoniae*, dan meringankan kerusakan patologis pada jaringan paru.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi interaksi penghambatan antibiotik *clarithromycin*, *ceftriaxone*, dan senyawa aktif quercetin terhadap *pneumolysin* (PLY) pada bakteri *Streptococcus pneumoniae* secara *in-silico*.

## BAHAN DAN METODE

### 1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April-Juni 2021 di Laboratorium Mikrobiologi, Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana.

### 2. Preparasi Protein

Struktur kristal protein diunduh melalui RCSB PDB. Protein yang digunakan adalah protein *pneumolysin* dengan PDB ID: PQQA dan resolusi 2.80Å. Preparasi protein dilanjutkan dengan menseleksi molekul air dan ligan untuk dihilangkan dari kristal struktur protein menggunakan *software* Discovery Studio. Struktur protein kemudian disimpan dalam format PDB (.pdb). Analisis Plot Ramachandran dilakukan melalui *website* MOL Probitry.

### 3. Preparasi Ligan

Ligan yang digunakan adalah ceftriaxone (ID:5479530), clarithromycin (ID:84029), dan quercetin (ID:5280343). Struktur ligan diunduh melalui PubChem dalam format SDF (.sdf). Ligan dengan forma SDF (.sdf) diubah ke dalam formay PDB (.pdb) menggunakan perangkat lunak Open Babel.

### 4. Docking

Proses *docking* dilakukan pada protein dan masing-masing ligan yang telah dipreparasi dalam format PDB menggunakan *software* HEX 8.0.0. Metode yang digunakan dalam proses *docking* ini adalah *shape + electro + DARS*. Hasil *docking* protein dengan setiap ligan kemudian disimpan ke dalam format PDB (.pdb) untuk dilakukan proses analisis visualisasi.

### 5. Analisis Visualisasi Hasil Docking

Hasil *docking* dari HEX 8.0.0 kemudian divisualisasikan menggunakan *software* Discovery Studio Visualizer 2019. Analisis visualisasi hasil *docking* dilakukan dengan mengamati interaksi yang terjadi selama proses *docking* antara protein dengan masing-masing ligan serta selektivitas setiap ligan terhadap protein yang dilihat dari hasil *energy binding*.

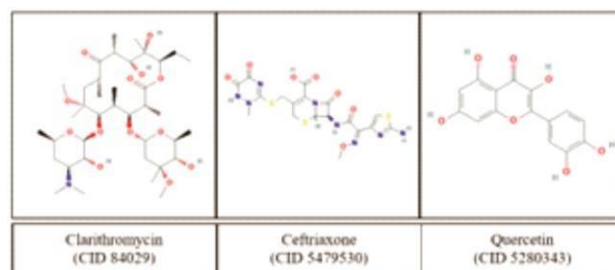
### 6. Rancangan Penelitian

*Docking* dilakukan antara protein *pneumolysin* dengan ligan ceftriaxone, clarithromycin, dan quercetin. Data yang dianalisis adalah interaksi antara protein dengan ligan, identifikasi residu asam amino yang terlibat selama proses interaksi, dan selektivitas ligan terhadap protein yang terlihat dari hasil *energy binding*. Data hasil penelitian yang didapat lalu dibahas secara deskriptif dan mengacu pada jurnal hasil penelitian.

## HASIL

### Struktur Ligan

Ligan-ligan yang digunakan pada penelitian ini diunduh melalui *website* <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> dalam format 3D-SDF dengan ID ceftriaxone (ID:5479530), clarithromycin (ID:84029), dan quercetin (ID: 5280343). Struktur 2 dimensi dari masing-masing ligan ditunjukkan pada Gambar 1 dan karakteristik sifat kimia dan fisika dari ligan disajikan pada Tabel 1.



**Gambar 1.** Struktur 2D ligan (PubChem, 2020).

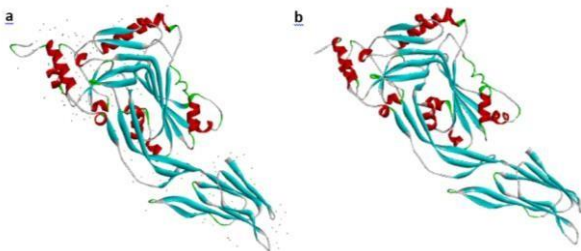
Format isomer 3D-SDF dikonversi menjadi 3D-PDB menggunakan *software* Open Babel. Open Babel merupakan perangkat lunak yang dirancang untuk mencari, menganalisis, dan mengkonversi format file molekuler yang berbeda (Raharjo, 2019). Proses konversi dari format SDF menjadi PDB dilakukan untuk meminimalisasi energi pada proses *docking*. Selain itu proses konversi ini bertujuan untuk menyesuaikan dengan perangkat yang digunakan (program HEX 8.0.0 dan Discovery Studio menerima struktur kimia dalam format 3D-PDB) pada proses *docking* dan analisis virtual (Kavitha and Mahalekshmi, 2014).

**Tabel 1.** Karakteristik sifat kimia dan fisika masing-masing ligan (Pubchem, 2020).

Deskripsi	Ligan		
	Ligan 1	Ligan 2	Ligan 3
Weight (g/mol)	554.6	748.0	302.23
Formula	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>8</sub> O <sub>7</sub> S <sub>3</sub>	C <sub>38</sub> H <sub>69</sub> NO <sub>13</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>
<sup>x</sup> logP3	-1.3	3.2	1.5
H-Bond Donor	5	4	5
H-Bond acceptor	13	14	7

### Struktur Pneumolysin

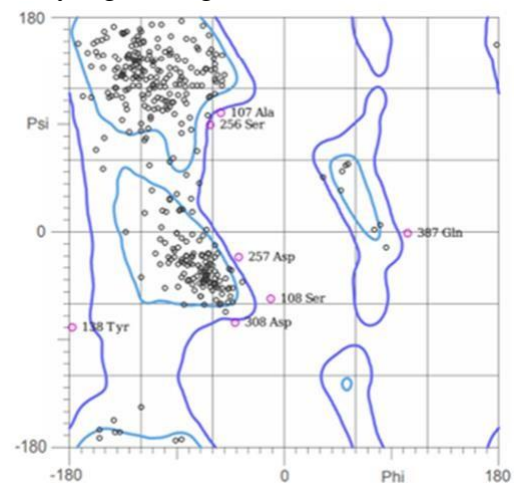
Struktur 3 dimensi *pneumolysin* diunduh dari *database* RCSB PDB dengan PDB ID: PQQA dan kerapatan 2.80Å. Struktur protein yang diunduh dari RCSB PDB memiliki banyak molekul air yang tersebar di sekelilingnya (gambar 2a). Molekul air ini merupakan residu *non-standard* yang dapat menghambat proses penambatan karena memungkinkan terjadinya pengikatan dengan ligan melalui ikatan hidrogen, sehingga perlu dihilangkan untuk meminimalisasi energi. Proses penghilangan molekul air dilakukan menggunakan perangkat lunak Discovery Studio (gambar 2b).



**Gambar 2.** Struktur Kristal *pneumolysin*. [a] dengan molekul air, [b] tanpa molekul air.

Kualitas kestabilan struktur protein diukur dengan analisis Plot Ramachandran menggunakan *website* MOL Probitiy <http://molprobitiy.biochem.duke.edu/> (gambar 3). Plot Ramachandran merupakan plot sebaran dua dimensi yang menggambarkan sebaran residu asam amino dan visualisasi koordinat tiga dimensi yang direalisasikan melalui eksperimen ke dalam koordinat internal dan terdiri dari sudut dihedral  $\Phi$  (phi) sebagai sumbu x dan  $\Psi$  (psi) sebagai sumbu y (Tam *et al.*, 2020). Plot ini memperlihatkan konformasi yang memungkinkan dari sudut  $\Phi$  dan  $\Psi$  untuk polipeptida (Hayward and Milner-White, 2021).

Plot Ramachandran terdiri dari empat kuadran dan empat daerah, yaitu *most favoured regions*, *additional allowed regions*, *generously allowed regions*, dan *disallowed regions*. Kualitas struktur protein dapat ditentukan dengan melihat adanya residu non-glisin yang terletak pada wilayah sudut dihedral terlarang (*disallowed regions*) dan wilayah yang paling disukai (*favoured regions*) (Ravikumar *et al.*, 2021). Bila residu non-glisin pada daerah terlarang lebih dari 15% dan residu pada daerah yang paling disukai kurang dari 80% maka struktur protein tersebut memiliki kualitas struktur yang kurang baik (Suhaidi dkk., 2019).



**Gambar 3.** Plot Ramachandran protein *pneumolysin*

Keterangan: *Favoured regions* 89,8% (432/481), *Allowed regions* 97,5% (469/481), dan *Outliers* 2,49 (12/481)

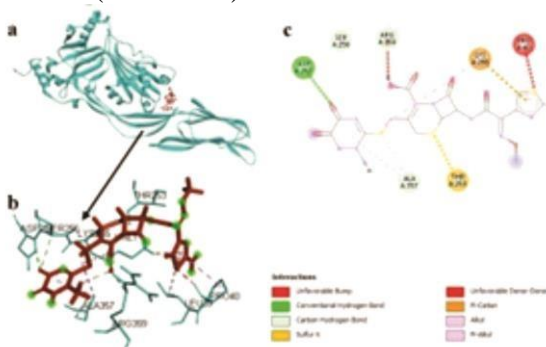
Hasil analisis dari struktur Kristal *pneumolysin* menunjukkan bahwa residu pada wilayah *favoured regions* sebesar 89,8%, wilayah *allowed regions* sebesar 97,5%, dan wilayah *outliers* atau *disallowed regions* sebesar 2,49% . Hal ini mengindikasikan bahwa struktur protein tersebut memiliki kualitas yang baik.

Residu glisin dan proline tidak ikut dipertimbangkan dalam analisis Plot Ramachandran karena keduanya memiliki perbedaan dengan asam amino lainnya. Residu glisin secara khusus tidak memiliki C<sup>β</sup> atom. Hal ini memungkinkan glisin untuk berotasi secara fleksibel dan tidak terbatas hanya pada daerah *allowed regions*, sehingga bila dilihat pada plot posisi dari glisin adalah pada -180° dan +180°

(Baruch-Shpigler *et al.*, 2017). Sedangkan pada residu proline memiliki rantai samping siklik yang rotasinya dibatasi oleh *pyrrolidine ring*. Hal ini menyebabkan proline menjadi residu yang gerakan rotasinya paling terbatas, sehingga bila dilihat pada plot posisi phi dari proline terbatas pada  $-60^\circ$  dan psi berada pada  $-45^\circ$  dan  $+135^\circ$  (Panja *et al.*, 2015).

### Interaksi antara *pneumolysin*-ceftriaxone

Interaksi antara protein *pneumolysin* dengan ligan ceftriaxone menghasilkan energi ikatan sebesar  $-329,98\text{kJ/mol}$  (gambar 4, tabel 2). Ligan ceftriaxone yang ditunjukkan oleh tanda panah pada gambar 4a berikatan dengan protein *pneumolysin* pada domain 3. Interaksi antara *pneumolysin* dan ceftriaxone menghasilkan 4 ikatan hidrogen yang meliputi residu asam amino Ser256, Arg359, Ala357 dengan tipe ikatan hidrogen karbon dan residu Asp257 dengan tipe ikatan hidrogen konvensional. Kestabilan struktur kompleks dipertahankan oleh 5 ikatan hidrofobik yang meliputi residu Leu39, Pro40, dan Ala357 dengan tipe ikatan Pi-Alkyl serta residu Ala357 dan Lys255 dengan tipe ikatan Alkyl. Satu ikatan elektrostatik, yaitu residu Lys255 tipe ikatan Pi-cation serta ikatan yang bersifat *unfavorable bump* residu Pro40, *unfavorable donor-donor* residu Arg359, dan ikatan Sulfur-X residu Thr253 (Gambar 4).

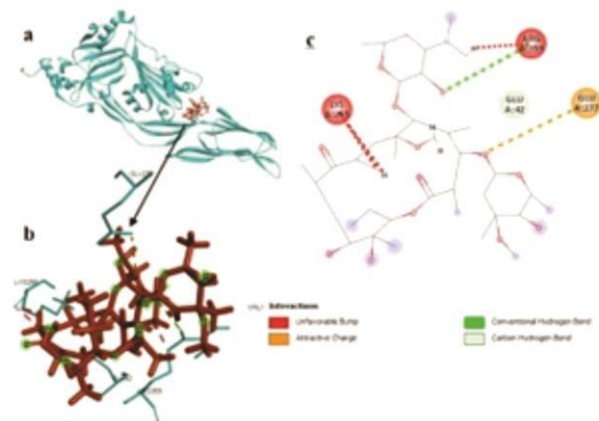


**Gambar 4.** Interaksi antara *pneumolysin* dengan ceftriaxone. [a-b] visualisasi 3 dimensi. [c] visualisasi 2 dimensi.

### Interaksi antara *pneumolysin*-clarithromycin

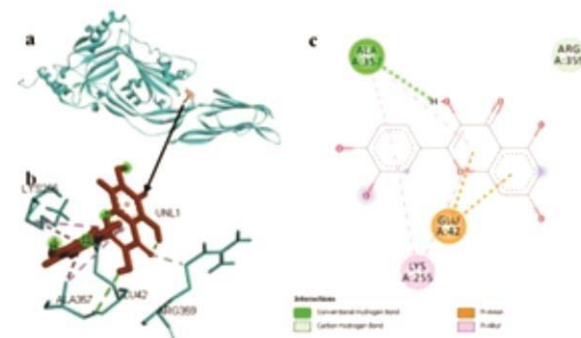
Interaksi antara protein *pneumolysin* dengan ligan clarithromycin menghasilkan energi ikatan sebesar  $-311,12\text{kJ/mol}$  (gambar 5, tabel 2). Ligan clarithromycin yang ditunjukkan

oleh tanda panah pada gambar 5a berikatan dengan protein *pneumolysin* pada domain 3. Interaksi antara protein *pneumolysin* dengan ligan clarithromycin menghasilkan 3 ikatan hidrogen yang meliputi residu asam amino Arg359 dengan tipe ikatan hidrogen konvensional dan 2 residu Glu277 dengan tipe ikatan hidrogen karbon. Satu ikatan elektrostatik, yaitu residu Glu277 dengan tipe ikatan *attractive charge*, serta 3 ikatan yang bersifat *unfavorable bump* meliputi 2 residu Lys255 dan Arg359 (Gambar 5).



**Gambar 5.** Interaksi antara *pneumolysin* dengan clarithromycin. [a-b] visualisasi 3 dimensi. [c] visualisasi 2 dimensi.

### Interaksi antara *pneumolysin*-quercetin



**Gambar 6.** Interaksi antara *pneumolysin* dengan quercetin. [a-b] visualisasi 3 dimensi. [c] visualisasi 2 dimensi

Interaksi antara protein *pneumolysin* dengan ligan quercetin menghasilkan energi ikatan sebesar  $-246,52\text{kJ/mol}$  (gambar 6, tabel 2). Ligan quercetin yang ditunjukkan oleh tanda panah pada gambar 6a berikatan dengan protein *pneumolysin* pada domain 3. Interaksi antara *pneumolysin* dengan quercetin menghasilkan 2

ikatan hidrogen meliputi residu Arg359 dengan tipe ikatan hidrogen karbon dan residu Ala357 dengan tipe ikatan hidrogen konvensional. Kestabilan struktur kompleks dipertahankan oleh 4 ikatan hidrofobik yang meliputi 2 residu Lys255 dan 2 residu Ala357 dengan tipe ikatan Pi-Alkyl, serta 2 ikatan elektrostatik yang meliputi 2 residu Glu42 dengan tipe ikatan Pi-Anion (Gambar 6).

Hasil interaksi dari penambatan 3 ligan secara *in silico* ditampilkan pada tabel 2 dengan ceftriaxone sebagai kontrol positif. Ceftriaxone merupakan antibiotik yang paling umum digunakan sebagai inhibitor protein selektif

*pneumolysin* dari bakteri *Streptococcus pneumoniae* dan telah teruji baik secara *in vitro* maupun *in vivo* (Mizrahi *et al.*, 2020). Ceftriaxone akan menghambat hemolisis dan sitolisis yang dimediasi *pneumolysin* dengan menghalangi oligomerisasi monomer pada pembentukan kompleks pra-pori dan secara bersamaan mengurangi aktivitas peptidase SrtA (Cools *et al.*, 2021). Data interaksi yang diperoleh antara lain, titik terjadinya interaksi, residu yang terlibat selama proses penambatan, tipe ikatan kimia, jarak atom, serta energi ikatan *docking*.

**Tabel 2.** Interaksi Residu dan Energi Ikatan Antara Kompleks Protein-Ligan.

Interaksi	Titik Interaksi	Jarak (Å)	Kategori Ikatan Kimia	Tipe	Energi Ikatan (kJ/mol)
<i>Pneumolysin</i> - Ceftriaxone	A:ASP257	2,37	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond	-329,98
	A:SER256	3,37	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	
	A:ARG359	3,11	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	
	A:ALA257	2,83	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	
	A:THR253	2,84	Other	Sulfur-X	
	A:PRO40	2,19	Unfavorable	Unfavorable Bump	
	A:LYS255	3,16	Electrostatic	Pi-Cation	
	A:ARG359	1,69	Unfavorable	Unfavorable Donor-Donor	
	A:LEU39	5,42	Hydrophobic	Pi-Alkyl	
	A:PRO40	4,78	Hydrophobic	Pi-Alkyl	
	A:ALA357	4,11	Hydrophobic	Pi-Alkyl	
	A:LYS255	5,09	Hydrophobic	Alkyl	
	A:ALA357	4,15	Hydrophobic	Alkyl	
<i>Pneumolysin</i> - Clarithromycin	A:GLU277	4,34	Electrostatic	Attractive Charge	-311,12
	A:GLU42	1,94	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	
	A:GLU42	1,95	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	
	A:ARG359	2,95	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond	
	A:LYS255	2,16	Unfavorable	Unfavorable Bump	
	A:LYS255	1,68	Unfavorable	Unfavorable Bump	
<i>Pneumolysin</i> - Quercetin	A:ARG359	1,88	Unfavorable	Unfavorable Bump	-246,52
	A:GLU42	2,69	Electrostatic	Pi-Anion	
	A:GLU42	3,46	Electrostatic	Pi-Anion	
	A:ALA357	2,95	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond	
	A:ARG359	2,35	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	
	A:LYS255	4,98	Hidrophobic	Pi-Alkyl	
	A:LYS255	5,40	Hidrophobic	Pi-Alkyl	
	A:ALA357	3,45	Hidrophobic	Pi-Alkyl	
A:ALA357	3,67	Hidrophobic	Pi-Alkyl		

## PEMBAHASAN

Proses penambatan antara protein *pneumolysin* dengan ligan ceftriaxone, clarithromycin, dan quercetin terjadi di daerah

domain 3 (Gambar 4a, 5a, 6a). Hal ini menunjukkan bahwa mekanisme penghambatan yang terjadi adalah penghambatan non-kompetitif, dimana pengikatan ligan tidak mempengaruhi pengikatan antara *pneumolysin*

dengan substrat yang dimediasi oleh domain 4 (Delaune and Alsayouri, 2020). *Pneumolysin* memiliki dua mekanisme sebagai aktivitas utama dari proses virulensinya, yaitu pembentukan pori transmembran dan aktivasi sistem komplemen jalur klasik melalui interaksi langsung dengan antibodi IgG (Gonzales *et al.*, 2021). Proses pembentukan pori transmembran dimediasi oleh domain 4 melalui Trp-rich *undecapeptide* pada C-terminal yang berfungsi untuk mengenali dan mengikat membran kolesterol (Vögele *et al.*, 2019). Domain 1-3 akan tetap berada di luar membran untuk membentuk struktur pre-pori. Proses pembentukan pre-pori dilanjutkan dengan pembentukan *self-association*, dimana domain 3 akan berasosiasi bersama domain 1 dan domain 2 menghasilkan oligomerisasi (Marshall *et al.*, 2015). Bentuk *alpha helical bundles* ( $\alpha$ -HB1 dan  $\alpha$ -HB2) domain 3 akan melipat menjadi dua  $\beta$ -hairpins (TMH1 dan TMH2) yang menembus membran sel dan membangun  $\beta$ -barrel internal pori. Pori transmembran yang terbentuk akan menyebabkan lisis sel (Chiu *et al.*, 2019).

Aktivasi komplemen jalur klasik merupakan bagian dari *adaptive immune responses* dari sistem kekebalan tubuh. Sistem ini akan meningkatkan kemampuan antibodi pada proses fagositosis, lisis sel, dan aktivasi respon inflamasi (Rezaei *et al.*, 2021). Mekanisme aktivasi komplemen jalur klasik dimulai dari penempelan antibodi IgG dan IgM pada permukaan patogen. Ikatan ini akan mengaktivasi protein komplemen C1, dimana aktivasi C1 akan menginisiasi perubahan protein komplemen C2 menjadi C2a dan C2b dan protein komplemen C4 menjadi C4a dan C4b. Protein C2a dan C4b kemudian akan bergabung menjadi suatu kompleks protein yang dikenal sebagai protein *C3-convertase* dan menghasilkan protein C3a dan C3b. Protein C3b akan menempel dengan *C3-covertase* dan membentuk kompleks protein *C5-convertase* yang menghasilkan protein C5a dan C5b. Protein C5b kemudian akan bergabung dengan protein C6, C7, C8, dan C9 membentuk suatu kompleks protein yang dikenal sebagai *Membrane attacking Complex* (MAC) yang dapat mengakibatkan lisis pada permukaan patogen (Leendart, 2017).

*Pneumolysin* akan berikatan dengan antibodi IgG melalui Fc yang dapat mengganggu aktivasi dari sistem komplemen jalur klasik. Residu tyrosine384 dan aspartate385 pada domain 3 dari *pneumolysin* diyakini bertanggung jawab pada interaksi ini (Kucinskaite-Kodze *et al.*, 2020). Sehingga penambatan antara ligan ceftriaxone, clarithromycin, dan quercetin di daerah domain 3 dapat menghambat aktivitas virulensi dari protein *pneumolysin* dengan mengganggu proses oligomerisasi pori dan mencegah proses *Fc-binding* dari antibodi IgG pada sistem komplemen (Lawrence *et al.*, 2015).

Nilai energi ikatan antara protein *pneumolysin* dengan ligan ceftriaxone, clarithromycin, dan quercetin ditampilkan pada data pada tabel 2. Urutan nilai energi ikatan dari yang paling lemah sampai yang paling kuat adalah quercetin < clarithromycin < ceftriaxone. Ikatan energi yang paling kuat ditunjukkan dengan nilai ikatan energi yang paling negatif (Singh and Tripathi, 2020). Nilai energi ikatan didapatkan dari persamaan berikut:

$$\Delta G_{bind} = G_{protein} - [G_{ligand} + G_{complex}]$$

Dimana  $\Delta G_{bind}$  adalah energi ikatan,  $G_{protein}$  adalah energi protein,  $G_{ligand}$  adalah energi ligan, dan  $G_{complex}$  adalah energi yang dihasilkan dari interaksi kompleks protein-ligan selama proses pengikatan (Raharjo, 2019). Nilai energi ikatan tergantung pada interaksi yang terjadi selama proses penambatan, semakin banyak ikatan hidrogen yang terlibat pada proses penambatan maka menghasilkan ikatan energi yang lebih negatif. Nilai ikatan energi yang paling negatif akan menghasilkan kestabilan kompleks protein-ligan yang baik (Fukunishi *et al.*, 2018).

Meskipun quercetin memiliki nilai energi ikatan yang lebih lemah dibandingkan dengan clarithromycin, data interaksi residu asam amino menunjukkan kesamaan yang lebih banyak dengan ceftriaxone dibandingkan dengan clarithromycin. Ikatan antara *pneumolysin* dengan quercetin memiliki 3 residu asam amino yang sama, sedangkan ikatan antara *pneumolysin* dengan clarithromycin memiliki 2 residu asam amino yang sama. Residu Arg359 pada quercetin

terikat melalui ikatan hidrofobik dengan tipe ikatan Pi-alkyl, sedangkan pada ceftriaxone berupa ikatan hidrogen tipe hidrogen karbon dan satu ikatan bersifat *unfavourable donor-donor*. Dua residu Lys255 pada quercetin terikat melalui ikatan hidrofobik dengan tipe ikatan Pi-Alkyl, sedangkan pada ceftriaxone berupa ikatan hidrofobik tipe Alkyl dan ikatan elektrostatik tipe Pi-cation. Residu Ala357 pada quercetin terikat melalui ikatan hidrofobik tipe Pi-Alkyl dan ikatan hidrogen tipe karbon konvensional, sedangkan pada ceftriaxone berupa ikatan hidrofobik tipe Alkyl (Tabel 2, Gambar 4c, Gambar 6c).

Ikatan antara *pneumolysin*-clarithromycin dengan *pneumolysin*-ceftriaxone memiliki 2 residu asam amino yang sama, yaitu Arg359 dan Lys255. Residu Arg359 pada clarithromycin merupakan ikatan hidrogen dengan tipe hidrogen konvensional dan satu ikatan bersifat *unfavourable bump*, sedangkan pada ceftriaxone berupa ikatan hidrogen dengan tipe hidrogen karbon dan satu ikatan bersifat *unfavourable donor-donor*. Residu Lys255 pada clarithromycin merupakan ikatan yang bersifat *unfavourable bump*, sedangkan pada ceftriaxone merupakan ikatan hidrofobik dan ikatan elektrostatik dengan tipe Alkyl dan Pi-cation (Tabel 2, Gambar 4c, Gambar 5c).

Interaksi ligan-reseptor melibatkan ikatan-ikatan kimia, seperti ikatan kovalen, ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik, elektrostatik, ionik, Van der Waals dan dipol-dipol (Feher, 2012). Kestabilan struktur protein dipertahankan oleh dua jenis ikatan kovalen yang kuat berupa ikatan peptida dan disulfida serta tiga jenis ikatan non-kovalen yang lemah, berupa ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik, dan ikatan elektrostatik (Singh and Tripathi, 2020). Walaupun ikatan non-kovalen tergolong lemah, namun apabila terdapat dalam jumlah banyak akan berperan penting dalam kestabilan struktur protein (Roy *et al.*, 2015). Ikatan hidrogen melibatkan interaksi antara atom hidrogen dengan atom elektronegatif seperti O<sub>2</sub>, Cl<sub>2</sub>, dan F (Singh and Tripathi, 2020). Ikatan hidrogen sangat dibutuhkan oleh protein sehingga secara biologis protein dapat aktif. Hal ini disebabkan oleh interaksi hidrogen cenderung lebih terarah membentuk ikatan antara donor dan

acceptor. Ikatan yang bersifat *unfavourable*, seperti ikatan *unfavourable bump* dan *unfavourable donor-donor* mampu mempengaruhi kestabilan aktivitas obat maupun ligan yang terikat. Terbentuknya ikatan yang bersifat *unfavourable* pada kompleks protein-ligan dapat mengurangi kestabilan kompleks tersebut karena tipe ikatan ini menunjukkan gaya tolak yang terjadi antara 2 molekul dan atom (Dhorajiwala *et al.*, 2019).

Karakteristik sifat fisika dan kimia ligan juga dapat mempengaruhi kemampuan afinitas dari kompleks protein-ligan. Menurut *Lipinski's rule of five* suatu molekul obat yang baik tidak boleh memiliki berat lebih dari 500Da, ikatan hidrogen donor  $\leq 5$ , ikatan hidrogen akseptor  $\leq 10$ , dan nilai koefisien partisi log P (XlogP3)  $\leq 5$ . Hal ini akan mempengaruhi kestabilan interaksi dengan reseptor (Goodwin *et al.*, 2017). Interaksi ikatan hidrogen (*H-bonds*) adalah jenis interaksi elektrostatik yang spesifik antara proton yang melekat pada atom elektronis (N atau O) dan sepasang elektron tunggal pada atom elektronis (N, O, atau R). Nilai donor dan akseptor ikatan hidrogen berhubungan dengan aktivitas biologis dari suatu obat (Abelian *et al.*, 2021).

Koefisien partisi (log P) merupakan salah satu parameter yang sering digunakan untuk menghitung nilai lipofilisitas dalam pembuatan desain obat. Nilai lipofilisitas merupakan representatif dari hubungan kuantitatif struktur obat dengan aktivitasnya (QSAR), semakin besar nilai lipofilisitas maka semakin baik nilai QSAR pada kandidat obat (Utomo dkk., 2017). Koefisien partisi adalah tetapan kesetimbangan suatu senyawa dalam pelarut polar dan non polar, yang secara logaritmik berhubungan dengan energi bebas (Bannan *et al.*, 2016). Penentuan koefisien partisi secara eksperimen dilakukan dengan cara pendistribusian senyawa dalam jumlah tertentu ke dalam keseimbangan termodinamik antara dua pelarut yang berbeda kepolaran, yaitu oktanol dan air. Nilai XlogP di atas 0 menunjukkan aktivitas lipofilisitas pada obat, dimana senyawa obat dapat larut baik dalam pelarut oktanol maupun air. Sedangkan nilai XlogP di bawah 0 menunjukkan aktivitas hidrofobisitas, dimana senyawa obat hanya dapat



larut dalam air (Di and Kerns, 2016). Senyawa obat yang memiliki aktivitas lipofilisitas dinilai memiliki *affinity binding* yang lebih baik dibandingkan dengan senyawa hidrofobisitas (Miller *et al.*, 2020).

Ceftriaxone memiliki berat molekul sebesar 554,6 g/mol, nilai *H-bond donor* sebesar 3, nilai *H-bond acceptor* sebesar 14, dan nilai  $^X\log P3$  sebesar -1,3 (tabel 1) (Pubchem<sup>a</sup>, 2020). Bila dibandingkan dengan aturan Lipinski's ceftriaxone tidak memenuhi syarat pada bagian berat molekul, nilai *H-bond acceptor*, dan nilai  $^X\log P3$ , sehingga kemampuan afinitas ikatan antara ligan dan reseptor tidak terlalu baik. Hal ini yang menyebabkan terjadinya beberapa interaksi yang bersifat *unfavourable* pada kompleks ceftriaxone dan *pneumolysin*. Nilai  $X\log P$  menunjukkan bahwa ceftriaxone memiliki aktivitas hidrofobisitas, sehingga obat hanya dapat larut pada air (Di and Kerns, 2016).

Clarithromycin memiliki berat molekul sebesar 748 g/mol, nilai *H-bond donor* sebesar 4, nilai *H-bond acceptor* sebesar 14, dan nilai  $X\log P3$  sebesar 3,2 (tabel 1) (Pubchem<sup>b</sup>, 2020). Bila dibandingkan dengan aturan Lipinski's clarithromycin tidak memenuhi syarat pada bagian berat molekul, sehingga kemampuan afinitas ikatan antara ligan dan reseptor tidak terlalu baik. Hal ini yang menyebabkan terjadinya beberapa interaksi yang bersifat *unfavourable* pada kompleks ceftriaxone dan *pneumolysin*. Nilai  $^X\log P$  menunjukkan bahwa clarithromycin memiliki aktivitas lipofilisitas, sehingga obat dapat larut pada pelarut oktanol dan air dan memiliki QSAR yang baik (Di and Kerns, 2016).

Quercetin memiliki berat molekul sebesar 302,23 g/mol, nilai *H-bond donor* sebesar 5, nilai *H-bond acceptor* sebesar 7, dan nilai  $X\log P3$

sebesar 1,5 (tabel 1) (Pubchem<sup>c</sup>, 2020). Bila dibandingkan dengan aturan Lipinski's maka quercetin telah memenuhi semua persyaratan,

sehingga ligan ini dinilai memiliki kemampuan afinitas ikatan yang sangat baik. Hal ini menyebabkan ikatan kompleks ligan-reseptor antara quercetin dan *pneumolysin* kuat dan stabil, yang ditandai dengan tidak adanya interaksi

memiliki aktivitas lipofilisitas, sehingga obat dapat larut pada pelarut oktanol dan air dan memiliki QSAR yang baik (Di and Kerns, 2016).

Hasil uji *in silico* antara ketiga ligan dengan reseptor menunjukkan bahwa senyawa quercetin memiliki potensi sebagai desain obat yang dapat dikembangkan untuk terapi antibakteri dari bakteri *Streptococcus pneumonia* di masa depan. Meskipun memiliki nilai energi *binding* yang paling rendah diantara interaksi kedua ligan lainnya, interaksi antara quercetin dan *pneumolysin* memiliki ikatan yang lebih kuat dan stabil. Namun dalam pembuatan desain obat perlu dilakukan uji lainnya untuk mengkonfirmasi hasil yang telah didapatkan. Data analisis hasil *in silico* harus dilengkapi dengan penentuan nilai  $IC_{50}$  dan evaluasi aktivitas biologis secara *in vitro* dan *in vivo*. Nilai  $IC_{50}$  dibutuhkan untuk mengetahui konsentrasi maksimal dari ligan yang dibutuhkan dalam menghambat aktivitas *pneumolysin* sebesar 50%.

Konsentrasi penghambatan maksimal atau  $IC_{50}$  (*inhibitory concentration*) adalah ukuran efektivitas suatu konsentrasi obat yang dibutuhkan dalam menghambat fungsi biologis tertentu sebesar 50%. Nilai ini umumnya digunakan sebagai ukuran potensi obat antagonis dalam penelitian farmakologi. (Swinney, 2011). Nilai  $IC_{50}$  memiliki hubungan dengan nilai energi ikatan melalui nilai konstanta inhibisi ( $K_i$ ) dengan persamaan berikut:

$$\Delta G_{\text{ikatan}} = -RT \ln K_i$$

Dimana nilai  $K_i$  dapat dihitung dengan persamaan  $IC_{50}$  berikut:

- *Competitive inhibitor*

$$K_i = [I]_{50} - \frac{E}{2} / \left[ \frac{K_d}{K_i} + 1 \right]$$

- *Uncompetitive inhibitor*

$$K_i = [I]_{50} - \frac{E}{2} / \left[ \frac{K_d}{K_i} + 1 \right]$$

- *Non-competitive inhibitor*

residu asam amino yang bersifat *unfavourable*. Nilai  $X\log P$  menunjukkan bahwa clarithromycin

$K_i = 1/50$  apabila  $K_i = K_m$  atau  $K_i < K_m$   
dimana R adalah 8,314 J/mol, T adalah suhu  
dalam Kelvin, E adalah enzim, S adalah substrat,  
dan  $K_m$  adalah konstanta Michaelis. Semakin  
negatif nilai ikatan energinya ( $\Delta G$ ),

maka  
akan semakin baik nilai  $IC_{50}$  (Raharjo, 2019).

Hasil IC<sub>50</sub> yang didapatkan kemudian dapat dikonfirmasi dengan penelitian lanjutan secara *in vivo* dan *in vitro*. Penelitian lanjutan juga dapat dilakukan dengan mengkombinasikan kompleks ligan ceftriaxone-clarithromycin, ceftriaxone-quercetin, dan clarithromycin-quercetin untuk melihat apakah interaksi yang dihasilkan dari kombinasi desain obat lebih baik dibandingkan dengan interaksi dari masing-masing antibiotik yang telah diujikan saat ini dalam menghambat aktivitas protein pneumolysin. Pada penelitian ini interaksi antara protein pneumolysin dan ceftriaxone menghasilkan 4 ikatan hidrogen, 5 ikatan hidrofobik, 1 ikatan elektrostatik, dan 2 ikatan residu bersifat *unfavourable* dengan nilai energi ikatan sebesar -329,98kJ/mol. Interaksi antara protein pneumolysin dan clarithromycin menghasilkan 3 ikatan hidrogen, 1 ikatan elektrostatik, dan 3 ikatan residu bersifat *unfavourable* dengan nilai energi ikatan sebesar -311,12kJ/mol. Interaksi antara protein pneumolysin dan quercetin menghasilkan 2 ikatan hidrogen, 4 ikatan hidrofobik, dan 2 ikatan elektrostatik dengan nilai energi ikatan sebesar -246,52kJ/mol. Dengan demikian Ceftriaxone, Clarithromycin, and Quercetin memiliki kemampuan sebagai penghambat *Pneumolysin* enzyme pada *Streptococcus pneumonia*.

## KESIMPULAN

Kesimpulan penelitian ini adalah Ceftriaxone, Clarithromycin, and Quercetin memiliki kemampuan sebagai penghambat *Pneumolysin* enzyme pada *Streptococcus pneumonia*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abelian, A., M. Dybek, J. Wallach, B. Gaye, and A. Adejare. 2021. *Pharmaceutical Chemistry In: Remington (23<sup>rd</sup> Ed.)*, USA: Academic Press.
- Bannan, C.C., G. Calabro, D.Y. Kyu, and D.L. Mobley. 2016. Calculating Partition Coefficients of Small Molecules in Octanol/Water and Cyclohexane/Water. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 12(8): 4015 – 4024.
- Baruch-Shpigler, Y., H. Wang, I. Tuvi-Arad, and D. Avnir. 2017. Chiral Ramachandran Plots I: Glycine. *Biochemistry*. 56(42): 1 – 30.
- Chiu, F.F., C.H. Leng, Y.J. Ding, J.C. Chang, L.S. Chang, S.P. Lien, H.W. Chen, L.K. Siu, and S.J. Liu. 2019. Domain 4 of Pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae* is a Multifunctional Domain Contributing TLR4 Activating and Hemolytic Activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 517(4): 596 – 602.
- Cools, F., P. Delputte, and P. Cos. 2021. The Search for Novel Treatment Strategies for *Streptococcus pneumoniae* Infections. *FEMS Microbiology Reviews*. 45(4): 1 – 23.
- Delaune, K.P. and K. Alsayouri. 2020. *Physiology, Noncompetitive Inhibitor*. USA: Statpearls Publishing.
- Dhorajiwala, T.M., S.T. Halder, and L. Samant. 2019. Comparative In Silico Molecular Docking Analysis of L-Theonine-3 Dehydrogenase, a Protein Target Against African Trypanosomiasis Using Selected Phytochemicals. *Journal of Applied Biotechnology Reports*. 6(3): 101 – 108.
- Di, L. and E. H. Kerns. 2016. *Lipophilicity In: Drug-Like Properties (2<sup>nd</sup> Edition)*, USA: Academic Press.
- Ezaji, K., M. Yaghoubi, M. Nojomi, S. Mahmoody, S.M. Zahraie, M. Moradi-Lakeh, S.R. Tabatabaei, and A. Karimi. 2019. Cost-Effectiveness of Introducing the Pneumococcal Conjugate Vaccine for Children Under 5 Years in the Islamic Republic of Iran. *Eastern Mediterranean Health Journal*. 25(10): 668 – 697.
- Faraj, R.H.A., L. Collard, R. Cliffe, L.A. Blount, R. Lonnen, R. Wallis, P.W. Andrew, and A.J. Hudson. 2020. Formation of Pre-Pore Complexes of *Pneumolysin* is Accompanied by a Decrease in Short-range Order of Lipid Molecules Throughout Vesicle Bilayers. *Scientific Reports*. 10(4585): 1 – 12.
- Feher, J. 2012. Chemical Energy and Intermolecular Forces *In: Quantitative*

- Human Physiology:Chemical Foundations of Physiology I, USA: Academic Press.
- Fukunishi, Y., Y. Yamashita, T. Mashimo, H. Nakamura. 2018. Prediction of Protein Compound Binding Energies from Known Activity Data: Docking-score-based Methpd and its Applications. *Molecular Informatics*. 37(1): 1 – 11.
- Gonzales, J., T. Chakraborty, M. Romero, M.A. Mraheil, A. Kurlar, B. Pace, and R. Lucas. 2021. *Streptococcus pneumoniae* and It's Virulence Factors H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Pneumolysin are Potent Mediators of the Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease. *Toxins (Basel)*. 13(2): 157 – 168.
- Goodwin, R.J.A., J. Bunch, and D.F. McGinnity. 2017. Mass Spectrometry Imaging in Oncology Dryg Discovery *In: Advances in Cancer Research*, USA: Academic Press.
- Hayward, S. and E.J. Milner-white. 2021. Determination of Amino Acids that Favour the  $\alpha_L$  Region Using Ramachandran Propensity Plots. Implications for  $\alpha$ -sheet as the Possible Amyloid Intermediate. *Journal of Structural Biology*. 213(2): 107738 – 107748.
- Hu, D.K., Y. Liu, X.Y. Li, and Y. Qu. 2015. *In vitro* Expression of *Streptococcus pneumoniae* PLY Gene in Human Monocytes and Pneumocytes. *European Journal of Medical Research*. 20(52):1–6.
- Jimbo-Sotomayor, R., L. Armijos-Acurio, J. Proaño-Espinosa, K. Segarra-Galarza, and X. Sánchez-Choez. 2020. Morbidity and Mortality Due to Pneumococcal Disease in Children in Ecuador From 2005 – 2015. *Journal of Global Infectious Disease*. 12(3): 124 – 128.
- Kavitha, C.R. and T. Mahalekshmi. 2014. Chemical File Format Conversion Tools: An Overview. *International Journal of Engineering Research & Technology (IJERT)*. 3(2). 2111 – 2118.
- Kucinskaite-Kodze, I., M. Simanavicius, J. Dapkunas, M. Pleckaityte, and A. Zvirbliene. 2020. *Biomolecules*. 10(7): 1 – 20.
- Lawrence, S.L., S.C. Feil, C.J. Morton, A.J. Farrand, T.D. Mulhern, M.A. Gorman, K.R. Wade, R.K. Tweten, and M.W. Parker. 2015. Crystal Structure of *Pneumococcus pneumoniae* Pneumolysin Provides Key Insight Into Early Steps of Pore Formation. *Scientific Reports*. 5(14352): 1 – 13.
- Leendart, A.T. 2017. Complement System *In: Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology* (10<sup>th</sup> Ed.), USA: Elsevier Inc. Unites States of America.
- Marshall, J.E., B.H.A. Faraj, A.R. Gingras, R. Lonnen, Md. A. Sheikh, M. El-Mezgueldi, P.C.E. Moody, P.W. Andrew, and R. Wallis. 2015. The Crystal Structure of Pneumolysin at 2.0 Å Resolution Reveals the Molecular Packing of the Pre-pore Complex. *Scientific Reports*. 5(13293): 1 – 11.
- Miller, R.M., M. Madeira, H.B. Wood, W.M Geissler, C.E. Raab, and L.J. Martin. 2020. Integrating the Impact of Lipophilicity on Potenci and Pharmacokinetic Parameters Enables the Use of Diverse Chemical Space during Small Molecule Drug Optimazation. *Journal of Medicinal Chemistry*. 63(21): 12156 – 12170.
- Mizrahi, A., J.C. Marvaud, B. Pilmis, J.C. Nguyen Van, C. Couzigou, C. Bruel, and T. Lambert. 2020. Emergence of Ceftriaxone Resistance During a Case of Pneumococcal Meningitis with Fatal Evolution. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 64(3): 1 – 4.
- Nishimoto, A.T., J.W. Rosch, and I. Tuomanen. 2020. *Pneumolysin*: Pathogenesis and Therapeutic Target. *Frontiers in Microbiology*. 11(1543): 1 – 10.
- Panja, A.S., B. Bandopadhyay, and S. Maiti. 2015. Protein Thermostability is Owing Their Preferences to Non-Polar Smaller Volume Amino Acids, Variantions in Residual Physico-Chemical Properties and More Salt-Bridges. *PLOS ONE*. 10(7): 1 – 21.
- PubChem<sup>a</sup>. 2020. PubChem: Ceftriaxone [online]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5479530>. Diakses pada 2 Desember 2020.

- PubChem<sup>b</sup>. 2020. PubChem: Clarithromycin [online]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/84029>. Diakses pada 2 Desember 2020.
- PubChem<sup>c</sup>. 2020. *PubChem: Quercetin* [online]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280343>. Diakses pada 2 Desember 2020.
- Qianghua, L.V., P. Zhang, P. Quang, M. Cui, T. Liu, Y. Yin, and G. Chi. 2019. Quercetin, a *Pneumolysin* Inhibitor, Protects Mice Against *Streptococcus pneumoniae* Infection. *Microbial Pathogenesis*. 140(103934): 1 – 29.
- Raharjo, S.J. 2019. Molecular Docking and Molecular Dynamics: Virtual Screening of Sesquiterpenoid *Pogostemon herba* as Predicted Cyclooxygenase Inhibitor. *IntechOpen*. DOI: 10.5772/intechopen.85319.
- Ravikumar, A., A.G. de Brevern, and N. Srinivasan. 2021. Conformational Strain Indicated by Ramachandran Angles for the Protein Backbone is Only Weakly Related to the Flexibility. *The Journal of Physical Chemistry B*. 125(10): 2597 – 2606.
- Rezaei, N., M. Sadeghalvad, and H.R. Mohammadi-Motlagh. 2021. General Concept of Immunity *In: Reference Module in Sciences*, USA: Elsevier.
- Roy, K., S. Kar, and R.N. Das. 2015. Background of QSAR and Historical Developments *In: Understand the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment*, USA: Academic Press.
- Sánchez-Tarjuelo, R., I. Cortegano, J. Manosalva, M. Rodríguez, C. Ruiz, M. Alía, M.C. Prado, E. Cano, M.J. Ferrándiz, A.G. de la Campa, M.L. Gaspar, and B. de Andrés. 2020. The TLR4-MyD88 Signaling Axis Regulates Lung Monocyte Differentiation Pathways in Response to *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in Immunology*. 11 (2120): 1 – 13.
- Singh, D.B. and T. Tripathi. 2020. *Frontiers in Protein Structure, Function, and Dynamics*, Singapore: Springer.
- Smith, E.L., I. Wheeler, H. Adler, D.M.Ferreira, R.Sá-leão, O. Abdullahi, I. Abdetifa, S. Becker-Dreps, S. Esposito, H. Farida, R. Kandasamy, G.A. Mackenzie, J.P. Nourti, S. Nzenze, S.A. Madhi, O. Ortega, A. Rica, D. Safari, F. Schaumburg, E. Ussuf, E.A.M. Sanders, L.R. Grant, Y.L. Hammitt, K.L. O'Brien, P. Gounder, D.J.T. Bruden, M.C. Stanton, and J. Rylance. 2020. Upper Airways Colonisation of *Streptococcus pneumoniae* in Adults Aged 60 Years and Older: a Systematic Review of Prevalence and Individual Participant Data Meta-Analysis of Risk Factors. *Journal of Infections*. 81(4): 540 – 548.
- Suhaidi, A., Rizarullah, dan Feriyani. 2019. Simulasi Docking Senyawa Aktif Daun Binahong Sebagai Inhibitor Enzyme Aldose Reductase. *SEL Jurnal Penelitian Kesehatan*. 6(2): 45 – 65.
- Swinney, D.C. 2011. Molecular Mechanism of Action (MMoA) in Drug Discovery *In: Annual Reports in Medicinal Chemistry*, USA: Academic Press.
- Tam, B., S. Sinha, and S.M. Wang. 2020. Combining Ramachandran Plot and Molecular Dynamics Simulation for Structural-based Variant Classification: Using TP53 Variants as Model. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 18(2020): 4033–4039.
- Utomo, S.B., F. Sanubari, B. Utami, dan N.D. Nurhayati. 2017. Analisis Hubungan Kuantitatif Struktur dan Aktivitas Analgesik Senyawa Turunan Meperidin Menggunakan Metode Semiempiris AM1. *Jurnal Kimia dan Pendidikan Kimia*. 2(3): 158 – 168.
- Vögele, M., R.M. Bhaskara, S. Mulhivill, K. van Pee, Ö. Yildiz, W. Kühlbrandt, D.J. Müller, and G. Hummer. 2019. Membrane Perforation by The Pore-forming Toxic *Pneumolysin*. *Proceeding of The National Academy of Sciences of The United States of Americac (PNAS)*. 116(27): 13352 – 13357.

- Wang, Y., Z. Wen, X. Pan, D.E. Briles, Y. He, and J.R. Zhang. 2018. Novel Immunoprotective Proteins of *Streptococcus pneumoniae* Identified by Opsonophagocytosis Killing Screen. *American Society for Microbiology*. 86(9): 423 – 441.
- WHO. 2020. *Pneumococcal Disease* [online]. <https://www.who.int/ith/diseases/pneumococcal/en/>. Diakses pada 12 Desember 2020.