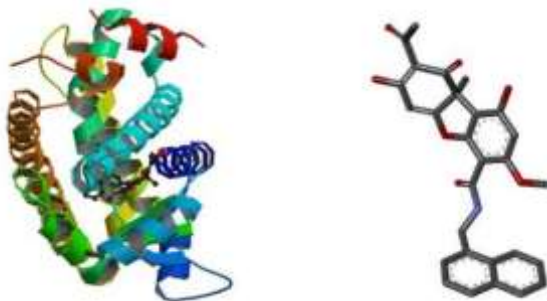


Bab VI Hasil dan Pembahasan

VI.1 Penelusuran Pustaka Struktur dan Preparasi Receptor Protein PPAR GAMMA



Gambar VI. 1 Komplek Protein 3LMP (kiri) dan ligan alami (kanan)

Tabel VI. 1 Pustaka Struktur Reseptor Protein PPAR- γ

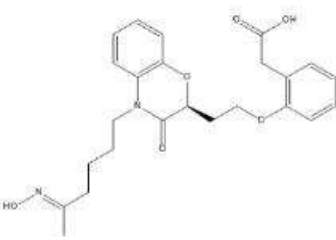
Kode PDB	3LMP
Metode	Difraksi sinar-X
Resolusi	1,9 Å
Jumlah Rantai	2
Jumlah Residu	298

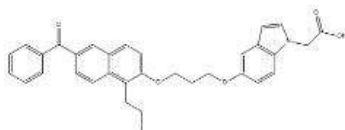
Sebelum dilakukan simulasi docking dan dinamika molekul, terlebih dahulu dilakukan preparasi protein (tanpa ligan) dan ligan alami yang dipisahkan dengan menggunakan piranti lunak Discovery Studio Visualizer 2016 (Dassault Systemes BIOVIA, 2015).

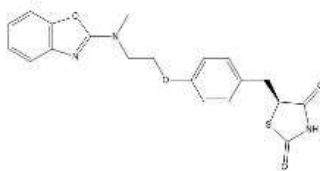
VI.2 Preparasi Ligan Uji

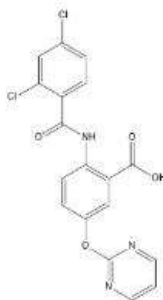
Senyawa uji yang berjumlah 11 senyawa agonis PPAR- γ diperoleh dari jurnal penelitian Patrick Markt, *et al* (2007). Keseluruhan ligan uji tersebut dibuat pemodelan 2 dimensi dengan menggunakan ChemDraw. Pemodelan struktur dilakukan untuk mengetahui parameter fisikokimia senyawa uji antara lain ClogP, BM, dan parameter yang lainnya. Model ini digunakan untuk melakukan simulasi berikutnya, seperti optimasi geometri untuk mengetahui energi total terendah dari senyawa, penentuan parameter HOMO-LUMO serta muatan parsial senyawa uji, simulasi *molecular docking* dan dinamika molekul.

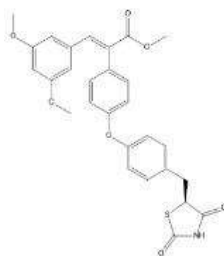
Tabel VI. 2 Pemodelan Struktur 2D PPAR- γ dengan Menggunakan ChemBioDraw

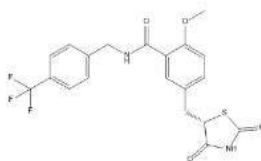
Senyawa Uji	Struktur 2D
1	

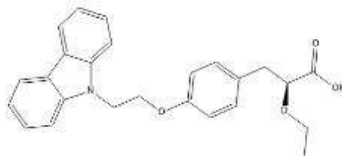
2

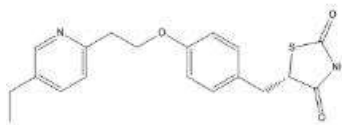
3

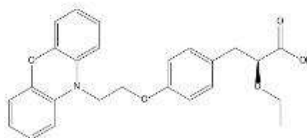
4

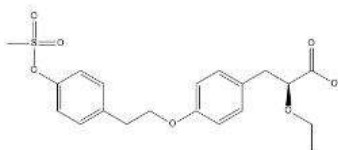
5

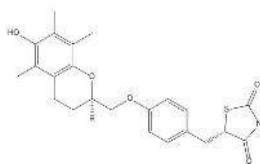
6

7

8

9

10

11

VI.3 Penentuan Parameter Sifat Fisikokimia

Pemodelan 2D dilakukan sebelum penentuan parameter sifat fisikokimia dari senyawa agonis PPAR- γ . Penentuan parameter sifat fisikokimia menurut aturan *Lipinski* yang dianalisis antara lain koefisien partisi (ClogP), bobot molekul (BM), H-donor, aseptor, dan parameter lainnya yaitu HOMO-LUMO dianalisis setelah optimasi geometri. Penentuan parameter sifat fisikokimia terhadap ligan uji senyawa agonis PPAR- γ dilakukan menggunakan piranti lunak ChemBioDraw® Ultra versi 14.0.

VI.3.1 Penentuan Koefisien Partisi (ClogP)

ClogP merupakan parameter fisikokimia yang menunjukkan lipofilisitas / hidrofobisitas suatu senyawa. Semakin besar nilai ClogP menunjukkan bahwa semakin mudah senyawa tersebut larut dalam lemak atau menembus lapisan membran. Akan tetapi, nilai ClogP yang terlalu besar menunjukkan bahwa sifat senyawa tersebut sangat lipofil, sehingga kemungkinan akan tertahan di lapisan membran. Membran yang bersifat lipofil mengakibatkan senyawa tersebut sukar berinteraksi dengan reseptor dan terdistribusi lebih luas di dalam tubuh, serta selektivitas ikatan senyawa terhadap enzim target menjadi berkurang dan menyebabkan toksisitasnya menjadi lebih tinggi (Ruswanto dkk., 2015).

Berdasarkan aturan Lipinski persyaratan untuk nilai ClogP adalah <5 (Lipinski et al, 1997). Hasil penentuan nilai ClogP terhadap 11 senyawa uji (Tabel VI.3) menunjukkan bahwa senyawa uji 2, senyawa uji 5, senyawa uji 7, senyawa uji 9, dan senyawa uji 11 memiliki nilai ClogP yang >5 , sehingga menunjukkan bahwa senyawa-senyawa tersebut tidak memenuhi aturan Lipinski dan memiliki sifat hidrofobisitas / lipofilisitas yang cukup tinggi. Hal tersebut karena pada struktur ligan uji tersebut didominasi oleh gugus-gugus hidrofobik dan sedikit gugus yang bersifat hidrofilik. Dengan sifat seperti ini, maka diprediksi ligan uji tersebut akan tertahan lebih lama di lapisan membran dan lebih sukar berinteraksi dengan reseptor dibandingkan dengan ligan uji yang lainnya.

VI.3.2 Penentuan Bobot Molekul (BM)

Nilai BM berkaitan dengan proses distribusi obat, dimana distribusi obat terjadi dengan cara menembus membran biologis melalui proses difusi (Ruswanto, 2014). Berdasarkan aturan *Lipinski*, syarat nilai BM adalah < 500 g/mol (Lipinski *et al*, 1997).

Nilai BM < 500 g/mol menunjukkan ukuran molekul yang relatif kecil sehingga memudahkan senyawa obat untuk menembus membran biologis. Sebaliknya nilai BM > 500 g/mol menunjukkan ukuran molekul yang cukup besar sehingga senyawa tersebut cukup sulit untuk menembus membran biologis dan berinteraksi dengan reseptor. Hasil penentuan BM terhadap 11 senyawa uji (Tabel VI.3) menunjukkan bahwa keseluruhan ligan uji memiliki nilai BM < 500 g/mol sehingga memenuhi aturan *Lipinski*. BM menjadi faktor penting untuk obat yang mengalami proses absorpsi seperti obat oral untuk menembus membran biologis tubuh dan selanjutnya berinteraksi dengan reseptor.

Tabel VI. 3 Parameter Sifat Fisikokimia Senyawa Uji

Senyawa uji	C Log P	BM (g/mol)	H-bond donor	H-bond aseptor
1	2,6846	440,50	1	5
2	8,17188	521,61	1	5
3	3,7898	397,45	1	6
4	3,65266	404,20	2	5

5	5,763	519,57	1	7
6	3,6874	438,42	2	7
7	5,4718	403,48	1	5
8	3,533	356,44	1	4
9	5,8818	419,48	1	6
10	2,9898	408,47	1	7
11	5,5852	441,54	2	4

VI.3.3 Penentuan Total Energi (Hasil Optimasi Geometri)

Optimasi geometri dilakukan dengan menggunakan piranti lunak Gaussian09. Tujuan optimasi geometri adalah untuk memperoleh konformasi paling stabil secara geometri dan menghitung energi nya. Pada studi ini, optimasi geometri dilakukan dengan menggunakan metode Density Functional Theory (DFT). Metode DFT merupakan metode mekanika kuantum yang tidak hanya memperhitungkan elektron sebagai fungsi gelombang tetapi telah memperhitungkan fungsi kerapatan elektron, sehingga memiliki akurasi yang cukup tinggi (Foresman & Frisch, 1996). Metode DFT memerlukan suatu fungsi yang merupakan pendekatan dari beberapa teori dalam perhitungan komputasi. Dalam penelitian ini fungsi pendekatan yang digunakan adalah B3LYP. B3LYP disebut juga sebagai fungsi hybrid karena merupakan hasil kombinasi perkiraan Hartree-Fock dengan pertukaran energi dan perkiraan DFT dengan pertukaran energi, semuanya dikombinasikan dalam fungsional yang meliputi korelasi elektron. Untuk perhitungan elektron, diperlukan adanya fungsi basis / basis set (Pongajow dkk, 2013). Basis set yang digunakan dalam

penelitian ini adalah basis set 6-31G. Basis set 6-31G telah menambahkan fungsi polarisasi ke semua atom (non hidrogen) dan meningkatkan pemodelan inti elektron. Selain itu juga 6-31G memiliki kecepatan dan akurasi yang cukup baik, dan merupakan basis dasar yang paling umum untuk digunakan (Hehre, 2003).

Tabel VI. 4 Total Energi Senyawa Uji Hasil Optimasi Geometri

Senyawa uji	Total Energi (a.u)
1	-1491,802
2	-1706,611
3	-1636,539
4	-2077,710
5	-2061,041
6	-1880,096
7	-1323,026
8	-1469,136
9	-1398,188
10	-1700,748
11	-1759,505

VI.3.4 Analisis Highest Occupied Molecular Orbital (HOMO) dan Lowest Unoccupied Molecular Orbital (LUMO)

Penetapan Energi HOMO-LUMO dilakukan dengan menggunakan piranti lunak Gaussian09, setelah senyawa uji dilakukan optimasi geometri dengan menggunakan metode DFT. HOMO-LUMO adalah prediktor kimia kuantum yang bertanggung jawab dalam

pembentukan kompleks perpindahan muatan (Dhuha dkk, 2014). Nilai HOMO yang besar menunjukkan kecenderungan senyawa tersebut untuk mendonorkan elektron (donor elektron) lebih besar, sedangkan nilai LUMO yang rendah menunjukkan kecenderungan senyawa untuk menerima elektron (aseptor elektron) lebih besar (Ohno, 2004).

Tabel VI. 5 HOMO, LUMO dan Gap Energy Senyawa Uji

Senyawa uji	HOMO (a.u)	LUMO (a.u)	Gap Energy
1	-0,21995	-0,03041	0,18954
2	-0,20268	-0,06683	0,13585
3	-0,20745	-0,0543	0,15315
4	-0,23317	-0,06657	0,1666
5	-0,22063	-0,07053	0,1501
6	-0,23702	-0,06347	0,17355
7	-0,20151	-0,02647	0,17504
8	-0,21855	-0,05119	0,16736
9	-0,17824	-0,02644	0,1518
10	-0,21458	-0,10983	0,10475
11	-0,19225	-0,05408	0,13817

Nilai HOMO yang paling besar ditunjukkan oleh senyawa uji 9 yaitu sebesar -0.17824 a.u yang menunjukkan bahwa senyawa uji 9 memiliki kemampuan yang lebih besar dalam mendonorkan elektron dibandingkan senyawa yang lainnya. Sedangkan nilai LUMO yang paling rendah ditunjukkan oleh senyawa uji 10 yaitu sebesar -0,10983

a.u yang menunjukkan bahwa senyawa uji 10 memiliki kemampuan yang lebih besar dalam menerima elektron dibandingkan ligan yang lainnya. *Gap energy* merupakan selisih antara nilai energi HOMO dan LUMO yang berperan sebagai indikator reaktivitas dan energi stabilitas suatu molekul. Selisih energi pada orbital HOMO-LUMO akan menggambarkan kemudahan suatu sistem molekul untuk mengalami eksitasi ke keadaan elektronik yang lebih tinggi (Tahir dkk., 2005). Semakin besar nilai *gap energy* maka semakin sulit elektron untuk tereksitasi sehingga stabilitasnya lebih tinggi dan reaktivitasnya lebih rendah. Sedangkan semakin kecil nilai *gap energy* menggambarkan bahwa senyawa uji memiliki reaktivitas yang tinggi dan stabilitas yang rendah. Berdasarkan hasil yang telah dilakukan menunjukkan bahwa senyawa uji 1 memiliki nilai *gap energy* yang paling besar dan senyawa uji 10 memiliki nilai *gap energy* yang rendah dibandingkan senyawa uji lainnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa senyawa uji 1 diperkirakan memiliki reaktivitas yang lebih rendah dan senyawa uji 10 memiliki stabilitas tinggi dibandingkan dengan senyawa uji yang lainnya.

VI.3.5 Penentuan Muatan Parsial

Muatan parsial merupakan distribusi elektron dalam kimia untuk menghitung interaksi elektrostatik. Dalam simulasi docking, elektrostatik diperlukan untuk melakukan perhitungan skor berdasarkan medan gaya pada fungsi sampling dan scoring. Sehingga muatan parsial harus secara akurat terdistribusi diantara atom untuk menghitung energi elektrostatik (Bujnicki M, 2009). Semakin akurat muatan parsial, maka semakin baik kualitas perhitungan skor energi

pada docking dan semakin akurat metode yang digunakan (Stroud and Moore, 2008).

VI.4 *Molecular Docking*

Proses docking dilakukan dengan menggunakan piranti lunak AutoDock versi 4.2. Tujuan dilakukannya docking adalah untuk memprediksi interaksi molekul kecil (ligan) dengan reseptor protein target dengan afinitas terbaik. Reseptor protein yang digunakan adalah PPAR- γ yang diunduh dari web Protein Data Bank (kode PDB : 3LMP). Umumnya struktur protein pada PDB mengandung molekul pelarut (air) dan residu lainnya, sehingga diperlukan penghilangan molekul air agar tidak mengganggu pada saat simulasi docking dilakukan dan untuk memastikan bahwa yang benar-benar berinteraksi adalah ligand dan reseptor. Selain itu juga perlu ditambah hidrogen pada protein, karena protein tersebut dipreparasi secara eksperimental melalui X-ray diffraction. Pada kristalografi sinar-X, atom hidrogen tidak terlihat dalam percobaan. Oleh karena itu, pada sebagian besar file PDB hasil kristalografi sinar-X dengan resolusi yang kurang baik, atom hidrogen tidak akan ada pada struktur. Sehingga pada simulasi docking perlu dilakukan penambahan hidrogen untuk mengoptimalkan posisi hidrogen dari struktur yang dihasilkan dan mampu menentukan posisi yang diinginkan secara energetik dari atom-atom (Kerzmann, 2006).

VI.4.1 *Validasi Docking*

Validasi metode *docking* dilakukan dengan cara redocking antara ligan alami dengan reseptor target PPAR- γ untuk pengecekan

validitas parameter yang akan digunakan untuk docking senyawa uji. Pada proses validasi docking, yang dilihat adalah nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD). RMSD merupakan parameter yang menggambarkan seberapa besar perubahan interaksi protein-ligan pada struktur kristal sebelum dan sesudah docking. Metode *docking* dikatakan reliable / valid apabila nilai $\text{RMSD} \leq 2 \text{ \AA}$ (Cole dkk, 2005). Yang artinya parameter *docking* yang digunakan telah valid sehingga dapat digunakan selanjutnya untuk *docking* senyawa uji.

Tabel VI. 6 Grid Box Yang Digunakan Pada Saat Validasi

Grid Box			Grid Spacing	Grid Center		
X	Y	Z	0,375 Å	X center	Y center	Z center
40	40	40		11,373	48,578	61,997

Number of Runs :100

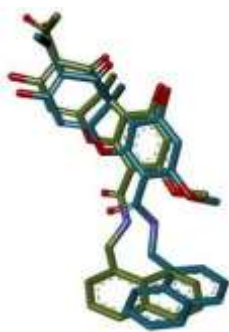
Number of Evals : Medium

Metode Algoritma : Lamarckian Genetic Algorithm

Parameter yang digunakan pada docking antara lain Grid Box dengan ukuran X : 40, Y : 40, Z : 40 Å. Grid Box adalah pengaturan tempat docking yang berfungsi untuk membatasi prediksi daerah interaksi antara reseptor dan ligan. Metode algoritma yang digunakan adalah Lamarckian Genetic Algorithm (LGA). Algoritma tersebut merupakan penggabungan antara algoritma Local Search dan Genetic Algorithm. Nilai energi hasil docking dipengaruhi oleh search run, yang merupakan pengulangan yang dilakukan dalam proses docking (Syahputra dkk, 2014). Pada penelitian ini dilakukan pencarian

konformasi sebanyak 100 dalam satu kali analisis docking, sehingga akan dihasilkan 100 konformasi pada ligan.

Berdasarkan hasil re-docking, didapatkan nilai RMSD yang $< 2 \text{ \AA}$ yaitu sebesar $0.93 \text{ \AA}$. Hal ini menunjukkan bahwa metode docking yang digunakan telah valid dan pengaturan parameter docking yang digunakan telah memenuhi kriteria validitas metode docking, sehingga parameter tersebut dapat digunakan selanjutnya untuk docking senyawa uji.



Keterangan

Warna hijau : ligan alami

Warna biru : ligan hasil re-docking

RMSD : $0,93 \text{ \AA}$

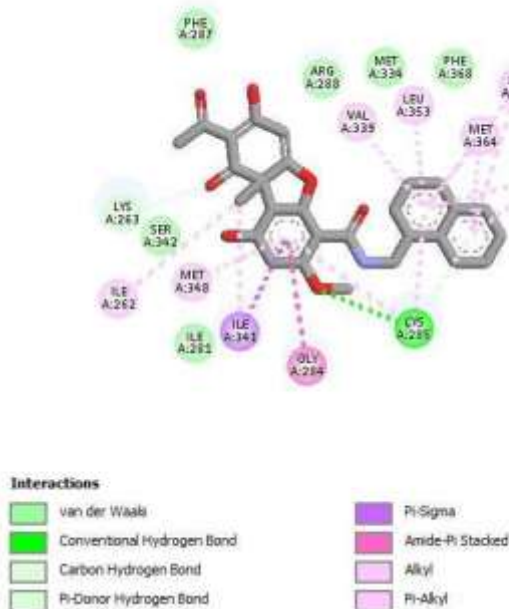
Gambar VI. 2 Visualisasi Hasil Re-docking

VI.4.2 Hasil Energi Bebas Ikatan (ΔG) dan Konstanta Inhibisi (K_i) Ligan Alami

Hasil validasi docking menunjukkan nilai energi bebas ikatan < 0 , yang menunjukkan bahwa terjadi interaksi antara ligan alami dengan

reseptor dengan nilai sebesar -12.23 kkal/mol dan nilai konstanta inhibisi sebesar $1,09$ nM.

VI.4.3 Interaksi Ikatan antara Ligan Alami dengan Reseptor Target PPAR γ (Re-docking)



Gambar VI.3 Visualisasi interaksi ikatan antara Ligan Alami dengan Reseptor Target PPAR γ hasil validasi / re-docking

Tabel VI. 7 Interaksi Ikatan antara Ligan Alami dengan Reseptor Target PPAR γ

Interaksi	Residu asam amino
Hidrogen : A:CYS285:SG - A:CEK23:O21	ILE262,
A:LYS301:NZ - C:LEU693:O	GLY284,

C:LYS688:N - A:GLU471:OE2	CYS285,
C:ILE689:N - A:GLU471:OE2	LEU330,
C:LEU690:N - A:GLU471:OE1	VAL339,
Pi-sigma : A:VAL315:CG2 - C:HIS691	ILE341,
A:ILE341:CG2 - A:CEK23	MET348,
Alkil : A:VAL315 - C:LEU690	LEU353,
A:LEU318 - C:LEU690	MET364, dan
A:LEU318 - C:LEU694	LYS367
A:LEU468 - C:ILE689	
A:CEK23:C17 - A:ILE262	
A:CEK23:C17 - A:ILE341	
Pi-alkil : C:HIS687 - A:VAL315	
C:HIS687 - A:LYS319	
C:HIS691 - A:LEU311	
A:CEK23 - A:CYS285	
A:CEK23 - A:MET348	
A:CEK23 - A:CYS285	
A:CEK23 - A:LEU330	
A:CEK23 - A:VAL339	
A:CEK23 - A:LEU353	
A:CEK23 - A:MET364	
A:CEK23 - A:LYS367	
A:CEK23 - A:LEU330	
A:CEK23 - A:MET364	
A:CEK23 - A:LYS367	

VI.4.4 Docking Senyawa Uji

Pada docking senyawa uji, digunakan algoritma parameter docking yang sudah tervalidasi yang bertujuan untuk mengarahkan agar ligan senyawa uji berinteraksi pada daerah yang sama dengan ligan alaminya di dalam reseptor. Simulasi docking senyawa uji dilakukan untuk mengetahui konformasi interaksi senyawa uji pada sisi aktif reseptornya dan senyawa uji mana yang memiliki afinitas terbaik terhadap reseptor.

Ukuran grid box yang digunakan untuk senyawa uji adalah 40 x 40 x 40 dengan grid spacing 0,375 Å dan nilai center box senyawa uji yaitu X=11,373 Å, Y=48,578 Å, Z=61,997 Å. Kemudian algoritma yang digunakan adalah Genetic Algorithm dengan Number of GA Runs 100 dan pemilihan Number of Evalsnya medium dengan metode algoritma yang digunakan adalah Lamarckian Genetic Algorithm. Hasil docking yang diperoleh antara lain adalah nilai energi bebas ikatan dan konstanta inhibisi serta dapat diprediksi ikatan kimia antara senyawa uji dengan reseptor PPAR- γ .

VI.4.5 Energi Bebas Ikatan (ΔG) dan Konstanta Inhibisi (K_i)

Analisis Hasil docking yang pertama meliputi analisis energi bebas ikatan (ΔG) dan konstanta inhibisi (K_i) yang berkaitan dengan afinitas pengikatan. Afinitas pengikatan merupakan ukuran kemampuan obat untuk berikatan pada reseptor (Ruswanto dkk, 2015).

Tabel VI. 8 Energi Bebas Ikatan (ΔG) dan Konstanta Inhibisi (K_i)

Senyawa Uji	Energi bebas ikatan / ΔG (kkal/mol)	Konstanta Inhibisi / K_i (nM)
1	-9,49	109,80
2	-11,38	4,57
3	-9,36	138,87
4	-8,46	627,86
5	-11,18	6,37
6	-9,02	244,39
7	-10,43	22,52
8	-9,09	216,42
9	-10,05	43,34
10	-9,19	184,03
11	-10,89	10,35
Alami	-12,23	1,09

Analisis energi bebas dilakukan untuk mengetahui spontanitas suatu reaksi dan kestabilan interaksi ligan-reseptor. Semakin negatif nilai ΔG menunjukkan tingkat kestabilan yang baik antara reseptor dan ligan sehingga afinitas ikatan yang terbentuk semakin kuat (Syahputra dkk, 2014). Selain itu nilai ΔG yang semakin negatif menunjukkan semakin tinggi afinitas ligan terhadap sisi aktif reseptor, karena reaksi berlangsung spontan sehingga meningkatkan potensi untuk melakukan pengikatan dengan protein target dan diprediksikan memiliki afinitas yang lebih baik. Analisis K_i dilakukan untuk menunjukkan kestabilan kompleks yang terbentuk antara ligan-reseptor. Semakin kecil nilai K_i maka semakin tinggi afinitas ligan terhadap sisi

aktif reseptor, sehingga diprediksikan ligan tersebut menghasilkan aktifitas biologis yang lebih baik (Kim, R. & J. Skolnick, 2007).

Hasil docking ligan uji (Tabel VI.8) menunjukkan bahwa keseluruhan ligan uji memiliki nilai energi bebas ikatan < 0 yang menggambarkan bahwa ligan uji memiliki afinitas pada sisi aktif reseptor. Nilai ΔG dan K_i yang rendah ditunjukkan oleh senyawa uji 2 yaitu -11,38 kkal/mol dan 4,57 nM.

Hal tersebut menunjukkan bahwa senyawa uji 2 dengan ligan alami mempunyai kesamaan yang baik, sehingga senyawa uji tersebut diprediksikan memiliki afinitas yang lebih baik terhadap sisi aktif reseptor PPAR- γ dibandingkan dengan ligan uji yang lainnya.

VI.4.6 Interaksi Ikatan Senyawa Uji

Setelah menganalisis afinitas ligan uji terhadap reseptor PPAR γ , selanjutnya adalah menganalisis interaksi antara reseptor PPAR γ dengan ligan uji pada sisi pengikatan. Sisi pengikatan protein merupakan area dari pengikatan protein terhadap ligan yang akan mempengaruhi konformasi maupun fungsi dari protein. Area tersebut melibatkan residu-residu asam amino yang berperan penting pada pengikatan dengan ligan (Pratama dkk, 2016).

Pada interaksi ikatan 11 senyawa uji dengan ligan alami memiliki kesamaan residu- residu asam amino yang sesuai.

VI.5 Simulasi *Molecular Dynamic* Senyawa Uji Terbaik

Simulasi molecular dynamic antara reseptor target PPAR- γ dengan senyawa uji terbaik dilakukan dengan menggunakan program Amber (David AC dkk., 2016). Tujuan dari simulasi *molecular dynamic* yaitu

untuk mengamati kestabilan ikatan yang terjadi terhadap ruang dan waktu, menganalisis dinamika interaksi inhibisi dan mengamati kestabilan ikatan yang terjadi serta interaksi secara lebih lanjut. Dari hasil docking molekular, ligan uji yang akan lanjut ke tahap simulasi molekular dinamik ialah sebagai berikut.

Tabel VI. 9 Urutan Senyawa Uji Yang Akan Dilakukan Simulasi
Molecular Dynamic

Senyawa Uji	Energi bebas ikatan / ΔG (kkal/mol)	Konstanta Inhibisi / K_i (nM)
2	-11,38	4,57
5	-11,18	6,37
11	-10,89	10,35
7	-10,43	22,52
9	-10,5	43,34
Alami	-12,23	1,09

Beberapa tahap yang dilakukan dalam simulasi dinamika molekul adalah persiapan berkas masukan ligan dan makromolekul, pembuatan topologi dan koordinat ligan dan makromolekul, minimisasi kompleks, ekuilibrasi kompleks, produksi, dan analisis dinamika molekuler.

VI.5.1 Persiapan Berkas Ligan dan Makromolekul

Simulasi dinamika molekuler dimulai dengan mempersiapkan berkas masukan, yaitu masing-masing ligan dan makromolekul. Ligan yang digunakan merupakan ligan terbaik dari simulasi docking. Persiapan

dilakukan dengan cara memisahkan struktur reseptor protein PPAR- γ dari semua ligand dan hanya menyisakan protein nya saja. Sedangkan ligand terbaik disiapkan dengan cara membuka berkas .dlg kemudian dilihat konformasi energi ikatan terendah dan disimpan dalam bentuk (.pdb). Dalam hal ini berkas (.pdb) ligand dan berkas (.pdb) makromolekul sudah bisa digunakan untuk simulasi dinamika molekuler.

VI.5.2 Pembuatan Topologi dan Koordinat

Topologi dan koordinat dibuat melalui berkas ligand, makromolekul, dan kompleks ligand-makromolekul dalam kondisi vakum dan dalam pelarut air. Tahapan ini dilakukan agar simulasi berlangsung pada posisi yang tetap dan tidak ada perubahan struktur atom-atom backbone residu maupun ligand. Pada tahap ini juga dilakukan penambahan counter-ions (Ion Na^+) untuk membuat sistem menjadi netral dan seluruh sistem dilarutkan dalam model pelarut air TIP3P. Dasar pemilihan pelarut air untuk sistem yang terlarut adalah untuk mengefisiensikan waktu simulasi dan jarak kotak minimal 10 Å yang merupakan jarak standar yang digunakan pada program ini.

VI.5.3 Minimisasi Sistem

Tahap minimisasi dilakukan untuk merelaksasikan sistem. Minimisasi ini dilakukan melalui tiga tahapan : min1.in, min2.in, dan min3.in. Tahap pertama merupakan minimisasi terhadap molekul air saja, dengan menahan pergerakan protein dari residu. Tahap kedua merupakan tahapan yang diberi tahanan terhadap protein nya saja. Terakhir min3.in merupakan minimisasi terhadap seluruh sistem yang tidak diberi tahanan agar minimisasinya maksimal.

VI.5.4 Pemanasan Sistem

Tahap pemanasan dilakukan untuk memungkinkan sistem memanaskan dari 0 K hingga 310 K (suhu fisiologis). Pemanasan ini dilakukan dalam tiga tahapan : heat1.in, heat2.in, dan heat3.in. Tahap pertama pemanasan dari 0 K hingga 100 K. Tahap kedua pemanasan dari 100 K hingga 200 K. Tahap ketiga pemanasan dari 200 K hingga 310 K.

VI.5.5 Ekuilibrasi Sistem

Ekulibrasi dilakukan untuk menstabilkan sistem, sehingga sistem mencapai keadaan konstan sebelum menjalani simulasi dinamika molekul. Tahap ini dilakukan untuk membuat sistem berada pada tekanan yang konstan. Ada empat parameter yang harus diamati setelah ekuilibrasi dilakukan. Keempat parameter tersebut adalah temperatur, berat jenis, energi potensial, dan RMSD.

VI.5.6 Produksi

Sebelum produksi dilakukan, harus dilakukan pengecekan terhadap empat parameter; yaitu suhu, energi potensial, berat jenis, dan RMSD. Parameter tersebut dilihat untuk menentukan apakah sistem sudah siap untuk dilakukan produksi atau belum. Parameter suhu, energi potensial, berat jenis, dan RMSD pada hasil ekuilibrasi telah menunjukkan suhu yang konstan. Dalam penelitian ini dilakukan produksi selama 50 ns.

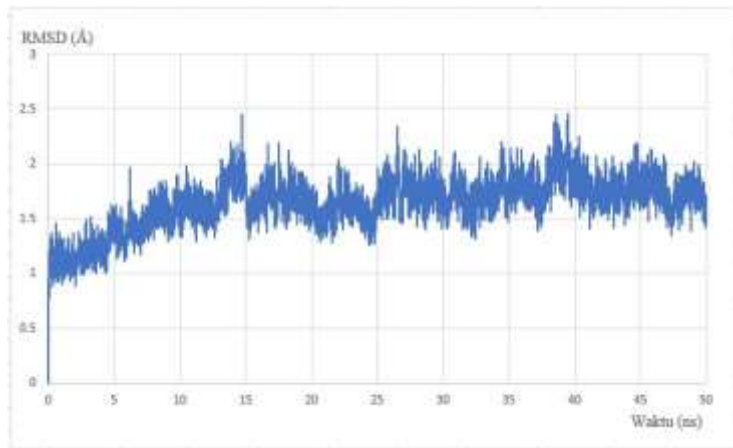
VI.5.7 Analisis Hasil Simulasi Dinamika Molekul

Analisis hasil simulasi dinamika molekul dibagi menjadi:

1. Analisis RMSD

RMSD atau akar kuadrat rata-rata deviasi merupakan suatu ukuran yang sering digunakan dalam geometri 3D molekul untuk membandingkan perubahan atau pergerakan konformasi molekul (Farkhani, 2012). Tujuan analisis nilai RMSD adalah untuk menggambarkan seberapa jauh struktur berubah setelah dilakukan simulasi dan memastikan stabilitas struktur dengan menghitung nilai RMSD atom backbone protein mulai dari awal simulasi dan diplot dengan waktu.

1.1 Grafik RMSD Protein Tunggal

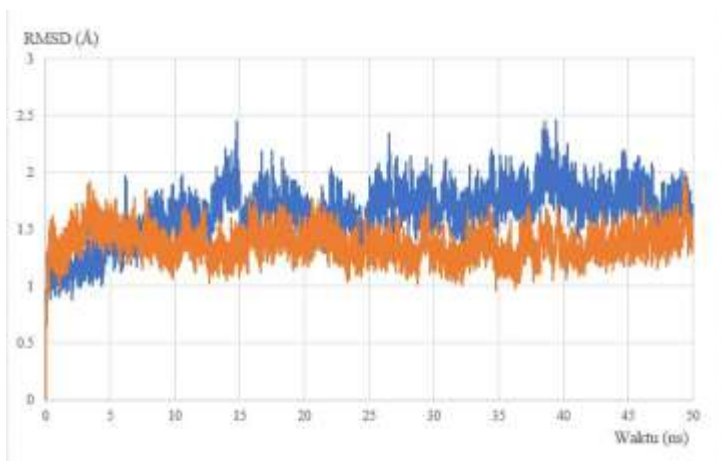


Gambar VI. 3 Grafik RMSD Protein Tunggal

Pada gambar grafik di atas merupakan grafik RMSD protein tunggal. Protein tunggal ialah dimana pada proses Dinamika molekular tidak ada penggabungan ligan. Hal ini dilakukan sebagai pembanding untuk

senyawa uji yang lainnya. Selama simulasi pada protein tunggal ini berlangsung selama 50 ns, protein tunggal mengalami peningkatan RMSD atom backbone pada 1 Å di awal simulasi, akan tetapi pada 15 ns terjadi fluktuasi RMSD atom backbone dan stabil kembali hingga akhir simulasi.

1.2 Grafik RMSD Protein Tunggal dan Protein yang Terkompleks dengan Ligan Alami

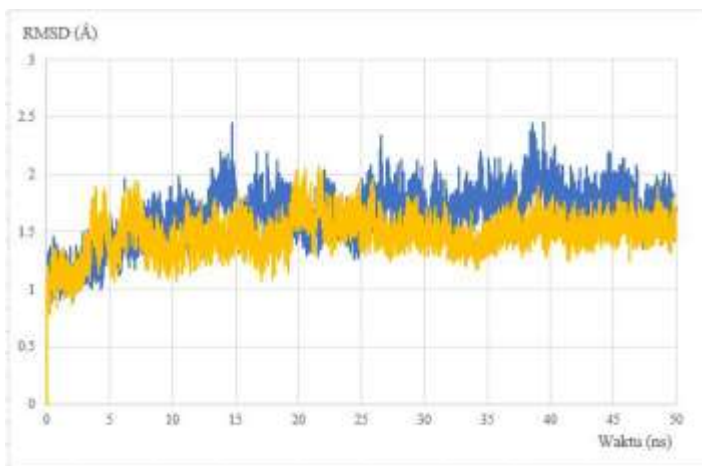


Gambar VI. 4 Grafik RMSD Protein Tunggal (warna biru) dan Protein yang Terkompleks dengan Ligan Alami (warna orange)

Pada gambar grafik RMSD di atas, selama simulasi yang berlangsung selama 50 ns, protein yang terkompleks ligan alami mengalami peningkatan RMSD atom backbone pada 1,2 Å di awal simulasi, akan tetapi pada 5,5 ns terjadi fluktuasi RMSD atom backbone dan stabil kembali hingga akhir simulasi. Dengan adanya protein yang

terkompleks dengan ligan alami, grafik RMSD (Gambar VI.4) lebih rendah. Artinya RMSD ini terkompleks lebih stabil.

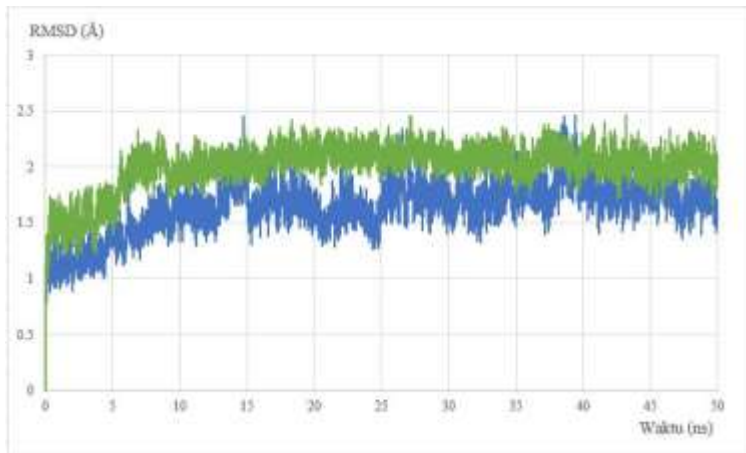
1.2.1 Grafik RMSD Protein Tunggal dan Protein yang Terkompleks dengan Ligan Uji 2



Gambar VI. 5 Grafik RMSD Protein Tunggal (warna biru) dan Protein yang Terkompleks dengan Ligan Uji 2 (warna kuning)

Pada gambar grafik RMSD di atas, selama simulasi yang berlangsung selama 50 ns, protein yang terkompleks dengan ligan uji 2 mengalami peningkatan RMSD atom backbone pada 1,2 Å di awal simulasi, akan tetapi pada 15,5 ns terjadi fluktuasi RMSD atom dan stabil kembali hingga akhir simulasi. Dengan adanya protein yang terkompleks dengan ligan uji 2, grafik RMSD (Gambar VI.5) lebih rendah. Artinya RMSD ini terkompleks dengan stabil.

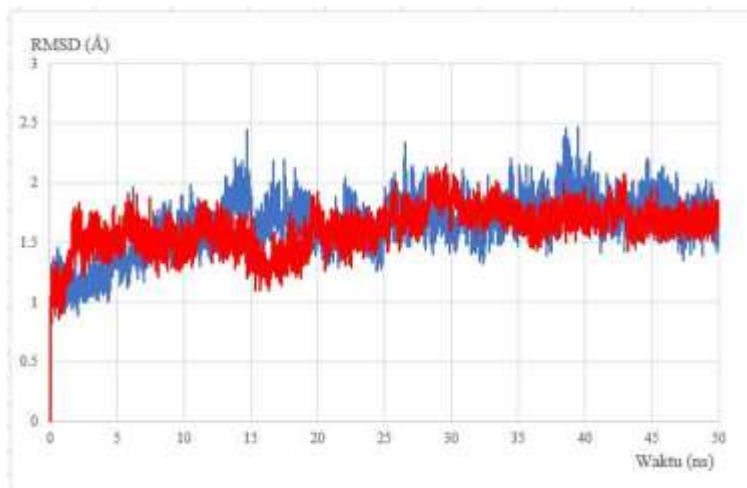
1.3 Grafik RMSD Protein Tunggl dan Protein yang Terkompleks dengan Ligan Uji 5



Gambar VI. 6 Grafik RMSD Protein Tunggal (warna biru) dan Protein yang Terkompleks dengan Ligan Uji 5 (warna hijau)

Pada gambar grafik RMSD di atas, selama simulasi yang berlangsung selama 50 ns, protein yang terkompleks dengan ligan uji 5 mengalami peningkatan RMSD atom backbone pada 1,5 Å di awal simulasi serta terus meningkat hingga akhir simulasi. Hal ini simulasi yang dilakukan dengan waktu 50 ns belum cukup untuk membuat RMSD (Gambar VI.6) bisa terkompleks stabil, maka perlu dilakukan kembali simulasi yang cukup lama agar terkompleks dengan stabil.

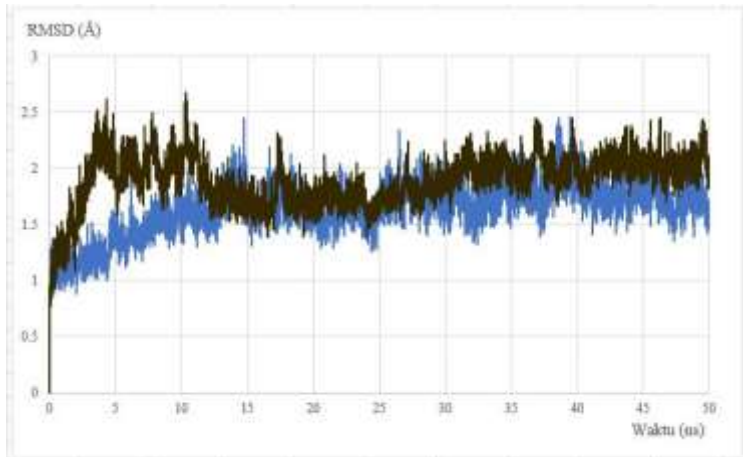
1.4 Grafik RMSD Protein Tunggal dan Protein yang Terkompleks dengan Ligan Uji 11



Gambar VI. 7 Grafik RMSD Protein Tunggal (warna biru) dan Protein yang Terkompleks dengan Ligan Uji 11 (warna merah)

Pada gambar grafik RMSD di atas, selama simulasi yang berlangsung selama 50 ns, protein yang terkompleks dengan ligan uji 11 mengalami peningkatan RMSD atom backbone pada 1,2 Å di awal simulasi, akan tetapi pada 15,3 ns terjadi fluktuasi RMSD atom dan stabil kembali hingga akhir simulasi. Dengan adanya protein yang terkompleks dengan ligan uji 11, grafik RMSD (Gambar VI.7) sedikit mendekati RMSD protein tunggal. Namun hal tersebut masih di katakan terkompleks dengan stabil.

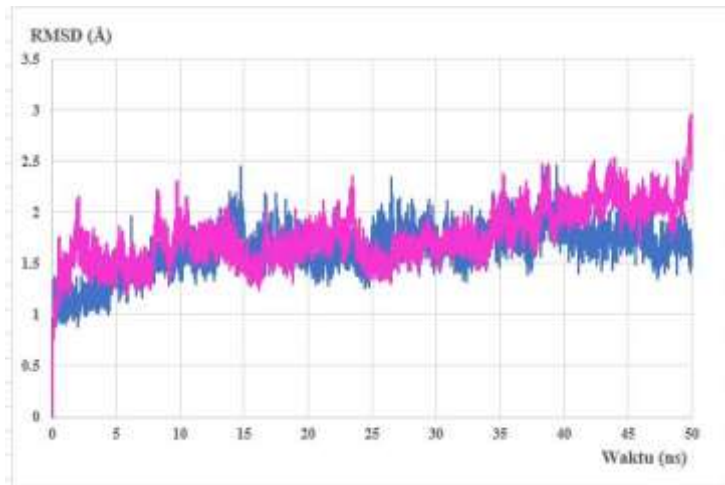
1.5 Grafik RMSD Protein Tunggal dan Protein yang Terkompleks dengan Ligan Uji 7



Gambar VI. 8 Grafik RMSD Protein Tunggal (warna biru) dan Protein yang Terkompleks dengan Ligan Uji 7 (warna coklat)

Pada gambar grafik RMSD di atas, selama simulasi yang berlangsung selama 50 ns, protein yang terkompleks dengan ligan uji 5 mengalami peningkatan RMSD atom backbone pada 1,5 Å di awal simulasi serta terus meningkat hingga akhir simulasi. Hal ini simulasi yang dilakukan dengan waktu 50 ns belum cukup untuk membuat RMSD (Gambar VI.8) bisa terkompleks stabil, maka perlu dilakukan kembali simulasi yang cukup lama agar terkompleks dengan stabil.

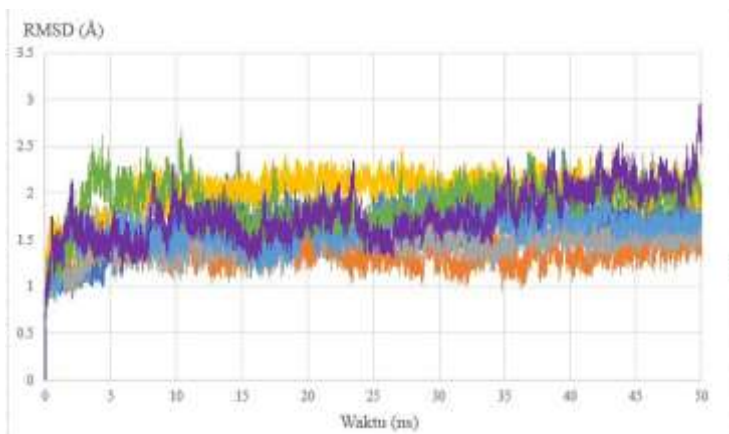
1.6 Grafik RMSD Protein Tunggal dan Protein yang Terkompleks dengan Ligan Uji 9



Gambar VI. 9 Grafik RMSD Protein Tunggal (warna biru) dan Protein yang Terkompleks dengan Ligan Uji 9 (warna magenta)

Pada gambar grafik RMSD di atas, selama simulasi yang berlangsung selama 50 ns, protein yang terkompleks dengan ligan uji 5 mengalami peningkatan RMSD atom backbone pada 1,5 Å di awal simulasi serta terus meningkat hingga akhir simulasi. Hal ini simulasi yang dilakukan dengan waktu 50 ns belum cukup untuk membuat RMSD (Gambar VI.9) bisa terkompleks stabil, maka perlu dilakukan kembali simulasi yang cukup lama agar terkompleks dengan stabil.

1.7 Grafik RMSD Protein Tunggal dan Protein yang Terkompleks dengan Ligan Alami, Ligan Uji 2, 5, 11, 7, dan 9



Gambar VI. 10 Grafik RMSD Protein Tunggal (warna biru) dan Protein yang Terkompleks dengan Ligan Alami (warna orange), Ligan Uji 2 (warna abu-abu), Ligan Uji 5 (warna kuning), Ligan Uji 11 (warna biru muda), Ligan Uji 7 (warna hijau), dan Ligan Uji 9 (warna ungu)

Secara keseluruhan (Gambar VI.10), terlihat bahwa waktu yang dibutuhkan agar keenam kompleks dalam konformasi stabil relatif sama. Selama simulasi yang berlangsung selama 50 ns, semua senyawa mengalami peningkatan RMSD atom backbone pada rata-rata 1,5 Å di awal simulasi. Selanjutnya senyawa alami, senyawa uji 2, senyawa uji 11, dan senyawa uji 9 cenderung stabil hingga simulasi berakhir. Sedangkan pada senyawa uji 5 dan senyawa uji 7, terjadi fluktuasi RMSD yang cukup tinggi, hal tersebut dikarenakan waktu yang di tempuh belum cukup untuk melihat apakah senyawa uji 5 dan senyawa uji 7 bisa terkompleks stabil. Maka perlu dilakukan kembali

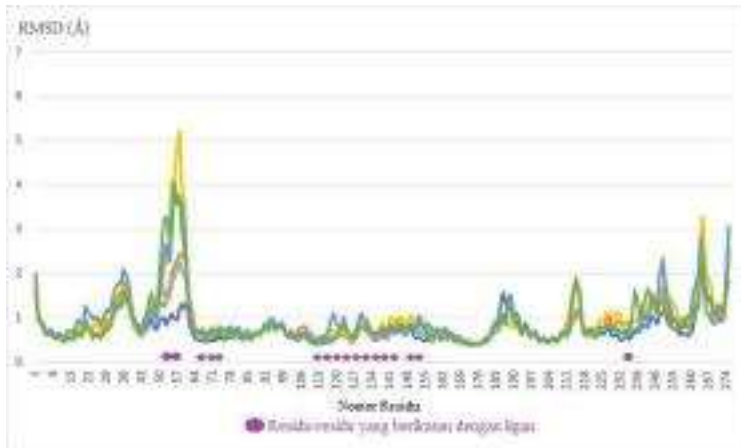
simulasi dengan penambahan waktu yang cukup lama agar senyawa uji 5 dan 7 bisa terkompleks stabil.

Simulasi perlu dijalankan dalam waktu lebih lama untuk mengamati lebih lanjut fluktuasi yang terjadi pada sistem, serta mendapatkan nilai RMSD yang lebih stabil dan analisa dapat dilakukan lebih baik dan mendalam.

Peningkatan nilai RMSD menunjukan bahwa struktur enzim mulai terbuka dan ligan mulai mencari sisi ikatan atau koordinat yang sesuai pada protein tersebut. Sedangkan, nilai RMSD yang mulai stabil menandakan bahwa konformasi maksimal protein setelah terikat dengan ligan mulai tercapai sehingga protein mampu mempertahankan posisinya. Selain itu, adanya interaksi antar residu pada enzim membuat protein cenderung mempertahankan strukturnya.

2. Analisis RMSF

Root Mean Square Fluctuation atau akar kuadrat rata-rata fluktuasi adalah ukuran deviasi antara posisi partikel dan beberapa posisi referensinya. Berbeda dengan RMSD, RMSF dihitung terhadap masing-masing residu protein, yakni melihat sejauh mana fluktuasi pergerakan masing-masing residu selama simulasi berlangsung. Nilai RMSF secara garis besar akan menggambarkan pergeseran konformasi setiap residu asam amino yang memberikan fleksibilitas protein. RMSF ditentukan dari waktu ketika energi potensial mengalami fluktuasi minimal, yakni dimulai dari 1 nanodetik hingga akhir simulasi.



Gambar VI. 11 Grafik RMSF senyawa alami (warna biru), Senyawa Uji 2 (warna orange), Senyawa Uji 5 (warna abu-abu), Senyawa Uji 11 (warna kuning), Senyawa Uji 7 (warna biru muda), dan Senyawa Uji 9 (warna hijau)

Pada gambar grafik RMSF, bahwa residu-residu penting pada situs pengikatan ligan seperti ILE56, LYS57, ARG67, ILE68, GLY71, CYS72, ILE113, LEU117, LEU120, VAL126, ILE128, SER129, MET135, LEU140, PHE150, LYS154, dan HIE236 tidak menunjukkan nilai RMSF yang tinggi. Jarak ikatan residu-residu tersebut relatif stabil pada jarak 1,5 Å, namun pada senyawa uji 11 mengalami fluktuasi yang cukup tinggi pada 5 Å tetapi stabil kembali hingga simulasi berakhir (Gambar VI.11). Hal ini menunjukkan bahwa residu-residu tersebut tidak memberikan fleksibilitas yang tinggi dan dapat dikatakan merupakan residu yang stabil. Residu yang memiliki nilai RMSF yang tinggi memiliki fleksibilitas yang tinggi, maka hasil yang diperoleh tidak stabil. Pada residu-residu

tersebut kemudian mengalami perubahan posisi saat simulasi dinamika molekuler berlangsung.

3. Analisis MM/GBSA

Energi Ikatan Bebas MM/GBSA (Molecular mechanics energies with the Poisson-Boltzman surface area method) adalah suatu metode untuk menghitung energi ikatan bebas antara ligan kecil dan makromolekul biologi. MM/GBSA berdasarkan simulasi dinamika molekul untuk makromolekul-ligan kompleks. MM/GBSA bergantung terhadap konstanta dielektrik protein yang ditentukan. Teori energi bebas ikatan MM/GBSA memiliki enam perhitungan, yaitu:

$$G = E_{\text{bind}} + E_{\text{el}} + E_{\text{vdW}} + G_{\text{pol}} + G_{\text{np}} - TS$$

Yang pertama merupakan energi ikatan meliputi ikatan (bond), sudut dan dihedral, dan merupakan interaksi elektrostatik dan interaksi van der Waals. sebagai kontribusi polar terhadap energi bebas solvasi ditentukan dengan menyelesaikan persamaan Poisson-Boltzman atau dengan model MM/GBSA (generalized Born). sebagai kontribusi non-polar dihasilkan dari hubungan linear terhadap solvent accessible surface area (SASA). Dan yang terakhir adalah temperatur dikali dengan entropi ditentukan dari analisis frekuensi vibrasi.

Tabel VI. 10 Hasil perhitungan MM/GBSA

Kode Senyawa	ΔE vdw (kkal/mol)	ΔE ele (kkal/mol)	ΔE polar (kkal/mol)	ΔE nonpolar (kkal/mol)	total (kkal/mol)
Alami	-60,8483	-8,1248	26,0638	-7,3298	-50,2391
2	-74,9957	-20,0571	31,3982	-9,6327	-73,2873
5	-65,9181	-28,7963	44,8822	-9,208	-59,0402
11	-56,7821	-24,8074	43,7194	-7,1654	-45,0355
7	-53,3173	-26,4692	37,9484	-6,6466	-48,4847
9	-57,1877	-10,8231	20,9434	-7,4545	-54,5219

Tabel VI. 11 ΔG Total Hasil Dinamika molekular dan ΔG Hasil Molekular *Docking*

Kode Senyawa	ΔG Total Hasil Dinamika Molekular (kkal/mol)	ΔG Hasil Molekular Docking (kkal/mol)
Alami	-50,2391	-12,23
2	-73,2873	-11,38
5	-59,0402	-11,18
11	-45,0355	-10,89
7	-48,4847	-10,43
9	-54,5219	-10,05

Pada tabel di atas (Tabel VI.9) nilai energi ikat bebas MM/GBSA yang akan dibahas adalah energi ikat bebas antara protein dan ligan selama 50 ns. Berdasarkan energi ikat bebas MM/GBSA (Tabel VI.10) nilai energi ikat terendah dihasilkan antara protein dengan senyawa uji 2

sebesar -73.2873 kkal/mol. Dari nilai tersebut, diketahui bahwa protein PPAR- γ cenderung lebih dapat mengikat senyawa uji 2 dibanding senyawa uji yang lain, dan pada perbandingan senyawa alami pun nilai yang di peroleh lebih rendah.

Perbandingan antara total nilai energi bebas MM/GMBSA hasil dinamika molekular dengan nilai energi bebas ikatan hasil molekular *docking* pada (Tabel VI.10), senyawa uji terbaik masih di pegang oleh senyawa uji 2. Hal tersebut bahwa hasil kedua dari simulasi tersebut bahwa protein PPAR- γ berpotensi lebih dapat mengikat senyawa uji 2 dibandin senyawa uji lainnya.

Bab VII Kesimpulan dan Saran

VII. 1 Kesimpulan

1. Hasil docking sebelas ligan uji hasil *Virtual Screening* kandidat diabetes milietus tipe dua terhadap makromolekul senyawa uji 2, senyawa uji 5, senyawa uji 11, senyawa uji 7, dan senyawa uji 9 didapatkan secara berturut-turut nilai ΔG yakni -11,38; -11,18; -10,89; -10,43; dan -10,05 kkal/mol. Dan nilai K_i secara berturut-turut 4,57; 6,37; 10,35; 22,52; dan 43,34 nM. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas lima senyawa hasil docking dari basis data senyawa memiliki nilai energi bebas ikatan dan konstanta inhibisi yang lebih kecil pada senyawa uji 2 sehingga mengindikasikan senyawa tersebut memiliki potensi terbaik sebagai inhibitor reseptor PPAR- γ .
2. Berdasarkan hasil simulasi dinamika molekul selama 50 ns dari 11 senyawa uji terhadap reseptor protein PPAR- γ menunjukkan adanya interaksi yang stabil dan fleksibilitas yang rendah pada 5 senyawa uji yaitu senyawa uji 2, senyawa uji 5, senyawa uji 11, senyawa uji 7, dan senyawa uji 9 dibuktikan dengan nilai RMSD dan RMSF. Senyawa uji 2 memiliki nilai RMSD terendah (± 1 Å) dibandingkan dengan senyawa uji lainnya, sehingga dapat dikatakan senyawa uji tersebut memiliki kestabilan yang paling baik. Residu-residu dengan fleksibilitas rendah pada RMSF umumnya sama dengan residu yang berperan pada pengikatan senyawa uji dengan reseptor PPAR- γ , sehingga menunjukkan

adanya kestabilan pada daerah residu yang berikatan dengan senyawa uji.

VII. 2 Saran

Waktu analisis dalam simulasi dinamika molekul perlu diperpanjang untuk mendapatkan data yang lebih lengkap sehingga analisis dapat dilakukan lebih mendalam lagi.