

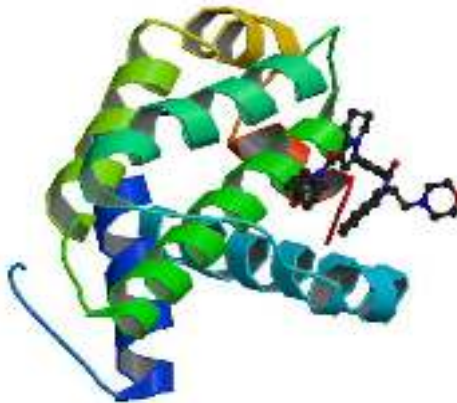
BAB VI

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam bab ini penyusun akan mencantumkan hasil penelitian yang sudah dilakukan, disertai dengan penjelasan dari hasil penelitian tersebut.

VI.1 Penelusuran Pustaka Dan Preparasi Protein Target

Protein



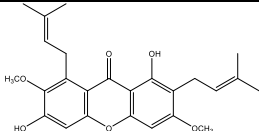
Gambar VI.1 : protein Bcl-2 plus ligan alami (S55746),
kode pdb : 6GL8, metode :difraksi sinar x , resolusi : 1.4

VI.2 Preparasi Ligan Uji

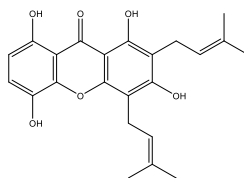
Dalam tahap pertama penyusun menggambar dua dimensi dan tiga dimensi ligan uji menggunakan aplikasi chemdraw, setelah struktur ligan uji selesai di gambar tahap selanjutnya yaitu mencari parameter fisikokimianya, proses selanjutnya senyawa ini digunakan untuk melakukan simulasi, yang pertama simulasi optimasi geometri yang kedua adalah simulasi *docking*, dan yang terakhir simulasi dinamika molekul.

Proses awal yang dilakukan adalah penggambaran struktur ligan uji yang berjumlah 10 senyawa melalui aplikasi chemdraw dengan format Sybyl MOL2 Files (.mol2). Setelah terbentuk gambar struktur ligan uji tahap selanjutnya adalah melakukan pencarian parameter fisikokimia. Parameter fisikokimia yang bisa digunakan antara lain CLogP, BM, H donor, H akseptor. Tahap selanjutnya melakukan optimasi geometri untuk mengetahui energi total terendah dari senyawa tersebut dan penentuan parameter HOMO-LUMO.

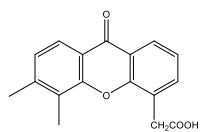
Table VI.1 : Pemodelan dua dimensi senyawa uji

Kode Senyawa	Gambar Senyawa
Xanthone 1	

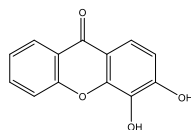
Xanthone 2



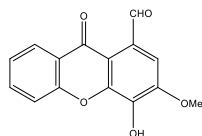
Xanthone 3



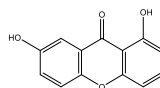
Xanthone 4



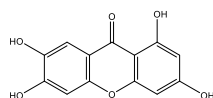
Xanthone 5



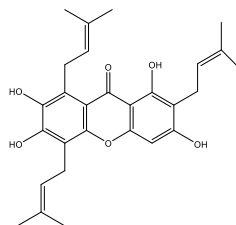
Xanthone 6



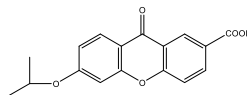
Xanthone 7



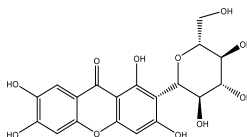
Xanthone 8



Xanthone 9



Xanthone10



VI.3 Penentuan Parameter Sifat Fisikokimia

Ligan uji yang telah di gambar kemudian di cek nilanya, hasil tersebut digunakan untuk mengetahui sifat fisikokimia dari 10 senyawa ligan uji. Penentuan parameter sifat fisikokimia meliputi pengecekan koefisien partisi (CLogP), HOMO-LUMO, dan BM.

Tabel VI.2 : ClogP, BM, H donor dan H akseptor

Senyawa	C logP	BM (g/mol)	H donor	H akseptor
Xanthone 10	-0,260	407	8	3
Xanthone 9	3,722	289	1	3
Xanthone 8	7,644	438	4	2
Xanthone 7	1,841	256	4	2
Xanthone 6	3,058	222	2	2
Xanthone 5	2,236	206	2	3
Xanthone 4	2,228	238	2	2
Xanthone 3	3,196	266	1	2
Xanthone 2	6,523	392	4	2
Xanthone 1	6,751	419	4	2

VI.3.1 Penentuan Koefisien Partisi (CLogP)

Penentuan CLogP terhadap ligan uji dilakukan menggunakan software ChemDraw® Ultra. 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 protein target 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 (1) nilai Log P <5, (2) berat molekul <500 g/mol (3) jumlah donor ikatan hidrogen <5 dan (4) jumlah akseptor ikatan hidrogen <10. (Lipinski dkk, 1997). Hasil penentuan nilai CLogP terhadap 10 ligan uji (Tabel VI.1) menunjukkan bahwa ligan uji memenuhi aturan *Lipinski*.

Bioavailabilitas obat dalam mencapai target kerjanya merupakan salah satu aspek penting dalam pembuatan desain obat. Sebelum obat dapat mencapai target kerjanya, obat-obat tersebut harus melewati beberapa

membran. Lipofilisitas merupakan salah satu sifat fisikokimia yang mempengaruhi bioavailabilitas obat (Kujawski dkk, 2012).

Kandidat suatu obat dapat disaring berdasarkan nilai CLogP karena CLogP merupakan salah satu parameter yang menunjukkan sifat lipofilisitas suatu senyawa (Bhal, 2011). Partisi (CLogP) dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *Chem Office 2010*. Semakin tingginya nilai CLogP menunjukkan bahwa semakin tinggi pula lipofilisitasnya.

Dengan tingginya nilai CLogP, maka sifat senyawa akan cenderung bersifat hidrofobik dan cenderung memiliki sifat toksisitas yang tinggi karena akan tertahan lebih lama di lapisan membran sehingga ikatan terhadap protein target juga akan berkurang. Sedangkan semakin kecil nilai CLogP maka senyawa bersifat hidrofilik, jika hasil CLogP terlalu negatif juga akan mengakibatkan senyawa tidak akan bisa melewati lipid membran. Berdasarkan data dari Tabel VI.1 menunjukkan bahwa nilai CLogP tidak masuk syarat Lipinski senyawa xanthone 2, xanthone 1 dan xanthone 8.

VI.3.2 Penentuan Bobot Molekul (BM)

Proses distribusi obat didalam tubuh berkaitan dengan bobot molekul karena proses distribusi obat terjadi dengan cara menembus membran didalam tubuh. Peningkatan bobot molekul berkaitan dengan penurunan tingkat permeasi dalam lipid bilayer. Untuk itu, nilai BM <500 g/mol akan memudahkan senyawa obat untuk menembus

membran dan dapat berinteraksi dengan protein target. Sebaliknya jika nilai BM >500 g/mol, maka senyawa obat lebih kecil kemungkinannya untuk aktif secara oral dibandingkan senyawa obat yang memiliki bobot molekul rendah (Pollastri, 2010). Dari struktur senyawa uji turunan xanthone memiliki perbedaan bobot molekul yang cukup signifikan tetapi masih masuk syarat Lipinski karena masih di bawah 500 /mol.

VI.3.3 Donor dan Akseptor Ikatan Hidrogen

Jumlah donor dan akseptor ikatan hidrogen berkaitan dengan semakin tinggi kapasitas ikatan hidrogen yang dapat terbentuk. Protein diprediksikan akan mengalami perubahan konformasi yang stabil jika terdapat banyak ikatan hidrogen yang terjadi. Semakin tinggi kapasitas ikatan hidrogen, maka semakin tinggi energi yang dibutuhkan agar proses absorpsi dapat terjadi (Arwansyah, 2014).

Dari hasil penelitian dapat diprediksikan bahwa gugus OH merupakan gugus-gugus yang akan berperan sebagai donor ikatan hidrogen. Sedangkan adanya atom O pada senyawa uji, diprediksikan akan berperan menjadi gugus akseptor ikatan hidrogen. Berdasarkan data Tabel VI.1 menunjukkan bahwa hanya senyawa uji xanthone 10 memiliki jumlah donor dan akseptor yang tidak memenuhi syarat lipinski.

VI.3.4 Penentuan Total Energi (Hasil Optimasi Geometri)

Tujuan optimasi geometri yaitu untuk memperoleh konformasi paling stabil secara geometri dan perhitungan energi. Pada studi ini, optimasi geometri dilakukan dengan menggunakan aplikasi Gaussian09, dan metode yang di gunakan adalah *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.3 : Total energi ligan uji hasil optimasi geometri

Nama Senyawa	Total Energy (a.u)
Xanthone 1	-1420,44
Xanthone 2	-1341,85
Xanthone 3	-956,91
Xanthone 4	-800,87
Xanthone 5	-953,44
Xanthone 6	-800,88
Xanthone 7	-951,27
Xanthone 8	-1537,17
Xanthone 9	-1032,09
Xanthone10	-1561,82

VI.3.5 Analisis Highest Occupied Molecular Orbital (HOMO)

dan Lowest Unoccupied Molecular Orbital (LUMO)

HOMO-LUMO adalah prediktor kimia kuantum yang bertanggung jawab dalam pembentukan kompleks perpindahan muatan (Dhuha dkk, 2014). Untuk mendapatkan nilai HOMO-LUMO dilakukan dengan cara mengoptimasi senyawa dengan metode DFT menggunakan aplikasi *Gaussian09*.

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.4 : HOMO, LUMO dan Gap energy ligan uji

Senyawa	LUMO (a.u)	HOMO (a.u)	Gap energi
Xanthone 1	-0,06774	-0,21015	0,14241
Xanthone 2	-0,05728	-0,19785	0,14057
Xanthone 3	-0,06798	-0,23038	0,1624
Xanthone 4	-0,06634	-0,22183	0,15549
Xanthone 5	-0,09035	-0,23019	0,13984
Xanthone 6	-0,08157	-0,22044	0,13887
Xanthone 7	-0,07262	-0,22001	0,14739
Xanthone 8	-0,06219	-0,20466	0,14247
Xanthone 9	-0,07966	-0,24167	0,16201
Xanthone 10	-0,06685	-0,21198	0,14513

Nilai HOMO yang terbesar di tunjukan oleh ligan xanthone 2 yaitu - 0,19785 a.u, nilai tersebut menunjukkan bahwa ligan uji xanthone 2 memiliki kemampuan yang lebih besar dalam mendonorkan elektron dibandingkan dengan ligan yang lainnya. Sedangkan nilai LUMO yang paling rendah di tunjukan oleh ligan uji xanthone 9 yaitu - 0,24167 a.u yang menunjukkan bahwa xanthone 9 memiliki kemampuan yang lebih besar dalam menerima elektron dibandingkan ligan uji yang lainnya.

Gap energy merupakan selisih antara nilai energi HOMO dan energi 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 diuji menunjukkan bahwa ligan uji xantone 3 memiliki nilai *gap energy* yang paling besar. Hal tersebut menunjukkan bahwa ligan uji xantone 3 diperkirakan memiliki reaktivitas paling tinggi dan memiliki stabilitas tertinggi dibandingkan dengan ligan uji lainnya.

VI.4 Molecular Docking

Tujuan dilakukannya *Molecular docking* adalah untuk memprediksi interaksi molekul kecil (ligan) dengan protein target dengan afinitas terbaik. Proses *Molecular docking* dilakukan dengan menggunakan aplikasi *AutoDock* versi 4.2.3.

Protein target yang digunakan adalah BCL-2 yang diunduh dari web *Protein Data Bank* (kode PDB: 6GL8). 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 ligan dan protein target.

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

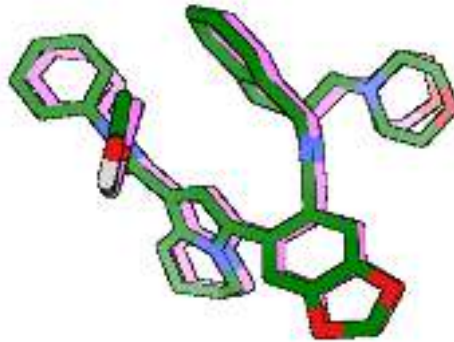
percobaan. Oleh karena itu, pada sebagian besar file PDB hasil kristalografi sinar-X dengan resolusi yang kurang baik, atom hidrogen tidak akan ada pada struktur.

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 protein target BCL-2 untuk pengecekan validitas parameter yang akan digunakan untuk *docking* senyawa uji. Pada proses validasi *docking*, yang dilihat adalah nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*).

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.



Gambar VI.2 : Visualisasi *overlay* hasil *re-docking* ligan alami (hijau) dan ligan alami hasil *re-docking* (merah muda).

Hasil dari Validasi *docking* 0,76 Å dengan Gridbox 40 x 40 x40, kordinat X center 17,189, Y center 2,647, dan Z center 15,648, validasi *docking* dengan metode *docking* Medium 100 pose, hasil *redocking* adalah Delta gibbs – 12,42 kcal dan Ki = 784,78 pM.

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 protein target 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).

Proses re-*docking* ini dilakukan sebanyak 100 konformasi dalam satu kali analisis *docking*, sehingga dihasilkan 100 posisi yang berbeda. Berdasarkan hasil analisis *docking*, didapatkan nilai RMSD yang < 2 Å yaitu sebesar 0,76 Å. Hal ini menunjukkan bahwa metode re-*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.

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

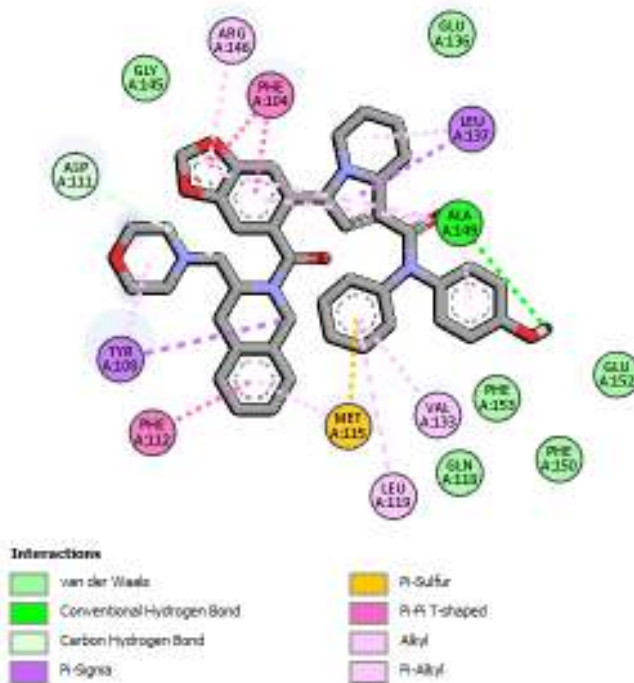
(Ki) Ligan Alami

Hasil dari validasi *docking* menunjukkan nilai energi bebas ikatan < 0 , yang menunjukkan bahwa terjadi interaksi antara ligan alami dengan protein target dengan nilai sebesar $-12,42$ kkal/mol dan nilai konstanta inhibisi sebesar 784,78 pM.

Tabel VI.5 : Interaksi ligan alami dengan target protein target

Kode Senyawa	Interaksi	Residu Asam Amino
Alami	Vanderwaals : A:GLN118 -	ASP111
		ALA149
		LEU137
		MET115
		PHE104
		PHE112
	Hydrogen : d:RES1:H95 -	PHE104
		TYR108
		LEU119

	Carbon Hydrogen : d:RES1:C33 - A:ASP111:OD2 d:RES1:C40 - A:ASP111:OD2 pi sigma : A:LEU137:CD2 - d:RES1 d:RES1:C26 - A:TYR108 pi sulphur : A:MET115:SD - d:RES1 pi – pi t shaped : A:PHE104 - d:RES1 A:PHE112 - d:RES1 d:RES1 - A:PHE104 alkil : A:LEU137 - d:RES1 pi-alkil : A:TYR108 - d:RES1 d:RES1 - A:ALA149 d:RES1 - A:LEU119 d:RES1 - A:VAL133 d:RES1 - A:ALA149 d:RES1 - A:ARG146 d:RES1 - A:ALA149 d:RES1 - A:MET115	VAL133 ARG146
--	---	---------------------------



Gambar VI.3 : Visualisasi interaksi hasil *docking* senyawa ligan alami

Gambar di atas ini menunjukkan Interaksi ikatan antara ligan alami dengan *receptor* target.

VI.4.3 *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 protein target. Simulasi *docking* senyawa uji dilakukan untuk mengetahui konformasi interaksi senyawa uji pada sisi aktif protein target dan senyawa uji mana yang memiliki *afinitas* terbaik terhadap protein target.

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=22,172 Å, Y=3,524 Å, Z=13,030 Å. Kemudian algoritma yang digunakan adalah *Genetic Algorithm* dengan *Number of GA Runs* 100 dan pemilihan *Number of Evals 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 protein target BCL-2.

Dari hasil docking 10 senyawa uji didapatkan kesamaan interaksi ikatan hydrogen yang terjadi pada asam amino diantaranya ARG146, ALA149, TYR108 dan ASP111 dalam ligan xanthone 1, xanthone 3, xanthone 5, xanthone 6, xanthone 7, xanthone 9, dan xanthone10. Dari sepuluh senyawa uji tersebut ada pun ligan yang tidak memiliki ikatan hydrogen diantaranya ligan xanthone 2, xanthone 4 dan xanthone 5.

VI.4.4 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 protein target (Ruswanto dkk, 2015).

Tabel VI.6 : Energi Bebas Ikatan (ΔG) dan Konstanta Inhibisi (K_i)

Kode Senyawa	Energi bebas ikatan / ΔG (kkal/mol)	Konstanta Inhibisi / K_i (uM)
Xanthone 1	-6,29	24,5 uM
Xanthone 2	-6,39	20,66 uM
Xanthone 3	-6,46	18,43 uM
Xanthone 4	-5,54	86,34 uM
Xanthone 5	-5,63	74,72 uM
Xanthone 6	-5,70	66,34 uM
Xanthone 7	-5,34	122,77 uM
Xanthone 8	-6,55	15,90 uM
Xanthone 9	-6,32	23,50 uM
Xanthone 10	-6,21	22,22 uM

Analisis energi bebas dilakukan untuk mengetahui spontanitas suatu reaksi dan kestabilan interaksi ligan-protein target. Semakin negatif nilai ΔG menunjukkan tingkat kestabilan yang baik antara protein target 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 protein target, 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-protein target. Semakin kecil nilai K_i maka semakin tinggi afinitas ligan terhadap sisi aktif protein target,

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

Hasil *docking* ligan uji menunjukkan bahwa keseluruhan ligan uji memiliki nilai energi bebas ikatan yang menggambarkan bahwa ligan uji memiliki afinitas pada sisi aktif protein target. Nilai ΔG dan K_i yang paling baik ditunjukkan oleh ligan uji xanthon 8 yaitu -6.55 kkal/mol dan 15,90 nM. Hal tersebut menunjukkan bahwa ligan uji tersebut diprediksikan memiliki afinitas yang lebih baik terhadap sisi aktif protein target BCL-2 dibandingkan dengan ligan uji yang lainnya.

VI.4.5 Interaksi Ikatan Senyawa Uji

Setelah menganalisis afinitas ligan uji terhadap protein target BCL-2, selanjutnya adalah menganalisis interaksi antara protein target BCL-2 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).

VI.5 Simulasi *Molecular Dynamic* Senyawa Uji Terbaik

Simulasi *molecular dynamic* antara protein target target BCL-2 dengan senyawa uji terbaik dilakukan dengan menggunakan program Amber. 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.

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

VI.5.1 Persiapan Berkas Ligan dan Makromolekul

Simulasi dinamika molekul 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 protein target protein BCL-2 dari semua ligan dan hanya menyisakan protein nya saja. Sedangkan ligan terbaik disiapkan dengan cara membuka berkas .dlg kemudian dilihat konformasi energi ikatan terendah dan disimpan dalam bentuk .pdb. Dalam hal ini berkas .pdb ligan dan berkas .pdb makromolekul sudah bisa digunakan untuk simulasi dinamika molekul.

VI.5.2 Pembuatan Topologi dan Koordinat

Topologi dan koordinat dibuat melalui berkas ligan, makromolekul, dan kompleks ligan-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 ligan. 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

Ekuilibrasi 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 *Root Mean Square Deviation* (RMSD).

VI.5.6 Produksi

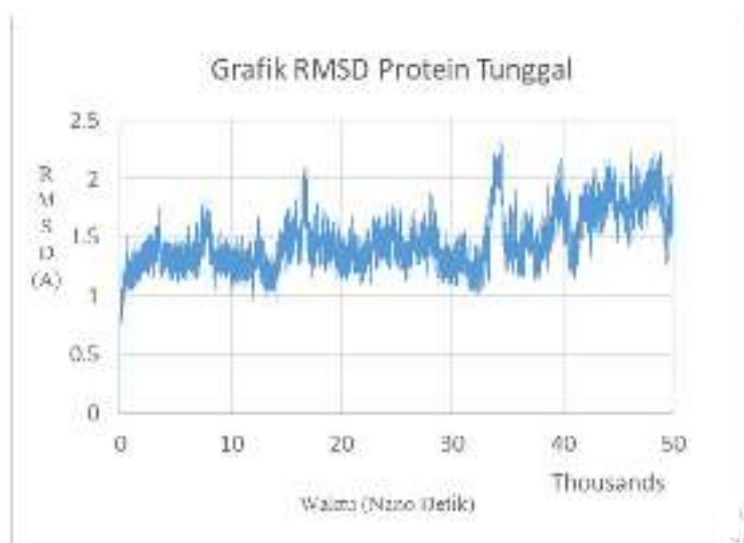
Sebelum produksi dilakukan, harus dilakukan pengecekan terhadap empat parameter; yaitu suhu, energi potensial, berat jenis, dan RMSD. Parameter tersebut dilihat untuk menentukan apakah sistem sudah siap untuk dilakukan produksi atau belum. Parameter suhu, energi potensial, berat jenis, dan RMSD pada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

VI.5.7 Analisis Hasil Simulasi Dinamika Molekul

Analisis hasil simulasi dinamika molekul dibagi menjadi dua yaitu *Root Mean Square Deviation* (RMSD) dan *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF).

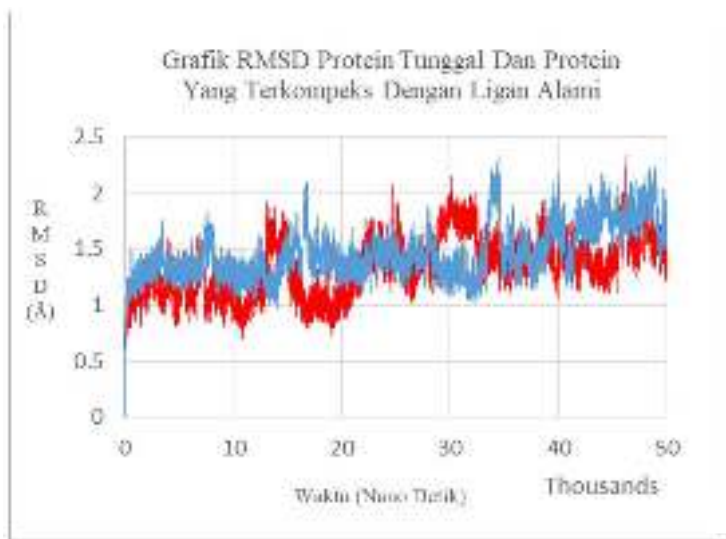
1. Analisis *Root Mean Square Deviation* (RMSD)

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.



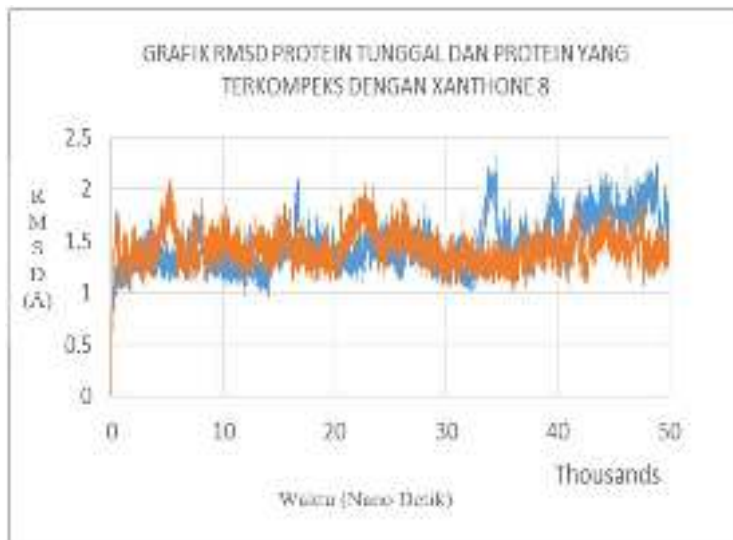
Gambar VI.4 : Grafik RMSD senyawa protein tunggal

Pada grafik di atas terbaca bahwa keadaan senyawa protein tunggal terlihat stabil di rentan jarak 1 Å sampai dengan 1,5 Å, dan jika mengalami kenaikan pun di sekitar 34 nanodetik sampai dengan 35 nanodetik.



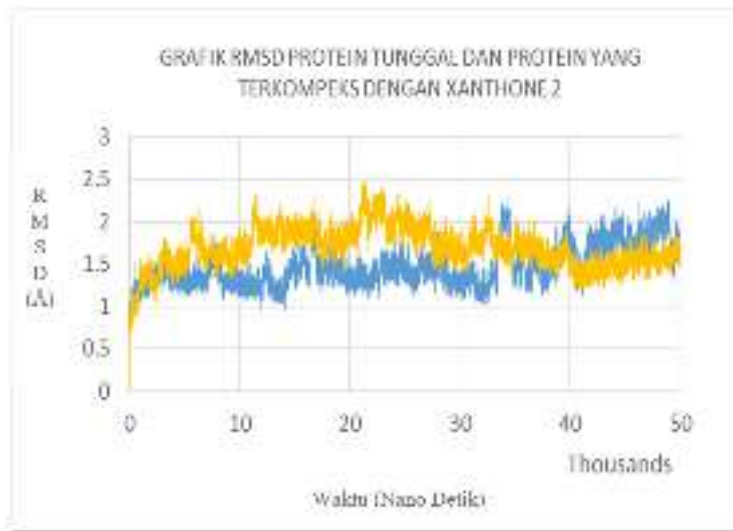
Gambar VI.5 : Grafik RMSD senyawa protein tunggal dan protein yang terkompleks dengan ligan alami

Dalam grafik diatas warna merah menunjukan protein yang terkompleks dengan ligan alami sedangkan yang berwarna biru adalah senyawa protein tunggal. Terlihat pada grafik perbandingan protein dengan ligan alami mengalami kenaikan rata-rata RMSD yang masih terlihat stabil dengan rentan jarak 0,8 Å sampai dengan 1,2 Å, di atas juga terlihat ligan alami mengalami kenaikan yang cukup signifikan di sekitar rentang waktu 14 nanodetik sampai 16 nanodetik dan rentang waktu sekitar 28 nanodetik sampai 33 nanodetik setelah itu keadaan receptor kembali stabil.



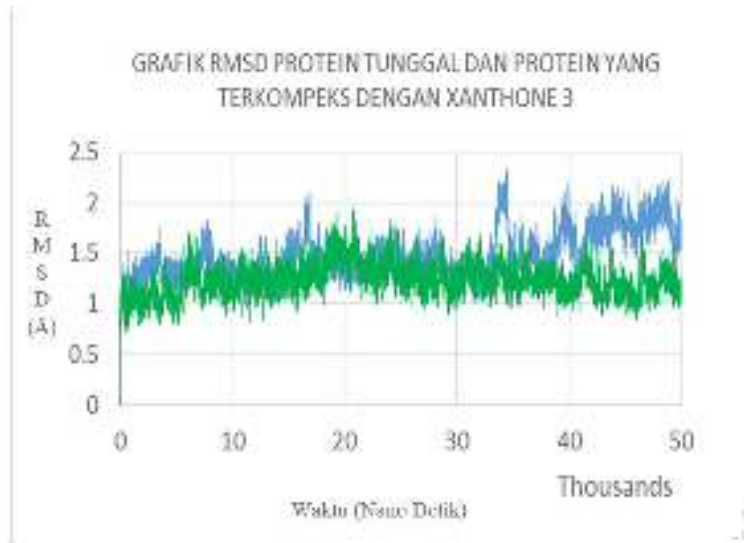
Gambar VI.6 : Grafik RMSD senyawa protein tunggal dan protein yang terkompleks dengan xanthone 8

Pada gambar di atas warna orange menunjukkan grafik protein yang terkompleks dengan xanthone 8 sedangkan warna biru menunjukkan grafik senyawa protein tunggal. Selama simulasi *molecular dynamics*, keadaan protein dalam grafik di atas saat berinteraksi dengan xanthone 8 terlihat lebih stabil, di sekitar angka 1 Å sampai 1.2 Å, walaupun mengalami kenaikan di sekitar waktu 4 nanodetik sampai 5 nanodetik dan 21 nanodetik sampai 23 nanodetik namun selain waktu yang di sebutkan di atas keadaan xanthone 8 terlihat stabil di bandingkan dengan keadaan protein tanpa ligan.



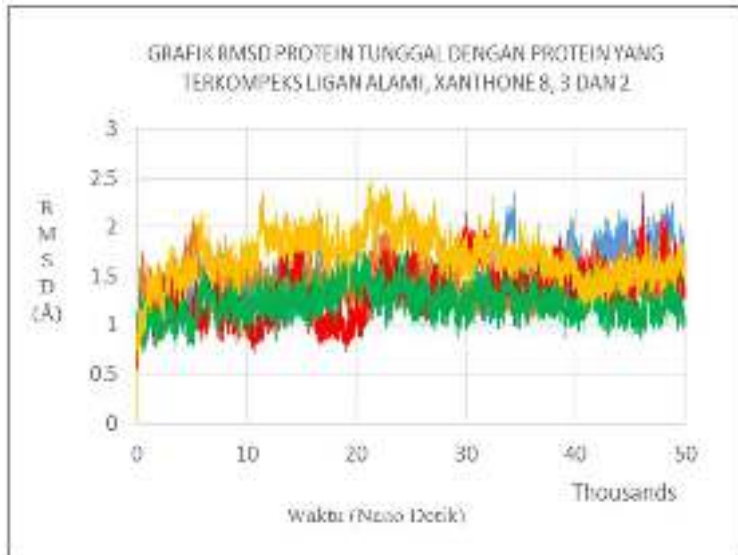
Gambar VI.7 : Grafik RMSD senyawa protein tunggal dan protein yang terkompleks dengan xanthone 2

Dalam gambar di atas grafik berwarna kuning menunjukkan protein yang terkompleks dengan xanthone 2 dan warna biru menunjukkan senyawa protein tunggal. Perbandingan keadaan protein saat berinteraksi dengan xanthone 2 terlihat lebih tinggi dibandingkan dengan keadaan protein tanpa ligan, hal tersebut terlihat di rentan waktu 5 nano detik sampai 38 nano detik dan terlihat menurun dalam jangka waktu sekitar 40 nano detik sampai dengan 50 nano detik kemudian protein dan xanthone 2 terlihat stabil pada rentang 1.3 Å sampai dengan 1.6 Å.



Gambar VI.8 : Grafik RMSD senyawa protein tunggal dan protein yang terkompleks dengan xanthone 3

Pada gambar di atas grafik dengan warna kuning menunjukkan protein yang terkompleks dengan xanthone 3 sedangkan warna biru menunjukkan senyawa protein tunggal. Setelah dilakukan simulasi, hasilnya dapat dilihat pada grafik di atas keadaan protein saat berinteraksi dengan xanthone 3 memiliki nilai rata-rata RMSD lebih rendah dan terlihat lebih stabil dibandingkan dengan keadaan protein tanpa ligan.



Gambar VI.9 : Grafik RMSD senyawa protein tunggal dengan protein yang terkompleks ligan alami, xanthone 8, xanthone 3 dan xanthone 2

Pada gambar di atas grafik berwarna biru menunjukkan senyawa protein tunggal, grafik yang berwarna merah adalah protein yang terkompleks dengan ligan alami, sedangkan grafik yang berwarna kuning adalah protein yang terkompleks dengan xanthone 2, selanjutnya grafik berwarna hijau yaitu protein yang terkompleks dengan xanthone 3, sedangkan grafik yang berwarna orange menunjukkan protein yang terkompleks dengan xanthone 8. Grafik di atas menunjukkan perbandingan antara senyawa tersebut, diantaranya

adalah protein tunggal, protein yang terkompleks ligan alami, protein yang terkompleks dengan xanthone 2, protein yang terkompleks dengan xanthone 3, dan protein yang terkompleks dengan xanthone 8.

2. Analisis *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF)

Analisis dinamika molekul selanjutnya adalah dengan melihat nilai *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF). RMSF adalah akar kuadrat rata-rata fluktuasi yang mengukur deviasi posisi partikel dan beberapa posisi referensi. RMSF menghitung nilai masing-masing residu penyusun protein yaitu dengan melihat fluktuasi pergerakan masing-masing residu selama berlangsungnya simulasi. Secara garis besar nilai RMSF menggambarkan pergeseran konformasi setiap residu asam amino yang memberikan fleksibilitas protein. Perhitungan nilai RMSF dimulai pada 1 nanodetik yaitu saat energi potensial mengalami fluktuasi minimal hingga saat simulasi berakhir pada waktu 50 nanodetik.



Gambar VI.10 : Grafik nilai RMSF

Dari grafik nilai RMSF di atas dapat dilihat bahwa residu-residu penting pengikatan ligan dengan protein yaitu residu asam amino PHE45, TYR49, ASP52, PHE53, MET56, GLN59, VAL74, GLU77, LEU78, ALA90, PHE91, GLU93, PHE94 tidak menunjukkan nilai RMSF yang tinggi. Residu-residu asam amino tersebut relatif stabil pada jarak ikatan $<1.5 \text{ \AA}$ dan tidak memberikan fluktuasi yang tinggi selama simulasi. Residu asam amino yang memiliki nilai RMSF tinggi dapat terjadi karena residu asam amino tersebut memiliki fleksibilitas yang tinggi sehingga tidak stabil. Residu asam amino tersebut yang kemudian mengalami perubahan posisi pada saat simulasi berlangsung.

3. Analisis MM/GBSA

Tabel VI.7 : Hasil perhitungan MM/GBSA

Kode Senyawa	ΔE Vdw (kkal/mol)	ΔE Ele (kkal/mol)	ΔG Polar (kkal/mol)	ΔG nonpolar (kkal/mol)	ΔG Total (kkal/mol)
alami	-52,5965	-10,9888	29,265	-6,5823	-40,9026
xanthone 2	-45,6902	-3,6091	17,6857	-5,7832	-37,3968
xanthone 3	-25,3222	-21,7315	28,1314	-3,5413	-22,4636
xanthone 8	-37,6573	-12,5469	27,253	-5,3303	-28,2815

Dari diatas menunjukan bahwa senyawa 2 memiliki energi van der waals paling tinggi dengan nilai -45,6902 kkal/mol. Hal ini menunjukan bahwa banyaknya ikatan *van der waals*. Dari hasil penelitian juga didapatkan interaksi antara senyawa uji dengan protein target Bcl-2 yang ditunjukkan dengan nilai ΔG pengikatan. Nilai ΔG pengikatan paling baik dimiliki senyawa 2 dengan nilai sebesar -37,3968 kkal/mol. Hal ini tidak sesuai dengan hasil docking senyawa uji.