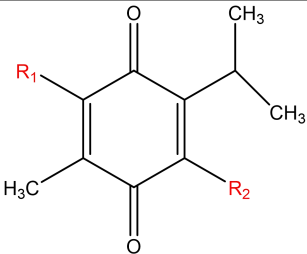


BAB. VI Hasil dan Pembahasan

VI.1 Data Set Senyawa

Data set yang digunakan harus memenuhi beberapa parameter agar data yang digunakan seragam, parameter tersebut adalah keseragaman pengujian (bahan dan cara pengujian), keseragaman aktivitas, dan senyawa yang diuji yaitu turunan senyawa timokuinon dari *Nigella sativa* L. dan dipelajari hubungan struktur dan nilai aktivitasnya.

Tabel VI. 1 Data Set Senyawa Timokuinon (Johnson, *et.al.*, 2018).

 KERANGKA TIMOKUINON (Tk)			
SENYAWA	R1	R2	IC ₅₀ (μM)
Tk1	6-NHCH ₃	-	12,9
Tk2	6-NHCH ₂ CH ₃	-	16,0
Tk3	-	6-NH ₂	35,1
Tk4	-	5-CH ₃	13,4
Tk5	2-N(CH ₃) ₂	5-CH ₃	5,6
Tk6	3-N(CH ₃) ₂	5-CH ₃	35,6
Tk7		5-CH ₃	32,0
Tk8	3-Br	6-Br	3,6
Tk9	2-C(CH ₃) ₃	5-CH ₃	13,5
Tk10	3-Cl	3-Cl	6,0
Tk11	2-C(CH ₃) ₃	-	10,0
Tk12	2-C(CH ₃) ₃	5-C(CH ₃) ₃	51,2
Tk13	3-CH ₃	5-CH ₃	5,2
Tk14	2-C(CH ₃) ₃	6-C(CH ₃) ₃	37,4
Tk15	2-C(CH ₃) ₃	5-C(CH ₃) ₃	54,2
Tk16	2-C(CH ₃) ₇	C(CH ₃) ₇	6,6

Sifat fisikokimia ditentukan oleh (deskriptor) yang akan berpengaruh terhadap aktivitas biologi senyawa tersebut senyawa timokuinon yang digunakan adalah berasal dari hasil penelitian secara *in vitro* yang dilakukan oleh Johnson, *et al.*, 2018 terhadap penghambatan aktifitas kanker ovarium dengan konsentrasi hambat 50% (IC_{50}) dimana ktivitas biologi suatu senyawa ini dapat diukur oleh nilai IC_{50} . IC_{50} merupakan ukuran efektivitas senyawa dalam fungsi biologis atau biokimia dalam menghambat suatu penyakit Data set senyawa turunan timokuinon pada penelitian ini dimodelkan menggunakan program *Chem Draw* dan *Chem 3D Ultra* sehingga diperoleh model secara 2D dan 3D dari setiap senyawa.

VI.2 Optimasi geometri

Senyawa yang telah dilakukan pemodelan kemudian dilakukan pengoptimasian struktur dengan menggunakan *software* Gaussian 09W dimana optimasi geometri atau optimasi energi ini adalah suatu langkah untuk mendapatkan struktur dengan energi minimal atau terendah dari suatu molekul. Struktur dengan energi terendah dapat diinterpretasikan sebagai sistem dengan keadaan yang stabil di alam (Leach, 2001). Optimasi geometri merupakan media komputasi yang dimaksudkan untuk mengetahui sifat fisikokimia dari suatu senyawa uji. Metode yang digunakan adalah dengan metode *Density Functional Theory* (DFT) sering dipilih karena memodelkan sistem molekul dengan akurat dan memberikan data dalam tingkat mikroskopik yang berkorelasi signifikan dengan hasil eksperimen laboratorium atau juga metode ini hanya menghitung secara global energi elektronik total dan juga berdasarkan dari kerapatan elektron. Selain itu juga fungsional yang merupakan dari

pendekatan dari beberapa teori dalam perhitungan komputasi pada penelitian ini yaitu B3LYP disebut juga sebagai fungsi *Hybrid* karena merupakan hasil kombinasi perkiraan Hartree-Fock dengan pertukaran energi, semuanya dikombinasikan dalam fungsional yang meliputi korelasi elektron (Pongajow, 2013). Basis set yang digunakan yaitu 6-31G yang menandakan di dalam set basis ini terdapat enam fungsi Gaussian yang mewakili orbital, tiga fungsi Gaussian untuk orbital elektron valensi bagian yang berkontraksi, dan satu untuk bagian yang berdifusi (Pamungkas, 2013). Setelah dilakukan optimasi geometri pada masing-masing senyawa timokuinon maka akan diperoleh nilai sifat fisikokimia dari masing-masing senyawa tersebut yang dengan nilai energi terendah sehingga senyawa tersebut lebih stabil. selanjutnya akan digunakan sebagai deskriptor, deskriptor akan melihat aktivitas biologi pada senyawa tersebut (Lampiran 1).

VI.3 Perhitungan deskriptor

Perhitungan deskriptor ini digunakan untuk penetapan parameter fisikokimia yang bertujuan untuk melihat interpretasi dari hasil HKSA dari senyawa uji timokuinon. Penentuan deskriptor adalah tahapan pertama yang dilakukan, dimana deskriptor-deskriptor ini dapat memberikan kontribusi yang sangat penting dalam HKSA berdasarkan dari parameter-parameter menurut Hansch. Apabila adanya hubungan yang kuat antara deskriptor dengan aktivitas biologi maka aktivitas nantinya akan diprediksi, Oleh karena itu, deskriptor yang dipilih harus mempunyai hubungan yang erat dengan deskriptor. Deskriptor yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan dari Hansch ada 3 parameter yang dapat mewakili yaitu

parameter hidrofobik, parameter elektronik dan parameter steril.

A. Parameter hidrofobik

Parameter hidrofobik (lipofilik) suatu obat dapat dinilai secara eksperimental dapat menguji sebaran distribusi obat dalam oktanol/air. Parameter ini menunjukkan kelarutan obat dalam lipid agar mampu menembus reseptor.

Tabel VI.2 Nilai Deskriptor Log P dan Log S Senyawa Turunan Timokuinon.

Senyawa	Log P	Log S
Tk1	0,965	-1,307
Tk2	1,393	-1,640
Tk3	0,932	-1,712
Tk4	-0,059	-0,650
Tk5	-0,706	-1,214
Tk6	-0,706	-1,209
Tk7	0,740	-3,122
Tk8	-0,196	-2,411
Tk9	1,508	-1,839
Tk10	1,586	-2,970
Tk11	1,295	-1,722
Tk12	2,810	-2,904
Tk13	0,031	-0,775
Tk14	2,726	-2,904
Tk15	3,910	-3,853
Tk16	4,912	-4,547

Deskriptor yang dipilih untuk parameter hidrofobik yaitu terdiri dari Log P, Log S dan momen dipol. Distribusi relatif diketahui yaitu sebagai koefisien partisi (P). Koefisien partisi (P) adalah tetapan kesetimbangan suatu senyawa dalam pelarut non- polar/polar. Senyawa yang bersifat hidrofobik memiliki nilai P tinggi, sedangkan senyawa hidrofilik memiliki nilai P yang rendah. Nilai log P menunjukkan efektivitas distribusi senyawa dari kandidat obat

dalam tubuh manusia. Semakin tinggi nilai Log P sampai batas tertentu maka obat tersebut akan lebih mudah terdistribusi dalam fasa non polar (lipid) daripada fasa polar (air), sehingga semakin mudah untuk menembus membran biologis yang terusun atas lipid. Sifat ini akan memudahkan senyawa obat untuk dapat berikatan dengan reseptor, sehingga makin baik untuk dikonsumsi manusia (Dewi dan Sanjaya, 2018).

Kelarutan berperan penting dalam proses absorpsi obat dalam mencapai sirkulasi darah untuk selanjutnya diedarkan ke seluruh tubuh. Sifat ini dipengaruhi oleh polaritas senyawa obat dalam menembus membran sel yang tersusun atas lipid. Senyawa dengan kepolaran tinggi akan menurunkan daya absorpsi senyawa obat karena sifatnya hidrofilik. Sebaliknya, rendahnya polaritas senyawa akan meningkatkan absorpsi karena sifatnya yang lipofilik. Pada kajian kimia komputasi, sifat ini diwakili oleh log S (Azizah dkk., 2013). Sedangkan Momen dipol didefinisikan sebagai perbedaan elektronegativitas atom-atom yang menyusun suatu senyawa. Makin besar selisih keelektronegatifan antara dua atom, makin besar pula kepolarannya

Nilai log P yang paling besar adalah senyawa dengan nomor 16, ini menandakan bahwa pada senyawa tersebut cenderung lebih bersifat sangat non polar dari pada molekul yang lain atau hidrofobisitas molekul tersebut semakin besar (Tabel VI.2).

B. Parameter elektronik

Parameter elektronik memiliki efek suatu obat dapat melewati membran sel dan seberapa kuat efek tersebut dapat berinteraksi dengan lokasi ikat. Saat suatu senyawa berinteraksi dengan sisi aktif

reseptor, dua orbital atom atau molekul mengalami interaksi yang nantinya akan menghasilkan dua orbital baru. Salah satu orbital asalnya (orbital anti-ikatan), dan orbital lainnya memiliki energi yang kecil (orbital ikatan) kemudian terjadilah interaksi antar molekul HOMO-LUMO. Saat terjadi antara dua orbital.

HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbitals*) merupakan orbital tertinggi pada pita valensi yang ditempati elektron. Energi HOMO berikatan langsung dengan potensial ionisasi dan karakteristik kerentanan molekul terhadap serangan elektrofil. LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbitals*) merupakan orbital terendah pada pita konduksi yang tidak ditempati elektron. Energi LUMO berhubungan langsung dengan afinitas elektron dan ciri kerentanan molekul terhadap serangan nukleofil. Energi HOMO dan energi LUMO sangat penting dalam reaksi radikal. Selisih antara energi HOMO dan LUMO (GAP) penting dalam penentuan ukuran kestabilan molekul. Apabila selisihnya besar maka molekul tersebut memiliki stabilitas yang tinggi, sehingga reaktivitasnya rendah dalam reaksi kimia. (Pamungkas *et al.*, 2013).

Tabel VI.3 Nilai Energi HOMO, LUMO, dan Momen Dipol dari Senyawa Turunan Timokuinon.

Senyawa	HOMO (eV)	LUMO (eV)	Momen Dipol
Tk1	-0,216	-0,049	1,603
Tk2	-0,216	-0,049	1,608
Tk3	-0,221	-0,116	2,554
Tk4	-0,270	-0,135	0,764
Tk5	-0,214	-0,113	2,953
Tk6	-0,217	-0,115	3,607
Tk7	-0,220	-0,125	0,869
Tk8	-0,227	-0,126	3,511
Tk9	-0,262	-0,129	0,211
Tk10	-0,279	-0,147	0,712
Tk11	-0,267	-0,134	0,985
Tk12	-0,260	-0,128	0,0005
Tk13	-0,264	-0,130	1,134
Tk14	-0,259	-0,128	1,553
Tk15	-0,253	-0,120	1,098
Tk16	-0,255	-0,127	0,433

C. Parameter sterik

Parameter Sterik dari suatu substituen dapat diukur berdasarkan sifat meruah gugus-gugus dan efek gugus pada kontak obat dengan sisi reseptor yang berdekatan (Siswandono, 2008). Parameter sterik berpengaruh terhadap interaksi obat dengan reseptor atau enzim.

Tabel VI.4 Nilai Deskriptor Sterik dari Senyawa Turunan Timokuinon

Dalam hal ini, deskriptor yang dipilih yaitu *Heat of Formation* (HF),

Senyawa	HF	MR	CMA	MTI	IB
Tk1	-483,94	55,074	214,905	2114	53976
Tk2	-504,58	59,822	234,001	2626	76585
Tk3	-340,81	52,749	188,522	1710	37861
Tk4	-284,46	35,618	127,530	646	6756
Tk5	-269,68	49,312	173,186	1412	26687
Tk6	-269,68	49,312	173,233	1389	26272
Tk7	-337,35	65,792	215,352	3862	109560
Tk8	-325,95	60,359	205,278	1902	52082
Tk9	-387,24	53,60	190,372	1762	38208
Tk10	-441,66	63,182	214,506	2179	70979
Tk11	-355,13	49,242	172,030	1408	26141
Tk12	-457,91	67,224	235,004	3172	103502
Tk13	-316,57	39,975	145,744	848	10919
Tk14	-457,91	67,224	234,690	3044	99543
Tk15	-513,30	80,783	274,227	4994	228760
Tk16	-599,25	94,474	291,221	7576	464914

Molar Refractivity (MR), *Connolly Molecular Area* (CMA), Mol Topologi Indeks (MTI) dan Indeks Balaban. Dimana *Molar Refractivity* (MR) merupakan ukuran penyebaran molekul dalam satu mol senyawa. *Heat of Formation* (HF) merupakan entalpi pembentukan yang nantinya akan mempengaruhi kestabilan dari pemanasan pada suatu struktur. Sedangkan, *Connolly Molecular Area* (CMA) merupakan suatu tetapan yang dikemukakan oleh Connolly yang berhubungan dengan sifat sterik dari *solvent* yang berhubungan dengan cara pendekatan suatu *solvent* dengan molekul protein atau ligan-ligan spesifik.

Indeks balbalan merupakan gambaran kapasitas molar, energi Gibbs bias indeks dan entalpi pada rantai struktur senyawa (Zhoua, 2009). Mol topologi Indeks merupakan pengukuran cabang molekul, bentuk, ukuran bahwa struktur kimia disebut sebagai grafik kimia, yaitu suatu model kimia yang digunakan untuk menjelaskan sifat interaksi antara objek-objek kimia (atom, ikatan, gugus atom, molekul dan pasangan molekul (Devillevs, 1997).

D. Parameter termodinamika

Nilai-nilai Termodinamik juga digunakan untuk mewakili parameter elektronik, besaran termodinamika yang dipilih yaitu Energi Elektronik (E_{ele}), Energi Thermal (E_{thermal}), S_{entropi} , H_{entalpi} dan Energi Total.

H_{entalpi} merupakan besaran termodinamika yang menyatakan jumlah energi internal yang terdapat di dalam sebuah sistem termodinamika ditambah dengan jumlah energi yang digunakan untuk melakukan aktivitas pada suatu materi. S_{entropi} merupakan sebuah besaran termodinamika yang berfungsi mengukur energi dalam satuan temperatur yang tidak dapat digunakan untuk melakukan suatu usaha. H_{entalpi} merupakan proses perpindahan kalor yang terjadi secara konstan, sedangkan didalam sentropi proses tersebut terjadi dari komponen yang bersuhu tinggi ke komponen yang bersuhu rendah (Pronowo, 2001).

Tabel VI.5 Nilai Deskriptor Termodinamika dari Turunan Senyawa Timokuinon

Senyawa	Etotal	Eele	Ethermal	Sentropi	Hentalpi
Tk1	-635,622	-635,330	192,816	124,249	-635,314
Tk2	-674,9295	-674,609	211,659	131,548	-674,591
Tk3	-593,926	-593,709	143,999	109,158	-593,695
Tk4	-420,654	-420,541	76,355	86,579	-420,532
Tk5	-554,590	-554,402	124,951	107,668	-554,390
Tk6	-554,591	-554,403	124,931	104,414	-554,391
Tk7	-806,205	-806,001	137,306	122,58	-805,986
Tk8	-3164,896	-3164,688	139,311	122,505	-3164,673
Tk9	-577,876	-577,648	151,243	111,151	-577,6340
Tk10	-1496,999	-1496,791	140,548	132,048	-1496,775
Tk11	-538,562	-538,3627	132,505	103,305	-538,399
Tk12	-695,783	-695,470	207,315	128,146	-695,452
Tk13	-459,966	-459,824	94,424	91,559	-459,814
Tk14	-695,781	-695,467	207,409	127,855	-695,449
Tk15	-813,679	-813,280	263,878	151,02	-813,258
Tk16	-931,561	-931,076	320,002	166,912	-931,129

Energi Total merupakan penjumlahan fungsi energi potensial yang berasal dari berbagai macam energi yang membuat suatu molekul berada dalam keadaan geometri yang paling sederhana dengan sterik yang paling rendah. Energi Elektronik merupakan energi yang disebabkan oleh energi potensial dan kinetik elektronnya . Energi thermal merupakan energi yang memiliki kaitan dengan gerak acak atom dan molekul, dinamakan termal karena energi ini dapat diukur melalui suhu (termal) (Pronowo, 2001).

VI.4 Permodelan Persamaan HKSA dengan *Multi Linear Regresion* (MLR)

Persamaan Hubungan Kuantitatif Struktur Aktivitas (HKSA) dapat dilihat dengan cara analisis perhitungan statistika yang sering digunakan dalam hubungan struktur dan aktivitas melalui parameter-parameter sifat fisika kimia adalah analisis regresi linear dan nonlinear. Untuk mengetahui hubungan kuantitatif antara struktur kimia dan aktivitas biologis melalui parameter sifat kimia fisika dapat dilakukan perhitungan statistika dengan bantuan komputer, menggunakan program seperti SPSS dan *statistica*. Perhitungan analisis statistik yang paling sering digunakan dalam hubungan struktur dan aktifitas melalui parameter kimia fisika adalah regresi linier.

Analisis perhitungan statistika yang digunakan *Multi Linear Regresion* (MLR) untuk mengetahui hubungan antara variabel terikat dan variabel bebas. Variabel terikat yang digunakan yaitu nilai aktivitas turunan senyawa timokuinon (Log IC_{50}) dan variabel bebasnya yaitu 15 deskriptor yang telah mewakili dari 3 parameter, yaitu parameter hidrofobik, parameter elektronik, dan parameter sterik. Kemudian dilakukan analisis statistik regresi multi linear dari 16 data *training set*.

Data *training set* ini berfungsi untuk membangun model persamaan HKSA. Metode untuk melihat adalah metode *backward*, metode ini untuk mengetahui dari 15 deskriptor tersebut yang nantinya akan berpengaruh terhadap aktivitas biologi, sehingga dimasukkan ke dalam statistik yaitu pada variabel *dependent* dimasukkan Log IC_{50} sedangkan pada variabel *independent* dimasukkan 15 deskriptor. Hasil yang didapatkan dari program SPSS sebanyak 10 model.

Tetapi hanya 5 model yang telah memenuhi kriteria statistik dengan nilai $R \geq 0,90$, $R^2 \geq 0,81$ dan $F_{hitung}/F_{tabel} \geq 1$ dan $SE \leq 0$. Hal ini telah sesuai dengan pendekatan analisis Hansch.

Tabel VI.6 Model *Summary* SPSS

Model	R	R ²	Standar Error	Deskriptor
1*	0,917	0,840	0,357	MTI, LUMO, Etotal, Momen Dipol, HOMO, CMA, Log P, Ethermal, Sentropi, HF, Log S, Indeks Balaban
2	0,916	0,840	0,309	MTI, LUMO, Etotal, Momen Dipol, HOMO, CMA, Ethermal, Sentropi, HF, Log S, Indeks Balaban
3	0,912	0,832	0,283	MTI, LUMO, Etotal, CMA, Log P, Ethermal, Sentropi, HF, Log S, Indeks Balaban
4	0,909	0,826	0,263	MTI, LUMO, Etotal, CMA, Ethermal, Sentropi, HF, Log S, Indeks Balaban
5	0,904	0,817	0,249	MTI, LUMO, Etotal, CMA, Sentropi, HF, Log S, Indeks Balaban

Keterangan *: Deskriptor model 1 yang terpilih.

Dari hasil analisis yang didapat dari pertama model yang telah memenuhi persyaratan dimana dilihat dari nilai R, R², dan SE. Selanjutnya untuk memilih model persamaan pertama kali yang dipertimbangkan adalah kelengkapan dari ke 3 parameter Hansch. Dari semua model persamaan yang diperoleh, maka yang dipilih adalah model pertama karena model yang paling spesifik sesuai kriteria statistik dan telah mewakili 3 parameter analisis Hansch, yaitu parameter hidrofobik, parameter elektronik dan parameter sterik.

Pada model pertama pada tabel di atas memiliki koefisien korelasi yang kuat yaitu $R = 0,917$, hal ini menunjukkan bahwa hubungan antara variabel terikat dan variabel bebas memiliki hubungan yang kuat untuk dijadikan sebagai persamaan HKSA. Kemudian diperkuat dengan nilai koefisien R^2 yang sangat penting dalam menjelaskan hubungan antara Log IC_{50} eksperimen sebagai variabel terikat dan deskriptor sebagai variabel bebas. Dari hasil analisis perhitungan MLR didapatkan nilai $R^2 = 0,840$, maka dapat dinyatakan bahwa pengaruh deskriptor terhadap Log IC_{50} eksperimen sebesar 84%.

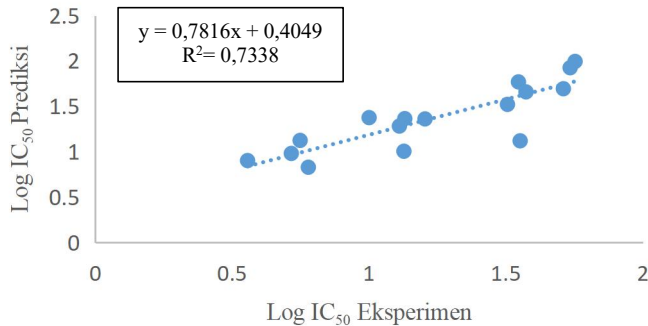
Berdasarkan dari literatur (Siswandono, 1995) apabila nilai R^2 semakin mendekati 1 maka hubungan antara aktivitas dengan deskriptor semakin baik. Persamaan HKSA yang baik adalah apabila memiliki jumlah deskriptor yang sedikit 5-6 deskriptor maka Selanjutnya dari sebanyak 9 deskriptor dilakukan kombinasi secara manual terpilih untuk membangun kembali persamaan HKSA. Dan 12 kombinasi deskriptor yang memenuhi persyaratan. Selanjutnya setelah dikombinasikan menjadi 6 deskriptor yaitu Log P , HOMO, HF, E_{thermal} dan S_{entropi}

Persamaan HKSA :

$$\text{Log IC}_{50} \text{ Prediksi} = 7,329 + (0,768 \times \text{Log P}) + (19,423 \times \text{HOMO}) + (-1,57\text{E-}05 \times \text{HF}) + (-0,001 \times E_{\text{thermal}}) + (-0,049 \times S_{\text{entropi}}).$$

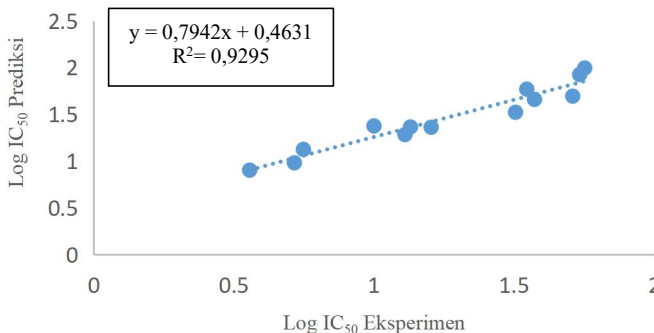
Kemudian dibuat plot antara Log IC_{50} eksperimen dengan Log IC_{50} prediksi, dimana nilai IC_{50} prediksi dihitung menggunakan persamaan regresi yang melibatkan 6 deskriptor terpilih (Lampiran 3). Selanjutnya dilakukan pencilaan atau penghilangan data yang paling jauh menyimpang dari garis linearnya sehingga nilai R menjadi $\geq 0,90$ hingga mendekati 1.

dimana pencilan ini berdasarkan dari analisis statistika dengan melihat *casewise diagnostic* yaitu data mana yang harus dilakukan pencilan. Pada analisis *casewise diagnostic* data yang dilakukan pencilan adalah data Tk4, Tk6, dan Tk8 sehingga data tersebut yang dilakukan pencilan.



Gambar VI.1 Hubungan antara Log IC₅₀ prediksi dan Log IC₅₀ eksperimen sebelum penghilangan data yang menyimpang

Senyawa yang dihilangkan yaitu pada senyawa Tk4, Tk6, dan Tk8. Setelah dilakukan pencilan data maka nilai R^2 mengalami kenaikan yaitu yang awalnya dari $R^2 = 0,7338$ menjadi $R^2 = 0,9295$. Hal ini dinyatakan bahwa pada senyawa yang dihilangkan tersebut tidak memberikan korelasi yang baik sehingga harus dilakukan penghilangan data dengan menggunakan analisa statistik yaitu *casewise diagnostic*.



Gambar VI.2 Hubungan antara Log IC₅₀ prediksi dan Log IC₅₀ eksperimen setelah penghilangan data yang menyimpang

Setelah dilakukan pencilaan data yang menyimpang sehingga terdapat 13 senyawa mana tahapan selanjutnya adalah melakukan regresi kembali untuk mendapatkan persamaan HKSA terbaik.

Persamaan HKSA Terbaik :

$$\text{Log IC}_{50} \text{ Prediksi} = 7,329 + (0,768 \times \text{Log P}) + (19,423 \times \text{HOMO}) + (-1,57\text{E-}05 \times \text{HF}) + (-0,001 \times E_{\text{thermal}}) + (-0,049 \times S_{\text{entropi}}).$$

Dimana persamaan HKSA diatas dapat memenuhi persyaratan, sehingga nantinya dapat dilakukan validasi persamaan HKSA yaitu Fhitung/Ftabel dan nilai q^2 . Nilai q^2 ini merupakan parameter yang menunjukkan kinerja stabilitas model yang diperoleh. Nilai q^2 ini ditentukan dengan metode *Leave One Out* (LOO). Prinsip dari metode LOO ini adalah pencarian nilai koefisien untuk setiap deskriptor dengan cara menghilangkan setiap data senyawa pada persamaan regresi linear, syarat dari nilai q^2 yaitu $\geq 0,5$ (Tropsha, 2010). Pada nilai q^2 menunjukkan nilai kualitas dan juga kebaikan model persamaan yang terbentuk dari analisis regresi linear serta

merupakan tahapan yang menunjukkan kinerja dan stabilitas model yang diperoleh.

VI.5 Validasi Persamaan HKSA

Persamaan HKSA yang telah diperoleh digunakan untuk memvalidasi dari senyawa turunan timokuinon. Validasi dilakukan dengan uji F_{hitung}/F_{tabel} dimana untuk mengetahui pengaruh-pengaruh deskriptor secara bersamaan terhadap aktivitas inhibisi. Sedangkan validasi LOO untuk menilai kualitas dan kebaikan dari model persamaan yang telah terbentuk dari analisis regresi linear.

Tabel VI. 6 menunjukkan nilai validasi persamaan HKSA dengan perhitungan F_{hitung}/F_{tabel} dan q^2 .

Tabel VI.7 Validasi Persamaan HKSA

Keterangan	Hasil
Persamaan HKSA Terpilih	Log IC ₅₀ Prediksi = $7,329 + (0,768 \times \text{Log P}) + (19,423 \times \text{HOMO}) + (-1,57\text{E-}05 \times \text{HF}) + (-0,001 \times \text{E}_{\text{thermal}}) + (-0,049 \times \text{S}_{\text{entropi}})$.
R	0,979
R ²	0,929
F _{tabel}	3,971
F _{hitung}	11,030
F_{hitung}/F_{tabel}	2,777
q ²	0,949

Dimana yang terpilih pada suatu persamaan HKSA yang memiliki probabilitas paling baik dan signifikan adalah Log IC₅₀ Prediksi = $7,329 + (0,768 \times \text{Log P}) + (19,423 \times \text{HOMO}) + (-1,57\text{E-}05 \times \text{HF}) + (-0,001 \times \text{E}_{\text{thermal}}) + (-0,049 \times \text{S}_{\text{entropi}})$. Dengan nilai $F_{hitung} = 11,030$ dan $F_{hitung}/F_{tabel} = 3,971523151$, serta validasi silang LOO persamaan HKSA indi didapatkan koefisien validasi silang $q^2 = 0,949$. (Lampiran 2).

dan ini dapat dinyatakan telah memenuhi persyaratan validasi dengan standar nilai $F_{hitung}/F_{tabel} \geq 1$ dan nilai $q^2 = \geq 0,5$ yang menunjukkan bahwa persamaan HKSA diatas dapat digunakan dalam memprediksi aktivitas biologi (Log IC₅₀) karena berdasarkan dari kualitas model yang baik (Tropsha, 2010).

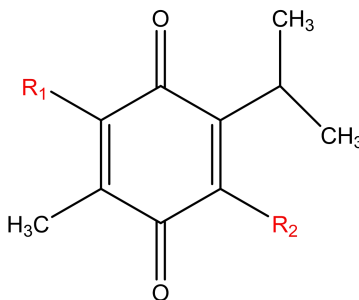
VI.6 Desain senyawa baru

Pada proses desain senyawa baru dapat dilakukan dengan cara penambahan substituen pada rantai samping dari suatu struktur senyawa sehingga diharapkan akan mampu menghasilkan suatu senyawa baru yang memiliki aktivitas biologi yang lebih efektif dibandingkan dengan struktur senyawa sebelumnya. Diketahui bahwa aktivitas yang lebih baik, apabila diperoleh nilai Log IC₅₀ yaitu dengan nilai yang kecil. Didalam desain senyawa baru ini dilakukan metode substitusi dengan penambahan substituen, dimana substituen yang dipilih adalah berdasarkan dari metode skema Topliss.

Modifikasi struktur model pendekatan Topliss adalah dengan cara memasukkan gugus-gugus yang mempunyai sifat lipofilik, elektronik dan sterik tertentu, pada posisi yang tertentu struktur senyawa penuntun, dengan ramalan akan menghasilkan senyawa yang memberikan aktivitas lebih tinggi, sama atau lebih rendah dibanding dengan aktivitas senyawa penuntun dan kemudian dicari jalur sintesis yang paling menguntungkan. Modifikasi struktur model pendekatan Topliss dikelompokkan menjadi dua, yaitu modifikasi struktur pada cincin aromatik dan pada rantai samping gugus alkil. Pada modifikasi struktur cincin aromatik yang diperhatikan adalah sifat lipofilik, (+) π atau (-) π dan elektronik,

(+)σ atau (-)σ, dari substituen-substituen yang dimasukkan dalam struktur penuntun dan pengaruhnya terhadap aktivitas biologis (Siswandono, 2008).

Pada desain senyawa baru dari penelitian kali ini menggunakan modifikasi struktur pada cincin aromatik karena pada struktur senyawa timokuinon bersifat aromatik. Digunakan macam-macam substituen 3-Cl, 3-CH₃, 3-NO₂, 3-N(CH₃)₂, 3-OCH₃, 3-F, 3-CF₃, 3-NH₂, 3-CN, 3-COCH₃, 6-SO₂CH₃, 3-OH. Senyawa yang dipilih untuk mendesain senyawa baru yaitu salah satu dari seri senyawa analog turunan timokuinon dengan pertimbangan utama yaitu turunan senyawa timokuinon yang memiliki nilai Log IC₅₀ prediksi yang paling kecil. Senyawa Tk8 dipilih sebagai senyawa induk dengan nilai Log IC₅₀ Prediksi sebesar 2×10^{-3} .



Gambar VI.3 Struktur senyawa induk (Tk) dan posisi substitusi. Pada senyawa induk, penambahan substitusi dapat dilakukan pada cincin benzen pada posisi R₁ dan R₂, pemilihan tempat substitusi berdasarkan dari hasil penelitian mengenai hubungan struktur dengan aktivitas biologi, dimana penambahan substituen pendonor atau penarik elektron pada posisi tersebut memiliki pengaruh yang sangat signifikan pada aktivitas biologi. Didapatkan 10 desain senyawa baru yang memiliki nilai Log IC₅₀ prediksi yang lebih baik

yaitu pada penambahan 3-Cl, 3-NO₂, 3-N(CH₃)₂, 3-OCH₃, 3-F, 3-CF₃, 3-NH₂, 3-CN, 3-COCH₃, 6-SO₂CH₃, 3-OH Data perhitungan sebelas belas substituen untuk senyawa baru apat dilihat pada (Lampiran 3). Modifikasi antara stuktur senyawa baru yang telah dilakukan dengan penambahan substituen tertentu berdasarkan dari persamaan HKSA terbaik yang terdiri dari Log P, HOMO, HF, E_{thermal} dan S_{entropi}. Dari sepuluh senyawa baru tersebut dapat dilihat bahwa senyawa baru tersebut memiliki nilai Log IC₅₀ lebih kecil dibandingkan dengan senyawa induk yaitu senyawa Tkd2, Tkd5, Tkd8, dan Tkd9 sehingga semua senyawa baru tersebut dapat diprediksi memiliki kemampuan dapat menghambat sel kanker ovarium lebih baik dan efisien.

VI.7 Simulasi *docking*

Sepuluh senyawa baru yang kemungkinan memiliki aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa induk, kemudian selanjutnya dapat diperkirakan interaksi dari senyawa dengan reseptor melalui cara *docking* dengan software *Autodock Tools 1.5.6*. Tujuan dilakukannya *docking* adalah untuk memprediksi orientasi ikatan dari suatu molekul kecil (ligan) kandidat obat terhadap protein reseptor target, sehingga dapat diperkirakan afinitas dan aktivitas ligan terkait (Mukesh *et al.*, 2011). Ligan uji yang digunakan adalah sepuluh senyawa baru dan juga senyawa induk sebagai standar. Sedangkan target reseptor adalah yaitu dengan kode PDB ID 6IAR Ligan dan protein target yang digunakan dapat dilihat pada (Lampiran 6). Pada umumnya struktur protein pada PDB mengandung molekul pelarut yaitu air dan residu lainnya, sehingga

nantinya perlu dilakukan penghilangan molekul air sehingga nantinya tidak mengganggu pada proses simulasi docking dilakukan dan juga untuk memastikan bahwa benar-benar berinteraksi antara ligan dengan target reseptor.

Selain itu perlu menambahkan hidrogen pada protein, karena protein dipreparasi secara eksperimental melalui *ray diffraction*. Pada kristalografi sinar-X, atom hidrogen tidak dapat terlihat dalam penelitian. Oleh karena itu pada sebagian besar pada file PDB hasil kristalografi sinar-X dengan resolusi yang kurang baik, atom hidrogen juga tidak ada pada struktur, sehingga pada simulasi *docking* perlu dilakukan penambahan hidrogen sehingga nantinya dapat mengoptimalkan posisi hidrogen dari struktur yang dihasilkan dan nanti akan mampu melakukan konformasi gugus secara sinergis dari atom-atom (Kerzmann, 2006).

Tabel VI.8 Karakteristik Target *Docking*

Karakteristik	Keterangan
PDB ID 6IAR	Kelas Baru Trisiklik Indazol sebagai Antagonis Perusak Reseptor Estrogen Selektif
Ligan Alami	Trisiklik Indazol
Klasifikasi	Protein pengikat DNA
Organisme	<i>Homo sapiens</i>
Resolusi	1,84 Å

Sumber <https://www.rcsb.org/structure/6IAR>

VI.7.1 Validasi *docking*

Validasi *docking* dilakukan dengan cara re-docking antara ligan alami dengan target untuk melihat validitas parameter yang akan digunakan nantinya untuk proses *docking* senyawa uji. Ligan alami yang digunakan untuk validasi *docking* adalah Trisiklik Indazol. Pada proses validasi *docking* ini berdasarkan dari parameter yaitu dilihat dari nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD). RMSD menjelaskan mengenai nilai jarak atom pada satu konformasi dengan atom terdekat yang memiliki tipe sama dengan atom tersebut pada konformasi lain. Semakin kecil nilai RMSD menunjukkan bahwa posisi ligan yang diperkirakan semakin baik karena semakin mendekati konformasi asal (Lestari, 2015).

Nilai $\text{RMSD} < 2 \text{ \AA}$ menunjukkan bahwa semakin kecil kesalahan dari perhitungan, sehingga dapat dikatakan lebih akurat perhitungannya. Namun jika nilai $\text{RMSD} > 2 \text{ \AA}$ menunjukkan bahwa penyimpangan dari hasil perhitungan lebih besar (Ferwadi, dkk. 2017) sehingga hasil interaksi ligan dan reseptor secara *in silico* tidak dapat digunakan sebagai acuan. Dilain pihak, *binding affinity* merupakan ukuran kemampuan obat untuk berikatan dengan reseptor. Semakin kecil nilai *binding affinity*, maka afinitas antar reseptor dengan ligan semakin tinggi dan sebaliknya jika semakin besar nilai *binding affinity* maka afinitas antar reseptor semakin rendah (Saputri, dkk., 2016). yang dimaksudkan parameter *docking* yang digunakan telah valid atau sesuai sehingga dapat digunakan pada proses selanjutnya yaitu docking pada senyawa uji.

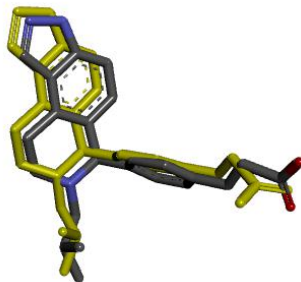
Pada validasi *docking*, parameter-parameter yang digunakan yaitu pengaturan pada *Grid box*. *Grid box* adalah pengaturan yang bertujuan agar mengarahkan ligan senyawa untuk berinteraksi pada

daerah di dalam reseptor (Ruswanto, 2015). dimana pada gridbox minimal dengan ukuran X-point: 40, Y-point: 40 dan Z-point: 40. Pada validasi ligan telah didapatkan ukuran volume gridbox yang telah disesuaikan yaitu X-point: 58 ; Y-point: 54 ; Z-point: 48 dimana ukuran pada ligan alami secara visualisasi, sehingga ukuran volume pada *grid box* tidak boleh melebihi senyawa ligan alami dan juga tidak boleh terlalu kecil, sehingga dapat disesuaikan dengan besarnya struktur ligan alami. Sedangkan grid central pada ligan alami yang dihasilkan adalah X-center: 54,700 ; Y-center: -4,598 ; Z-center: 74,208. Apabila ukuran volume terlalu kecil atau terlalu besar, maka nantinya dapat mempengaruhi nilai RMSD. Hasil *spacing* pada ligan alami yaitu sebesar 0,375 Å.

Metode algoritma yang digunakan adalah Lamarckian Genetic Algorithm (LGA). Algoritma tersebut adalah merupakan penggabungan antara algoritma *Local Search* dan *Genetic Algorithm*. Nilai energi hasil *docking* nantinya dipengaruhi oleh *search run*, yang merupakan pengulangan yang dilakukan pada proses *docking* (Syahputra, 2014). Pada penelitian ini dilakukan pencarian konformasi sebanyak 100 dalam satu kali analisis *docking*. Sehingga nantinya akan dihasilkan 100 konformasi pada ligan. Pada hasil *re-docking*, didapatkan nilai $\text{RMSD} \leq 2 \text{ \AA}$ yaitu 0,812 Å (Tabel VI.8).

Hal ini menunjukkan bahwa pada simulasi *docking* yang digunakan telah valid dan pada pengaturan parameter *docking* yang digunakan telah memenuhi kriteria validitas pada metode *docking*, sehingga pada parameter ini dapat digunakan pada tahap selanjutnya yaitu dilakukan proses *docking* pada senyawa uji.

Pada validasi docking juga melihat overlay pada ligan alami dimana Pada tabel VI.9 menunjukkan hasil validasi *re-docking* dengan nilai energi bebas ikatan (ΔG) ≤ 0 yang menunjukkan bahwa terjadi interaksi antara ligan alami dengan reseptor dengan nilai sebesar -11,07 kkal/mol dan nilai konstanta inhibisi sebesar 7,68 nM. Validasi *re-docking* dilakukan pada posisi ligan yang memiliki afinitas terbaik dengan nilai RMSD sebesar 0,812 Å. Walaupun memberikan konformasi yang sedikit berbeda, akan tetapi baik ligan alami maupun hasil *re-docking* memiliki interaksi yang sama dengan reseptor, yaitu terbentuknya jenis ikatan hidrogen pada residu yaitu bersifat pendonor dan akseptor.



Gambar VI.4 Overlay posisi ligan hasil *re-docking* dengan hasil kristalografi (Abu : hasil kristalografi ; Kuning : hasil *re-docking*).

Pada ligan alami sebelum dilakukannya validasi menunjukkan adanya 1 interaksi ikatan hidrogen yaitu glutamin 353: atom OE2 sebagai pendonor dan A:H8W601 atom N16 berperan sebagai akseptor dengan jarak 2,8 Å. Pada hasil *re-docking* adanya 2 interaksi ikatan hidrogen yaitu pada ikatan hidrogen pertama sebagai pendonor adalah Arginin394: atom HH12 dan sebagai akseptor adalah H8W601: atom N15 dengan jarak 2,3 Å. Sedangkan

pada ikatan hidrogen kedua sebagai pendonor adalah H8W601:atom N16 dan sebagai akseptor adalah Glutamin353: atom OE2 dengan jarak sebesar 2,6 Å. Dimana hal ini menyatakan bahwa pada validasi *docking* sebelum dilakukannya proses *re-docking* hanya terjadi interaksi 1 ikatan hidrogen, kemudian setelah dilakukannya validasi *re-docking* terjadinya 2 interaksi hidrogen pada ligan alami. Sehingga selanjutnya dapat dilakukan proses *docking* pada senyawa uji menggunakan paramater *re-docking* yang telah tervalidasi dengan baik.

Tabel VI.9 Interaksi Asam Amino dengan Ligan Alami.

Ligan Alami	Jenis ikatan	Interaksi	Interaksi	Jarak (Å)
6IAR-H8W601 (Struktur Kristal)	Hidrogen	Donor : N16 (H8W601)	Akseptor : OE2 (GLU353) A:H8W601	2,8
		A:PHE404	A:H8W601	4,9
	Hidrofobik π - π bentuk T	A:LEU391	A:MET421	4,0
		A:H8W601:C3		4,3
	Hidrofobik π -alkil		A:LEU387	
			A:LEU387	4,9
		A:H8W601	A:LEU391	4,4
		A:H8W601	A:ALA350	4,3
		A:H8W601		3,9
		A:H8W601		
6IAR-H8W601 (Hasil <i>Re-docking</i>) ΔG : -11,07 Kkal/mol Ki : 7,68 nM	Hidrogen	Donor : HH12 (ARG394)	Akseptor : N15 (H8W601)	2,3
		N16 (H8W601)	OE2 (GLU353)	2,6
	Hidropobik π - π bentuk T	A:LEU346:C, O;THR347:N	A:H8W601	4,4
	Hidropobik π -amida	A:H8W601	A:ALA350	4,6
		A:H8W601	A:LEU387	4,9
	Hidropobik π -alkil	A:H8W601	A:LEU387	4,2
		A:H8W601	A:LEU391	4,7
		A:H8W601	A:ALA350	4,0
		A:H8W601	A:LEU525	4,9

VI.7.2 *Docking* senyawa uji

Docking molekular pada ligan uji dilakukan dengan cara yang sama dengan proses validasi menggunakan ukuran dan posisi *grid box* yang sama. Parameter yang diamati untuk penentuan afinitas ligan terhadap reseptor adalah energi bebas ikatan (ΔG), konstanta inhibisi prediksi (K_i), residu asam amino, serta jumlah ikatan hidrogen, yang ditunjukkan pada (Tabel VI.10). Pada *docking* senyawa uji, digunakan algoritma parameter *docking* yang telah tervalidasi yang bertujuan untuk mengarahkan agar ligan senyawa baru dapat berinteraksi pada daerah yang sama dengan ligan alaminya didalam reseptor. Simulasi *docking* senyawa uji dilakukan untuk mengetahui konformasi interaksi senyawa uji pada sisi aktif reseptornya dan nantinya dapat dilihat ligan senyawa uji mana yang lebih memiliki afinitas terbaik terhadap reseptor.

Hasil *docking* yang akan diperoleh adalah energi bebas ikatan (ΔG) dan konstanta inhibisi (K_i) serta dapat diprediksi ikatan kimia antara senyawa baru dengan reseptor yang meliputi interaksi ikatan hidrogen dan interaksi hidropobik. Analisis hasil *docking* yang pertama meliputi analisis energi bebas ikatan (ΔG) dan konstanta inhibisi (K_i) yang berkaitan dengan afinitas pengikatan. Afinitas pengikatan adalah merupakan ukuran suatu kemampuan obat untuk berikatan dengan reseptor (Ruswanto dkk., 2015).

Hasil dapat dilihat pada Tabel VI.10 Analisis bebas ikatan dilakukan untuk mengetahui spontanitas suatu reaksi dan kestabilan interaksi ligan dengan reseptor. Semakin negatif nilai ΔG menunjukkan tingkat kestabilan yang baik antara reseptor dan ligan sehingga afinitas ikatan yang terbentuk semakin kuat (Syahputra dkk, 2014). Dan 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 dengan reseptor. Semakin kecil nilai K_i maka akan semakin tinggi afinitas ligan terhadap reseptor, sehingga diprediksikan ligan tersebut menghasilkan aktivitas biologi yang lebih baik (Kim & Skolnick, 2007).

Tabel VI.10 Nilai Energi Bebas Ikatan (ΔG) dan Konstanta Inhibisi (K_i)

No Senyawa	IC50 (μM)	ΔG (kkal/mol)	Konstanta Inhibisi (μM)
Tkd1	3×10^{-3}	-6,43	19,22
Tkd2	7×10^{-4}	-7,02	7,20
Tkd3	1×10^{-2}	-6,43	19,26
Tkd4	2×10^{-3}	-6,69	12,45
Tkd5	9×10^{-4}	-6,50	17,15
Tkd6	3×10^{-3}	-6,68	12,70
Tkd7	1×10^{-2}	-6,15	31,08
Tkd8	3×10^{-4}	-7,30	4,45
Tkd9	3×10^{-4}	-6,77	10,85
Tkd10	2×10^{-3}	-6,61	14,34

Hasil docking ligan uji senyawa baru yang dapat dilihat pada Tabel VI.10 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 pada kedua ligan. Diantaranya Tkd2 dan nomor Tkd8 adalah yang memiliki nilai ΔG dan K_i yang paling rendah, yaitu pada senyawa Tkd2 ΔG sebesar -7.02 kkal/mol dan K_i sebesar

7.20 μM sedangkan pada senyawa Tkd8 ΔG sebesar -7.30 kkal/mol sedangkan K_i sebesar 4.45 μM . Hal ini menunjukkan bahwa ligan uji tersebut diprediksikan memiliki afinitas yang lebih baik terhadap sisi aktif reseptor. Hasil *docking* senyawa uji Dapat dilihat pada Lampiran 4.

VI.7.3 Interaksi ikatan senyawa uji

Menganalisis suatu interaksi senyawa dilakukan setelah menganalisis afinitas suatu ligan senyawa baru terhadap reseptor, dimana pada hal ini menganalisis interaksi ligan uji terhadap reseptor pada sisi pengikatan. Pada sisi pengikatan protein yaitu merupakan area dari pengikatan protein terhadap ligan yang mempengaruhi konformasi maupun fungsi dari protein. Dimana area tersebut melibatkan residu-residu asam amino yang berperan penting pada pengikatan dengan ligan (Pratama dkk., 2016). Interaksi ikatan senyawa biasanya terjadi karena adanya ikatan hidrogen, ikatan hidropobik dan ikatan yang lainnya.

a. Interaksi hidrogen

Pada interaksi ikatan hidrogen dilakukan untuk mengetahui kontribusi afinitas dari suatu ligan terhadap reseptor karena terjadinya interaksi elektrostatis antara atom ligan dengan atom reseptor. Dimana syarat untuk jarak ikatan hidrogen adalah $\leq 3,9 \text{ \AA}$ (Xu Stat, 2016). Menurut konsep yang digunakan oleh IUPAC, terminologi ikatan hidrogen digambarkan sebagai suatu bentuk interaksi elektrostatis antara atom hidrogen yang terikat pada atom elektronegatif dengan atom elektronegatif lainnya. Interaksi elektrostatis tersebut diperkuat oleh kecilnya ukuran atom hidrogen yang memudahkan terjadinya interaksi dipol-dipol yaitu dari antara

atom donor proton (D) dengan atom akseptor proton (A). Ikatan hidrogen ini, yang digambarkan dengan garis putus-putus, dapat terjadi antar molekul maupun intra molekul. Selain itu, kedua atom elektronegatif tersebut biasanya (tetapi tidak harus) berasal dari baris pertama Tabel Periodik Unsur, yaitu nitrogen (N), oksigen (O) atau fluor (F) (Fessenden, 1986).

Hasil interaksi ikatan senyawa uji yang terdapat pada Lampiran 5 menunjukkan bahwa dari 10 senyawa uji, senyawa Tkd2 yang dapat memenuhi syarat jarak ikatan hidrogen, karena pada senyawa Tkd2 memiliki ikatan hidrogen terbanyak yaitu sebanyak 3 ikatan hidrogen dan nilai jarak ikatan hidrogen paling terkecil. Dimana apabila semakin kecil jarak ikatan hidrogen maka interaksi antar ligan dengan target lebih baik. Pada senyawa Tkd2 yaitu 6IAR-2-bromo-6-isopropil-3-metil-5-nitrosikloheksa-2,5-dien-1,4-dion menunjukkan 3 ikatan hidrogen dengan jarak 1,9 Å serta *binding set* yaitu sebesar -7.02 kkal/mol dan konstanta inhibisi sebesar 7.20 µM.

Hal ini menunjukkan bahwa ikatan dan reaksi yang terjadi lebih kuat dan spontan sama halnya dengan ligan alami. Pada senyawa Tkd2 yaitu menghasilkan residu asam amino yaitu terjadi interaksi ikatan hidrogen HH12(ARG394) sebagai pendonor sedangkan Lig-O sebagai akseptor, pada interaksi ikatan hidrogen Lig-O sebagai pendonor sedangkan O(LEU387) sebagai akseptor dan selanjutnya pada interaksi ikatan hidrogen Lig-H sebagai pendonor sedangkan pada OE2(GLU353) berperan sebagai akseptor. Pada interaksi hidrogen ini ikatan yang lebih penting yaitu pada ikatan hidrogen terhadap residu asam amino OE2(GLU353) (Scoot *et al.*, 2019). Karena apabila dibandingkan dengan ligan alami yang juga

memiliki ikatan hidrogen yang sama dengan residu OE2(GLU535). Sehingga kemungkinan dapat dikatakan bahwa Tkd2 ini memiliki interaksi yang hampir mirip dengan ligan alami yaitu dapat menghambat sel kanker ovarium.

Hasil terhadap reseptor estrogen α yang berikatan pada DNA, senyawa Tkd2 memiliki *binding set* dengan energi ikatan yang lebih kecil sehingga akan semakin stabil ikatan antara obat-reseptor. Senyawa Tkd2 memiliki aktivitas sebagai antagonis sama halnya dengan ligan uji yaitu trisiklik indazol, dimana ligan kedua nya sebagai antagonis terhadap reseptor yang sama, hal ini dinyatakan bahwa kemungkinan mekanisme dari senyawa Tkd2 mirip dengan ligan alami, karena pada senyawa Tkd2 berikatan dengan reseptor estrogen α .

Hormon estrogen ini berfungsi dalam tingkat kesuburan dalam proses ovulasi dengan cepat, yang dapat menyebabkan pertumbuhan sel kanker ovarium juga semakin cepat. Sehingga senyawa Tkd2 akan menghambat reseptor estrogen α dan akan mengakibatkan respon estrogen α dalam pembentukan ovulasi menjadi terhambat atau berkurang.

Kemungkinan senyawa Tkd2 sangat berpotensi memiliki aktivitas antagonis terhadap reseptor estrogen α pada DNA yang dapat menghambat pertumbuhan sel kanker ovarium.

b. Interaksi hidrofobik

Interaksi hidrofobik juga berperan dalam menentukan stabilitas ligan terhadap reseptor androgen. Interaksi hidrofobik merupakan interaksi yang bersifat menghindari lingkungan cair dan cenderung berkelompok di sebelah dalam struktur globular dari protein, Pembentukan ikatan hidrofobik meminimalkan interaksi residu

nonpolar dengan air (Lins & Brasseur 1995). Asam amino pada interaksi ikatan hidropobik terdiri dari banyaknya asam amino yang terlibat tetapi Pada Tkd2 asam amino yang terlibat yaitu pada ikatan hidrofobik adalah LEU391, LEU428, MET388, LEU349, LEU387, LEU346, dan LEU349.

Residu yang terlibat pada interaksi hidrofobik merupakan residu dari asam amino yang bersifat nonpolar. Residu asam amino yang bersifat nonpolar (hidrofobik) cenderung membentuk kelompok pada bagian interior protein. Hasil visualisasi dua dimensi (2D) dan tiga dimensi (3D) pada area penambatan ligan dan reseptor hanya dapat menunjukkan ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik sedangkan interaksi elektrostatik belum dapat divisualisasikan dengan *software* yang digunakan. Interaksi elektrostatik juga berperan dalam stabilitas ligan terhadap reseptor. Interaksi elektrostatik merupakan interaksi antara atom yang disebabkan perbedaan kepolarannya (Sharp and Honig 1990).

VI.8 Prediksi toksisitas

Prediksi toksisitas merupakan salah satu isu utama dalam pengembangan obat baru, dengan lebih dari 30% calon obat baru gagal pada saat uji klinis, karena terdapat efek toksik yang tidak terdeteksi (Djalil dkk., 2012).

1. Uji mutagenitas

Mutasi tempat adalah perubahan yang terjadi dalam pasangan nukleotida tunggal tertentu dalam diri molekul DNA. Penyimpangan kromosom mungkin berupa pecahnya kromosom dan penyusunan ulang kromosom (mutasi struktural) atau perubahan jumlah kromosom (Donatus, 2005). Hasil prediksi senyawa uji terhadap 10

senyawa menggunakan perangkat lunak PreADMET *predictor* dapat dilihat pada Tabel VI.11.

Berdasarkan dari hasil penelitian prediksi toksisitas pada uji mutagenitas dengan ASMES Tes dengan perangkat lunak PreADMET secara *online* maka didapatkan hasil bahwa 10 senyawa Timokuinon desain (Tkd) diprediksi bersifat mutagen.

Selain itu, dilakukan juga uji mutagenitas pada TA100_10RLI didapatkan senyawa Tkd3 dan Tkd7 didapatkan hasil yaitu negatif, TA100_NA pada semua senyawa didapatkan hasil negatif, TA1534_10RLI pada semua senyawa didapatkan hasil positif, dan TA1153_NA hanya pada senyawa Tkd4 dan Tkd8 yang bersifat positif.

Tabel VI.11 Prediksi Toksisitas (Prediksi Mutagenitas dengan ASMES Tes).

Senyawa	AMES Tes	TA100_10 RLI	TA100_ NA	TA1535_10 RLI	TA1153_N A
Tkd1	Mutagen	Positif	Negatif	Positif	Negatif
Tkd2	Mutagen	Positif	Negatif	Positif	Negatif
Tkd3	Mutagen	Negatif	Negatif	Positif	Negatif
Tkd4	Mutagen	Positif	Negatif	Positif	Positif
Tkd5	Mutagen	Positif	Negatif	Positif	Negatif
Tkd6	Mutagen	Positif	Negatif	Positif	Negatif
Tkd7	Mutagen	Negatif	Negatif	Positif	Negatif
Tkd8	Mutagen	Positif	Negatif	Positif	Positif
Tkd9	Mutagen	Positif	Negatif	Positif	Negatif
Tkd10	Mutagen	Positif	Negatif	Positif	Negatif

2. Uji karsinogenitas

Istilah karsinogenik ini biasanya didefinisikan sebagai induksi atau peningkatan neoplasia oleh zat-zat kimia. Meskipun secara etimologi arti adalah induksi karsinoma, istilah ini digunakan secara luas untuk pembentukan tumor. Dengan kata lain istilah ini mencakup tidak hanya keganasan epitelial (karsinoma) tetapi juga tumor ganas mesenkim (sarkoma) dan tumor-tumor jinak (Hodgson, 2000). Pada hasil uji karsinogenitas terhadap mencit senyawa Tkd7 dan Tkd8 didapatkan negatif sedangkan uji karsinogenitas terhadap tikus senyawa Tkd2, Tkd3, Tkd5, dan Tkd10 didapatkan hasil negatif. Hasil Prediksi karsinogenitas dilakukan menggunakan perangkat lunak PreADMET *predictor* dapat dilihat pada Tabel VI.12.

3. Toksisitas pada Jantung (Kardiotoksisitas)

Human Ether-a-go-go-Related Gene (HeRG) mengkode kanal kalium yang bertanggung jawab atas repolarisasi normal dari potensi aksi jantung. Senyawa dapat menghambat HeRG telah dikaitkan dengan perpanjangan interval QT dan dapat menyebabkan aritmia jantung yang fatal (Diaz dkk, 2004). Pada hasil resiko inhibisi pada HeRG dari semua senyawa baru memiliki resiko rendah untuk menghambat kanal HeRG. Hasil Prediksi Resiko inhibisi pada HeRG dilakukan menggunakan perangkat lunak PreADMET *predictor* dapat dilihat pada Tabel VI.12.

Tabel VI.12 Prediksi Toksisitas (Prediksi karsinogenitas dan resiko inhibisi pada HeRG)

Senyawa	Terhadap Mencit	Terhadap Tikus	Resiko inhibisi pada HeRG
Tkd1	Positif	Positif	Resiko rendah
Tkd2	Negatif	Negatif	Resiko rendah
Tkd3	Positif	Negatif	Resiko rendah
Tkd4	Positif	Positif	Resiko rendah
Tkd5	Positif	Negatif	Resiko rendah
Tkd6	Positif	Positif	Resiko rendah
Tkd7	Negatif	Positif	Resiko rendah
Tkd8	Negatif	Positif	Resiko rendah
Tkd9	Positif	Positif	Resiko rendah
Tkd10	Positif	Negatif	Resiko rendah