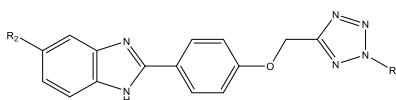


Bab VI Hasil dan Pembahasan

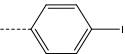
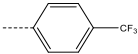
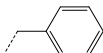
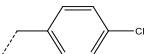
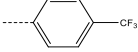
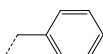
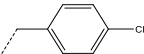
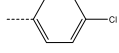
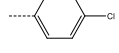
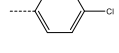
VI.1 Data Set

Data set senyawa turunan adalah senyawa-senyawa turunan benzimidazol yang digunakan harus memiliki kesamaan baik metode pada pengujian (bahan dan cara pengujian), keseragaman aktivitas, dan senyawa yang diuji yaitu senyawa turunan benzimidazol dan dipelajari hubungan struktur dan nilai aktivitasnya.

Tabel VI.2 Nilai IC_{50} senyawa turunan benzimidazol



No	Senyawa	R1	R2	IC_{50} (μ M)
1	9a			53,31
2	9b			80,97
3	9c			0,05
4	9d			0,45
5	9e			0,84
6	9f			9,47
7	10b			8,37

8	10c			0,05
9	10d			0,08
10	10e			85,76
11	10f			6,18
12	10g			4,98
13	11a			49,69
14	11c			0,06
15	11e			0,59
16	11f			0,07
17	11g			9,4
18	12c		H	7,96
19	13c		Cl	2,91
20	19a			27,11
21	19b			3,86
22	20a			33,37

Dipelajari hubungan struktur dan nilai aktivitasnya untuk menentukan sifat fisika dan kimia (deskriptor) yang berkontribusi terhadap aktivitas biologis senyawa tersebut. Aktivitas biologis suatu senyawa diukur dengan IC_{50} . IC_{50} adalah ukuran efektivitas senyawa dalam fungsi biologis atau biokimia yang menghambat. Deskriptor yang digunakan adalah deskriptor-deskriptor dalam analisis Hansch, parameter-parameter diperlakukan sebagai variabel bebas (prediktor) untuk menerangkan harga aktivitas biologis. Model analisis Hansch digunakan karena dinilai lebih berkembang dibanding model Free-Wilson karena lebih sederhana dan konsepnya secara langsung berhubungan dengan prinsip-prinsip kimia fisika organik yang sudah ada dan penggunaan pendekatan model Hansch telah banyak menjelaskan hubungan struktur dan aktivitas suatu turunan obat (Kubinyi, 1993).

VI.2 Optimasi Geometri Senyawa Turunan Benzimidazole

Untuk mendapatkan nilai parameter fisikokimia di perlukan Optimasi geometri dari set senyawa yang ada. Optimasi geometri bertujuan untuk menghitung energi struktur terendah, sehingga diperoleh struktur dengan gaya-gaya atomik dan konformasi struktur molekul tertentu sedemikian rupa yang mendekati struktur yang sebenarnya serta konformasi yang stabil (Syarifudin, 2015).

Perhitungan dilakukan menggunakan *Gaussian09W* dengan menggunakan *Metode Density Functional Theory* (DFT). Metode ini dipilih karena memodelkan sistem molekul dengan akurat dan memberikan data dalam tingkat mikroskopik yang berkorelasi signifikan dengan hasil eksperimen laboratorium. Selain itu

fungsiional yang merupakan 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 dan perkiraan DFT dengan pertukaran energi, semuanya dikombinasikan dalam fungsiional yang meliputi korelasi elektron (Pongajow, 2013). Basis set yang digunakan adalah 6-31G. Notasi 6-31G menandakan di dalam basis set ini terdapat enam fungsi *Gaussian* yang mewakili orbital, tiga fungsi *Gaussian* untuk orbital elektron valensi bagian yang terkontraksi, dan satu untuk bagian yang berdifusi. "G" menunjukkan tipe orbital *Gaussian* yang digunakan (Pamungkas, 2013). Setelah dilakukan optimasi geometri pada masing-masing senyawa turunan benzimidazole maka akan diperoleh nilai-nilai sifat fisikokimia dari masing-masing senyawa tersebut yang selanjutnya nilai-nilai tersebut akan digunakan sebagai deskriptor.

VI.3 Perhitungan Deskriptor

Penentuan deskriptor merupakan langkah pertama yang sangat penting. Kajian HKSA menggunakan deskriptor yaitu untuk menjelaskan struktur dari masing-masing senyawa yang dikaji dan deskriptor tersebut ditentukan berdasarkan sifat dari senyawa turunan benzimidazol. Apabila terdapat hubungan yang kuat antara deskriptor dengan aktivitas biologis maka aktivitas akan dapat diprediksi, tetapi jika hubungannya lemah, maka tidak bisa diprediksi. Deskriptor yang dipilih pada penelitian ini mewakili 3 parameter yaitu parameter hidrofobik, elektronik, dan sterik.

Parameter Hidrofobik

Parameter hidrofobik merupakan hubungan langsung ke kelarutan dalam fasa air, membran permeasi, dan untuk yang kontribusi untuk ligan mengikat pada situs reseptor. Parameter hidrofobik suatu obat dapat dinilai secara eksperimen dengan menguji sebaran distribusi obat didalam campuran n-oktanol/air (Kubinyi, 1993).

Deskriptor yang dipilih untuk parameter hidrofobik yaitu logP dan logS. Nilai logP menggambarkan perbandingan konsentrasi kelarutan senyawa dalam campuran dua fase lemak di banding air yang tak larut pada kesetimbangan. Semakin besar nilai logP senyawa akan cenderung berada pada fase non polar daripada fase polar, yang berarti senyawa tersebut semakin mudah untuk menembus membran biologis sehingga dapat berikatan dengan reseptor, sedangkan bila nilai logP semakin kecil senyawa akan cenderung berada pada fase polar dari pada fase non polar, yang berarti senyawa tersebut hanya larut dalam cairan tubuh saja dan sulit untuk menembus membran biologis sehingga sulit untuk berikatan dengan reseptor (Nindita, 2014). Hal ini sesuai dengan dengan (Dipiro, 2011) bahwa komponen dinding usus yang berupa mukosa sebagian besar terdiri dari lipid yang merupakan hambatan awal senyawa obat mencapai target. Proses awal obat dalam mencapai target ditentukan berdasarkan kemampuan penetrasi atau absorpsi obat pada membran biologi. Sedangkan untuk logS yaitu kebalikan dari logP yang merupakan logaritma kelarutan dalam air, sehingga apabila nilai logS tinggi maka nilai logP rendah.

Tabel VI.3 Nilai Log P dan Log S senyawa turunan benzimidazol

Senyawa	Log P	Log S
9a	4,807	-7,709
9b	4,969	-8,044
9c	5,429	-8,444
9d	5,512	-8,539
9e	5,726	-8,755
9f	4,942	-7,517
10b	5,985	-8,691
10c	6,445	-9,105
10d	6,888	-9,477
10e	6,742	-9,416
10f	6,338	-9,216
10g	6,580	-8,891
11a	4,583	-7,595
11c	5,205	-8,330
11e	5,502	-8,642
11f	4,718	-7,417
11g	5,340	-8,116
12c	5,475	-7,762
13c	6,477	-8,912
19a	4,366	-6,275
19b	3,603	-6,457
20a	4,792	-7,206

Parameter Elektronik

Parameter elektronik dari suatu molekul dapat memberi gambaran dari sifat molekul tersebut, mengingat elektron-elektron pada atom dalam suatu molekul berpengaruh terhadap interaksi antara obat dengan reseptor (Kubinyi, 1993).

Deskriptor yang dipilih untuk parameter elektronik adalah HOMO, LUMO dan Momen Dipol (MD). HOMO adalah orbital tertinggi pada pita valensi yang ditempati elektron. Sedangkan LUMO adalah orbital terendah pada pita konduksi yang ditempati elektron. Penetapan energi HOMO dan LUMO bertujuan untuk menyelidiki reaktivitas suatu molekul senyawa uji terhadap sisi aktif reseptor. Momen dipol didefinisikan sebagai perbedaan elektronegatifitas atom-atom yang menyusun suatu senyawa. Makin besar selisih keelektronegatifan antara dua atom, makin besar pula kepolarannya tetapi molekul tersebut tidak memiliki titik pusat simetri atau distribusi muatannya tidak simetris (Dhuha, 2014). Selain penentuan energi yang dipilih untuk parameter elektronik, besaran termodinamika juga digunakan untuk mewakili parameter elektronik yaitu Entropi, E_{total} , dan E_{Gibbs} . Entropi merupakan sebuah besaran termodinamika yang berfungsi untuk mengukur energi dalam satuan temperatur yang tidak dapat digunakan untuk melakukan usaha. E_{total} merupakan penjumlahan fungsi energi potensial yang berasal dari berbagai macam energi yang membuat suatu molekul berada dalam keadaan bentuk geometri yang paling sederhana dengan sterik yang paling rendah. Energi Gibbs merupakan jumlah maksimum energi yang dibebaskan pada suatu proses yang terjadi pada suhu tetap dan tekanan bebas (Pranowo, 2011).

Tabel VI.4 Penetapan energi HOMO, LUMO dan Momen Dipol (MD) senyawa turunan benzimidazol dengan perangkat lunak

Gaussian09W

Senyawa	HOMO	LUMO	MD
9a	-0,205	-0,075	4,108
9b	-0,206	-0,081	2,460
9c	-0,206	-0,085	2,409
9d	-0,210	-0,058	2,789
9e	-0,208	-0,096	3,126
9f	-0,204	-0,052	5,477
10b	-0,210	-0,054	2,896
10c	-0,210	-0,060	2,804
10d	-0,204	-0,056	2,000
10e	-0,211	-0,074	3,147
10f	-0,206	-0,047	8,955
10g	-0,209	-0,051	4,434
11a	-0,200	-0,049	2,203
11c	-0,201	-0,058	4,300
11e	-0,202	-0,073	5,907
11f	-0,200	-0,044	1,492
11g	-0,200	-0,046	3,434
12c	-0,210	-0,060	2,208
13c	-0,216	-0,068	5,513
19a	-0,212	-0,069	3,173
19b	-0,202	-0,065	2,539
20a	-0,210	-0,058	3,554

Tabel VI.5 Nilai Besaran Termodinamika

Senyawa	Sentropi	Etotal	EGibbs
9a	179,547	-1361,968	0,322
9b	183,874	-1461,179	0,313
9c	187,427	-1821,541	0,310
9d	191,166	-8228,865	0,318
9e	202,030	-1698,925	0,320
9f	189,301	-1401,269	0,348
10b	204,102	-1563,078	0,405
10c	207,122	-1923,441	0,403
10d	213,155	-8346,171	0,397
10e	220,880	-1800,826	0,413
10f	202,767	-1463,861	0,414
10g	216,376	-1962,744	0,429
11a	182,195	-1423,344	0,370
11c	196,256	-1882,918	0,355
11e	209,293	-1760,303	0,365
11f	198,425	-1462,647	0,393
11g	203,642	-1922,222	0,382
12c	165,934	-1656,768	0,289
13c	171,116	-2077,034	0,248
19a	165,758	-1577,959	0,301
19b	154,617	-1537,437	0,254
20a	185,010	-1656,560	0,352

Parameter Sterik

Parameter sterik merupakan sifat meruah gugus-gugus dan efek gugus pada kontak obat dengan sisi reseptor yang berdekatan. Parameter sterik substituent dapat diukur berdasarkan sifat pada gugus-gugus dan efek gugus pada kontak obat dengan sisi reseptor yang berdekatan. Parameter sterik berpengaruh terhadap interaksi obat dengan reseptor atau enzim (Kubinyi, 1993).

Parameter sterik yang di gunakan adalah MR, CSEV, CAA dan Balaban Index dimana parameter sterik yang menyatakan bentuk, ukuran dan bulk senyawa obat. Balaban Indeks menggambarkan kapasitas molar, energi Gibbs bias indeks dan entalpi pada rantai struktur senyawa (Zhoua, 2009). *Molar Refractivity* (MR) merupakan ukuran penyebaran molekul dalam satu mol senyawa. *Connolly Accessible Area* (CAA) merupakan luas permukaan dari ruang-ruang dalam molekul yang dapat diisi pelarut ketika senyawa tersebut kontak dengan pelarut, Senyawa dengan luas permukaan yang besar dapat mendukung faktor kelarutan senyawa ketika kontak dengan pelarut pada proses absorpsi sementara *Connolly Solvent-Excluded Volume* (CSEV) adalah Volume pelarut yang terkandung ketika kontak dengan permukaan molekul (Richmond, 1984).

Tabel VI.6 Data Deskriptor Sterik

Senyawa	MR	CSEV	CAA	Balaban Index
9a	11,994	270,916	659,190	1193665
9b	12,009	276,870	672,865	1395399
9c	12,485	289,531	693,565	1395399
9d	13,395	302,580	715,623	1395399
9e	12,504	301,164	719,086	2155075
9f	12,458	285,501	689,111	1414040
10b	13,496	315,831	750,974	2145850
10c	13,972	327,291	771,895	2145850
10d	14,787	338,727	791,240	2145850
10e	13,991	339,972	796,440	3203068
10f	13,480	310,783	733,314	1845276
10g	14,436	340,927	801,391	2496328
11a	12,991	289,772	697,282	1410234
11c	13,483	307,537	733,077	1633275
11e	13,502	320,201	757,571	2461800
11f	13,455	303,759	728,118	1653060
11g	13,946	321,139	762,581	1908009
12c	11,557	262,417	639,646	8758190
13c	11,584	267,532	642,203	8488810
19a	10,531	252,940	613,419	6642150
19b	10,431	234,549	576,425	4712060
20a	11,771	277,786	673,118	9975560

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

Data Parameter yang didapatkan dari hasil Optimasi geometri kemudian diinput pada *software* IBM SPSS Statistik 25. SPSS digunakan dalam analisis statistik, bertujuan untuk melihat hubungan pengaruh deskriptor terhadap aktivitas dan hubungan antara deskriptor dengan aktivitas adalah linier. Hubungan yang didapat pada umumnya dinyatakan dalam bentuk persamaan matematik yang menyatakan hubungan fungsional antara variabel-variabel. Analisis regresi dengan menggunakan MLR yang bertujuan untuk mengetahui hubungan antara variabel terikat dan variabel bebas. Variabel terikat yang digunakan adalah senyawa turunan benzimidazol (Log IC_{50}) dan variabel bebasnya adalah 12 deskriptor yang mewakili 3 parameter yaitu parameter hidrofobik, elektronik dan sterik.

Sebelum menentukan persamaan HKSA senyawa data set (22 senyawa) dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu training set (18 senyawa) dan test set sebanyak (4 senyawa).

Tabel VI.7 Data Training Set dan Test set.

No	Senyawa	IC₅₀ (μM)
1	9a	53,31
2*	9b	80,97
3*	9c	0,05
4	9d	0,45
5	9e	0,84
6	9f	9,47
7	10b	8,37
8*	10c	0,05
9	10d	0.08
10	10e	85,76
11	10f	6,18
12*	10g	4,98
13	11a	49,69
14	11c	0,06
15	11e	0,59
16	11f	0,07
17	11g	9,34
18	12c	7,96
19	13c	2,91
20	19a	27,11
21	19b	3,86
22	20a	33,37

*Test Set

Selanjutnya dilakukan analisis statistik regresi multi linear dari 18 data training set dan 4 senyawa data test set. Dimana training set berfungsi membangun model persamaan HKSA sedangkan test set berfungsi untuk validasi model yang telah dibangun. Kemudian metode yang digunakan adalah metode *backward* untuk mengetahui dari 12 deskriptor, deskriptor mana saja yang berpengaruh. untuk mendapatkan kombinasi parameter fisikokimia terbaik yang akan di gunakan untuk mendapatkan persamaan HKSA dilakukan seleksi deskriptor. Seleksi awal deskriptor yang sudah dilakukan terdapat 5 model persamaan.

Tabel VI.8 Model *Summary* SPSS

Model	R	R ²	Deskriptor
1	0,827	0,684	LogS, LUMO, MD, HOMO, Etotal, EGibbs, Balaban, LogP, Entropi, MR, CSEV, CAA
2	0,827	0,684	LUMO, MD, HOMO, Etotal, EGibbs, Balaban, LogP, Entropi, MR, CSEV, CAA
3*	0,827	0,683	MD, HOMO, Etotal, EGibbs, Balaban, LogP, Entropi, MR, CSEV, CAA
4	0,825	0,681	MD, HOMO, Etotal, EGibbs, Balaban, Entropi, MR, CSEV, CAA
5	0,800	0,641	MD, HOMO, Etotal, EGibbs, Balaban, Entropi, CSEV, CAA

*Model terpilih

Dari hasil yang didapat dipilih model ke-3 karena memiliki deskriptor paling sedikit yang memiliki 3 parameter Hansch dan memiliki kriteria statistik yang mendekati 1. Nilai R menunjukkan tingkat hubungan antara aktivitas biologis, apabila R semakin mendekati 1 maka diasumsikan bahwa semakin berpengaruh model kombinasi deskriptor tersebut terhadap aktivitas biologis senyawa, nilai R^2 menunjukkan berapa persen aktivitas biologis terhadap parameter sifat fisika-kimia (Arba, 2016).

Kemudian dilakukan kombinasi ulang dari model ke-3 diatas dengan kombinasi manual. Persamaan HKSA yang baik adalah deskriptor dengan jumlah paling sedikit. Kombinasi Deskriptor yang didapat adalah 5 deskriptor yaitu LogP, EGibbs, Balaban Index, *Connolly Accesible Area* (CAA) dan *Conolly Surface Excluded Volume* (CSEV) dengan nilai R sebesar 0,676 dan R^2 sebesar 0,432 merupakan kombinasi yang menghasilkan nilai R dan R^2 yang paling baik.

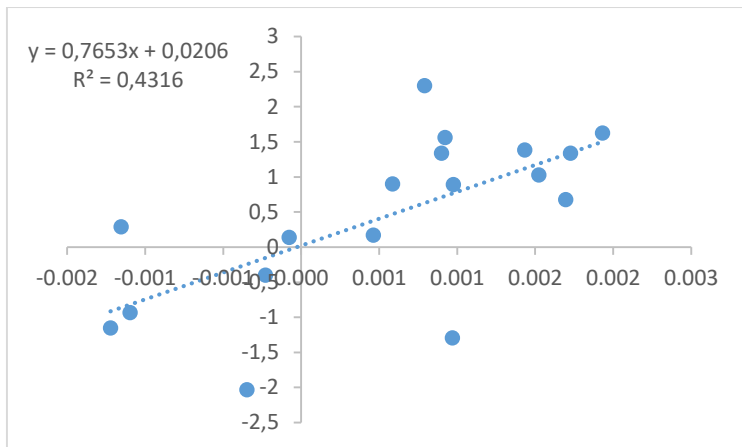
Tabel VI.9 Kombinasi Deskriptor Secara Manual

Kombinasi 5 Deskriptor	Nilai R	Nilai R^2
MR, MD, HOMO, Etotol, LogP	0,626	0,391
Balaban, MD, HOMO, Etotol, LogP	0,629	0,396
CAA, MD, HOMO, Etotol, LogP	0,623	0,388
CSEV, MD, HOMO, Etotol, LogP	0,622	0,387
Entropi, MD, HOMO, LogP, CSEV	0,493	0,243
EGibbs, MD, HOMO, LogP, CSEV	0,641	0,410
*CAA, LogP, EGibbs, Balaban, CSEV	0,676	0,457

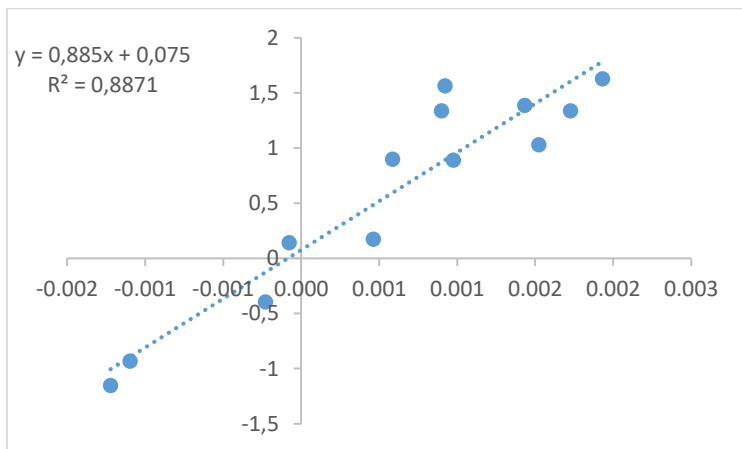
*Kombinasi terpilih

Untuk mendapatkan nilai R dan R^2 yang sesuai, kemudian dilakukan penghapusan senyawa yang memiliki pengaruh yang kecil dan menyimpang dari garis regresi linier dengan bantuan *Microsoft Excel*. Tujuan Penggunaan *Microsoft Excel* adalah Mengumpulkan data dari variabel yang dibutuhkan misalnya X sebagai variabel bebas dan Y sebagai variabel tidak bebas lalu Menggambarkan titik-titik pasangan (x,y) dalam sebuah sistem koordinat bidang yang disebut Scatter Diagram (Diagram Pencar/Tebaran) dimana dapat dibayangkan bentuk kurva halus yang sesuai dengan data. Kegunaan dari diagram pencar adalah membantu menunjukkan apakah terdapat hubungan yang bermanfaat antara dua variabel dan membantu menetapkan tipe persamaan yang menunjukkan hubungan antara kedua variabel tersebut (Wirawan, 2016).

Pembuatan diagram scatter antara Log IC_{50} prediksi dan Log IC_{50} eksperimen melihat data yang paling jauh menyimpang dari garis linearnya dihilangkan hingga nilai R^2 menjadi $\geq 0,80$, Diketahui senyawa nomor 2, 8, 19, 12 dan 13 harus dihilangkan sehingga nilai R^2 menjadi 0,887 dan nilai R menjadi 0,941. Nilai R (koefisien korelasi) menunjukkan tingkat hubungan antara dua data aktifitas biologis pengamatan percobaan dengan data hasil perhitungan berdasarkan persamaan yang diperoleh dari analisis regresi dan nilai R^2 menunjukkan berapa % aktivitas biologis yang didapat diperlukan hubungan dengan parameter sifat fisika kimia yang digunakan (Siswandono, 1995).



Gambar VI.5 Hubungan antara Log IC₅₀ prediksi dan Log IC₅₀ eksperimen sebelum penghapusan senyawa.



Gambar VI.6 Hubungan antara Log IC₅₀ prediksi dan Log IC₅₀ eksperimen setelah penghapusan senyawa.

Setelah dilakukan penghapusan senyawa yang menyimpang selanjutnya adalah melakukan regresi kembali untuk mendapatkan persamaan HKSA terbaik.

Persamaan HKSA terbaik adalah:

$$\text{Log } IC_{50} = 18,955 + (1,133 \times \text{Log}P) + (0,0000002 \times \text{Balaban Index}) + (-0,144 \times \text{CSEV}) + (37,199 \times \text{EGibbs}) + (0,002 \times \text{CAA}).$$

VI.5 Validasi HKSA

Validasi dilakukan dengan validasi uji $F_{\text{Hitung}}/F_{\text{tabel}}$ dan validasi *Leave One Out* (LOO). Validasi nilai $F_{\text{Hitung}}/F_{\text{tabel}}$ dilakukan untuk mengetahui pengaruh deskriptor secara simultan (bersama-sama) terhadap aktivitas inhibisi. Sedangkan validasi LOO untuk menilai kualitas dan kebaikan model persamaan yang terbentuk dari analisis regresi linier. Nilai hasil validasi silang yang didapat adalah 0,532 Nilai semakin baik jika mendekati satu atau persamaan dikatakan dapat diterima jika nilai $\geq 0,5$. Nilai $\geq 0,5$ yang menyatakan bahwa bahwa hipotesis nol (H_0) ditolak, sedangkan hipotesis alternatif (H_A) diterima pada aras 0,05 atau tingkat kepercayaan 95%. Nilai merupakan parameter yang menunjukkan kinerja dan stabilitas model yang diperoleh (Arba, 2016). Data perhitungan Validasi LOO dapat dilihat pada **Lampiran 1**

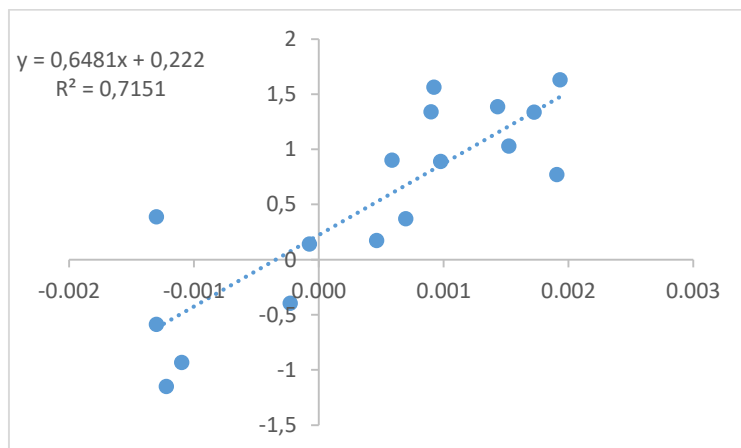
Untuk menghitung nilai F dilakukan analisis statistik dengan semua data yang ada. Nilai F ($F_{\text{Hitung}}/F_{\text{tabel}}$) ≥ 1 , Semakin tinggi nilai F, semakin kecil kemungkinan persamaan yang didapat benar atau bukan merupakan suatu kebetulan (Siswandono dan Soekardjo, 1995).

Nilai F_{hitung} dapat diperoleh dari hasil regresi menggunakan SPSS pada tabel ANOVA dapat diketahui bahwa nilai F_{hitung} adalah 10,829 nilai F_{tabel} dapat dicari menggunakan Excel dengan rumus $=FINV(0,05;df;(n-df-1))$ nilai F_{tabel} yang didapatkan adalah 3,972 Nilai F yang didapatkan merupakan hasil dari F_{hitung}/F_{tabel} nilai yang didapatkan adalah 2,727.

VI.6 Validasi eksternal dengan test set

Selanjutnya dilakukan validasi eksternal menggunakan senyawa *test set* dengan menghitung nilai koefisien korelasi prediksi (R^2_{Pred}) Hasil analisis menunjukan nilai $R^2_{Pred} = 0,7151$ yang mengindikasikan model HKSA yang dibangun valid karena nilai $R^2_{Pred} > 0,60$

(Arba, 2016)



Gambar VI.7 Aktivitas Log IC₅₀ prediksi dengan Log IC₅₀ eksperimen.

Tabel VI.10 Data Nilai parameter statistik yang didapat

Parameter Statistika	Nilai	Syarat	Memenuhi/Tidak Memenuhi
R	0,941	>0,9	memenuhi syarat
R ²	0,887	>0,81	memenuhi syarat
Df	5		
F hitung	10,829		
Ftabel	3,972		
F _{Hitung} /F _{Tabel}	2,727	>1	memenuhi syarat
q ²	0,532	>0,5	memenuhi syarat
Test set	0,715	>0,60	memenuhi syarat

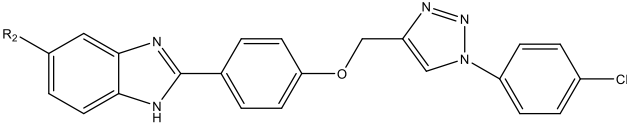
VI.7 Desain Senyawa Baru

Desain senyawa baru dilakukan dengan cara penambahan substituent pada rantai samping senyawa dengan harapan mampu menghasilkan senyawa baru yang memiliki aktivitas yang lebih baik. Dalam desain senyawa baru ini dilakukan metode substitusi dengan penambahan substituent, substituent dipilih dengan menggunakan pendekatan skema topliss untuk substitusi aromatik dan kombinasi dua substituent X dan Y pada posisi yang berbeda-beda (Fadhilah, 2012). Struktur dengan IC₅₀ terendah digunakan sebagai dasar untuk mendesain senyawa baru. Rantai -R pada gugus aromatik dijadikan target sesuai skema topliss.

Dalam desain senyawa baru ini dilakukan dengan penambahan substituent pada -R2. Pemilihan tersebut didasari pada hasil penelitian mengenai hubungan struktur dan aktivitas eksperimen, dimana penambahan gugus pada posisi tersebut memiliki pengaruh yang

cukup signifikan sebagai aktivitas antikanker. Semua desain senyawa baru dioptimasi dengan metode yang sama pada optimasi awal yaitu dengan metode *Density Functional Theory (DFT)* dan basis set 6-31G pada *software Gaussian09W*. Setelah optimasi dihitung nilai masing-masing deskriptor menggunakan persamaan HKSA terbaik yang sudah diperoleh, sehingga diperoleh nilai IC_{50} prediksi untuk masing-masing senyawa. Hasil senyawa baru yang di peroleh yaitu dengan mengganti rantai substituent –R2.

Tabel VI.11 Penambahan Substituent pada rantai samping senyawa turunan benzimidazol



No	Senyawa	R2	IC_{50}
1	B1	Br	0,07
2	B2	CF_3	0,5
3	B2	Cl	0,3
4	B4	NO_2	0,001
5	B5	SO_2CH_3	0,009
6	B6	SO_2NH_2	0,009
7	B7	$CONH_2$	0,02
8	B8	$COCH_3$	0,2
9	B9	$COOH$	0,09
10	B10	OCF_3	0,2
11	Senyawa acuan (10C)		2,4

Desain senyawa baru dengan penambahan substituent diatas didapatkan nilai IC_{50} lebih baik dibandingkan dengan nilai IC_{50} terendah dari senyawa induk benzimidazol.

Struktur desain senyawa baru dan data nilai aktivitas yang didapat dapat dilihat pada ***lampiran 2***.

VI.8 Validasi metode molecular docking

Validasi proses *docking* dilakukan dengan metode *re-docking* menggunakan *Autodocktools 4.2* Validasi metode *re-docking* dilakukan menggunakan perangkat lunak antara ligan alami dengan reseptor target EGFR (Kode PDB ID: 5UG9).

Tabel VI.12 Karakteristik Target Docking

Kode PDB ID	5UG9
Metode	X-RAY DIFFRACTION (XRD)
Resolusi	1,33 Å
Jumlah Rantai	1
Jumlah Residu	329
Komponen	SULFATE ION (SO4), GLYCEROL (GOL), 1,2- ETHANEDIOL (EDO)
Organisme	Homo Sapiens

Selanjutnya dilakukan Pengaturan *Grid Box* yang bertujuan mengarahkan ligan senyawa untuk berinteraksi pada daerah didalam reseptor, dimana pada gridbox minimal dengan ukuran X : 40, Y : 40, Z : 40 (Ruswanto, 2015). *Gridbox* disesuaikan dengan besar atau kecilnya struktur ligan alami. Apabila ukurannya terlalu kecil atau besar maka akan mempengaruhi nilai RMSDnya. *Gridbox* yang digunakan adalah X : 62, Y : 42, Z : 42. Sedangkan *Grid Spacing* adalah 0,375 dengan *Grid Center* X : -13,128; Y : 14,012; Z : -25,571. Metode algoritma yang digunakan adalah Lamarckian Genetic Algoritma (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 pada proses *docking*.

Hasil validasi metode *re-docking* didapatkan nilai yang valid dengan nilai RMSD yang memenuhi syarat yaitu 1,701 Å. Metode *re-docking* dinyatakan valid karena nilai RMSD nya kurang dari 2Å yang menunjukkan bahwa posisi atom-atom pada ligan hasil *redocking* tidak berbeda terlalu jauh dengan posisi pada ligan alami sebelum *re-docking*. Hasil tersebut menunjukkan bahwa reseptor EGFR dapat digunakan untuk proses *docking*. Dari hasil validasi *re-docking* didapatkan juga nilai energi bebas ikatan sebesar -9,11 kkal/mol dan nilai Konstanta inhibisi (Ki) sebesar 208,71 nM (nanoMolar). Menunjukkan Semakin negatif nilai ΔG dan semakin kecil nilai K_i menunjukkan afinitas ligan yang semakin tinggi (Arba, 2016).

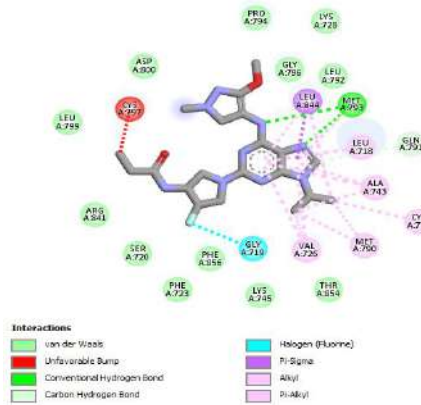
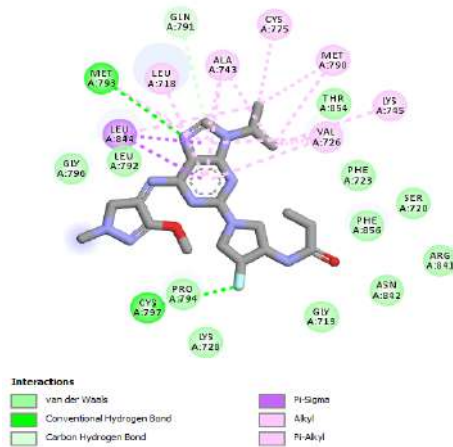
Nilai RMSD hasil *re-docking* dapat dilihat pada **Lampiran 3**



Gambar VI.8 Overlay posisi ligan hasil *re-docking* dengan ligan alami (kuning = Ligan Hasil ; Biru = Ligan Alami)

Dari gambar visualisasi overlay didapatkan konformasi yang tidak jauh berbeda dari ligan alami dan ligan hasil validasi *re-docking*. Dengan demikian metode *re-docking* yang digunakan telah valid sehingga parameter tersebut dapat digunakan untuk melakukan *docking* senyawa uji.

Sebelum dilakukan validasi *re-docking* menunjukkan adanya ikatan hidrogen antara ligan dengan residu asam amino yaitu MET793 dan ikatan hidrofobik yaitu CYS775, MET790, LEU844, dan VAL726. Perbedaannya, interaksi yang terjadi setelah validasi *re-docking* menunjukkan adanya ikatan hidrogen yang lain dengan residu asam amino yaitu MET793 dan CYS797. Berdasarkan penelitian (Inamura, 2010) residu asam amino tersebut dapat menghambat factor pertumbuhan dari sel kanker paru.

Gambar VI.9 Ligan alami sebelum *re-docking*Gambar VI.10 Ligan alami sesudah *re-docking*

Interaksi asam amino ligan alami sebelum dan sesudah *re-docking* dapat dilihat pada **lampiran 4**

VI.9 Molecular Docking Senyawa Uji

Berdasarkan hasil validasi *docking* didapatkan nilai RMSD yaitu $<2\text{\AA}$. 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. Kemudian dilakukan proses docking dengan senyawa uji untuk mengetahui energi bebas ikatan (ΔG) dan konstanta inhibisi (K_i). Analisis bebas (ΔG) 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 sedangkan analisis (K_i) dilakukan untuk menunjukkan kestabilan kompleks yang terbentuk antara ligan dengan reseptor. Selain itu semakin negatif nilai (ΔG) dan semakin kecil nilai (K_i) menunjukkan afinitas ligan yang semakin tinggi (Kim & Skolnick, 2007).

Tabel VI.13 Nilai Energi Bebas Ikatan (ΔG) dan Konstanta Inhibisi (Ki)

No	Senyawa	ΔG (kkal/mol)	ki (nM)
1	Ligan Alami	-9,11	208,71
2	B1	-9,95	50,87
3	B2	-9,48	112,92
4	B2	-9,45	117,35
5	B4	-9,59	93,85
6	B5	-10,68	14,88
7	B6	-10,59	17,19
8	B7	-9,42	124,82
9	B8	-9,61	89,65
10	B9	-11,14	6,87
11	B10	-8,76	379,88

Hasil *docking* ligan uji senyawa baru diatas menunjukkan bahwa keseluruhan ligan uji memiliki nilai energi bebas ikatan ≤ 0 yang menggambarkan bahwa ligan uji memiliki afinitas pada sisi aktif reseptor. Hasil studi interaksi dengan molekul target menunjukan bahwa pada senyawa B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, dan B9 diprediksi memiliki afinitas yang lebih baik dibanding dengan senyawa induk. Hal tersebut menunjukkan bahwa ligan uji tersebut diprediksikan memiliki afinitas yang lebih baik terhadap sisi aktif reseptor.

VI.9.1 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 hidrofobik dan ikatan yang lainnya.

Interaksi Hidrogen

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

Hasil interaksi ikatan senyawa uji menunjukkan bahwa semua senyawa uji yang didapat memenuhi syarat yaitu $\leq 3,9$. Pada senyawa B10 memiliki ikatan hidrogen terbanyak yaitu sebanyak 5 ikatan hidrogen dan nilai jarak ikatan hidrogen pada senyawa B4 didapatkan jarak dengan nilai terkecil. Dimana apabila semakin kecil jarak ikatan hidrogen maka interaksi antar ligan dengan target lebih baik.

Hasil terhadap reseptor EGFR pada DNA, senyawa B9 memiliki *binding set* yang paling kecil dengan energi ikatan -11,14 kkal/mol sehingga semakin stabil ikatan antara obat-reseptor. Kemungkinan senyawa B9 sangat berpotensi memiliki aktivitas inhibisi terhadap enzim tirosin kinase pada DNA yang dapat menghambat pertumbuhan dan pembelahan dari sel kanker paru.

Interaksi asam amino dengan senyawa uji dan Visualisasi senyawa uji dapat dilihat pada **Lampiran 5 dan 6**.