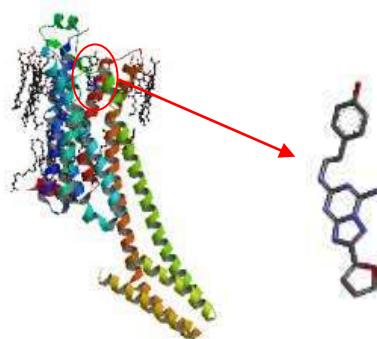


## BAB VI. HASIL DAN PEMBAHASAN

### VI.1. Persiapan Reseptor

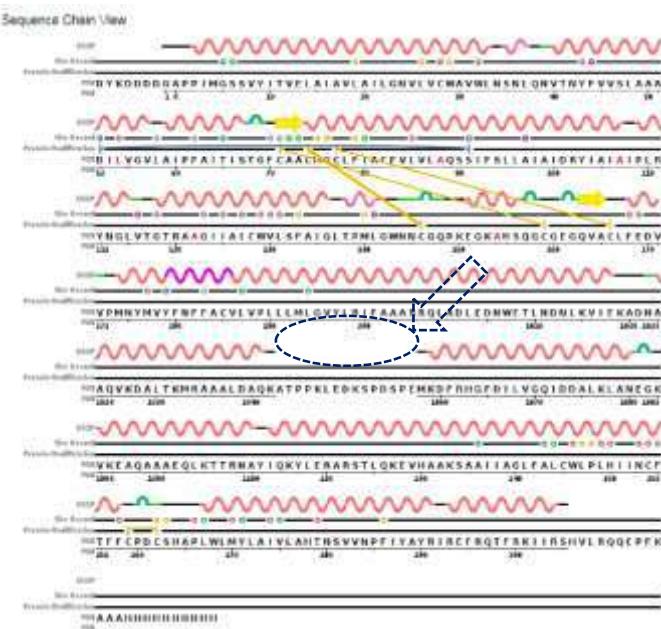
Struktur target yang digunakan yaitu reseptor adenosin A<sub>2A</sub> diunduh dari situs *Protein Data Bank* (PDB) <https://www.rcsb.org/> dengan PDB ID: 5IU4.



Gambar 6.1. Kompleks reseptor adenosin A<sub>2A</sub> (5IU4) dan ligan alami ZM241385 (RCSB PDB, 2020)

Pemilihan reseptor adenosin A<sub>2A</sub> sebagai target dikarenakan reseptor tersebut terlokalisasi dengan reseptor dopamin D<sub>2</sub> pada jalur neuron tidak langsung yang menunjukkan peran patologis pada penyakit Parkinson (Kulisevsky & Poyurovsky, 2012). Kode 5IU4 dipilih berdasarkan metode analisis yang digunakan yaitu difraksi sinar-x (XRD) yang lazim digunakan untuk menentukan struktur dengan resolusi sangat tinggi (tingkat atomik) dalam bentuk padat (kristal) sehingga sering kali lebih dapat dikaitkan langsung dengan kondisi fisiologis dan biologis, memiliki resolusi yang baik (kurang dari 2 Å) yaitu 1,72 Å, bekerja pada organisme *Homo sapiens* dan berikatan dengan ligan 4-{2-[7-amino-2-furan-2-yl[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-5yl]amino}ethyl}phenol (ZMA) yang memiliki interaksi antagonis pada reseptor adenosin A<sub>2A</sub> (Thenawidjaja, 2017; RCSB PDB, 2020).

Dilakukan perbaikan terhadap struktur reseptor adenosin A<sub>2A</sub> dengan PDB ID: 5IU4 dikarenakan terdapat residu asam amino yang hilang ditunjukkan pada Gambar 6.2.



berbasis website PROCHECK <https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/> yang hasilnya dapat dilihat pada Lampiran 3.

Kualitas struktur reseptor yang baik dapat dilihat dari persentase residu asam amino yang ditunjukkan oleh titik-titik dalam plot Ramachandran. Plot Ramachandran terbagi dalam empat *region* yaitu *most favoured regions*, *additional allowed regions*, *generously allowed regions* dan *disallowed regions*. Struktur reseptor yang memiliki lebih dari 90% residu asam amino pada *most favoured regions* dinilai memiliki kualitas yang baik (Laskowski, 1993).

Berdasarkan data dalam Lampiran 3, ditunjukkan bahwa residu asam amino yang terdapat dalam *most favoured regions* sebanyak 94,5%; residu dalam *additional allowed regions* sebanyak 5,5%; residu dalam *generously allowed regions* dan *disallowed regions* sebanyak 0,0%. Dapat disimpulkan bahwa struktur reseptor adenosin A<sub>2A</sub> hasil perbaikan dengan metode pemodelan homolog memilki kualitas yang baik.

## VI.2. Persiapan Ligan

Digunakan senyawa uji yang merupakan hasil penelitian *virtual screening* sebanyak 50 senyawa, digunakan 25 senyawa yang termasuk ke dalam golongan alkaloid quinolone dan imidazole karena memiliki energi bebas ikatan ( $\Delta G$ ) lebih kecil dari ligan alami (Ramadhanty, 2019). Struktur senyawa diunduh dari basis data <http://zinc.docking.org/> dan digambar ulang dalam bentuk 2D dan 3D menggunakan perangkat lunak *ChemOffice v.12.0.2*. Hasil pemodelan struktur 2D dan 3D terlampir pada Lampiran 2.

## VI.3. Optimasi Geometri

Dilakukan optimasi geometri pada senyawa uji menggunakan perangkat lunak *Gaussian09* dan *GaussView v.5.0.8* yang bertujuan untuk menentukan energi terendah dari suatu molekul. Struktur senyawa dengan energi terendah dapat diinterpretasikan sebagai sistem dengan keadaan yang stabil. Metode yang digunakan yaitu *Density Functional Theory* (DFT) yang merupakan metode untuk menghitung energi dari suatu molekul berdasarkan kerapatan elektron dari molekul tersebut dan dapat menghitung dengan tingkat ketelitian yang lebih akurat. Fungsi B3LYP disebut juga fungsi *hybrid* yang merupakan hasil kombinasi dari perkiraan Hartree-Fock dan DFT dengan

pertukaran energi dalam fungsional yang meliputi korelasi elektron. Basis set 6-31G digunakan karena memiliki keakuratan yang tinggi dalam deskripsi orbital kuantum dan dari basis set 6-31G telah ditambahkan fungsi polarisasi ke semua atom (leach, 2001; Pamungkas et al., 2013; Pongajow et al., 2013; Hehre, 2003).

Tabel 6.1. Total energi dan Gibbs senyawa uji hasil optimasi geometri

<b>Kode Ligan</b>	<b>Total Energy (kkal/mol)</b>	<b>Gibbs (kkal/mol)</b>
ZINC12560456	-901024,608	-900734,120
ZINC96116495	-875004,955	-874754,841
ZINC96116529	-875000,495	-874751,125
ZINC10959417	-874997,197	-874747,380
ZINC96114364	-872609,292	-872357,429
ZINC96116483	-850336,701	-850104,928
ZINC96115024	-850337,336	-850103,965
ZINC96116467	-850331,555	-850099,424
ZINC02134977	-848979,433	-848763,443
ZINC20611386	-846836,627	-846652,254
ZINC08994483	-846804,390	-846622,549
ZINC79190030	-835385,211	-835160,927
ZINC85878089	-825671,319	-825454,574
ZINC96116578	-823292,877	-823073,405
ZINC85879939	-823292,100	-823070,067
ZINC98364878	-823286,824	-823069,746
ZINC96116579	-823288,996	-823069,073
ZINC98363864	-766924,748	-766672,628
ZINC00038207	-764140,413	-763981,780
ZINC00848454	-754548,614	-754338,573
ZINC42025246	-732794,155	-732551,991
ZINC08764772	-718833,500	-718608,166
ZINC00044663	-705222,152	-705044,421
ZINC03831405	-650208,654	-649981,381
ZINC12956922	-573749,919	-573587,305

Hasil dari perhitungan optimasi geometri pada Tabel 6.1 menjelaskan bahwa energi tersebut merupakan energi minimum yang diperlukan dari masing-masing senyawa uji dalam memperoleh konformasi yang stabil. Senyawa dengan kode ZINC12560456 menunjukkan total energi dan energi *Gibbs* lebih rendah dari senyawa lain, hal ini menjelaskan bahwa senyawa tersebut membutuhkan energi yang paling rendah dalam mencapai konformasi yang stabil.

Selain total energi dan energi *Gibbs*, interpretasi dilakukan dengan melihat nilai *gap energy*, yaitu selisih antara nilai HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbitals*) dan LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbitals*). *Gap energy* menunjukkan kemudahan suatu sistem molekul dalam mengalami eksitasi menuju keadaan elektronik yang lebih tinggi (Kurniawan et al., 2013).

Tabel 6.2. Energi HOMO, energi LUMO dan *gap energy* senyawa uji

<b>Kode Ligan</b>	<b>HOMO (kkal/mol)</b>	<b>LUMO (kkal/mol)</b>	<b>Gap Energy (kkal/mol)</b>
ZINC12560456	-116,131	-52,804	<b>63,327</b>
ZINC00848454	-115,510	-50,558	64,953
ZINC00044663	-117,970	-51,806	66,164
ZINC79190030	<b>-113,157</b>	-42,400	70,757
ZINC98363864	-116,878	-41,597	75,281
ZINC00038207	-141,075	<b>-57,284</b>	83,790
ZINC96116495	-131,681	-45,519	86,162
ZINC20611386	-137,648	-47,577	90,071
ZINC12956922	-124,791	-34,682	90,109
ZINC10959417	-138,176	-47,320	90,856
ZINC85879939	-135,778	-44,414	91,364
ZINC96116529	-133,789	-41,672	92,117
ZINC85878089	-138,314	-42,783	95,531
ZINC03831405	-128,274	-29,988	98,285
ZINC96116467	-137,686	-38,340	99,346
ZINC96116483	-137,994	-37,738	100,256
ZINC96115024	-134,944	-34,613	100,331
ZINC02134977	-149,514	-42,927	106,587
ZINC96116578	-138,721	-28,915	109,806
ZINC98364878	-142,361	-30,020	112,341
ZINC96114364	-141,482	-27,215	114,268
ZINC08994483	-145,982	-30,942	115,040
ZINC08764772	-129,811	-9,908	119,903
ZINC96116579	-144,538	-24,209	120,329
ZINC42025246	-142,455	-11,050	131,405

Dari Tabel 6.2, menjelaskan bahwa nilai energi HOMO terbesar ditunjukkan oleh senyawa uji dengan kode ZINC79190030 sebesar -113,157 kkal/mol, hal ini diprediksikan bahwa senyawa tersebut memiliki kemampuan lebih besar sebagai donor elektron dibandingkan dengan senyawa uji lainnya. Sedangkan nilai energi LUMO terkecil ditunjukkan oleh senyawa uji dengan kode ZINC00038207 sebesar -57,284 kkal/mol, yang diprediksikan bahwa senyawa tersebut memiliki kemampuan lebih besar

dalam menerima elektron dibandingkan dengan senyawa uji lainnya. Nilai *gap energy* terendah ditunjukkan oleh senyawa uji dengan kode ZINC12560456 sebesar 63,327 kkal/mol, hal ini diprediksikan bahwa senyawa tersebut memiliki tingkat reaktivitas yang tinggi namun memiliki kestabilan yang rendah dibandingkan dengan senyawa uji lainnya. Sedangkan nilai *gap energy* terbesar ditunjukkan oleh senyawa uji dengan kode ZINC42025246 sebesar 131,405 kkal/mol, hal ini diprediksikan bahwa senyawa tersebut memiliki tingkat reaktivitas yang rendah namun memiliki kestabilan yang tinggi dibandingkan dengan senyawa uji lainnya.

#### **VI.4. Penentuan Parameter Sifat Fisikokimia**

Setelah dilakukan optimasi, senyawa uji ditentukan berbagai parameter sifat fisikokimianya menggunakan perangkat lunak *ChemOffice v.12.0.2*. Penentuan parameter fisikokimia meliputi Koefisien Partisi (CLogP), Bobot Molekul (BM), Jumlah Donor dan Akseptor Hidrogen serta *Molar Refractivity* (MR).

Nilai *Calculated Log P* (CLogP) menyatakan koefisien kelarutan suatu molekul dalam lemak atau air yang memiliki rentang -0,4 – 5. Semakin besar nilai ClogP, maka molekul tersebut semakin hidrofobik. Molekul yang terlampau hidrofobik memiliki kecenderungan toksitas tinggi, yang memungkinkan molekul tersebut akan tertahan lebih lama pada *lipid bilayer* dan terdistribusi lebih luas di dalam tubuh sehingga dapat menurunkan selektifitas ikatan terhadap reseptor target. Sebaliknya, apabila nilai ClogP terlalu negatif, maka molekul tersebut tidak mampu melewati membran *lipid bilayer* (Lipinski et al., 2001; Syahputra et al., 2014).

Nilai bobot molekul (BM) berhubungan dengan proses distribusi yang terjadi dengan cara menembus membran biologis melalui proses difusi. Suatu molekul dengan bobot lebih dari 500 g/mol dikatakan memiliki ukuran yang besar sehingga akan sulit untuk menembus membran biologis, sebaliknya molekul dengan bobot kurang dari 500 g/mol akan lebih mudah untuk menembus membran biologis (Lipinski et al., 2001; Ruswanto et al., 2015).

Nilai donor dan akseptor ikatan hidrogen berhubungan dengan aktivitas biologis dari suatu molekul obat. Berdasarkan aturan Lipinski, jumlah donor ikatan hidrogen tidak boleh lebih dari 5 dan jumlah akseptor ikatan hidrogen tidak boleh lebih dari 10. Semakin tinggi kapasitas ikatan hidrogen, maka energi yang dibutuhkan agar proses absorpsi dapat

terjadi semakin tinggi pula (Ruswanto et al., 2015; Lipinski et al., 2001; Syahputra et al., 2014).

*Molar Refractivity* (MR) menyatakan keruahan suatu molekul untuk memenuhi *binding site* dan berinteraksi dengan reseptor. Semakin tinggi nilai MR, maka semakin tinggi keruahan molekul. Akan tetapi, molekul dengan keruahan terlalu tinggi dapat menyebabkan interaksi yang kurang baik. Nilai MR yang baik berkisar antara 40-130 (Lipinski et al., 2001; Narko et al., 2017).

Aturan Lipinski menjelaskan bahwa suatu senyawa yang diprediksikan memiliki absorpsivitas dan permeabilitas yang baik apabila memiliki nilai CLogP kurang dari 5, memiliki bobot molekul kurang dari 500, jumlah donor ikatan hidrogen kurang dari 5 dan jumlah akseptor ikatan hidrogen kurang dari 10 (Lipinski et al., 2001).

Tabel 6.3. Sifat fisikokimia senyawa uji dan ligan alami ZMA

Kode Ligan	CLogP	BM (g/mol)	Jumlah Donor Hbond	Jumlah Akseptor Hbond	MR (cm <sup>3</sup> /mol)
ZINC12560456	<b>6,21</b>	443,22	2	5	127,20
ZINC96116495	3,62	419,19	2	5	117,12
ZINC96116529	3,33	419,19	2	5	116,70
ZINC10959417	4,08	419,19	2	5	116,19
ZINC96114364	2,14	419,20	4	5	115,13
ZINC96116483	3,57	405,17	2	5	111,91
ZINC96115024	2,41	405,17	2	5	112,37
ZINC96116467	2,88	405,17	2	5	112,34
ZINC02134977	3,43	395,15	3	4	103,08
ZINC20611386	1,76	383,11	4	5	96,04
ZINC08994483	1,58	383,11	4	6	96,15
ZINC79190030	3,28	380,18	2	7	95,88
ZINC85878089	2,57	391,15	2	5	107,92
ZINC96116578	0,70	391,16	4	5	105,48
ZINC85879939	1,09	391,16	4	5	105,93
ZINC98364878	0,89	391,16	4	5	106,10
ZINC96116579	0,70	391,16	4	5	105,48
ZINC98363864	1,95	370,20	2	4	101,13
ZINC00038207	1,82	350,09	3	6	92,43
ZINC00848454	4,20	363,16	2	5	104,12
ZINC42025246	1,98	363,20	2	4	105,33
ZINC08764772	2,49	358,18	2	4	104,91
ZINC00044663	3,15	335,13	2	5	94,63
ZINC03831405	2,79	324,18	1	4	94,69
ZINC12956922	3,52	288,14	2	4	89,16
ZMA	0,06	337,13	3	9	89,85

Tabel 6.3, menjelaskan bahwa dari semua parameter fisikokimia berdasarkan aturan Lipinski, hanya senyawa dengan kode ZINC12560456 yang tidak memenuhi, dikarenakan nilai CLogP senyawa tersebut lebih dari 5, yang berarti senyawa tersebut bersifat terlalu hidrofobik dan dikhawatirkan memiliki toksisitas yang tinggi karena memungkinkan tertahan lebih lama pada *lipid bilayer* dan terdistribusi lebih luas di dalam tubuh sehingga selektifitas ikatan terhadap reseptor target menjadi berkurang.

### **VI.5. Validasi Docking**

Validasi *docking* dilakukan dengan menambatkan kembali ligan alami pada reseptor adenosin A<sub>2A</sub> yang telah dipisahkan sebelumnya. Validasi metode *docking* dinyatakan valid apabila nilai dari *Root Mean Square Deviation* (RMSD) < 2 Å (Ferwadi, 2017).

Tabel 6. 4. Parameter *docking* yang digunakan

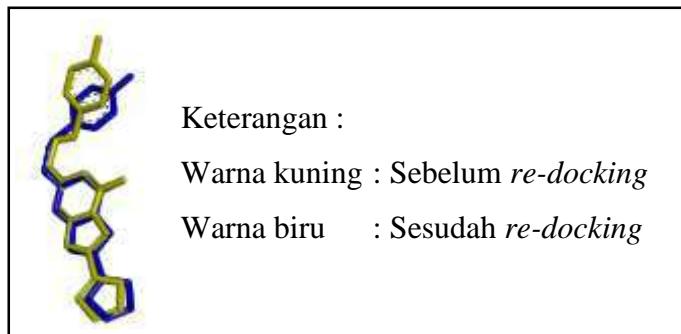
<i>Grid Box</i>	<b>X</b>	<b>Y</b>	<b>Z</b>
	60	40	40
<i>Grid Spacing</i>	0,375 Å		
<i>Grid Center</i>	<b>X center</b>	<b>Y center</b>	<b>Z center</b>
	-12,22	9,198	20,988
<i>Number of GA Runs</i>	100		
<i>Number of Evals</i>	Medium		
Metode Algoritma	<i>Lamarckian Genetic Algorithm</i>		

Pengaturan ukuran *gridbox* bertujuan untuk membatasi ruang pencarian konformasi suatu senyawa pada proses *docking* dan mendapatkan nilai *binding affinity* terbaik dari suatu senyawa terhadap reseptor targetnya, dengan kata lain bahwa senyawa ditambatkan pada posisi *binding site* target. Pengaturan ukuran *gridbox* yang terlalu besar akan menaikkan waktu proses penambatan molekuler dan menurunkan selektifitas penambatan pada sisi aktif reseptor target (Dermawan et al., 2019; Santoso, 2017).

Algoritma yang digunakan yaitu *Lamarckian Genetic Algorithm* (LGA) yang merupakan penggabungan dari algoritma *Local Search* dan *Genetic Algorithm*. LGA dinilai lebih optimal dalam kecepatan dan akurasi dibandingkan dengan algoritma lainnya, terutama dapat meningkatkan kompleksitas ligan dengan banyak ikatan yang dapat dirotasi dengan efisiensi tinggi (Syahputra et al., 2014; Dias & Jr, 2008; Fuhrmann et al., 2010).

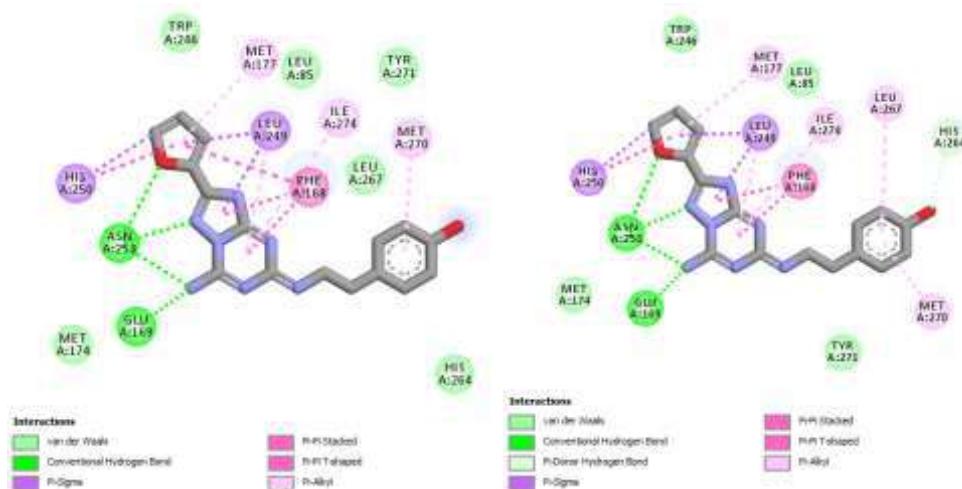
Hasil validasi *docking* antara reseptor adenosin A<sub>2A</sub> dengan PDB ID 5IU4 dan ligan alaminya dengan kode ligan ZMA, diperoleh konformasi terbaik dengan nilai RMSD

yang memenuhi syarat yaitu  $0,94 \text{ \AA}$  pada *run* ke-50, dengan energi bebas Gibbs ( $\Delta G$ ) sebesar -8,90 kkal/mol dan konstanta inhibisi (Ki) sebesar 300,54 nM. Validasi *docking* menggunakan ukuran volume *Grid Box*, *Grid Spacing*, *Grid Center* yang ditunjukkan pada Tabel 6.4. *Number of GA Runs* digunakan sebanyak 100 kali dalam sekali proses *docking*, sehingga dihasilkan 100 konformasi ligan untuk memperoleh energi bebas Gibbs ( $\Delta G$ ) dan konstanta inhibisi (Ki) terbaik. Tabel RMSD hasil *re-docking* ligan alami terlampir pada Lampiran 4. *Number of Evals* yang digunakan ialah *medium*.



Gambar 6.4. Visualisasi overlay antara ligan alami sebelum dan sesudah *re-docking*

Visualisasi hasil *re-docking* dilakukan dengan menampilkan perbandingan konformasi ligan alami sebelum dan sesudah proses *re-docking* dengan konformasi terbaik yang ditunjukkan pada Gambar 6.4. Terlihat bahwa penyimpangan yang terjadi antara konformasi ligan alami sebelum dan sesudah *re-docking* tidak begitu jauh terbukti dengan nilai RMSD terbaik yang diperoleh ialah  $0,94 \text{ \AA}$ .



Gambar 6.5. Visualisasi interaksi ikatan antara reseptor dengan ligan alami sebelum dan sesudah *re-docking*

Interaksi reseptor adenosin A<sub>2A</sub> dengan ligan alami ZMA pada saat sebelum dan sesudah *re-docking* terlihat mirip berdasarkan Gambar 6.5. Terjadi ikatan hidrogen konvensional pada residu GLU169 dan ASN253; interaksi hidrofobik pada residu PHE168, MET177, LEU249, HIS250, MET270 dan ILE274; interaksi van der Waals pada residu LEU85, MET174, TRP246 dan TYR271 pada saat sebelum dan sesudah *re-docking*. Terjadi perbedaan dimana pada saat sebelum *re-docking* residu HIS264 menunjukkan terjadi interaksi van der Waals, sedangkan saat sesudah *re-docking* menunjukkan ikatan  $\pi$ -donor hidrogen dan residu LEU267 sebelum *re-docking* menunjukkan interaksi van der Waals sedangkan sesudah *re-docking* terjadi interaksi hidrofobik. Tabel interaksi reseptor dan ligan alami lebih detail dapat dilihat pada Lampiran 5.

Residu asam amino penting pada reseptor yang berinteraksi dengan ligannya berupa ikatan hidrogen dan interaksi yang umum terjadi seperti interaksi hidrofobik dan elektrostatik, diprediksikan berperan penting di daerah *binding site* pada suatu reseptor. *Binding site* merupakan daerah pengikatan dari suatu reseptor terhadap ligan yang dapat mempengaruhi konformasi maupun fungsi reseptor (Arwansyah et al., 2014).

## **VI.6. Docking Senyawa Uji**

Setelah itu, dilakukan simulasi *docking* dengan menggunakan masing–masing senyawa uji yang telah dioptimasi. Selanjutnya senyawa tersebut di-*docking*-kan terhadap reseptor adenosin A<sub>2A</sub> pada sisi aktifnya sesuai ukuran dan daerah *grid box* yang telah diperoleh dari hasil validasi *docking*.

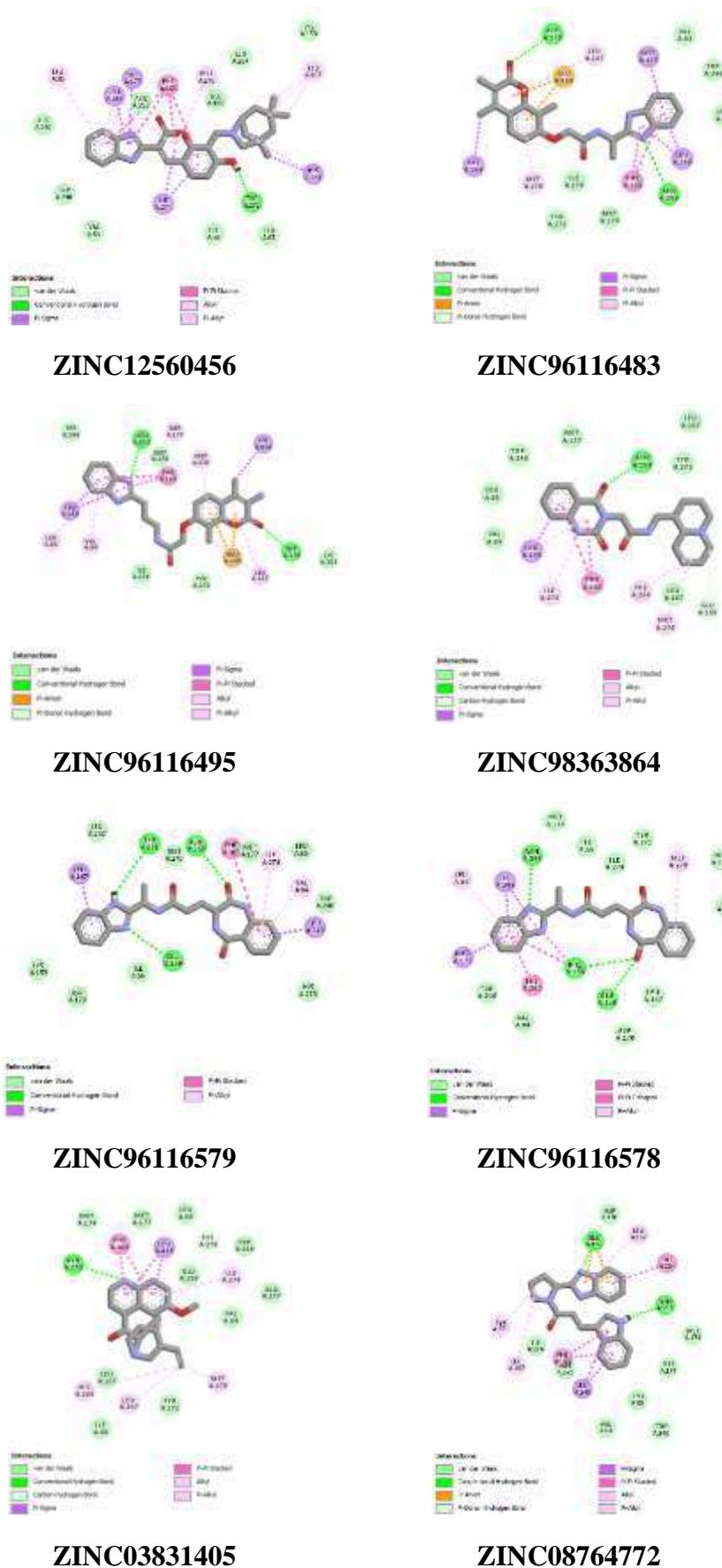
Parameter yang diamati ialah nilai energi bebas ikatan ( $\Delta G$ ), konstanta inhibisi (Ki) dan interaksi residu asam amino untuk menentukan afinitas senyawa uji dengan reseptor. Semakin rendah nilai  $\Delta G$  menunjukkan afinitas suatu ligan uji semakin tinggi yang berarti ikatan antara ligan dan reseptor target semakin stabil. Sedangkan, semakin rendah nilai Ki menunjukkan daya hambat oleh ligan terhadap aktivitas reseptor semakin efektif (Narko et al., 2017).

Dari Tabel 6.5, menjelaskan bahwa terdapat 11 ligan uji yang memiliki nilai  $\Delta G$  dan Ki yang lebih rendah dari ligan alaminya. Hal ini menunjukkan bahwa 11 ligan uji tersebut memiliki ikatan yang lebih stabil dan diprediksikan memiliki daya hambat yang lebih efektif terhadap reseptor target. Ligan uji terbaik ditunjukkan oleh senyawa dengan kode ZINC12560456 dengan nilai  $\Delta G$  sebesar -10,50 kkal/mol dan nilai Ki sebesar 20,18 nM.

Tabel 6.5. Energi bebas ikatan ( $\Delta G$ ) dan konstanta inhibisi (Ki) docking senyawa uji dan ligan alami

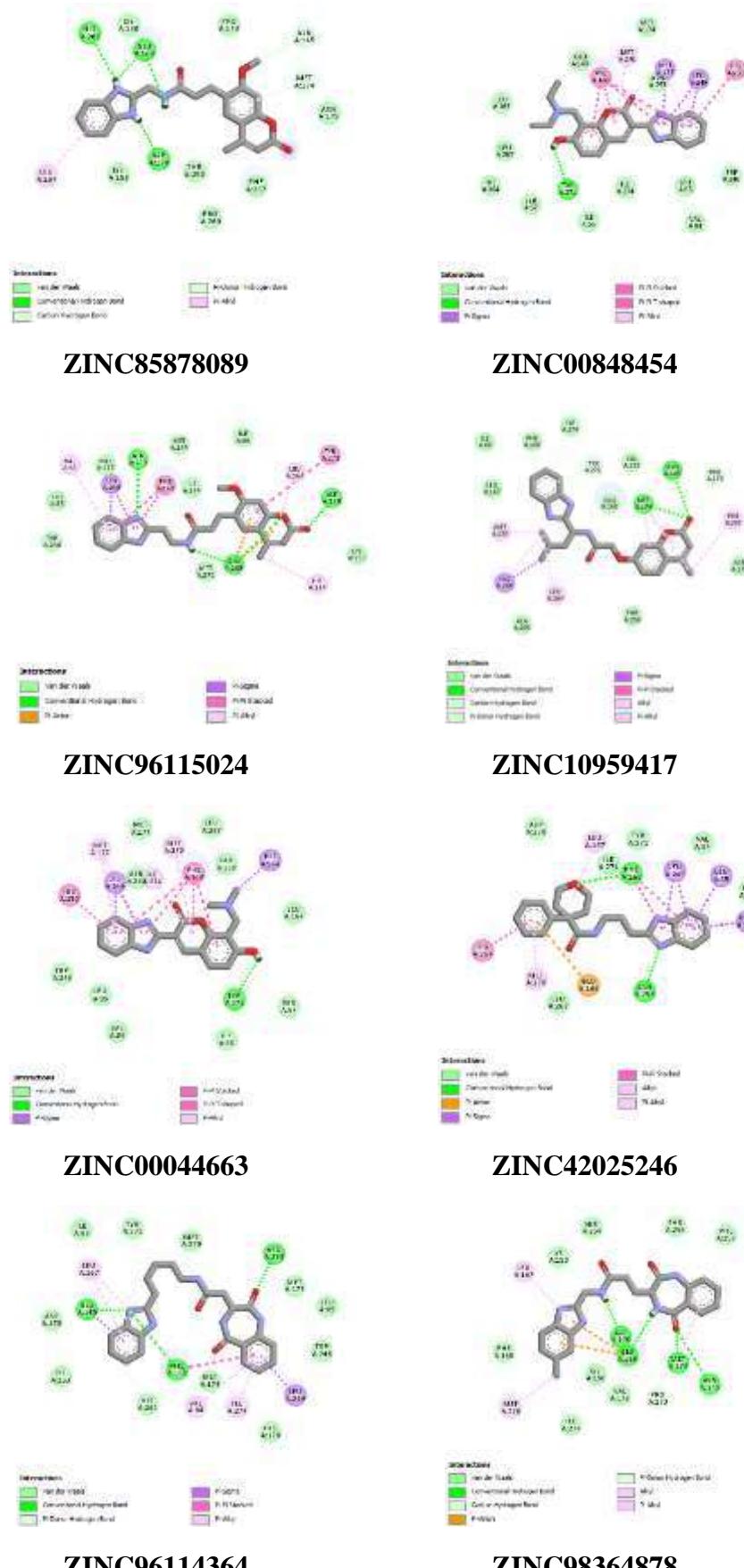
No	Senyawa	$\Delta G$ (kkal/mol)	Ki (nM)
1	ZINC12560456	-10,50	20,18
2	ZINC96116483	-10,25	30,45
3	ZINC96116495	-9,83	62,12
4	ZINC98363864	-9,72	75,22
5	ZINC96116579	-9,53	103,26
6	ZINC96116578	-9,50	108,22
7	ZINC03831405	-9,29	155,34
8	ZINC08764772	-8,99	256,23
9	ZINC85878089	-8,96	270,14
10	ZINC00848454	-8,94	281,22
11	ZINC96115024	-8,90	297,08
12	Ligan alami ZMA	<b>-8,90</b>	<b>300,54</b>
13	ZINC10959417	-8,85	327,81
14	ZINC00044663	-8,75	382,57
15	ZINC42025246	-8,72	408,16
16	ZINC96114364	-8,70	417,36
17	ZINC98364878	-8,68	431,23
18	ZINC96116467	-8,56	530,64
19	ZINC79190030	-8,51	577,36
20	ZINC85879939	-8,49	600,75
21	ZINC96116529	-8,44	646,51
22	ZINC12956922	-8,26	882,79
23	ZINC02134977	-7,48	3.290,00
24	ZINC08994483	-7,22	5.140,00
25	ZINC00038207	-7,14	5.840,00
26	ZINC20611386	-7,03	7.020,00

Interaksi yang terjadi antara senyawa uji dan reseptor adenosin A<sub>2A</sub> divisualisasikan dengan perangkat lunak *Discovery Studio Visualizer* 2016. Interaksi yang terjadi diantaranya ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik dan interaksi elektrostatik baik berupa jembatan garam ataupun gaya van der Waals. Nilai donor dan akseptor ikatan hidrogen berhubungan dengan aktivitas biologis suatu molekul. Sedangkan interaksi hidrofobik dan elektrostatik berperan dalam stabilitas ligan uji terhadap reseptor target (Ruslin et al., 2016).

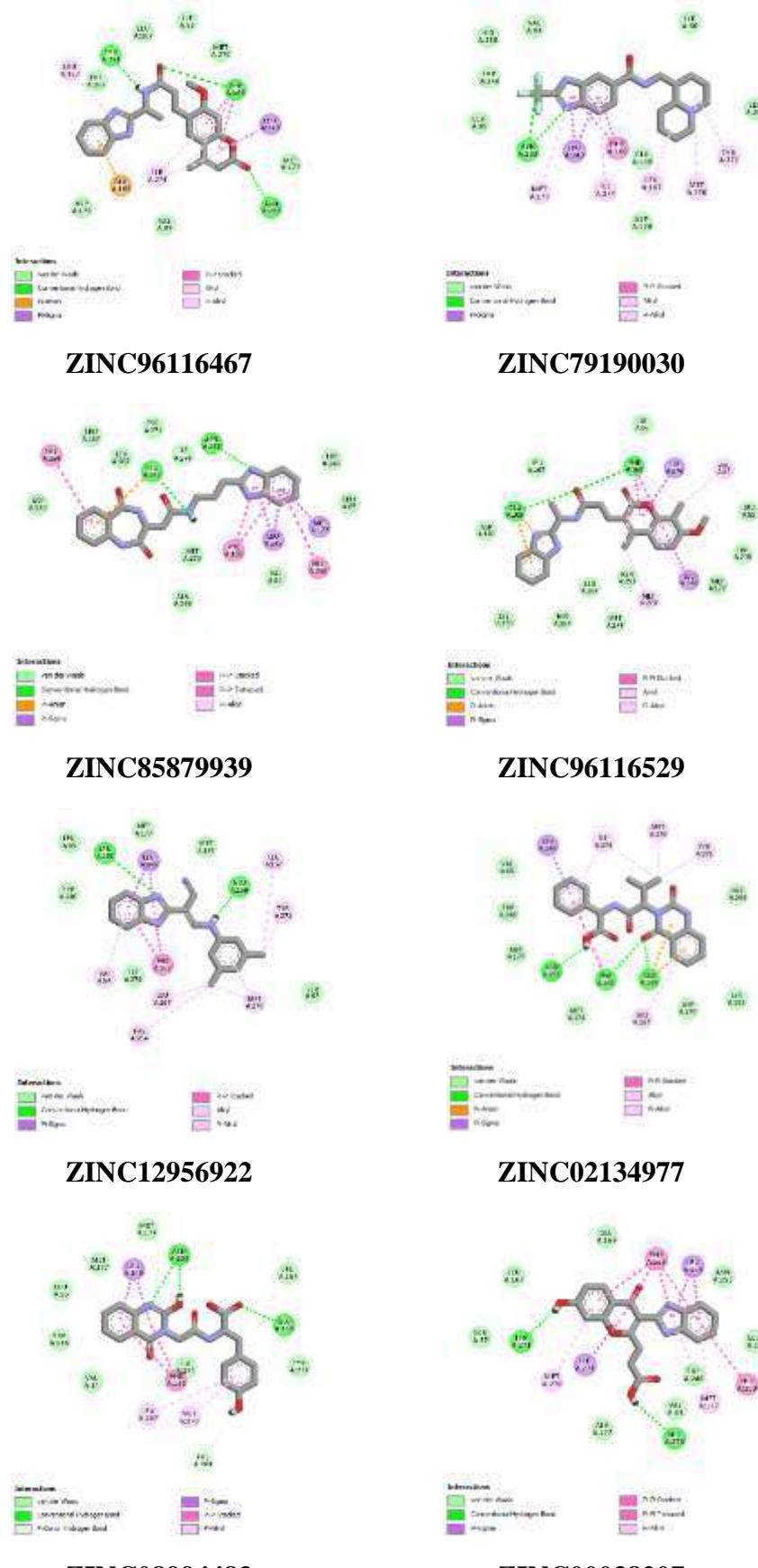


Gambar 6.6. Visualisasi interaksi hasil *docking* senyawa uji

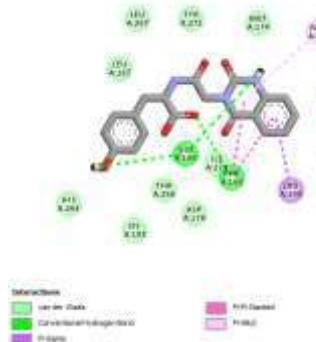
Lanjutan Gambar 6.6.



Lanjutan Gambar 6.6.



Lanjutan Gambar 6.6.



**ZINC20611386**

Pada senyawa uji terbaik dengan kode ZINC12560456 terbentuk ikatan hidrogen dengan residu asam amino TYR271; interaksi hidrofobik dengan residu asam amino LEU85, LEU167, PHE168, MET177, LEU249, HIS264, MET270, ILE274; dan interaksi van der Waals dengan residu asam amino ILE66, SER67, VAL84, LYS153, GLU169, TRP246, HIS250, ASN253, LEU267. Interaksi antara reseptor dengan senyawa uji lainnya dapat dilihat pada Lampiran 6. Interaksi yang terjadi antara senyawa uji dengan residu asam amino pada area *binding site* berperan penting dalam meningkatkan afinitas senyawa tersebut terhadap reseptor target (Arwansyah et al., 2014).

Berdasarkan pengamatan pada Tabel 6.5, dipilih 11 senyawa uji yang memiliki nilai  $\Delta G$  dan  $K_i$  yang lebih rendah dari ligan alaminya untuk dilanjutkan pada studi dinamika molekul.

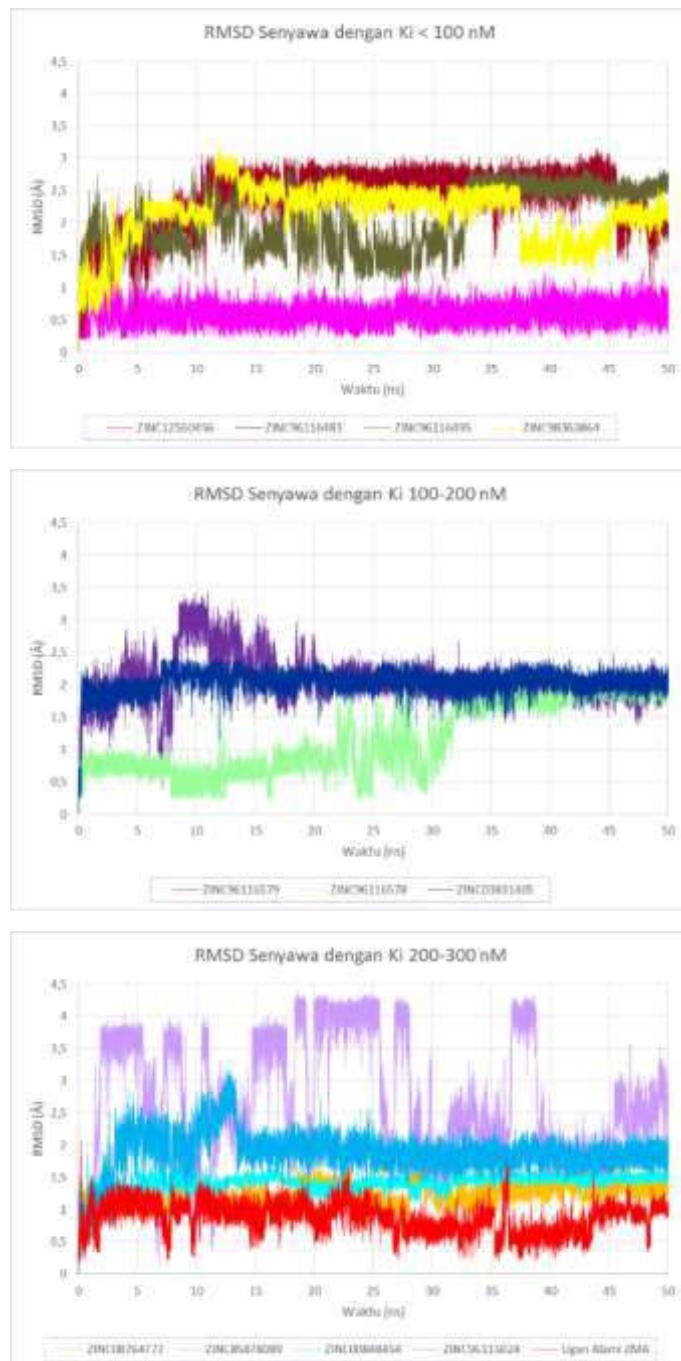
## VI.7. Simulasi Dinamika Molekul

Simulasi dinamika molekul dilakukan untuk menentukan perubahan struktural dan stabilitas kompleks antara reseptor dan ligan dengan melihat data fluktuasi, perubahan konformasi dan energi total selama jangka waktu simulasi (Sharif et al., 2018).

Parameter simulasi dinamika molekul yang diamati, yaitu RMSD (*Root Mean Square Deviation*), RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*), interaksi ikatan hidrogen antara reseptor dengan ligan, MM/PBSA dan MM/GBSA (*Molecular Mechanics combined with Poisson-Boltzmann or Generalized Born and Surface Area*) serta nilai energi bebas ikatan ( $\Delta G$ ).

### VI.7.1. RMSD

RMSD (*Root Mean Square Deviation*) merupakan nilai deviasi yang menggambarkan perbandingan antara konformasi ligan dan reseptor selama proses simulasi berlangsung yang digunakan untuk memantau stabilitas dinamika konformasi kompleks tersebut (Dermawan et al., 2019; Xie et al., 2015). Grafik RMSD kompleks ligan selama 50 ns digolongkan berdasarkan nilai konstanta inhibisi ( $K_i$ ) pada proses simulasi *docking*, ditunjukkan oleh Gambar 6.7.



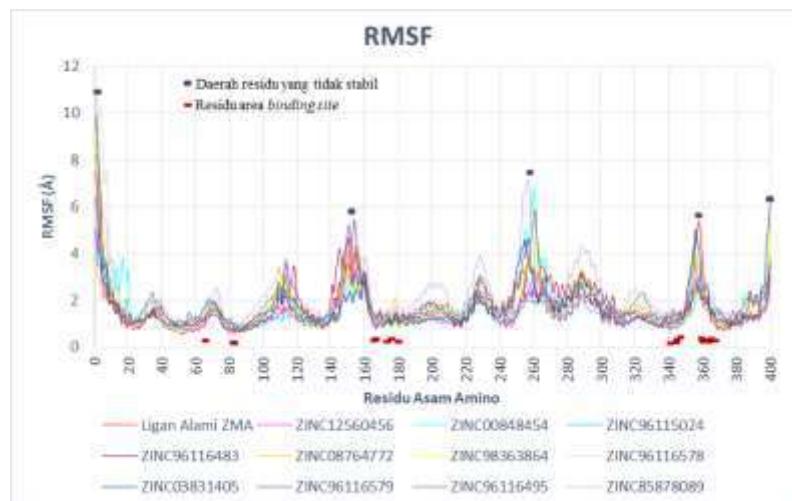
Gambar 6.7. Grafik RMSD kompleks ligan selama 50 ns

Selama simulasi 50 ns, hampir keseluruhan kompleks ligan menampilkan grafik yang stabil pada waktu yang berbeda, artinya sistem kompleks ligan mengalami pergerakan *minor* dilihat dari nilai RMSD dengan rata-rata di bawah 3 Å (Arba & Tjahjono, 2014). Adapun senyawa dengan kode ZINC85878089 terlihat sangat fluktuatif dan tidak stabil dilihat dari RMSD kisaran 0,5-4 Å. Senyawa uji dengan kode ZINC12560456 menunjukkan stabilitas terbaik dilihat dari nilai RMSD < 1 Å dan tidak menunjukkan fluktuasi yang signifikan selama proses simulasi.

Grafik RMSD keseluruhan kompleks antara sistem reseptor dan ligannya dapat diamati pada Lampiran 7. Terlihat hampir keseluruhan grafik sistem reseptor cenderung fluktuatif yang artinya reseptor cenderung aktif melakukan pergerakan selama proses simulasi, dilihat dari nilai RMSD dengan rata-rata > 3 Å. Adanya interaksi dengan suatu ligan pada area *binding site* reseptor dapat menstabilkan pergerakan sistem reseptor menjadi lebih konstan (Muttaqin et al., 2019). Visualisasi pergerakan kompleks reseptor dan senyawa uji terbaik dengan kode ZINC12560456 selama 50 ns ditunjukkan pada Lampiran 8.

### VI.7.2. RMSF

RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*) menggambarkan fluktuasi pergerakan masing-masing residu asam amino yang menyusun suatu reseptor, bertujuan untuk melihat kestabilan area *binding site* selama simulasi berlangsung (Dermawan et al., 2019; Xie et al., 2015).



Gambar 6.8. Grafik RMSF residu asam amino penyusun reseptor adenosin A<sub>2A</sub> selama 50 ns

Dilihat dari grafik RMSF, terdapat beberapa asam amino yang lebih aktif bergerak atau memiliki fleksibilitas yang tinggi pada saat simulasi berlangsung yang ditandai dengan bulatan warna biru. Namun residu yang berperan pada area *binding site* seperti yang ditunjukkan pada Lampiran 9 menunjukkan fluktuasi yang rendah menggambarkan kestabilan interaksi antara ligan dengan area *binding site* pada reseptor (Muttaqin et al., 2019). Asam amino Glu168 dan ASN348 menunjukkan ikatan hidrogen dengan ligan alami (Segala et al., 2016), yang berarti keduanya merupakan residu asam amino yang penting dalam reseptor adenosin A<sub>2A</sub>. Pada residu asam amino Glu168 dan ASN348 menunjukkan fluktuasi dan fleksibilitas yang rendah dilihat dari nilai RMSF  $\leq 1,5 \text{ \AA}$ . Residu yang memiliki tingkat fleksibilitas yang rendah dinilai lebih stabil (Junaid et al., 2014).

### VI.7.3. Analisis Ikatan Hidrogen

Ikatan hidrogen terbentuk antara atom elektronegatif dengan atom hidrogen yang terikat pada atom elektronegatif lainnya. Kekuatan ikatan hidrogen tergantung pada keelektronegatifan atom. Ikatan hidrogen merupakan ikatan non kovalen yang berkaitan dalam penentuan struktur dan aktivitas biologis suatu molekul (Macleod & Rosei, 2011; Wijaya et al., 2003).

Kekuatan ikatan hidrogen dapat diklasifikasikan berdasarkan jarak dan sudut ikatan, dimana ikatan yang sangat kuat memiliki rentang jarak dan sudut ikatan masing-masing 1,2-1,5 Å ; 175-180° sedangkan ikatan kuat memiliki rentang 1,5-2,2 Å ; 130-180° dan ikatan lemah memiliki rentang 2,0-3,0 ; 90-180° (Desiraju & Steiner, 2001).

Dari data yang tercantum pada Lampiran 10, diketahui bahwa seluruh ikatan hidrogen yang terbentuk dari interaksi kompleks ligan dan reseptor selama simulasi memiliki jarak ikatan hidrogen berada pada rentang 2,685-2,999 Å dan sudut ikatan berada pada rentang 136,22-175,59°. Hal ini dapat disimpulkan bahwa ikatan hidrogen yang terbentuk merupakan ikatan yang lemah. Semakin kuat ikatan hidrogen yang terbentuk, energi yang dibutuhkan pada proses absorpsi semakin besar (Syahputra et al., 2014). Namun, pada hasil simulasi ini terbentuk ikatan hidrogen yang lemah, sehingga energi yang diperlukan pada proses absorpsi tidak akan terlalu besar.

#### VI.7.4 Analisis MM/PBSA dan MM/GBSA

MM/PBSA dan MM/GBSA ialah metode yang dapat memperkirakan energi bebas untuk mempelajari afinitas ikatan reseptor-ligan (Yunta, 2016). Metode ini melibatkan beberapa energi dalam perhitungannya. Energi bebas ikatan merupakan hasil gabungan antara energi yang dihasilkan dari interaksi van der Waals, energi elektrostatik, kontribusi elektrostatik dan kontribusi non-polar terhadap energi bebas solvasi (Genheden & Ryde, 2015; Dermawan et al., 2019).

Tabel 6.6. Komponen energi selama simulasi dinamika molekul

Senyawa	Komponen Energi (Kkal/mol)						
	vdW	EEL	EGB	ESURF	ΔGgas	ΔGsolv	ΔGtot
ZINC12560456	-54,777	-6,015	8,572	-6,373	-60,792	2,199	-58,593
ZINC00848454	-50,316	-11,680	14,619	-6,197	-61,996	8,422	-53,574
ZINC96115024	-58,574	-17,916	32,168	-7,212	-76,490	24,957	-51,533
ZINC96116483	-56,496	-8,351	27,003	-6,795	-64,847	20,207	-44,640
ZINC08764772	-46,956	-14,339	25,841	-5,760	-61,294	20,081	-41,213
ZINC98363864	-42,793	-8,309	17,120	-5,354	-51,102	11,765	-39,337
ZINC96116578	-47,636	-22,317	37,808	-6,055	-69,953	31,752	-38,201
ZINC03831405	-36,176	-10,598	15,323	-4,883	-46,774	10,440	-36,334
Ligan Alami ZMA	<b>-42,204</b>	<b>-15,241</b>	<b>26,821</b>	<b>-5,220</b>	<b>-57,444</b>	<b>21,600</b>	<b>-35,844</b>
ZINC96116579	-44,825	-19,277	37,603	-6,008	-64,102	31,596	-32,507
ZINC96116495	-39,997	-29,868	43,870	-4,956	-69,865	38,914	-30,951
ZINC85878089	-16,623	-21,090	30,532	-2,157	-37,713	28,375	-9,338

Keterangan : vdW : Interaksi van der Waals  
EEL : Energi elektrostatik  
EGB : Kontribusi elektrostatik terhadap energi bebas solvasi  
ESURF : Kontribusi non-polar terhadap energi bebas solvasi  
ΔGgas : vdW + EEL (Energi mekanika molekul dalam fase gas)  
ΔGsolv : EGB + ESURF (Energi bebas solvasi)  
ΔGtot : vdW + EEL + EGB + ESURF (Energi bebas ikatan)

Tabel 6.6 menunjukkan bahwa senyawa dengan kode ZINC12560456 memiliki energi bebas ikatan paling rendah dibandingkan dengan senyawa lainnya yaitu sebesar -58,593 kkal/mol. Sedangkan ligan alami ZMA memiliki energi bebas ikatan sebesar -35,844 kkal/mol. Hal ini dapat disimpulkan bahwa senyawa ZINC12560456 diprediksikan memiliki afinitas terbaik dari senyawa lainnya. Dari Tabel 6.6 pun diketahui bahwa energi dari interaksi van der Waals merupakan komponen energi yang paling berpengaruh terhadap sistem yang menunjukkan bahwa residu asam amino penyusun *binding site* reseptor adenosin A<sub>2A</sub> didominasi oleh residu yang bersifat hidrofobik.

## VI.8. Prediksi Toksisitas

Prediksi toksisitas berbasis web dari situs <https://preadmet.bmdrc.kr/> dilakukan untuk menganalisis tingkat keamanan senyawa uji sebelum disintetis yang meliputi tes Ames, tes karsinogenitas terhadap hewan pengerat (mencit dan tikus), serta prediksi risiko kardiotoksisitas.

Tes Ames merupakan metode sederhana yang dipelopori dan disarankan oleh Dr. Ames untuk menguji mutagenisitas suatu senyawa dengan menggunakan beberapa jenis bakteri *Salmonella typhimurium*. Bakteri ini membawa mutasi pada gen yang terlibat dalam sintesis histidin yang dibutuhkan untuk pertumbuhannya. Kemampuan mutagen untuk mengembalikan pertumbuhan pada media yang bebas histidin merupakan variable yang diuji (Ames et al., 1972).

Tes karsinogenitas umumnya membutuhkan waktu selama 2 tahun dengan metode in vivo menggunakan mencit dan tikus sebagai hewan uji yang dipaparkan suatu senyawa. Variabel yang diamati ialah keberadaan kanker. PreADMET memprediksi hasilnya berdasarkan data NTP (*National Toxicology Program*) dan US FDA (*Yonsei Engineering Research*, 2017).

Kanal *Human ether-a-go-go related gene* (hERG) merupakan kanal ion kalium yang diekspresikan dalam jantung dan sistem saraf, bertanggung jawab dalam repolarisasi selama potensial aksi. Penyumbatan (inhibisi) kanal tersebut dapat menyebabkan kardiotoksisitas parah, gangguan jantung sampai kematian mendadak (Yi et al., 2013). Senyawa inhibitor hERG dapat diklasifikasikan menjadi inhibitor kuat ( $IC_{50} < 1 \mu M$ ); inhibitor moderat ( $IC_{50} 1-10 \mu M$ ) dan inhibitor lemah ( $IC_{50} \geq 10 \mu M$ ) seperti yang disyaratkan oleh industri farmasi (Marchese Robinson et al., 2011).

Tabel 6.7. Prediksi toksisitas senyawa uji

Senyawa	Tes Ames	Karsinogenik		Kardiotoksisitas
		Mencit	Tikus	
ZINC12560456	Non-mutagen	Negatif	Negatif	Risiko medium
ZINC96116483	Non-mutagen	Negatif	Negatif	Risiko medium
ZINC96116495	Mutagen	Negatif	Negatif	Risiko medium
ZINC98363864	Mutagen	Positif	Negatif	Risiko rendah
ZINC96116579	Mutagen	Negatif	Negatif	Risiko tinggi
ZINC96116578	Mutagen	Negatif	Negatif	Risiko tinggi
ZINC03831405	Mutagen	Negatif	Negatif	Risiko medium
ZINC08764772	Mutagen	Negatif	Negatif	Risiko tinggi
ZINC85878089	Mutagen	Negatif	Negatif	Risiko medium
ZINC00848454	Non-mutagen	Negatif	Negatif	Risiko medium
ZINC96115024	Mutagen	Negatif	Negatif	Risiko medium

Tabel 6.7 menunjukkan berdasarkan tes Ames, senyawa uji dengan kode ZINC12560456, ZINC96116483 dan ZINC00848454 diprediksikan bersifat non-mutagen, sedangkan 8 senyawa uji lainnya diprediksikan bersifat mutagen. Tes karsinogenik terhadap mencit dan tikus sebagai hewan uji diprediksikan hanya senyawa dengan kode ZINC98363864 yang menunjukkan hasil positif pada mencit, sedangkan yang lainnya menunjukkan hasil negatif baik pada mencit ataupun tikus. Prediksi timbulnya kardiotoksisitas berdasarkan kemampuan senyawa uji dalam menyumbat kanal hERG menunjukkan senyawa dengan kode ZINC98363864 menunjukkan risiko rendah, senyawa dengan kode ZINC12560456, ZINC96116483, ZINC96116495, ZINC03831405, ZINC85878089, ZINC00848454 dan ZINC96115024 menunjukkan risiko medium, sedangkan senyawa dengan kode ZINC96116579, ZINC96116578 dan ZINC08764772 menunjukkan risiko tinggi sebagai inhibitor kanal hERG.