

BAB VI

HASIL DAN PEMBAHASAN

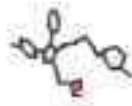
7.1 Preparasi Struktur Reseptor dan Senyawa Uji

A. Preparasi Reseptor

Reseptor Bcl-2 yang memiliki kode 3SPF didapatkan melalui situs protein data bank (PDB) <https://www.rcsb.org/pdb> yang berisikan informasi makromolekul biologis 3SPF. Kompleks protein ini menggunakan metode difraksi sinar-x dengan resolusi 1,7 Å. Kompleks protein ini terdiri dari ligan alami B50 dan kompleks lain seperti gliserol (GOL).



(a)



(b)

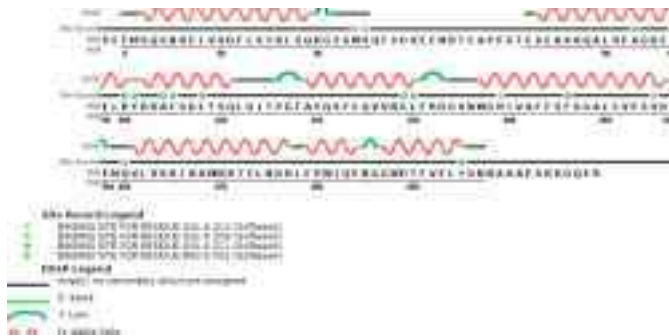
Gambar VI. 1 Reseptor Bcl-2 dengan kode 3SPF (a) dan ligan alami (b)

<https://www.rcsb.org/structure/3wze>

Sebelum melakukan proses *Molecular Docking* dan *Molecular Dynamic* terlebih dahulu dilakukan pemisahan antara protein dengan ligan alami menggunakan perangkat lunak *Discovery Studio Visualizer 2016*.

B. Perbaikan Reseptor

Dilakukan perbaikan terhadap reseptor Bcl-2 karena dilihat dari hasilnya terdapat residu asam amino yang hilang yang ditandai dengan kosongnya rantai pada deretan asam amino. Perbaikan reseptor ini dilakukan melalui web <https://swissmodel.expasy.org/>. Dapat dilihat pada gambar VI.2 terdapat residu yang hilang.



Gambar VI. 2 Residu yang hilang dalam reseptor Bcl-2

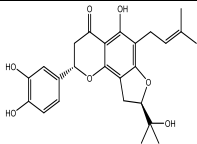
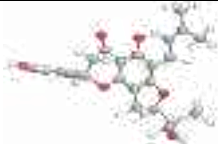
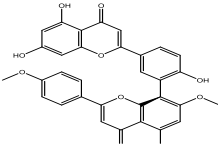
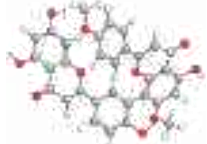
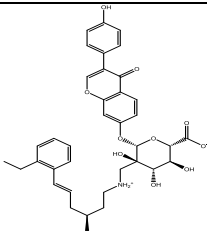
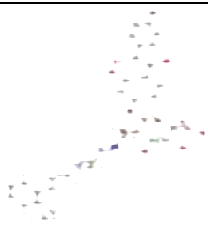


Gambar VI. 3 Reseptor Bcl-2 sebelum perbaikan (a) dan Reseptor Bcl-2 yang sudah perbaikan (b)

C. Preparasi Senyawa Uji

Senyawa uji terdiri dari 12 senyawa turunan senyawa flavonol. Senyawa uji ini dilakukan pemodelan 2D dan 3D menggunakan *ChemOffice* 2010. Pemodelan senyawa uji ini dilakukan untuk mendapatkan parameter fisikokimia yaitu LogP, BM, MR (*Molar refractivity*), akseptor dan donor ikatan hidrogen dan penentuan HOMO-LUMO.

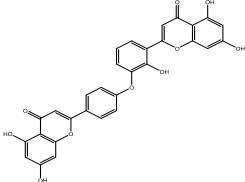
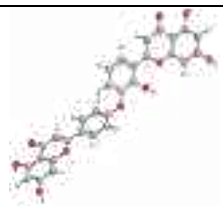
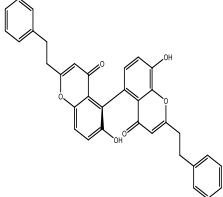
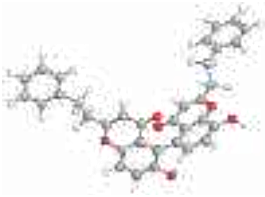
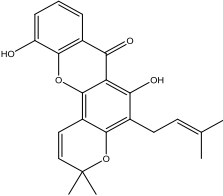
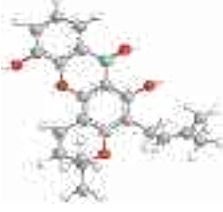
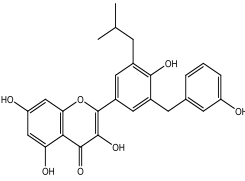
Tabel VI. 1 Pemodelan senyawa uji 2D dan 3D

Nama Senyawa	Pemodelan 2D	Pemodelan 3D
Senyawa 1		
Senyawa 2		
Senyawa 3		

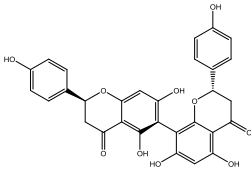
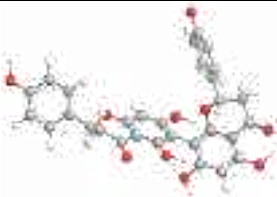
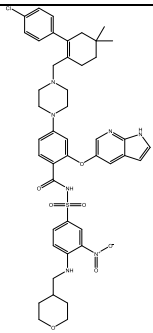
Tabel VI.1 Pemodelan Senyawa Uji 2D dan 3D (Lanjutan)

Nama Senyawa	Pemodelan 2D	Pemodelan 3D
Senyawa 4		
Senyawa 5		
Senyawa 6		
Senyawa 7		

Tabel VI.1 Pemodelan Senyawa Uji 2D dan 3D (Lanjutan)

Nama Senyawa	Pemodelan 2D	Pemodelan 3D
Senyawa 8		
Senyawa 9		
Senyawa 10		
Senyawa 11		

Tabel VI.1 Pemodelan Senyawa Uji 2D dan 3D (Lanjutan)

Nama Senyawa	Pemodelan 2D	Pemodelan 3D
Senyawa 12		
Senyawa Venetoclax (pembanding)		

7.2 Optimasi Geometri

Tahap optimasi geometri dilakukan setelah tahap persiapan senyawa uji telah selesai. Optimasi geometri ini bertujuan untuk menghitung energi terkecil dan konformasi yang stabil. Terdapat 12 senyawa uji yang telah dilakukan optimasi geometri menggunakan *Gaussian09W* dengan metode DFT dan basis set 6-31G.

7.3 Penentuan Parameter Fisikokimia

Parameter fisikokimia terdiri dari LogP, BM, MR (*Molar refractivity*), akseptor dan donor ikatan hidrogen dan penentuan HOMO-LUMO. Berdasarkan peraturan Lipinski ada beberapa syarat parameter fisikokimia yaitu (1) nilai Log P < 5, (2) berat molekul < 500 g/mol (3) jumlah donor ikatan hidrogen < 5 dan (4) jumlah akseptor ikatan hidrogen <10.

Tabel VI. 2 Parameter Fisikokimia

Nama Senyawa	Log P	BM (g/mol)	Jumlah donor ikatan hidrogen	Jumlah akseptor ikatan hydrogen
Senyawa 1	3,077	440,183	4	7
Senyawa 2	3,975	566,121	4	10
Senyawa 3	4,260	659,273	5	9
Senyawa 4	3,449	538,089	6	10
Senyawa 5	3,700	538,089	5	10

Tabel VI.2 Parameter Fisikokimia (lanjutan)

Nama Senyawa	Log P	BM (g/mol)	Jumlah donor ikatan hidrogen	Jumlah akseptor ikatan hidrogen
Senyawa 6	4,546	422,173	4	6
Senyawa 7	3,712	552,106	5	10
Senyawa 8	3,700	538,089	5	10
Senyawa 9	5,045	530,173	2	6
Senyawa 10	4,187	378,147	2	5
Senyawa 11	4,095	448,152	5	7
Senyawa 12	2,900	542,121	6	10
Senyawa Venetoclax (pembanding)	6,760	588.616	3	10

A. Penentuan Parameter Koefisien Partisi (Log P)

Koefisien partisi adalah parameter lipofisilitas yang berguna untuk interaksi suatu obat dengan makromolekul, enzim dan reseptor obat. Sifat lipofisilitas obat adalah kelarutan obat dalam fase lemak dan fase air. Koefisien partisi sering digunakan untuk menghubungkan antara struktur kimia dan aktivitas biologis. Nilai Log P yang besar menunjukkan sifat lipofisilitas yang besar, maka senyawa dapat mudah menembus membran biologis, sedangkan sebaliknya jika Log P bernilai kecil maka senyawa sulit untuk menembus membran biologis (Aryani, 2005). Pada penelitian ini penentuan parameter koefisien partisi menggunakan perangkat lunak *Chem Office 2010*. Berdasarkan Tabel VI.2 nilai Log P pada 12 senyawa uji yang memenuhi syarat Lipinski yaitu yang bernilai < 5 hanya 11 senyawa, sedangkan 1 senyawa yaitu senyawa uji ke-9 tidak memenuhi syarat aturan Lipinski. Senyawa pembanding yaitu senyawa venetoclax juga tidak memenuhi syarat aturan Lipinski.

B. Penentuan Parameter Berat Molekul (BM)

Proses distribusi obat didalam tubuh berkaitan dengan bobot molekul karena proses distribusi obat terjadi dengan cara menembus membran didalam tubuh. Menurut aturan Lipinski untuk nilai BM < 500 g/mol akan memudahkan senyawa obat untuk menembus membran dan dapat berinteraksi dengan

reseptor. Dari data penentuan parameter BM yang memenuhi syarat aturan Lipinski ada 4 senyawa dari 12 senyawa yaitu senyawa uji 1, senyawa uji 6, senyawa uji 10, dan senyawa uji 11. Tersisa 8 senyawa dan senyawa banding yang nilai BM nya > 500 g/mol.

C. Penentuan Parameter CMR (*Molar Refractivity*)

Molar Refractivity menggambarkan hubungan antara senyawa uji untuk memenuhi sisi pengikatan reseptor dalam sistem biologis yang akan berikatan dengan reseptor.

Tabel VI. 3 Penentuan Nilai CMR

Senyawa Uji	Nilai CMR
Senyawa Uji 1	11,803
Senyawa Uji 2	15,017
Senyawa Uji 3	17,956
Senyawa Uji 4	14,089
Senyawa Uji 5	14,089
Senyawa Uji 6	11,874
Senyawa Uji 7	14,553
Senyawa Uji 8	14,089
Senyawa Uji 9	15,332
Senyawa Uji 10	10,720
Senyawa Uji 11	12,269
Senyawa Uji 12	13,946
Senyawa venetoclax (pembanding)	24,340

Semakin tinggi nilai CMR maka semakin berikatan antara ligan uji dengan reseptor. Dari data tabel VI.3 selain senyawa

pembandingan terdapat senyawa uji 9 yang memiliki nilai CMR yang tinggi.

D. Penentuan Parameter Donor dan Akseptor Ikatan Hidrogen

Aturan Lipinski juga menyebutkan pentingnya memperhatikan ikatan hidrogen yang terjadi antara ligan dan protein. Syarat aturan Lipinski donor ikatan hidrogen < 5 dan akseptor ikatan hidrogen < 10 . Jumlah donor dan akseptor ikatan hidrogen berkaitan erat dengan kestabilan konformasi dari protein yang berikatan. Protein diprediksikan akan mengalami perubahan konformasi yang stabil jika terdapat banyak ikatan hidrogen yang terjadi pada ligan dan protein (Arwansyah, 2014).

Dari data Tabel VI.2 dihasilkan jumlah donor ikatan hidrogen yang memenuhi syarat Lipinski hanya 5 senyawa uji dari 12 senyawa uji dan senyawa banding yang memenuhi syarat. Jumlah akseptor ikatan hidrogen yang memenuhi syarat 6 senyawa dari 12 senyawa.

E. Penentuan Parameter HOMO-LUMO

Penetapan energi *Highest Occupied Molecular Orbital* (HOMO) dan *Lowest Unccupied Molecular Orbital* (LUMO) dilakukan menggunakan perangkat lunak *GaussView 5.0.8*. HOMO adalah orbital tertinggi yang ditempati elektron. Sedangkan LUMO adalah orbital terendah yang tidak

ditempati elektron. LUMO merupakan molekul terendah yang tidak diduduki elektron. Nilai HOMO yang tinggi menunjukkan kecenderungan senyawa tersebut memberikan elektron dan nilai LUMO yang rendah menunjukkan kecenderungan senyawa menerima elektron (Sanjaya, dkk. 2013).

Tabel VI. 4 Energi Total Optimasi, nilai HOMO, LUMO dan Gap Energy Senyawa Uji

Nama Senyawa	Energi Total (a.u)	HOMO (a.u)	LUMO (a.u)	Gap Energy
Senyawa 1	-1495,664	-0,213	-0,061	0,152
Senyawa 2	-1984,341	-0,221	-0,082	0,139
Senyawa 3	-2240,923	-0,184	-0,065	0,119
Senyawa 4	-1905,749	-0,231	-0,087	0,144
Senyawa 5	-1895,725	-0,217	-0,059	0,158
Senyawa 6	-1419,252	-0,207	-0,064	0,143
Senyawa 7	1945,044	-0,219	-0,085	0,134
Senyawa 8	-1905,736	-0,224	-0,094	0,130
Senyawa 9	1762,154	-0,214	-0,075	0,139
Senyawa 10	-1265,480	-0,211	-0,076	0,135
Senyawa 11	-1531,385	-0,209	-0,079	0,130
Senyawa 12	-1908,143	-0,213	-0,069	0,144
Senyawa Venetoclax	-3531,236	-0,204	-0,050	0,153

Pada Tabel VI.3 terlihat nilai HOMO terbesar terdapat pada senyawa uji 3 yaitu bernilai -0,184 yang menunjukkan kemampuan senyawa dalam mendonorkan elektronnya dibanding dengan senyawa lainnya. Sedangkan nilai LUMO

terendah dimiliki senyawa uji 8 dengan nilai LUMO -0,094 yang menunjukkan kemampuan senyawa tersebut dalam menerima elektron.

Celah energi (*gap energy*) dapat menggambarkan stabilitas molekul. Celah energi merupakan selisih dari nilai energi LUMO dengan nilai dari energi HOMO. Besarnya celah energi mengakibatkan sulitnya elektron untuk tereksitasi sehingga molekul tersebut memiliki reaktivitas yang rendah dan stabilitas yang tinggi. Pada data tabel VI.4 senyawa uji 3 memiliki celah energi yang besar dan stabil.

7.4 Molecular Docking

Molecular docking dapat memprediksi kuantitatif ikatan energi, memberikan peringkat pada senyawa berdasarkan ikatan kompleks ligan dengan reseptor (Guedes, dkk., 2013). Proses *Docking* ini menggunakan perangkat lunak *Autodocktools* 4.2.3. Sebelum dilakukan proses *docking* dilakukan terlebih dahulu preparasi senyawa uji dan preparasi reseptor Bcl-2. Reseptor Bcl-2 diunduh melalui web PDB dengan kode 3SPF. Pada proses preparasi reseptor dipisahkan antara protein dan ligan.

A. Validasi Docking

Proses validasi *docking* dilakukan menggunakan perangkat lunak *Autodocktools* 4.2.3 dengan cara melakukan validasi

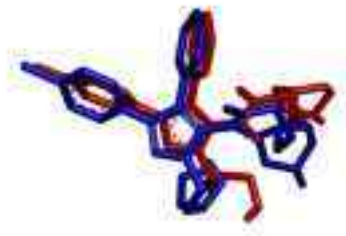
docking antara ligan alami dengan reseptor Bcl-2 dengan kode 3SPF. Validasi *docking* dilakukan untuk mendapatkan parameter-parameter yang valid sebelum melakukan *docking* pada senyawa uji. Semakin kecil nilai RMSD maka menunjukkan bahwa posisi ligan yang diperkirakan semakin baik karena posisi ligan semakin mendekati konformasi asal ((Ferencz, 2015). Pada proses validasi dapat dikatakan valid adalah dengan melihat nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*). Nilai RMSD yang paling baik adalah memiliki nilai $\text{RMSD} \leq 2\text{\AA}$ (Ruswanto, 2015). Pada proses validasi *docking*, dilakukan pengaturan Grid Box. Pengaturan Grid Box digunakan untuk membatasi daerah interaksi antara ligan dengan reseptor. Grid Box ditentukan dengan pengaturan *center of ligan*, kemudian ukurannya disesuaikan dengan besarnya senyawa uji.

Tabel VI. 5 Ukuran Grid Box Hasil Validasi Docking

Grid Box		Grid Spacing	Grid Spacing	
X	76		X	28,246
Y	44	0,375 Å	Y	10,126
Z	50		Z	22,460

Dari hasil validasi, didapatkan ukuran gridbox yang memenuhi persyaratan validasi ($\text{RMSD} \leq 2\text{\AA}$) adalah dengan ukuran nilai grid box yang terdapat pada table VI.5. Metoda algoritma yang digunakan adalah *Lamarckian Genetic Algoritma*. Dari metoda

algoritma pencarian tersebut, dilakukan juga perhitungan fungsi penilaian dengan konformasi pencarian *Number of GA Runs* sebanyak 100 pose dan *Number of Evals* yang digunakan adalah medium.



Gambar VI. 4 Hasil Visualisasi antara ligan alami (merah) dengan ligan alami re-docking (biru)

Dari gambar hasil visualisasi gambar VI.4 didapatkan konformasi yang tidak jauh berbeda dari ligan alami dan ligan hasil validasi *docking*. Berdasarkan hasil validasi metoda *docking*, nilai yang valid dan paling baik didapatkan pada run ke 61 dengan nilai RMSD yang memenuhi syarat yaitu 1,639 Å. Dengan hasil demikian maka metode *docking* yang digunakan telah valid dan pengaturan parameter telah memenuhi kriteria validasi metode *docking*, sehingga parameter-parameter tersebut dapat digunakan untuk melakukan *docking* senyawa uji. Dari hasil validasi *docking*

didapatkan juga nilai energi bebas ikatan (ΔG) sebesar $-21,841$ kJ/mol dan nilai Konstanta inhibisi (K_i) sebesar $0.149 \mu\text{M}$.

Tabel VI. 6 Hasil dan Interaksi Ikatan Ligan-Reseptor Pada Ligan Alami Hasil Validasi

Senyawa	ΔG (kJ/mol)	K_i (μM)	Interaksi	Residu Asam Amino
Ligan alami hasil validasi	$-21,841$	0.149	Interaksi Van Der Waals: SER145, GLU129	
			Interaksi Hidrogen Karbon: LEU130:CA- LIG:OAB	SER145, GLU129,
			Interaksi Hidropobik TYR101- LIG, PHE105- LIG, Ala149- LIG:CLAE, LIG:CLAE- LEU108, PHE105- LIG:CLAE, LIG- LEU108, LIG- ALA142, LIG- VAL126, LIG- LEU130, LIG- ALA104	LEU130, TYR101, PHE105, ALA149, LEU108, PHE105, LEU108, ALA142, VAL126, ALA104

B. Docking Senyawa Uji

Pada penelitian ini dilakukan *docking* senyawa uji menggunakan parameter-parameter validasi *docking* yang telah valid. Tujuan penggunaan parameter-parameter hasil validasi *docking* pada *docking* senyawa uji agar dilakukan pada daerah sisi aktif yang sama dengan sisi aktif reseptor hasil validasi.

Tabel VI. 7 Nilai Energi Bebas Ikatan (ΔG) dan Nilai Konstanta Inhibisi (K_i).

Senyawa Uji	Nilai Energi Bebas Ikatan (ΔG) kJ/mol	Nilai Konstanta Inhibisi (K_i) μM
Senyawa Uji 1	-32,259	2,25
Senyawa Uji 2	-33,054	1,62
Senyawa Uji 3	-36,861	0,346
Senyawa Uji 4	-33,514	1,34
Senyawa Uji 5	-36,903	0,343
Senyawa Uji 6	-31,045	3,61
Senyawa Uji 7	-35,062	0,725
Senyawa Uji 8	-37,739	0,246
Senyawa Uji 9	-35,815	0,528
Senyawa Uji 10	-30,752	4,07
Senyawa Uji 11	-34,476	0,911
Senyawa Uji 12	-28,869	8,78

Berdasarkan hasil penelitian seperti tabel VI.7 diperoleh hasil berupa nilai energi bebas ikatan (ΔG), dan nilai konstanta inhibisi (K_i). Nilai energi bebas ikatan (ΔG) menunjukkan

adanya interaksi antara senyawa uji dengan reseptor Bcl-2. Hal ini ditunjukkan dengan dengan nilai energi bebas < 0 . Semakin kecil nilai energi bebas tersebut, maka interaksi yang terjadi semakin stabil. Sedangkan nilai konstanta inhibisi (k_i) menunjukkan gambaran afinitas antara senyawa dengan makromolekulnya. Semakin kecil nilai konstanta inhibisi maka nilai penghambatan senyawa terhadap aktifitas protein target semakin efektif.

Dari data tabel VI.7 dapat terlihat nilai energi bebas ikatan (ΔG) dan nilai konstanta inhibisi (K_i) yang terendah adalah senyawa uji ke-8 dengan nilai energi bebas ikatan (ΔG) -37,739 kJ/mol dan nilai konstanta inhibisi (K_i) 0,246 μM . Interaksi yang terbentuk divisualisasikan sesuai dengan gambar VI.5.



Gambar VI. 5 Visualiasi Hasil Docking Senyawa Uji ke-8

Selanjutnya, nilai energi bebas ikatan (ΔG) dan konstanta inhibisi (K_i) yang terbaik terdapat pada 5 senyawa uji dilihat pada tabel VI.8

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

Senyawa Uji	Nilai Energi Bebas Ikatan (ΔG) kJ/mol	Nilai Konstanta Inhibisi (K_i) (μM)
Senyawa uji 5	-36,903	0,343
Senyawa uji 3	-36,861	0,346
Senyawa uji 9	-35,815	0,528
Senyawa uji 7	-35,062	0,725
Senyawa uji 11	-34,476	0,911

Dilakukan interaksi antara senyawa uji dengan reseptor Bcl-2 pada sisi aktif pengikatnya dilihat pada tabel VI.9

Tabel VI. 9 Hasil dan Interaksi Ikatan Ligan-Reseptor Pada Ligan Uji Terbaik

Senyawa	ΔG (kJ/mol)	K_i (μM)	Interaksi	Residu Asam Amino
Senyawa Uji 8	-37,739	0,246	Interaksi Van Der Waals:	ASN136, GLY138,
			ASN136, GLY138, LEU130, PHE146, GLN125	LEU130, PHE146, GLN125,
			Interaksi Ikatan Hidrogen:	SER122, TYR101,
			SER122:OG-LIG:O25, LIG:H58-TYR101:OH,	GLN111, LEU112,

			LIG:H51-GLN111:O, LIG:H51-LEU112:O Interaksi Hidrofobik: LEU108:CD1-LIG, PHE97-LIG, LIG- ALA104, LIG-ALA142, LIG-ARG139, LIG- VAL126	LEU108, PHE97, ALA104, ALA142, ARG139, VAL126
			Interaksi Van Der Waals: ASP107, GLN111, GLU129, SER122, LEU130, PHE143, PHE97, ALA149 Interaksi Ikatan Hidrogen: GLN125:NE2-LIG:O31, LIG:H49-ALA142:O, LIG:H48-ALA104:O, LIG:H57-LEU108:O Interaksi Ikatan Hidrogen Karbon: SER145:CB-LIG:O19 Interaksi Ikatan Hidrofobik: LEU108:CD1-LIG, PHE105-LIG, PHE146- LIG, LIG-VAL126, LIG- ALA142, LIG-LEU108, LIG-LEU112	ASP107, GLN111, GLU129, SER122, LEU130, PHE143, PHE97, ALA149, GLN125, ALA142, ALA104, LEU108, SER145, PHE105, PHE146, VAL126, LEU112
Senyawa Uji 5	-36,903	0,343		
			Interaksi Van Der Waals: GLY138, PHE105, LEU130, LEU108, PHE97, VAL126, ARG100, ARG102 Interaksi Elektrostatik: LIG:N17-ASP107:OD2	GLY138, PHE105, LEU130, LEU108, PHE97, VAL126, ARG100, ARG102,
Senyawa Uji 3	-36,861	0,346		

				Interaksi Ikatan Hidrogen: ARG103:NE-LIG:O49, ALA104:N-LIG:O50, LIG:H85-ASN136:OD1, TYR101:OH-LIG	ASP107, ARG103, ALA104, ASN136, TYR101, PHE146, ALA:142,
				Interaksi Ikatan Hidrogen Karbon: LIG:C16-ALA104:O, LIG:C18-ASP107:OD2	ALA104, ARG139
				Interaksi Hidrofobik: TRY101-LIG, PHE146-LIG, LIG-ALA:142, LIG-ALA104, LIG-ARG139	
				Interaksi Van Der Waals: LEU130, GLU125, GLN111, PHE146, PHE97, TYR101, ASN136, GLY138	LEU130, GLU125, GLN111, PHE146, PHE97, TYR101, ASN136,
Senyawa Uji 9	-35,815	0,528		Interaksi Ikatan Hidrogen: LIG:H66-ALA104:O, SER122:OG-LIG	GLY138, ALA104, SER122,
				Interaksi Hidrofobik: LEU108:CD1-LIG, PHE105-LIG, ASP107:C,O;LEU108:N-LIG, LIG-ARG139, LIG-ALA142, LIG-ALA104, LIG-LEU108, LIG-VAL126, LIG-LEU122	LEU108, PHE105, ASP107;L EU108, ARG139, ALA142, VAL126, LEU122
Senyawa Uji 7	-35,062	0,725		Interaksi Van Der Waals: GLN111, ASP107, PHE97, PHE105, GLU129	GLN111, ASP107, PHE97, PHE105, GLU129,

				Interaksi Ikatan Hidrogen: LIG:H60-SER145:O, LIG:H55-GLN125:OE1	SER145, GLN125, VAL126, PHE146,
				Ikatan Hidrofobik: VAL126:CG2-LIG, PHE146-LIG, LIG- ALA104, LIG-LEU108, LIG-ALA149, LIG- VAL126, LIG-LEU130	ALA104, LEU108, ALA149, VAL126, LEU130, ALA142
				Ikatan Van Der Waals: SER145, PHE105, VAL126, GLU129, GLY138	SER145, PHE105, VAL126, GLU129, GLY138,
				Interaksi Ikatan Hidrogen: LIG:H56-TYR101:OH, LIG:H55-ASN136:OD1, LIG:H52-ALA104:O	TYR101, ASN136, ALA104, LEU108,
				Interaksi Hidrofobik: LEU108:CD2-LIG, LEU130:CD1-LIG, PHE97-LIG, PHE146- LIG, LIG-ALA142, LIG- ARG139, LIG-ALA149	LEU13, PHE97, PHE146, ALA142, ARG139, ALA149

Berdasarkan hasil penelitian pada tabel VI.9 menunjukkan bahwa seluruh senyawa memiliki ikatan van der waals, ikatan hidrogen, ikatan hidorgen karbon, dan ikatan hidropobik sebagai interaksi dari ligan dan protein. Ikatan hidrogen tersebut dapat terbentuk, karena adanya gugus-gugus atom pendonor dan akseptor ikatan hidrogen.

Interaksi hidrofobik merupakan interaksi yang juga memberikan kontribusi yang cukup besar terhadap kestabilan

struktur protein. Kemiripan interaksi tersebut menunjukkan bahwa senyawa uji diprediksi memiliki aktifitas yang sama dengan ligan alami. Residu PHE105 cenderung memiliki interaksi hidrofobik karena residu tersebut yang selalu memberikan interaksi hidrofobik pada seluruh senyawa uji.

Interaksi van der Waals merupakan ikatan yang terbentuk ketika dua atom mendekat dan membentuk gaya tarik yang lemah dan nonspesifik. Dari hasil *docking* senyawa uji residu asam amino SER145 cenderung memiliki interaksi van der Waals karena residu tersebut yang selalu memberikan interaksi pada hampir semua senyawa uji.

C. *Docking* Senyawa Venetoclax (Pembanding)

Terdapat obat pembanding untuk penelitian ini yang sudah diuji sebelumnya. Venetoclax terpilih menjadi obat pembanding karena venetoclax diindikasikan sebagai inhibitor yang sangat selektif (ABT-199) yang menghambat Bcl-2.

Dalam penelitian ini senyawa pembanding juga dilakukan pengujian parameter yang sama dengan senyawa uji. Untuk parameter fisikokimia terlihat pada tabel VI.2 untuk pengujian aturan lipinski, dan juga terlihat pada tabel VI.3 dan VI.4.

Untuk proses *molecular docking* senyawa pembanding memiliki hasil docking $\Delta G = -51.320$ kJ/mol dan hasil K_i yang didapat 0,001 μM . Jika dibandingkan dengan hasil docking

senyawa uji yang terbaik yaitu senyawa uji 8 maka hasilnya lebih baik senyawa pembanding. Terdapat interaksi ikatan antara senyawa pembanding dengan reseptor bcl-2 dilahat pada tabel VI.10

Tabel VI. 10 Hasil dan Interaksi Ikatan Ligan-Reseptor Pada Senyawa pembanding

Senyawa	ΔG (kJ/mol)	Ki (μM)	Interaksi	Residu Asam Amino
Senyawa venetocla x (pemband ing)	-51,320	0,001	Interaksi Van Der Waals:	SER122,
			SER122, ASP133,	ASP133,
			ARG132, GLN111,	ARG132,
			LEU130, PH146, ASP107,	GLN111,
			PHE97, ALA142	LEU130,
			Interaksi Ikatan	PHE146,
			Hidrogen:	ASP107,
			LIG:H143-VAL126:O,	PHE97,
			LIG:H123-GLU129:OE2	ALA142,
			Interaksi Ikatan	VAL126,
			Hidrofobik:	GLU129,
			ALA104-LIG, LEU108-	ALA104,
			LIG, LEU112-LIG,	LEU108,
			VAL126-LIG, ALA149-	LEU112,
			LIG, LIG:C22-LEU112	ALA149.



Gambar VI. 6 Visualisasi Hasil Senyawa Venetoclax
(pembanding)

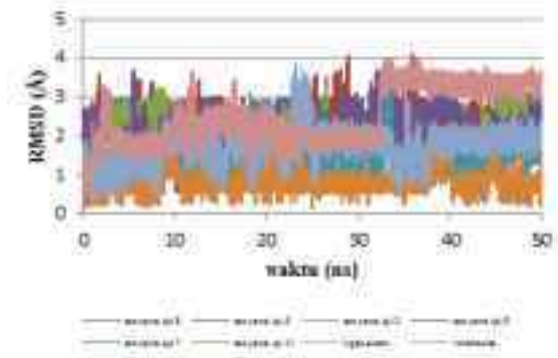
7.5 Molecular Dynamic

Setelah dilakukan simulasi *molecular docking* antara senyawa uji dengan reseptor Bcl-2, selanjutnya dilakukan simulasi *molecular dynamic*. Simulasi *molecular dynamic* dilakukan menggunakan perangkat lunak AMBER 16. Tujuan simulasi *molecular dynamic* yaitu untuk mengamati stabilitas interaksi ikatan, maupun perubahan konformasi yang dapat dialami protein selama periode waktu tertentu. Sebelum dilakukan proses *molecular dynamic*, dilakukan beberapa persiapan seperti persiapan topologi meliputi persiapan makromolekul reseptor Bcl-2 dan persiapan ligan senyawa uji yang kemudian di gabungkan kembali menjadi sebuah kompleks. Kompleks protein dan ligan tersebut kemudian di solvasi dengan penambahan box untuk simulasi dan penambahan pelarut air. Selanjutnya dilakukan tiga tahap minimisasi untuk

merelaksasikan sistem. Setelah dilakukan proses minimisasi energi, selanjutnya dilakukan proses *heating*. Pemanasan sistem dilakukan secara bertahap hingga suhu 310K dengan tekanan 1 Atm. Setelah itu dilakukan proses *equilibrasi* untuk memastikan sistem dalam keadaan yang konstan, selanjutnya dilakukan proses produksi senyawa uji yang dilakukan selama 50 nanodetik. Dari hasil produksi tersebut, kemudian dilakukan analisis *trajectory*. Analisis *trajectory* dilakukan dengan melihat nilai RMSD dan RMSF terhadap struktur asalnya.

A. RMSD (*Root Mean Square Deviation*)

RMSD merupakan akar kuadrat rata-rata deviasi, merupakan ukuran yang sering digunakan untuk membandingkan pergeseran konformasi molekul. Nilai RMSD digambarkan dalam sebuah grafik yang kemudian diplot dengan waktu seperti pada gambar VI.4. Pada gambar tersebut secara keseluruhan sistem mengalami peningkatan RMSD *backbone* yang menunjukkan bahwa struktur protein mulai terbuka pada sekitar waktu 1 nanodetik pada jarak sekitar 1 Å. Peningkatan nilai RMSD menunjukkan bahwa struktur protein mulai terbuka dan senyawa uji mulai mencari sisi ikatan yang sesuai dengan protein tersebut.



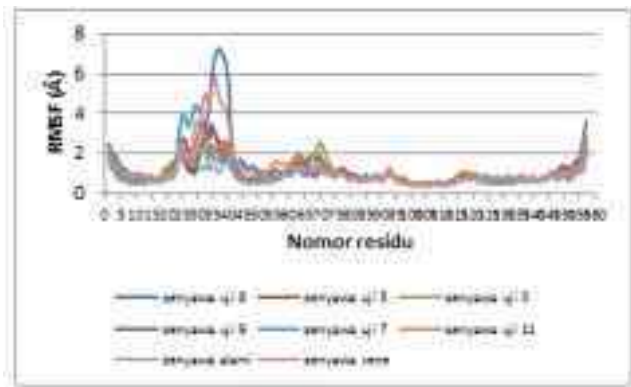
Gambar VI. 7 Grafik RMSD ligan selama 50 ns

Secara keseluruhan terlihat bahwa seluruh senyawa cenderung membutuhkan waktu yang relatif sama untuk stabil. Nilai RMSD yang mulai stabil menandakan konformasi maksimal protein setelah terikat dengan senyawa uji telah tercapai sehingga protein dapat mempertahankan posisinya. Pada grafik senyawa uji 8 terjadi peningkatan nilai RMSD dari 0,4 Å menjadi 0,5 Å pada waktu 3 nanodetik. Tetapi pada waktu 5 nanodetik terjadi penurunan nilai RMSD. Senyawa uji 5 menunjukkan grafik peningkatan nilai RMSD pada waktu 2 nanodetik dan terjadi penurunan pada waktu 3 nanodetik. Grafik senyawa uji 3 menunjukkan hasil terjadi peningkatan nilai RMSD dari grafik awal yang menunjukkan nilai RMSD 0,5 Å menjadi 0,6 Å pada waktu 3 nanodetik. Senyawa uji 9 memiliki peningkatan nilai RMSD yang sama dengan senyawa uji 3. Senyawa uji 7 memiliki grafik penurunan nilai RMSD pada waktu 4 nanodetik sebesar 0,4 Å. Senyawa uji terakhir

yaitu senyawa uji 11 menunjukkan terjadi peningkatan nilai RMSD 0,5 Å pada waktu 3 nanodetik. Dari hasil grafik RMSD pada gambar VI.4 terlihat bahwa RMSD tertinggi dicapai oleh senyawa uji 5 dengan nilai rata-rata pergeseran sebesar 4 Å dan nilai terendah dicapai senyawa uji 11 nilai pergeseran sebesar 0,1 Å.

B. RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*)

RMSF adalah akar kuadrat rata-rata fluktuasi yang mengukur deviasi posisi partikel dan beberapa posisi referensi. RMSF menghitung nilai masing-masing residu penyusun protein yaitu dengan melihat fluktuasi pergerakan masing-masing residu selama berlangsungnya simulasi. Secara garis besar nilai RMSF menggambarkan pergeseran konformasi setiap residu asam amino yang memberikan fleksibilitas protein. Perhitungan nilai RMSF dimulai pada 1 nanodetik yaitu saat energi potensial mengalami fluktuasi minimal hingga saat simulasi.



Gambar VI. 8 Grafik RMSF antara ligan dan protein selama 50 ns

Dari data grafik nilai RMSF yang dapat dilihat pada gambar VI.5 bahwa residu-residu penting pengikatan ligan dengan protein yaitu residu asam amino PHE97, ALA64, LEU68, VAL86, LEU90, ALA102, PHE106 tidak menunjukkan nilai RMSF yang tinggi. Residu asam amino tersebut relatif stabil dan tidak memberikan fluktuasi yang tinggi selama simulasi

.

C. MM/GBSA

MM/GBSA (*MM/Generalized Born and Surface Area*) merupakan suatu metode yang dapat digunakan untuk memperkirakan nilai energi bebas ikatan (ΔG) antara ligan

dengan makromolekul. MMGBSA digunakan untuk memprediksi interaksi pengikatan reaktif maupun absolut dari berbagai kompleks dengan kesalahan keakuratan 1-2 kkal/mol (Yunta, 2016). Pada penelitian ini dilakukan perhitungan MMGBSA pada waktu 48 nanodetik hingga selesainya simulasi pada 50 nanodetik.

Tabel VI. 11 Nilai Binding Energi

Kompleks	ΔE_{vdw} (Kj/mol)	ΔE_{ele} (Kj/mol)	ΔG_{polar} (Kj/mol)	$\Delta G_{\text{nonpolar}}$ (Kj/mol)	$\Delta G_{\text{pengikatan}}$ (Kj/mol)
Senyawa uji 8	-197,234	-81,491	158	-27,024	-147,749
Senyawa uji 5	-211,840	-36,949	130,495	-27,752	-146,046
Senyawa uji 3	-175,406	-30,551	94,086	-23,644	-135,551
Senyawa uji 9	-139,432	-6,937	60,969	-19,016	-104,416
Senyawa uji 7	-209,844	-13,138	107,165	-27,304	-143,21
Senyawa uji 11	-154	-25,054	98,136	-20,56	-101,478
Senyawa Venetoclax (pemanding)	-217,120	-49,379	96,395	-25,409	-195,513

Dari data tabel VI.11 menunjukkan bahwa senyawa uji 5 memiliki energi van der waals paling tinggi dengan nilai -211,840 kj/mol. Hal ini sesuai dengan hasil simulasi *docking* yang di dominasi interaksi van der waals pada interaksinya. Dari hasil data tabel VI.11 menunjukkan interaksi antara senyawa uji dengan reseptor Bcl-2 yang ditunjukkan dengan nilai ΔG pengikatan. Nilai ΔG pengikatan paling baik dimiliki senyawa uji 8 dengan nilai sebesar -147,749 kj/mol. Hal ini

sesuai dengan hasil simulasi *docking*, dimana senyawa uji 8 memiliki energi bebas ikatan paling baik diantara senyawa lainnya.

7.6 Prediksi Toksisitas

Senyawa uji yang telah dilakukan proses *molecular docking* dan *molecular dynamic* maka dilakukan juga uji prediksi toksisitas menggunakan aplikasi pre-ADMET. Aplikasi pre-ADMET didapatkan melalui web <https://preadmet.bmdrc.kr/> . Terdapat 6 senyawa yang akan dilakukan uji prediksi ADMET.

A. Tes Ames

Tes ames adalah metode sederhana untuk membuktikan apakah suatu senyawa bersifat mutagen atau tidak menggunakan bakteri. Hasil tes ames yang dilakukan terdapat pada tabel VI.11

Tabel VI. 12 Hasil Pemeriksaan Tes Ames

Senyawa Uji	Tes Ames
Senyawa uji 8	Mutagen
Senyawa uji 5	Mutagen
Senyawa uji 3	Mutagen

Senyawa uji 9	Mutagen
Senyawa uji 7	Mutagen
Senyawa uji 11	Tidak mutagen
Senyawa venetoclax (pembanding)	Tidak mutagen

B. Tes Karsinogenik

Tes karsinogenik merupakan tes yang digunakan untuk mengetahui senyawa tersebut toksisitas menyebabkan kanker pada tubuh. Tes karsinogenik ini dilakukan prediksi karsinogen pada tikus dan mencit.

Tabel VI. 13 Hasil Pemeriksaan Tes karsinogenik

Senyawa Uji	Tes Karinogenik Mencit	Tes Karsinogenik Tikus
Senyawa Uji 8	Positif	Positif
Senyawa Uji 5	Positif	Positif
Senyawa Uji 3	Negatif	Negatif
Senyawa Uji 9	Positif	Positif

Senyawa Uji 7	Positif	Positif
Senyawa Uji 11	Negatif	Negatif
Senyawa venetoclax (pembanding)	Negatif	Negatif

C. Tes Toksisitas Terhadap Jantung

Inhibisi hERG merupakan penilaian aktivitas penghambatan terhadap hERG. Sehingga jika terjadi penghambatan maka akan menimbulkan potensi kerusakan pada jantung.

Tabel VI. 14 Hasil Pemeriksaan Tes Inhibisi hERG

Senyawa Uji	Tes Inhibisi hERG
Senyawa uji 8	Resiko tinggi
Senyawa uji 5	Resiko sedang
Senyawa uji 3	Belum terdeteksi
Senyawa uji 9	Belum terdeteksi
Senyawa uji 7	Resiko sedang

Senyawa uji 11	Resiko sedang
Senayawa Venetoclax (Pembanding)	Resiko Rendah
