

LAMPIRAN

Lampiran 1 Dataset senyawa aktif

No.	ChEMBL ID	IC ₅₀ (nM)	Smiles
1	CHEMBL 4087205	1,2	<chem>C[C@H](O)Cc1cc(C(=O)Nc2ccc(cc2)S(=O)(=O)C)c(C)n1c3ccc(Cl)cc3c4ccc(F)cc4</chem>
2	CHEMBL 196374	1,259	<chem>CC1=NOC(=O)c2ccc(NC(=O)C(O)(CC(C)(C)c3cc(F)ccc3O)C(F)(F)F)cc12</chem>
3	CHEMBL 4102708	1,3	<chem>CC(=O)Oc1ccc(CCc2cc(C)c3OCC(=O)Nc3c2)c(C)c1</chem>
4	CHEMBL 1393	1,6	<chem>CC(=O)S[C@@H]1CC2=CC(=O)C[C@]2(C)[C@H]3CC[C@@]4(C)[C@@H](CC[C@@]45CCC(=O)O5)[C@H]13</chem>
5	CHEMBL 3263752	1,8	<chem>COc1nc(ccc1C(=O)O)C2=NN([C@H](C2)C3CCCC3)c4ccc(C#N)c(C)c4</chem>
6	CHEMBL 1215196	2	<chem>COc1cc(ccc1C2=NN([C@H](C2)C3CCCC3)c4ccc(C#N)c(Cl)c4)C(=O)O</chem>
7	CHEMBL 4078451	2	<chem>CC(=O)Oc1ccc(CCc2ccc3OCC(=O)Nc3c2)c(C)c1</chem>
8	CHEMBL 3263768	2,2	<chem>COc1nc(ccc1C(=O)Nc2nn[nH]2)C3=NN([C@H](C3)C4CCCC4)c5ccc(C#N)c(C)c5</chem>
9	CHEMBL 2181932	2,4	<chem>Cc1c(cnc(CCO)c1c2ccccc2C(F)(F)F)C(=O)Nc3ccc(cc3)S(=O)(=O)C</chem>
10	CHEMBL 3263760	2,7	<chem>COc1nc(ccc1C(=O)N)C2=NN([C@H](C2)C3CCCC3)c4ccc(C#N)c(C)c4</chem>
11	CHEMBL 3263766	2,8	<chem>COc1nc(ccc1C(=O)NS(=O)(=O)C)C2=NN([C@H](C2)C3CCCC3)c4ccc(C#N)c(C)c4</chem>
12	CHEMBL 4065788	3,1	<chem>C[C@H](O)Cc1cc(C(=O)Nc2ccc(cc2)S(=O)(=O)C)c(C)n1c3ccc(Cl)cc3C(F)(F)F</chem>
13	CHEMBL 3926496	3,3	<chem>C[C@@]12CCC(=O)C=C1[C@H]3C[C@H]3[C@H]4[C@H]2CC[C@]5(C)[C@@H]4[C@H]6C[C@H]6[C@]57CCC(=O)O7</chem>
14	CHEMBL 3263764	3,3	<chem>CNC(=O)c1ccc(nc1OC)C2=NN([C@H](C2)C3CCCC3)c4ccc(C#N)c(C)n4</chem>
15	CHEMBL 3263762	3,7	<chem>COc1nc(ccc1C(=O)N(C)C)C2=NN([C@H](C2)C3CCCC3)c4ccc(C#N)c(C)c4</chem>
16	CHEMBL 4064750	3,7	<chem>Cc1c(cc(CCO)n1c2ccc(Cl)cc2C(F)(F)F)C(=O)Nc3ccc(cc3)S(=O)(=O)C</chem>

17	CHEMBL 1097751	3,7	<chem>CC1=C(C#N)[C@H](C(=C(C)N1)C(=O)OC(C)(C)C)c2ccc(F)cc2Cl</chem>
18	CHEMBL 4078631	3,8	<chem>C[C@H](O)[C@@H](C)n1cc(C(=O)Nc2ccc(cc2)S(=O)(=O)C)c(C)c1c3ccc(F)cc3C(F)(F)F</chem>
19	CHEMBL 1215486	4	<chem>Cc1cc(ccc1C#N)N2N=C3[C@H](Cc4cc(ccc34)C(=O)O)[C@@H]2C5CCCC5</chem>
20	CHEMBL 3263767	4,1	<chem>COc1nc(ccc1C(=O)NS(=O)(=O)C)C2=NN([C@H](C2)C3CCCC3)c4ccc(C#N)c(C)n4</chem>
21	CHEMBL 3263763	4,3	<chem>COc1nc(ccc1C(=O)N)C2=NN([C@H](C2)C3CCCC3)c4ccc(C#N)c(C)n4</chem>
22	CHEMBL 3263757	4,4	<chem>CCOc1nc(ccc1C(=O)O)C2=NN([C@H](C2)C3CCCC3)c4ccc(C#N)c(C)c4</chem>
23	CHEMBL 3643690	4,7	<chem>Cc1cc(F)ccc1CCc2ccnc(NC(=O)N)c2</chem>
24	CHEMBL 3692351	5	<chem>CC[C@]12CC[C@H]3[C@@H](CC4=CC(=O)CC[C@H]34)[C@@H]1CC[C@]25OCC=C5</chem>
25	CHEMBL 1215197	6	<chem>CCOc1cc(ccc1C(=O)O)C2=NN([C@H](C2)C3CCCC3)c4ccc(C#N)c(Cl)c4</chem>
26	CHEMBL 4068898	6,5	<chem>Cc1c(cc(CCF)n1c2ccc(F)cc2OC(F)F)C(=O)Nc3ccc(cc3)S(=O)(=O)C</chem>
27	CHEMBL 1215487	7	<chem>COc1cc(ccc1C#N)N2N=C3[C@H](CCc4cc(ccc34)C(=O)O)[C@@H]2C5CCCC5</chem>
28	CHEMBL 4104632	7	<chem>CC(=O)C1=C(C)NC(=C([C@@H]1c2cccc3C(=O)C=C(C)Oc23)C(=O)OC4CCC4)C</chem>
29	CHEMBL 2181933	7,1	<chem>Cc1cccc1CCc2ccnc(NC(=O)N)c2</chem>
30	CHEMBL 3263754	7,6	<chem>COc1nc(ccc1C(=O)O)C2=NN([C@H](C2)C3CCCC3)c4ccc(C#N)c(C)n4</chem>
31	CHEMBL 263091	7,9,43	<chem>COc1ccc(F)cc1C(C)(C)CC(O)(C(=O)Nc2ccc3C(=O)ON=C(C)c3c2)C(F)(F)F</chem>
32	CHEMBL 3337825	8,4	<chem>Cc1nn(CCCC(F)(F)F)c(c2ccc(F)cc2)c1c3ccc4OCC(=O)Nc4c3</chem>
33	CHEMBL 1215552	9	<chem>COC(=O)C1=C(Cn2ccnc2)NC(=C(C#N)C1c3ccc(F)cc3Cl)C</chem>
34	CHEMBL 3263750	9	<chem>COc1cc(ccc1C(=O)O)C2=NN([C@H](C2)C3CCCC3)c4ccc(C#N)c(C)c4</chem>

35	CHEMBL 273453	9,268	<chem>C[C@]12CCC(=O)C=C1CC[C@H]3[C@@H]4CC[C@H](C(=O)CO)[C@]4(C[C@H](O)[C@H]23)C=O</chem>
36	CHEMBL 3643660	9,4	<chem>NC(=O)Nc1cc(ccn1)c2ccnn2c3ccc(Cl)cc3</chem>
37	CHEMBL 3263765	9,4	<chem>COc1nc(ccc1C(=O)N(C)C)C2=NN([C@H](C2)C3CCCC3)c4ccc(C#N)c(C)n4</chem>
38	CHEMBL 3940837	9,5	<chem>NC(=O)C[C@H]1COc2cc(Br)ccc2N1C(=O)c3ccc4OCC(=O)Nc4c3</chem>
39	CHEMBL 1094797	10	<chem>CCCC1=C([C@@H](C(=C(C)N1)C#N)c2ccnc3ccccc23)C(=O)OCC</chem>
40	CHEMBL 3910950	10	<chem>CNC(=O)CC1COc2cc(Br)ccc2N1C(=O)c3ccc4OCC(=O)Nc4c3</chem>
41	CHEMBL 3337831	10	<chem>Cc1nn(CCC(C)(F)F)c(c2ccc(F)cc2)c1c3ccc4OCC(=O)Nc4c3</chem>
42	CHEMBL 3263751	10,7	<chem>CCOc1cc(ccc1C(=O)O)C2=NN([C@H](C2)C3CCCC3)c4ccc(C#N)c(C)c4</chem>
43	CHEMBL 3643674	11	<chem>CC(Cc1ccnc(NC(=O)N)c1)c2ccccc2C</chem>
44	CHEMBL 1929041	12	<chem>Cc1cc(F)ccc1n2nc(cc2c3cc(Cl)c4OCC(=O)Nc4c3)C(F)(F)F</chem>
45	CHEMBL 3643686	13	<chem>NC(=O)Nc1cc(CCc2ccccc2C(F)(F)F)ccn1</chem>
46	CHEMBL 4086109	13	<chem>C[C@@H]1CN([C@@H](CO1)c2ccccc2F)c3ccc4OCC(=O)Nc4n3</chem>
47	CHEMBL 3643658	14	<chem>Cc1ccc(cc1)n2nccc2c3ccnc(NC(=O)N)c3</chem>
48	CHEMBL 2407646	14	<chem>COc1cc(CNC(=O)[C@@]2(Cc3ccccc3)OC(=O)N([C@H](C)C4CCCC4)C2=O)cc(OC)c1</chem>
49	CHEMBL 3337823	22	<chem>CCCCn1nc(C)c(c2ccc3OCC(=O)Nc3c2)c1c4ccc(F)cc4</chem>
50	CHEMBL 3643675	22	<chem>Cc1ccccc1C(Cc2ccnc(NC(=O)N)c2)C3CC3</chem>

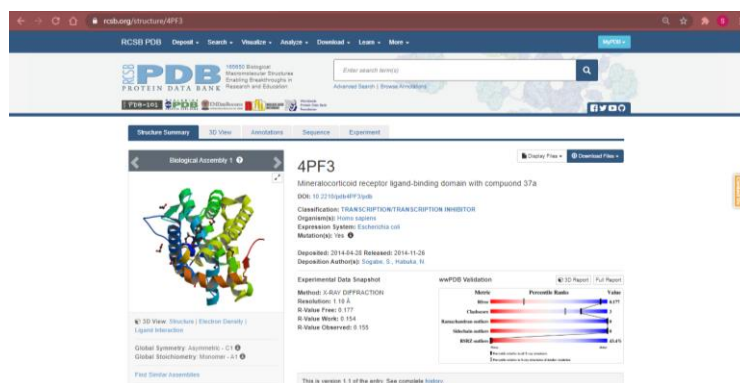
Lampiran 2 Rincian prosedur penelitian

1. Persiapan struktur target protein

Dilakukan pengunduhan struktur target reseptor mineralokortikoid dari situs web Protein Data Bank <https://www.rcsb.org/>. Dipilih berdasarkan kriteria seperti:

- untuk penyakit hipertensi,
- bekerja sebagai antagonis,
- organisme nya *Homo Sapiens*,
- metode yang digunakan *X-Ray Diffraction*,
- resolusi kurang dari 2 Å.

Reseptor yang terpilih memiliki kode PDB ID 4PF3 dan diunduh dalam format file PDB (*.pdb).



Kemudian dilakukan pemisahan antara ligan dan reseptor menggunakan software Discovery Studio. Format untuk reseptor (*.pdb) dan ligan (*.mol2).

2. Persiapan database, dataset aktif dan dataset pengecoh (decoy) compound

a. Database

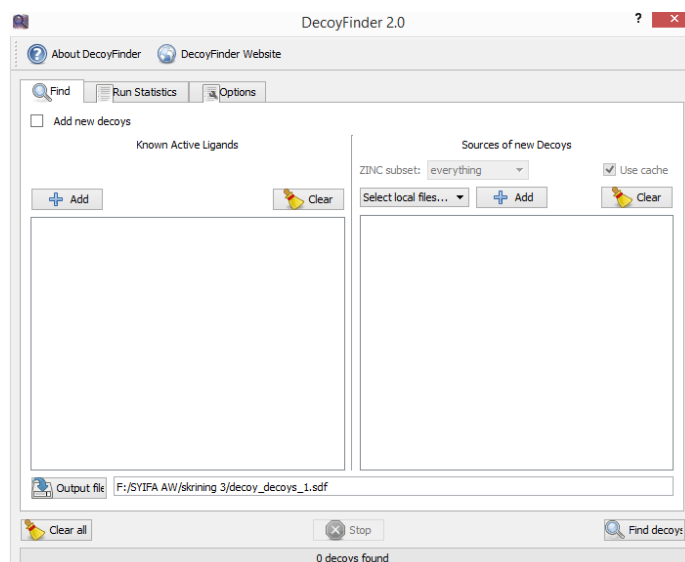
Digunakan database ZINC *Natural Product* berjumlah 153.837 senyawa dari 12 Database *Natural Product*. Diunduh pada situs web <http://www.zinc.docking.org> dengan format yang beragam termasuk SMILES, *.mol2, 3D SDF, dan format DOCK.

b. Pencarian senyawa aktif

Diunduh melalui *website* <http://www.ebi.ac.uk/chembl>. Pemilihan dataset aktif menggunakan senyawa aktif yang di dapat dari database ChEMBL. Kode senyawa ChEMBL yang digunakan untuk reseptor 4PF3 dipilih pada tab Target yang paling memenuhi syarat adalah ChEMBL1994 dengan 1.150 senyawa aktif diunduh berdasarkan nilai IC₅₀ dengan format *.csv.

c. Pencarian senyawa pengecoh (decoy)

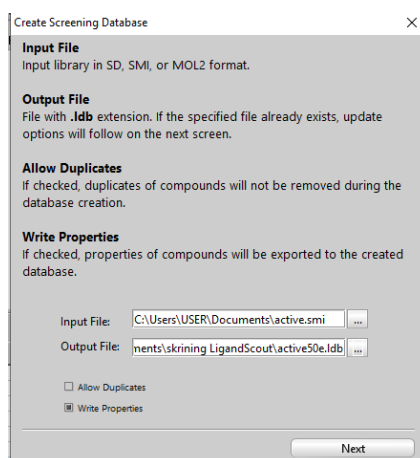
Dimasukkan 50 senyawa aktif dan database ZINC *Subset Clean Drug-Like* menggunakan *software* DecoyFinder. Kemudian diperoleh sebanyak 2.500 senyawa pengecoh. Disimpan dalam folder yang sama dengan format *.sdf. Untuk dataset aktif dimasukkan pada jendela **Known Active Ligands**, dan database pada jendela **Sources of new Decoys**.



1. Pharmacophore Modeling menggunakan LigandScout 4.0

a. Konversi *database active set compound* dan *decoy set compound*

Disesuaikan **Input File** dengan file yang akan dikonversi, dibuat tempat penyimpanan untuk hasil **Output File** dengan format *.ldb. Konversi dilakukan hanya per satu dataset, dilakukan prosedur yang sama untuk masing-masing dataset yang akan dikonversi.



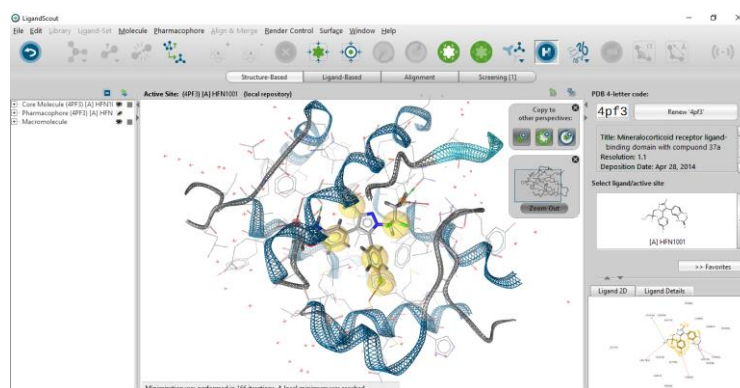
b. Pengunduhan PDB

Pada jendela **Structure Based** yang kosong, dimasukkan kode PDB: 4PF3 pada kolom PDB kemudian otomatis bagian jendela utama Structure Based akan menampilkan

struktur reseptor tersebut. Karena LigandScout 4.3 sudah terintegrasi langsung dengan pustaka RCSB tempat penyimpanan PDB.

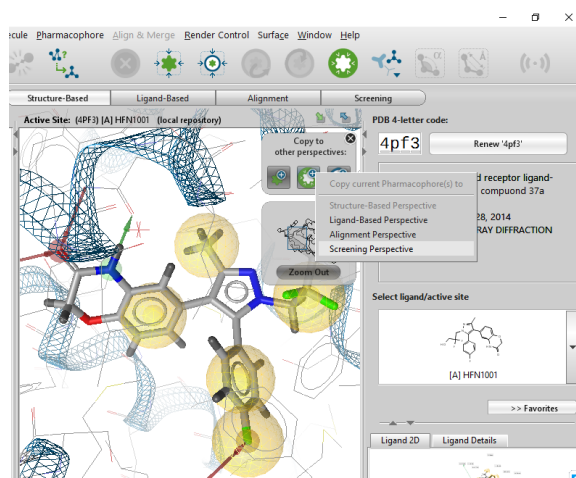
c. Optimasi Ligan Alami

Dipilih ligan alami yang akan digunakan dalam proses *virtual screening*. Dilakukan optimasi ligan tersebut dengan klik tab **Molecule** > **Minimize MMFF94 Energy of Molecule** yang merupakan optimasi geometri yang tersedia dalam LigandScout 4.0.

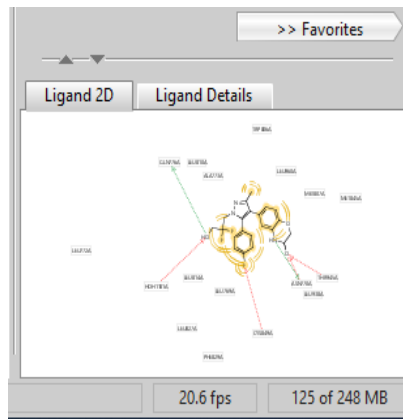


d. Pembuatan Fitur Farmakofor

Dibuat fitur farmakofor dari ligan alami yang sudah di optimasi. Klik tombol **Create pharmacophore** > **copy to screening perspective**.



Tampilan fitur-fitur farmakofor secara 3D dapat dilihat pada tampilan utama *LigandScout* di jendela **Structure Based**, sedangkan tampilan fitur-fitur farmakofor secara 2D dapat dilihat pada bagian bawah kanan di bagian **Ligand 2D**.



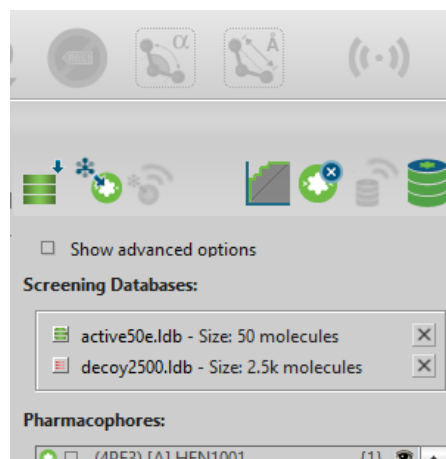
e. Penyimpanan Fitur Farmakofor

Disimpan fitur farmakofor dalam bentuk utuh dengan format 2 dimensi dan 3 dimensi.

f. Validasi Model Farmakofor

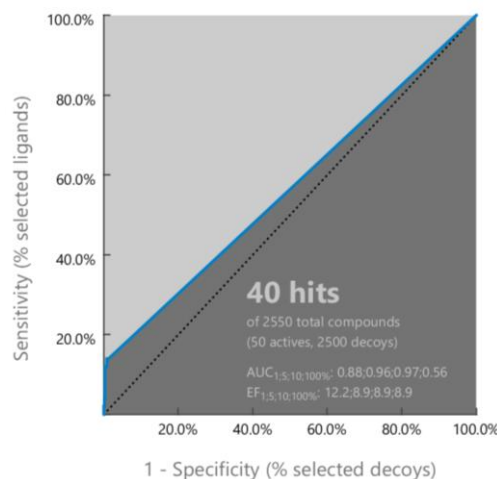
• Pencarian Kurva ROC

Dilakukan pencarian kurva ROC merupakan proses validasi dari metode ini. Skriningkan fitur farmakofor yang sudah dibuat terhadap *active set compound* yang ditandai dengan warna hijau dan *decoy set compound* yang ditandai dengan warna merah.



• Interpretasi Hasil Kurva ROC

Kurva ROC yang dipilih dan dinyatakan valid adalah kurva ROC dengan nilai AUC lebih dari 0,5 atau nilai EF lebih dari 1,0. Jika kedua parameter tersebut tidak terpenuhi, hapus beberapa fitur farmakofor dan ulangi pencarian kurva ROC sampai memenuhi persyaratan.

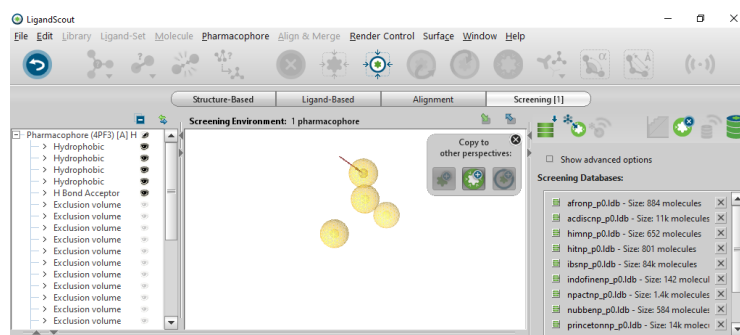


• Penyimpanan Hasil Kurva ROC

Disimpan hasil validasi metode dengan kurva ROC yang telah dinyatakan valid dalam empat bentuk, yaitu kurva ROC dalam bentuk gambar (PNG), visualisasi senyawa senyawa dalam bentuk gambar (PNG), bentuk senyawa dalam bentuk visualisasi molekul (SDF), dan simpan tabel hasil validasi tersebut (XLS).

g. Proses *Virtual Screening Database*

Dilakukan pengulangan validasi metode dengan fitur farmakofor yang memberikan kurva ROC terbaik. Skriningkan database uji terhadap fitur farmakofor yang sudah divalidasi.



h. Penyimpanan Hasil *Virtual Screening Database*

Disimpan dalam bentuk sesi (SES), hasil senyawanya dalam bentuk visualisasi molekul (SDF), dan tabel hasil tabel *virtual screening* (XLS).

i. Analisis Hasil *Virtual Screening Database*

Dianalisis hasilnya dilihat dari nilai *pharmacophore fit score* pada output Microsoft Excel, kemudian dibandingkan nilai *pharmacophore fit score* senyawa farmakofor pemandu yang sudah divalidasi.

PyRx Screening Tool

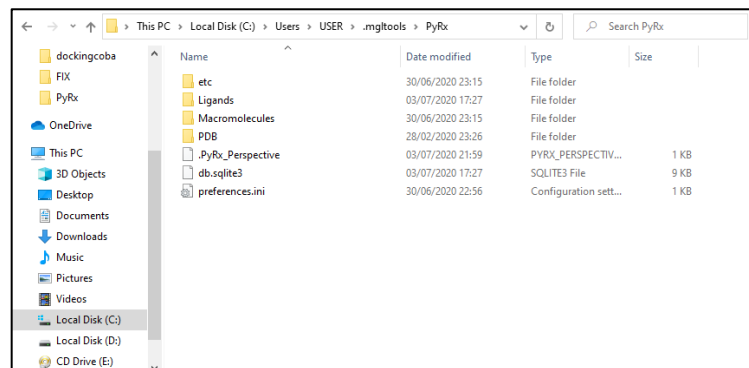
1. Menginstall PyRx

- a. Diunduh file setup PyRx melalui website PyRx (<http://pyrx.scripps.edu/>)
- b. Diunduh AutoDock 4.2 dan install pada (C:\Program Files (x86)\AutoDock) jangan pada (C:\Windows\system32)
- c. Unduh dan install PyRx 0.8 pada (C:\Program Files (x86)\PyRx)
- d. Mengganti file yang sesuai di (C:\Program Files (x86)\PyRx\Lib\site-packages\PyRx) dengan import-Wizard.py, dbPlot.py dan autodockNavigator.py
- e. Ketika PyRx akan dijalankan, pada menu Edit\Preferences atau lokasi AutoDock menjadi (C:\Program Files (x86)\AutoDock\autodock.exe) dan begitu juga untuk AutoGrid. Jika benar, tombol **Local** pada bagian bawah tab *AutoDock Wizard* akan tersedia dan dipilih selama *docking*.

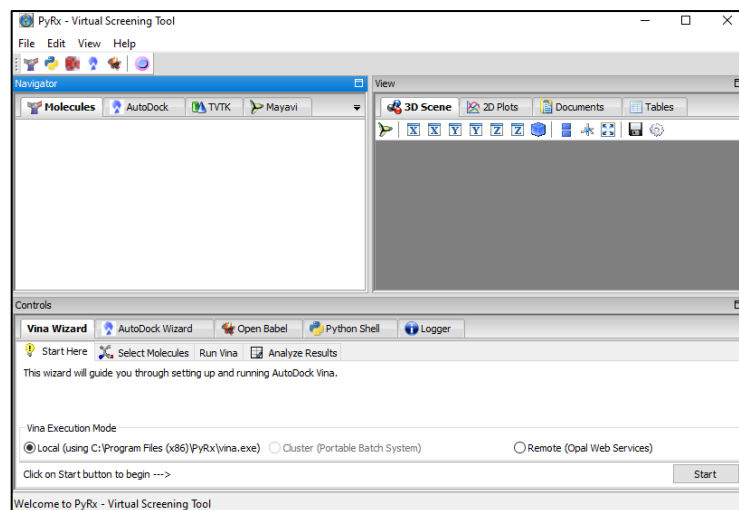
2. Menyiapkan file protein dan database senyawa

- a. Dibuka situs (<https://www.rcsb.org/>)
- b. Dicari dan diunduh reseptor dengan kode PDB: 4PF3 dalam bentuk *.pdb
- c. Dipersiapkan file database senyawa yaitu dataset senyawa aktif dan dataset senyawa pengecoh yang telah disiapkan.
- d. Dibuat file reseptor dengan reseptor yang telah dipisahkan dari ligannya

■ Folder untuk *output* PyRx



■ Tampilan awal PyRx

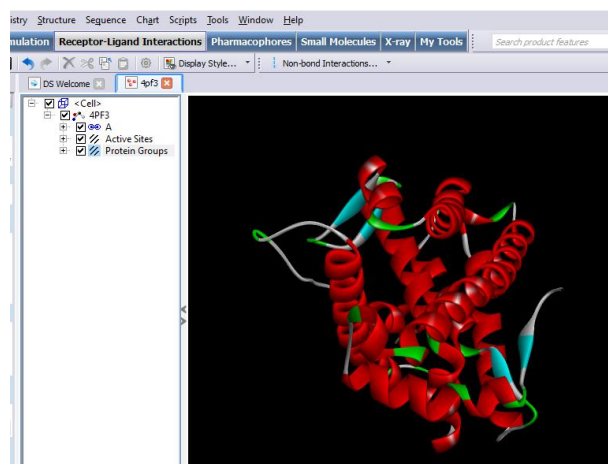


Docking ligan dengan PyRx

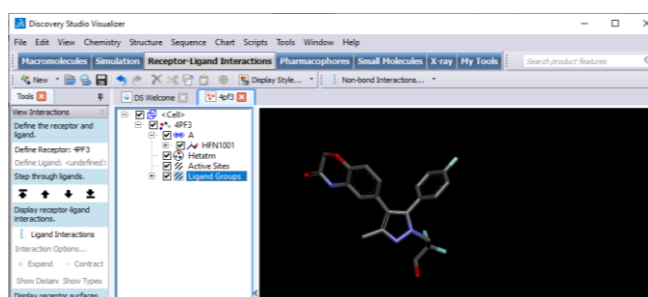
- Menyiapkan file reseptor dan ligan (dataset aktif, dataset decoy, dan database uji)
- Pemisahan struktur reseptor dengan ligan

Dilakukan pemisahan struktur reseptor dan ligan dengan bantuan aplikasi Discovery Studio. Untuk reseptor disimpan dalam format *.pdb dan untuk ligan *.mol2.

- Klik tab **View > hierarchy** untuk menampilkan jendela detail protein nya. Kemudian hapus molekul air terlebih dahulu dengan klik tab **Scripts > Selection > Select water molecules > Delete**. Yang pertama kita pisahkan proteinnya dulu dengan cara klik tab **Scripts > Selection > Select Ligands > Delete**. Simpan hasil protein yang telah dipisahkan dengan format *.pdb.



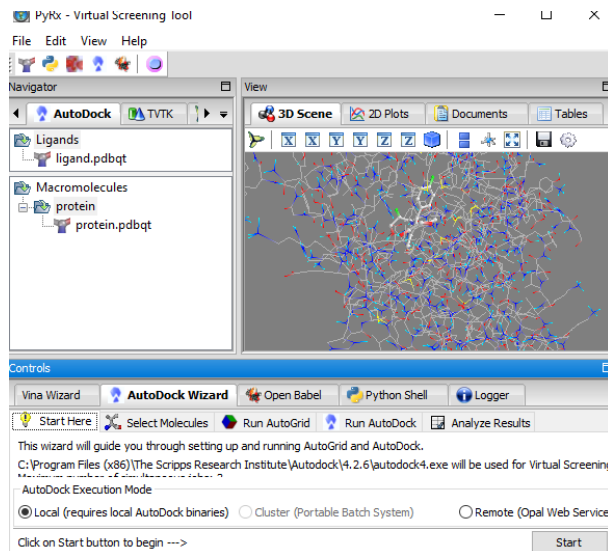
- Selanjutnya dipisahkan ligan nya dengan membuka protein dan ligan yang masih menyatu. Klik tab **Scripts > Selection > Select Protein > Delete**. Simpan hasil ligan yang telah dipisahkan dengan format *.mol2.



1. Lokasi target penambatan menggunakan autodock wizard

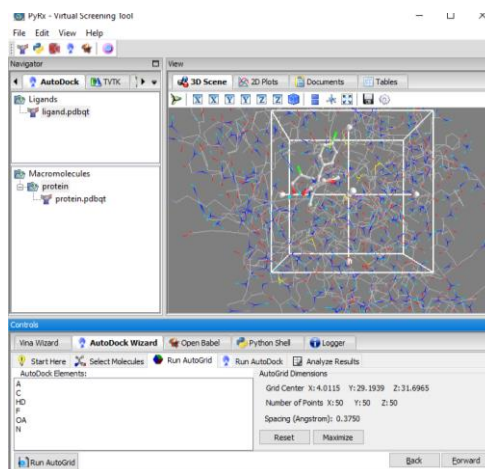
a. Input file makromolekul dan ligan

- Dilakukan konversi ligan alami yang telah dipisahkan melalui Open Babel yang tersedia secara default dalam PyRx 0.8. kemudian lakukan proses minimisasi energi menggunakan metode UFF yang tersedia.
- Dibuka ligand.mol2 melalui **File > Load Molecule**. Klik kanan pada ligan dibawah tab **Molecules** dan klik pada menu **AutoDock > Make Ligand**, menghasilkan file *.pdbqt dibawah folder **Ligands** pada tab **AutoDock**.
- Selanjutnya dibuka protein.pdb melalui **File > Load Molecule**. Klik kanan pada protein dibawah tab **Molecules** dan klik pada menu **AutoDock > Make Macromolecule**, akan menghasilkan file *.pdbqt dibawah folder **Macromolecule** pada tab **AutoDock**.
- Setelah dikonversi, akan terlihat di bawah tab **AutoDock** seperti ini.



b. Mengatur Autodock Search Space

- Setelah di input, lalu klik pada tombol **Start** dari **AutoDock Wizard**. Pilih ligand.pdbqt pada **Navigator > AutoDock > Ligand** dan klik **Forward**. Pilih protein dibawah folder **Macromolecules** lalu **Forward**.
- Terlihat halaman **Run AutoGrid** yang terdapat *Grid Box* secara tiga dimensi seperti ini:

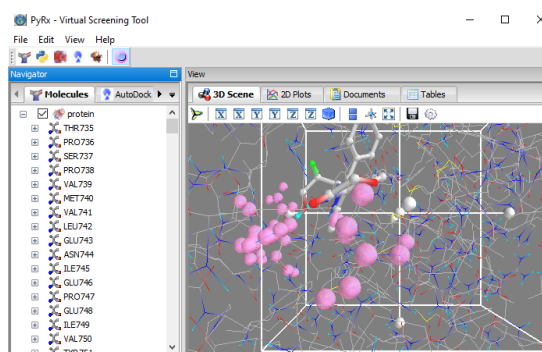


Grid Box ini memungkinkan mengatur *search space* (situs pengikatan/*binding site*) dalam protein.

- Diatur posisi kubus hingga didapat koordinat x, y, dan z yang sesuai untuk penambatan. Setelah mendapatkan koordinat yang sesuai, klik **Forward** untuk menjalankan **Autogrid**.
- Klik **Maximize** button jika ingin menyertakan seluruh molekul di dalam *Grid Box*. Klik **Reset** jika ingin mengembalikan ukuran gridbox secara default yaitu 40x40x40

dan mereset pusat *Gridbox* menjadi *center of the molecule*. Klik **Forward** untuk melanjutkan.

- Gunakan gagang bola dari *Grid Box* untuk memilih ruang pencarian atau *search space*.
- Dipilih ukuran *Grid Box* yang cukup besar agar ligan bergerak bebas dalam *search space*.
- Untuk menemukan situs pengikatan atau situs aktif dapat menggunakan asam amino situs pengikatan (dalam protein ini Asn770, Asn770, Gln776, Thr945 adalah asam amino situs aktif).
- Klik tombol molekul di bawah panel **Navigator**, lalu klik tombol + yang terletak di depan tab **Protein**. Pilih beberapa asam amino situs aktif dengan menggunakan tombol **CTRL** untuk memilihnya, lalu klik tombol **Toggle Selection Spheres** untuk melihat pada jendela bahwa asam amino yang terpilih berbentuk bola merah muda.



c. Memilih Parameter Docking

- Klik **Parameter Docking** pada tab **Run AutoDock** untuk melihat parameter yang dapat diubah. Dipilih **Lamarckian Genetic Algorithm**.
- PyRx 0.8 merupakan *software free license*, semua pilihan pada jendela **Lamarckian Genetic Algorithm Parameters** tidak bisa diatur lagi dan sudah menjadi *default*, kemudian jalankan **AutoDock**.

d. Analisis hasil docking

Pada halaman **Analyze Results** yang berisi tabel, hasil *docking* juga dapat di *export* berupa hasil numerik sebagai file *Comma-Separated Values* (CSV). Untuk menganalisis hasil docking, dapat dilihat tabel RMSD pada file *.dlg hasil *redocking* dan pastikan apakah nilainya sudah memenuhi syarat atau tidak. Jika nilai RMSD > 2,0; maka perlu mengulangi *redocking* dengan mengatur kembali **Search Space** dari *Grid Box*.

Sebelum lanjut, semua file output di **Analyze Result** dihapus dari *workspace*. Kemudian Klik tab **Autodock** pada jendela **Navigator** dan gunakan **Shift + the mouse** untuk memilih semua file dalam folder ligan. **Klik kanan > Delete > Yes** untuk konfirmasi.

2. Lokasi target penambatan menggunakan *Vina Wizard*

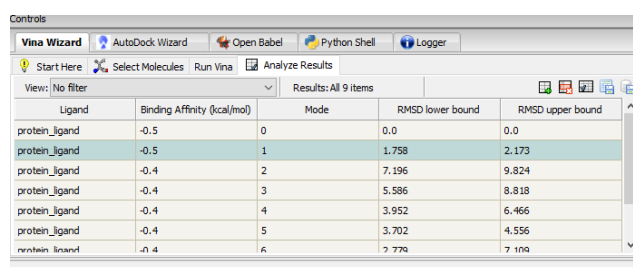
a. Input file makromolekul dan ligand

- Dibuka ligand.mol2 melalui **File > Load Molecule**. Klik kanan pada ligan dibawah tab **Molecules** dan klik pada menu **AutoDock > Make Ligand**, menghasilkan file *.pdbqt dibawah folder **Ligands** pada tab **AutoDock**.
- Selanjutnya dibuka protein.pdb melalui **File > Load Molecule**. Klik kanan pada protein dibawah tab **Molecules** dan klik pada menu **AutoDock > Make Macromolecule**, akan menghasilkan file *.pdbqt dibawah folder **Macromolecule** pada tab **AutoDock**.

b. Memilih *AutoDock Search Space*

- Setelah di input, lalu klik pada tombol **Start** dari **Vina Wizard**. Pilih ligand.pdbqt pada **Navigator > AutoDock > Ligand** dan klik **Forward**. Pilih protein dibawah folder **Macromolecules** lalu **Forward**.
- Terlihat halaman **Run Vina** yang terdapat *Grid Box* secara tiga dimensi.
- Diatur posisi kubus hingga didapat koordinat x, y, dan z yang sesuai untuk penambatan. Spacing yang digunakan oleh *docking* menggunakan *Vina Wizard* adalah 1,000 Å. Lalu, klik **Forward** untuk melanjutkan.
 - Gunakan gagang bola dari *Grid Box* untuk memilih ruang pencarian atau search space.
 - Dipilih ukuran *Grid Box* yang cukup besar agar ligan bergerak bebas dalam *search space*.
 - Untuk menemukan situs pengikatan atau situs aktif dapat menggunakan asam amino situs pengikatan (dalam protein ini Asn770, Asn770, Gln776, Thr945 adalah asam amino situs aktif).
 - Klik tombol molekul di bawah panel **Navigator**, lalu klik tombol + yang terletak di depan tab **protein**. Pilih beberapa asam amino situs aktif dengan menggunakan tombol **CTRL** untuk memilihnya, lalu klik tombol **Toggle Selection Spheres** untuk melihat pada jendela bahwa asam amino yang terpilih berbentuk bola merah muda.

- Setelah mendapatkan koordinat yang sesuai, klik **Forward** untuk menjalankan **Run Vina**.
 - Setelah perhitungan selesai, pada **Analyze Result** terlihat tabel di dengan nilai **Binding Affinity** (kcal/mol).
- c. Menganalisis Hasil Docking**
- Halaman **Analyze Results** adalah tempat hasil akhir *docking* disajikan. Untuk *Vina Wizard*, halaman ini berisi tabel. Hasil *docking* juga dapat di *export* berupa hasil numerik sebagai file **Comma-Separated Values (CSV)**.



Ligand	Binding Affinity (kcal/mol)	Mode	RMSD lower bound	RMSD upper bound
protein_ligand	-0.5	0	0.0	0.0
protein_ligand	-0.5	1	1.758	2.173
protein_ligand	-0.4	2	7.196	9.824
protein_ligand	-0.4	3	5.586	8.818
protein_ligand	-0.4	4	3.952	6.466
protein_ligand	-0.4	5	3.702	4.556
protein_ligand	-0.4	6	7.770	7.100

Sebelum lanjut, semua file output di **Analyze Result** dihapus dari *workspace*. Kemudian klik tab **Autodock** pada jendela **Navigator** dan gunakan **Shift + the mouse** untuk memilih semua file dalam folder ligan. **Klik kanan > Delete > Yes** untuk konfirmasi.

d. Menganalisis Hasil Docking: Validasi

Dibuka Discovery Studio 2016, masukkan **file** hasil senyawa dengan yang memiliki konformasi terbaik yang sudah dipisahkan dalam format ***.pdb**. Masukkan juga file ligan alami dengan format ***.pdbqt** kedalam satu jendela yang sama dalam Discovery Studio 2016. Klik **Structure > RMSD > All atoms**. Hasil RMSD akan ditampilkan pada jendela **Discovery Studio 2016** sebelah kanan.

Penapisan virtual berbasis docking

1. Penapisan virtual dengan Vina Wizard

a. Memasukan file makromolekul dan ligan

- Dilakukan tahapan yang hampir sama dengan tahapan dalam melakukan lokasi target penambatan dengan *vina wizard* tetapi ada beberapa perbedaan dalam **file input**. Untuk *virtual screening*, file input ligan mengandung sejumlah senyawa yang disebut dengan database.
 - Database ini berupa dataset senyawa aktif, dan dataset senyawa pengecoh (decoy).
- Klik tab **Open Babel** dibawah panel **Controls**. Klik pada icon pertama pada *toolbar*, dan buka file database ligan. **Klik kanan** pada ligan apapun di dalam widget **Open**

Babel dan pilih **Convert All to AutoDock Ligand (pdbqt)**. Akan terbuka kotak dialog progres dan file *.pdbqt yang dibuat di folder **Ligand**.

b. Memasukan nilai *search space*

- Nilai *Search Space* atau *gridbox* digunakan dari nilai yang telah ditentukan melalui validasi *docking* lokasi target penambatan menggunakan *vina wizard*.
- Klik pada tombol **Maximize** untuk membuat *search space* cukup besar untuk memasukkan semua atom dari target reseptor.
- Klik pada **Analyze Results** untuk melihat **Vina results** yang terbentuk. PyRx memungkinkan modus eksekusi *Cluster* di halaman awal.

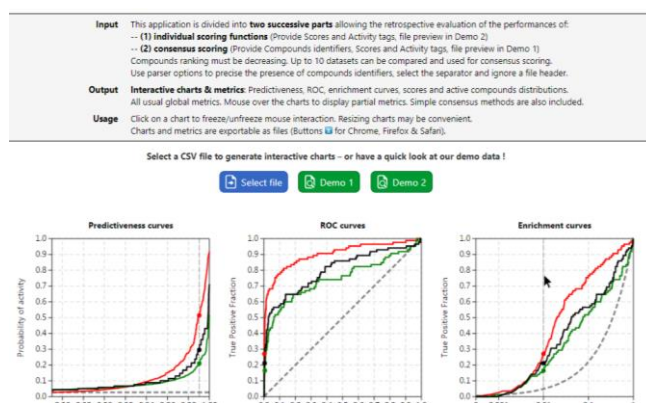
c. Validasi *virtual screening*

- Dilakukan validasi dengan bantuan website : <http://stats.drugdesign.fr/> dengan memasukkan file *.txt atau *.csv hasil validasi yang isinya telah dimodifikasi dengan format:

Binding Affinity<spasi>0 untuk senyawa *decoy*

Binding Affinity<spasi>1 untuk senyawa aktif

- Diurutkan nilai binding affinity dari terbesar sampai terkecil



2. Penapisan virtual dengan *Autodock Wizard*

a. Memasukan file makromolekul dan ligand

- Dilakukan tahapan yang sama dengan tahapan dalam melakukan penapisan virtual dengan *Vina Wizard*. Terdapat perbedaan hanya pada analisis hasil skriningnya saja.

b. Memasukan nilai *search space*

- Nilai *Search Space* atau *gridbox* digunakan dari nilai yang telah ditentukan melalui validasi *docking* lokasi target penambatan menggunakan *autodock wizard*.
- Klik pada tombol **Maximize** untuk membuat *search space* cukup besar untuk memasukkan semua atom dari target reseptor.

c. Validasi virtual screening

- Klik pada **Analyze Results** untuk melihat **Autodock results** yang terbentuk. PyRx memungkinkan modus eksekusi *Cluster* di halaman awal.
- Dilakukan validasi dengan bantuan website : <http://stats.drugdesign.fr/> dan masukkan file *.txt atau *.csv hasil validasi yang isinya telah dimodifikasi dengan format:
Binding Energy<spasi>0 untuk senyawa *decoy*
Binding Energy<spasi>1 untuk senyawa aktif
- Diurutkan nilai *binding energy* dari terbesar sampai terkecil

Penapisan virtual database berbasis *docking*

1. Penapisan virtual database dengan *Vina Wizard*

a. Memasukan file makromolekul dan ligan

- Tahapan yang dilakukan hampir sama dengan tahapan dalam melakukan penapisan dengan *vina wizard* tetapi ada beberapa perbedaan dalam **file input**. Untuk *virtual screening* database, file input ligan mengandung sejumlah senyawa yang disebut dengan database.
 - Database ini berupa database bahan alam yaitu *ZINC Natural Product*.
- Klik tab **Open Babel** dibawah panel **Controls**. Klik pada icon pertama pada toolbar, dan buka file database ligan. **Klik kanan** pada ligand apapun di dalam *widget* Open Babel dan pilih **Convert All to AutoDock Ligand (pdbqt)**. Akan terbuka kotak dialog progres dan file *.pdbqt yang dibuat di folder **Ligand**.

2. Memasukan nilai *search space*

- Nilai *Search Space* atau *gridbox* digunakan dari nilai yang telah ditentukan melalui validasi *docking* penapisan virtual menggunakan *vina wizard*.
- Klik pada tombol **Maximize** untuk membuat *search space* cukup besar untuk memasukkan semua atom dari target reseptor.
- Klik pada **Analyze Results** untuk melihat **Vina results** yang terbentuk. Simpan hasil outputnya dengan format *.csv.

3. Validasi penapisan virtual

- Validasi dilakukan dengan melihat nilai *Binding Affinity* pada file *.csv yang terkecil dari nilai *Binding Affinity* dan dilihat berasal dari database mana.

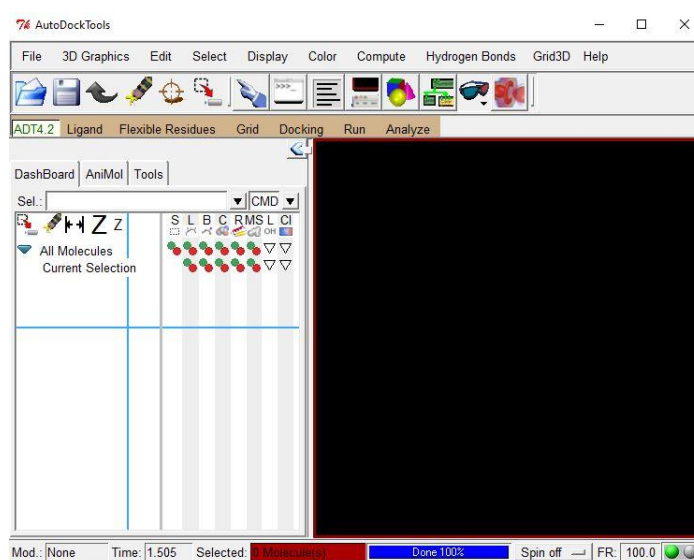
- Jika hasil dari *Vina* masih lebih dari 100 maka dilanjutkan dengan penapisan virtual database berbasis *docking* dengan tahapan yang sama seperti sebelumnya.

Interaksi senyawa uji terbaik

Dilakukan interaksi dan visualisasi untuk mendapatkan senyawa terbaik yaitu senyawa yang memiliki nilai energi ikatan yang paling kecil dan memiliki konstanta inhibisi yang lebih rendah dari ligan alami.

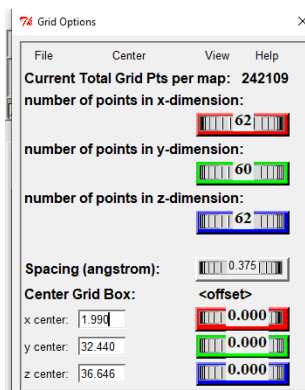
Hasil skrining senyawa uji yang didapatkan dari penapisan virtual berbasis *docking* menggunakan *autodock wizard* dilakukan *docking* pada *software* AutoDock Tools yang pada akhirnya dipilih beberapa kandidat senyawa terbaik.

Perangkat lunak Autodock Tools.4.2.3.

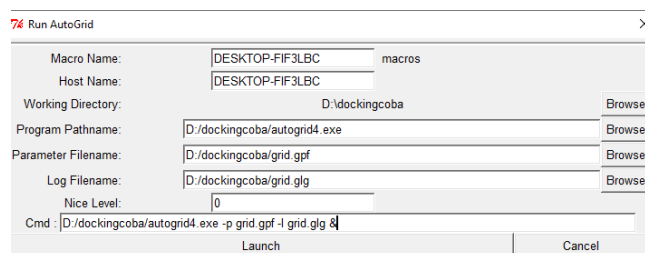


- Dilakukan pengaturan tempat folder kerja untuk mempermudah mencari dan menemukan file, dengan cara klik menu **File > Preference > Set**. Pada kotak dialog **Set User Preferences** bagian **Startup Directory** disesuaikan dengan alamat folder kerja, kemudian dipilih **Set > Dismiss**.
- Dibuka file reseptor yang sudah dipisahkan dari ligan alaminya, dengan cara klik **File > Read Molecule**. Kemudian dipilih file reseptor dengan format *.pdb. Dilakukan penambahan atom hidrogen pada reseptor dengan cara dipilih menu **Edit > Hydrogens > Add**. Dipilih **Polar Only > Ok**. Dipilih kembali menu **Edit > Hydrogens > Merge Non-Polar**.

- Diinput file ligan dalam format *.mol2, dengan cara dipilih tab **Ligand > Input > Open**. Dipilih file ligan yang sudah disiapkan. Kemudian dilakukan penentuan sudut torsi pada ligan yang dapat berotasi dengan cara klik tab **Ligand > Torsion Tree > Detect Root**. Dipilih kembali menu **Ligand > Torsion Tree > Choose Torsion**. Dipastikan jumlah ikatan yang berotasi maksimum, namun tidak melebihi 32. Kemudian dipilih **Done**. Persiapan ligan disimpan cara klik tab **Ligand > Output > Save dalam format *.pdbqt**.
- Dilakukan penentuan *grid box* dengan cara klik tab **Grid > Macromolecule > Choose**, kemudian disimpan file reseptor dalam format **PDBQT**. Dipilih kembali tab **Grid > Set Map Types > Choose Ligand**, dipilih file ligan > **Select Ligand**. Selanjutnya, klik tab **Grid > Grid Box**. Ukuran dan posisi *grid box* disesuaikan dengan posisi pada lokasi target penambatan *Autodock Wizard* dengan PyRx. Jika sudah selesai diatur, klik **File > Close Saving Current**. Kemudian dipilih kembali tab **Grid > Output > Save GPF**. File parameter *grid* disimpan dengan format GPF (*extension .gpf* ditulis manual).



- Program *autogrid* dijalankan dengan cara klik **Run > Run Autogrid**. Pada kotak dialog **Run Autogrid** bagian **Program Pathname > Browse > autogrid4.exe**, pada bagian **Parameter Filename > Browse > grid.gpf**. Secara otomatis pada bagian **Log Filename** akan muncul sebagai file outputnya. Pada bagian **Cmd**, dihapus alamat folder kerja pada bagian *.gpf dan *.glg. Dipilih **Launch**, ditunggu sampai kotak dialog **Autodock Process Manager** menghilang.



- Output **Autogrid** dapat dilihat dari file ***.glg** di folder kerja dengan menggunakan **Notepad**. **Autogrid** dikatakan berhasil apabila terdapat tulisan **Successful Completion**.

		(kcal/mol)	(kcal/mol)
1	A	-0.87	4.00e+005
2	C	-0.97	4.00e+005
3	HD	-0.72	2.00e+005
4	OA	-2.05	3.46e+005
5	N	-1.05	3.88e+005
6	e	-35.56	3.06e+001
7	d	0.00	1.66e+000

Electrostatic Potential
Desolvation Potential

* Note: Every pairwise-atomic interaction was clamped at 100000.00

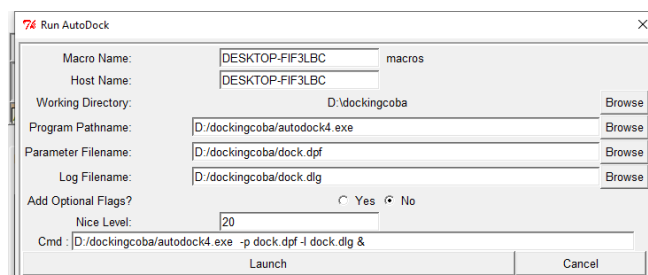
D:/dockingcoba/autogrid4.exe: **Successful Completion**
Real= 1m 56.39s, CPU= 1m 18.44s, System= 1.03s

- Dilakukan proses *docking* ligand terhadap reseptor target dengan cara klik **Docking > Macromolecule > Set Rigid Filename**, dipilih file reseptor dalam format PDBQT > **Open**. Dipilih lagi tab **Docking > Ligand > Choose**, dipilih file **ligan > Select Ligand > Accept**. Dilakukan pengaturan parameter *docking* dengan cara dipilih kembali tab **Docking > Search Parameter > Genetic Algorithm**. Pada kotak dialog **Genetic Algorithm Parameters** bagian **Number of GA Runs** di isi 10, pada bagian **Population Size** di isi 150 dan pada bagian **Maximum Number of evals** dipilih **medium**. Bagian yang lain dibiarkan *default*. Kemudian dipilih **Accept**.

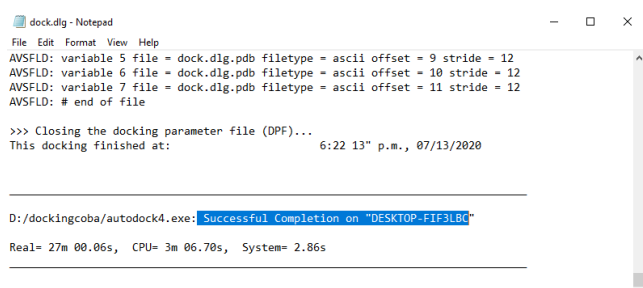
Genetic Algorithm Parameters

Number of GA Runs: 10
Population Size: 150
Maximum Number of evals: medium (2500000)
Maximum Number of generations: 27000
Maximum Number of top individuals that automatically survive: 1
Rate of Gene Mutation: 0.02
Rate of Crossover: 0.8
GA Crossover mode: twopt
Mean of Cauchy distribution for gene mutation: 0.0
Variance of Cauchy distribution for gene mutation: 1.0
Number of generations for picking worst individual: 10
Accept Close

- Klik tab **Docking > Docking Parameters > Accept**. Lalu, file parameter *docking* disimpan, klik tab **Docking > Output > Lamarckian GA**. File disimpan dengan format DPF (*extension .dpf* ditulis manual).
- Program *autodock* dijalankan dengan cara klik tab **Run > Run Autodock**. Pada kotak dialog **Run Autodock** bagian **Program Pathname > Browse > autodock.exe**, pada bagian **Parameter Filename > Browse > dock.dpf**. Secara otomatis pada bagian **Log Filename** akan muncul sebagai file outputnya. Pada bagian **Cmd**, dihapus alamat folder kerja pada bagian ***.dpf** dan ***.dlg**. Dipilih **Launch**, kemudian ditunggu sampai kotak dialog **Autodock Process Manager** menghilang.



- Output **Autodock** dapat dilihat dari file ***.dlg** di folder kerja dengan menggunakan **Notepad**. **Autodock** dikatakan berhasil apabila terdapat tulisan **Successful Completion**.



- Analisis hasil validasi *docking* dilihat dari nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) < 2 Å pada file output ***.dlg**.

Rank	Sub-Rank	Run	Binding Energy	Cluster RMSD	Reference RMSD	Grep Pattern
1	1	1	-10.81	0.00	0.53	RANKING
1	2	2	-10.74	0.97	0.95	RANKING
1	3	4	-10.73	0.37	0.33	RANKING
1	4	10	-10.73	0.29	0.57	RANKING
1	5	7	-10.70	0.99	0.96	RANKING
1	6	6	-10.56	0.61	0.61	RANKING
1	7	8	-10.36	1.12	0.99	RANKING
1	8	3	-10.26	1.09	1.10	RANKING
1	9	9	-9.84	1.76	1.55	RANKING
2	1	5	-9.72	0.00	2.15	RANKING

- Sedangkan analisis hasil *docking* senyawa uji dilihat dari nilai **Free Energy of Binding** dan **Inhibition Constant** pada file output ***.dlg**.

```

MODEL      1
USER       Run = 1
USER       Cluster Rank = 1
USER       Number of conformations in this cluster = 9
USER
USER       RMSD from reference structure      = 0.526 Å
USER
USER       Estimated Free Energy of Binding   = -10.81 kcal/mol  [-(1)*(2)*(3)-(4)]
USER       Estimated Inhibition Constant, Ki = -11.94 nM (nanomolar)  [Temperature = 298.15 K]
USER
USER       (1) Final Intermolecular Energy   = -13.20 kcal/mol
USER       vdW + Hbond + desolv Energy       = -13.10 kcal/mol
USER       Electrostatic Energy              = -0.09 kcal/mol
USER       (2) Final Total Internal Energy   = -1.92 kcal/mol
USER       (3) Torsional Free Energy         = +2.39 kcal/mol
USER       (4) Unbound System's Energy      [-(2)] = -1.92 kcal/mol
USER

```

- Untuk mengetahui interaksi ikatan yang terjadi pada konformasi terbaik dari hasil *docking* dilakukan dengan cara dibuka hasil *docking* senyawa uji pada file ***.dlg**, kemudian dipilih model konformasi dengan energi terendah.

