

## BAB III METODE PENELITIAN

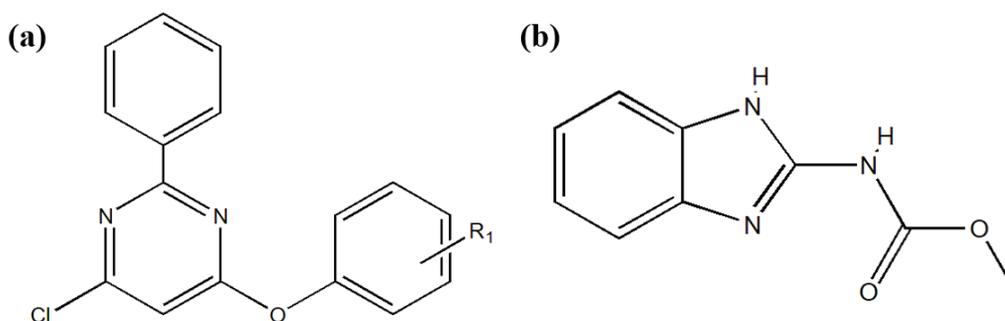
### 3.1 Alat dan Bahan

#### 3.1.1 Alat

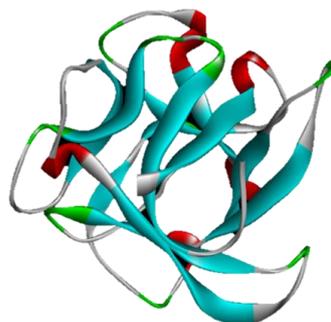
Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu komputer dengan spesifikasi Intel® Core™ i5-5200U CPU @ 2.20 GHz, RAM 4GB, dan penyimpanan internal. Situs yang digunakan adalah <https://graphonline.ru/en/>. Perangkat lunak yang digunakan adalah BuildQSAR, Microsoft Excel, ipython, Avogadro, Chemdraw, Autodock Vina, dan Biovia Discovery Visualizer.

#### 3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah data struktur dari 27 senyawa turunan fenilpirimidin dan data aktivitas nilai EC<sub>50</sub> sebagai antijamur *S. sclerotiorum*. Kerangka utama dari 27 senyawa turunan fenilpirimidin ditunjukkan pada Gambar 3.1.(a). Data struktur senyawa dan aktivitasnya ditunjukkan pada Tabel 3.1 yang diambil dari hasil penelitian Deng, *et al.*, (2020). Selanjutnya, nomor atom, nomor massa, elektronegativitas, dan jari-jari masing-masing atom yang ada di turunan fenilpirimidin ditunjukkan pada Tabel 3.2. Pada *molecular docking*, bahan yang dibutuhkan adalah struktur antijamur komersial karbendazim yang ditunjukkan pada Gambar 3.1.(b) dan kristal *S. sclerotiorum* dengan pdb id 2x2t yang ditunjukkan pada Gambar 3.2.



**Gambar 3.1** Kerangka utama struktur senyawa fenilpirimidin (a) dan struktur karbendazim



**Gambar 3.2** Struktur tiga dimensi *S. sclerotiorum* yang sudah dipreparasi

Berikut ditampilkan data struktur fenilpirimidin dan aktivitasnya.

**Tabel 3.1.** Data struktur Fenilpirimidin dan aktivitasnya (Deng, *Xet al.*, 2020).

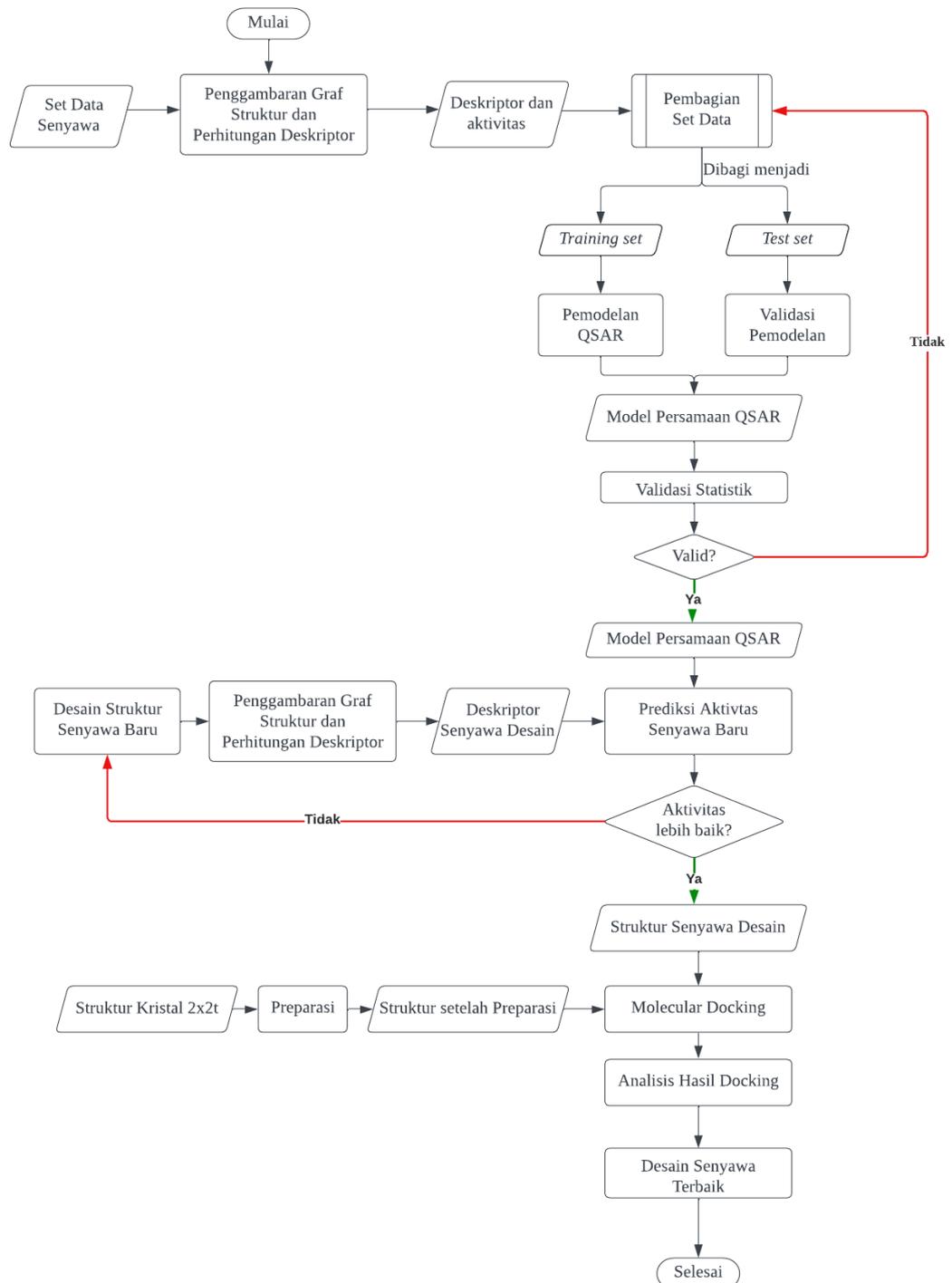
No.	Kode Senyawa	R	EC <sub>50</sub>	No.	Kode Senyawa	R	EC <sub>50</sub>
1.	S1	-H	1,63	15.	S15	4-Br	16,3
2.	S2	2-CH <sub>3</sub>	2,93	16.	S16	2-F	20,6
3.	S3	3-CH <sub>3</sub>	10,61	17.	S17	3-F	2,02
4.	S4	4-CH <sub>3</sub>	1,72	18.	S18	4-F	13,15
5.	S5	2-OCH <sub>3</sub>	6,19	19.	S19	2-CN	1,84
6.	S6	3-OCH <sub>3</sub>	2,25	20.	S20	3-CN	6,23
7.	S7	4-OCH <sub>3</sub>	4,63	21.	S21	4-CN	14,63
8.	S8	2-COOCH <sub>3</sub>	10,02	22.	S22	2-CF <sub>3</sub>	12,39
9.	S9	3-COOCH <sub>3</sub>	6,58	23.	S23	3-CF <sub>3</sub>	15,20
10.	S10	4-COOCH <sub>3</sub>	7,92	24.	S24	4-CF <sub>3</sub>	33,17
11.	S11	2-Cl	0,93	25.	S25	3,5-CH <sub>3</sub>	17,80
12.	S12	4-Cl	6,89	26.	S26	3,5-OCH <sub>3</sub>	24,08
13.	S13	2-Br	8,34	27.	S27	3,5-CN	9,24
14.	S14	3-Br	11,92				

**Tabel 3.2.** Data nomor atom, nomor massa, elektronegativitas, dan jari-jari unsur yang ada pada struktur fenilpirimidin

No	Unsur	Nomor Atom	Nomor Massa	Elektronegativitas (Pauling)	Jari-jari (pm)
1.	H	1	1	2,20	25
2.	C	6	12	2,55	70
3.	N	7	14	3,04	65
4.	O	8	16	3,44	60
5.	Cl	17	35	3,16	100
6.	Br	35	80	2,92	115

### 3.2 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini secara garis besar ditunjukkan pada Gambar 3.3.



**Gambar 3.3** Bagan alir proses penelitian

### 3.2.1 Struktur Senyawa dan Perhitungan Deskriptor

Sebanyak 27 struktur senyawa turunan fenilpirimidin dan aktivitas EC<sub>50</sub> diperoleh dari penelitian (Deng, *Xet al.*, 2020). Struktur senyawa tersebut digambar menggunakan graf melalui <https://graphonline.ru/en/>. Hasil dari gambar struktur kemudian diambil nilai *adjacency matrix*. Matrix ini kemudian diubah menjadi perintah untuk mencari nilai eigen dengan bantuan Microsoft Word. Ipython untuk mendapatkan nilai eigen yang digunakan untuk menghitung deskriptor. Perhitungan deskriptor dilakukan dengan menggunakan Microsoft Excel dengan rumus berikut:

$$\chi(n) = \sum_k |\lambda_k|^n$$

$\chi$  = deskriptor

$n$  = -3 sampai 3

$\lambda$  = nilai eigen

Deskriptor yang didapat dari perhitungan deskriptor dinamai dengan EV<sub>n</sub>x. EV berasal dari *eigen value* yaitu nilai yang digunakan untuk menghitung deskriptor.  $n$  menunjukkan sifat yang masing-masing telah ditunjukkan pada Tabel 3.2. Kemudian  $x$  menunjukkan pangkat dari -3 hingga 3.

### 3.2.2 Pembuatan dan Validasi Model QSAR

Sebanyak 27 struktur senyawa turunan fenilpirimidin dibagi menjadi *training set* dan *test set*. Pemisahan yang digunakan adalah *training set* sebanyak 21 senyawa atau 78% dan *test set* sebanyak 6 senyawa atau 22%. Pemisahan ini sesuai dengan kondisi optimal pemisahan untuk QSAR (Racz *et al.*, 2021). *Training set* digunakan untuk mencari persamaan QSAR, sedangkan *test set* digunakan untuk memvalidasi persamaan QSAR yang telah ditemukan. Pemodelan QSAR digunakan perangkat lunak BuildQSAR dengan regresi MLR. Algoritma yang digunakan untuk mencari persamaan yang dipakai adalah *genetic algorithm*.

Validasi model QSAR dilakukan pada persamaan QSAR terbaik yang telah didapat dengan cara mensubstitusi nilai deskriptor dari *test set* untuk mendapat nilai aktivitas prediksi. Kemudian nilai prediksi dan hasil eksperimen dibandingkan. Terdapat beberapa parameter yang harus dipenuhi dalam pemodelan persamaan QSAR

dengan perangkat lunak BuildQSAR menurut Veerasamy *et al.*, (2011) yakni sebagai berikut:

1. Nilai  $R^2$  pada *training set* lebih dari 0,8 dan pada *test set* lebih dari 0,6.
2. Selisih nilai  $Q^2$  dan  $R^2$  tidak lebih dari 0,3.
3. Nilai RMSE pada *test set* kurang dari 1.
4. Nilai F pada *training set* bernilai tinggi.

Menurut OECD parameter validasi internal yang harus terpenuhi adalah  $Q^2 > 0,5$ ;  $r_m^2 > 0,5$  dan parameter validasi eksternal yang harus dipenuhi adalah  $R_{pre}^2 > 0,5$  (Roy *et al.*, 2015).

### 3.2.3 Desain Senyawa

Desain senyawa dilakukan berdasarkan struktur dengan nilai aktivitas terbaik dari referensi. Bagian substituenya digunakan untuk memodifikasi senyawa. Selanjutnya struktur digambar kembali menggunakan <https://graphonline.ru/en/> dan dihitung deskriptornya menggunakan bantuan Microsoft Excel. Nilai deskriptor yang diperoleh digunakan untuk menghitung prediksi nilai aktivitas senyawa hasil desain berupa nilai  $EC_{50}$  berdasarkan persamaan QSAR yang telah divalidasi sebelumnya. Desain senyawa ini dilakukan hingga mendapat nilai yang lebih baik dari data yang sudah ada.

### 3.2.4 Applicability Domain (AD)

Setelah nilai aktivitas  $EC_{50}$  yang diperoleh dari hasil desain senyawa sebelumnya, kemudian dihitung *applicability domain*. Nilai *Leverage* (L) dan *Standardized Residual* (SR) menggunakan matriks dengan bantuan Microsoft Excel. Tahapan perhitungan nilai SR dan L adalah sebagai berikut:

1. Perhitungan Hat Matriks

Perhitungan hat matriks dilakukan dengan menggunakan rumus di bawah dimana X merupakan matriks deskriptor.

$$H = X(X^T X)^{-1} X^T$$

2. Penentuan Nilai *Leverage* (L)

Nilai L diperoleh dari elemen diagonal hasil perhitungan matriks.

### 3. Perhitungan Nilai *Standardized Residual* (SR)

Perhitungan nilai SR diperoleh dari hasil penentuan nilai L sebelumnya.

#### 3.2.5 Molecular docking

*Molecular docking* dilakukan pada hasil desain senyawa hasil prediksi aktivitas  $EC_{50}$  terbaik. *Molecular docking* dilakukan menggunakan perangkat lunak Autodock Vina. Tahapan awal pada *Molecular docking* adalah preparasi molekul protein. Molekul protein *S. Sclerotiorum* dengan kode PDB ID: 2X2T diunduh pada situs web <https://www.rcsb.org/>. Protein ini dipreparasi dengan menghilangkan molekul-molekul air dan non-ligan menggunakan AutoDock Tools. Selanjutnya ligan natif dipisahkan dari proteinnya. Kemudian dilakukan grid dengan metode *semigrid*. Selanjutnya digunakan perangkat lunak Autodock Vina untuk menghitung docking score atau energi afinitas. Kemudian tahapan selanjutnya yakni validasi menggunakan perangkat lunak pymol untuk mengetahui nilai RMSD yang harus kurang dari 2 Å. Setelah itu, menggabungkan protein dan ligan dalam satu file untuk selanjutnya dilihat visualisasi interaksinya menggunakan perangkat lunak Discovery Studio Visualizer.