

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

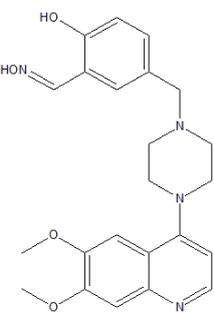
3.1.1 Alat Penelitian

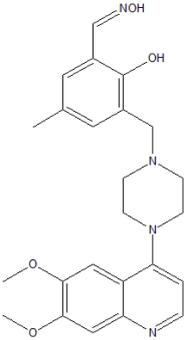
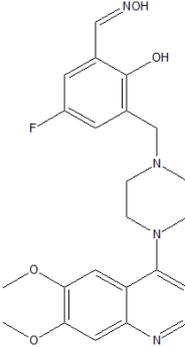
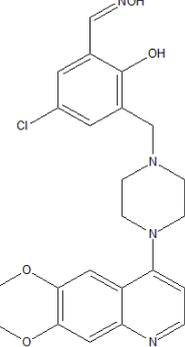
Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini berupa komputer dengan spesifikasi Intel® Celeron® CPU 4205U @1.80 GHz, RAM 4.0 GB, *Hard disk* 931.5 GB. Perangkat lunak yang digunakan ialah Avogadro untuk menggambar struktur 3D molekul senyawa, Build QSAR untuk membuat pemodelan QSAR, Microsoft Excel 2010 untuk mengolah data. Perangkat lunak UCSF Chimera digunakan untuk preparasi ligan dan protein, proses *docking* yang dioperasikan menggunakan *1-click docking* (<https://mcule.com/apps/1-click-docking>), situs web *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org>) dan perangkat lunak Biovia untuk visualisasi interaksi ligan-reseptor.

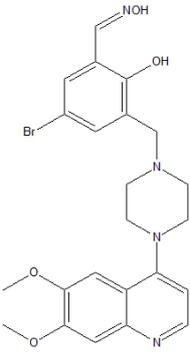
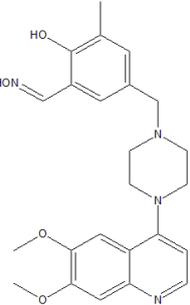
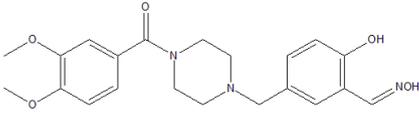
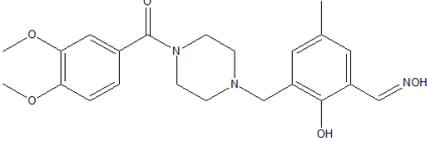
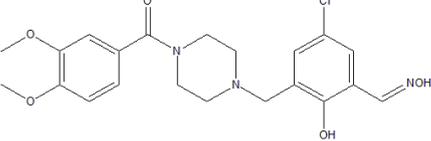
3.1.2 Bahan Penelitian

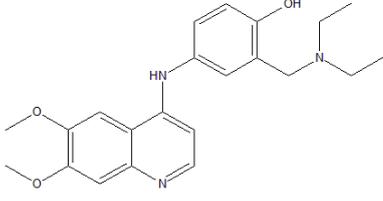
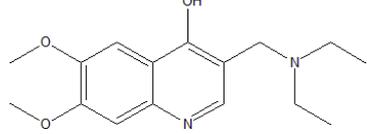
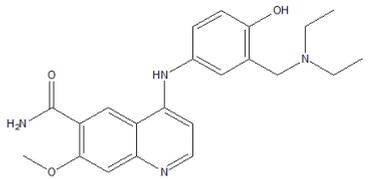
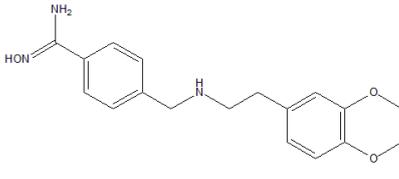
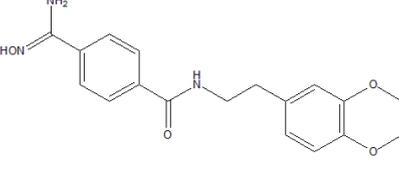
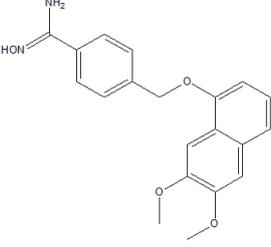
Bahan yang digunakan dalam membangun pemodelan 3D-QSAR adalah data 23 senyawa oksim non-kuarternar dan non-oksime dengan aktivitas (IC_{50}) yang diperoleh dari hasil penelitian oleh Bi et al., (2020). Data aktivitas reaktivator oksime non-kuarternar dan non-oksime ditunjukkan pada Tabel 3.1 berikut ini.

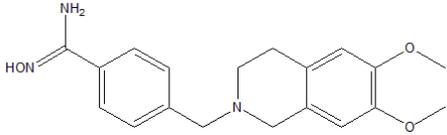
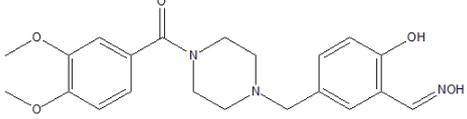
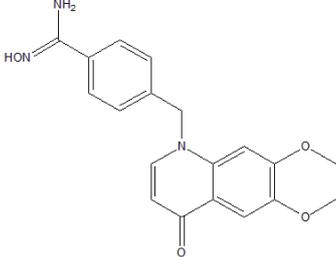
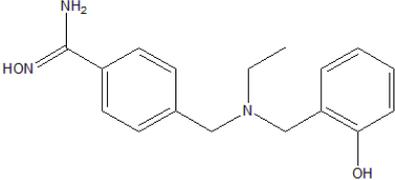
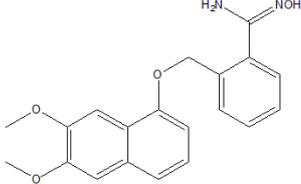
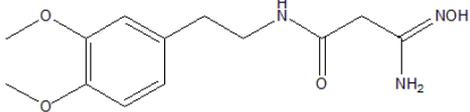
Tabel 3.1 Data set aktivitas $\log IC_{50}$ dan struktur senyawa reaktivator enzim asetilkolinesterase.
(Sumber: Bi et al., 2020)

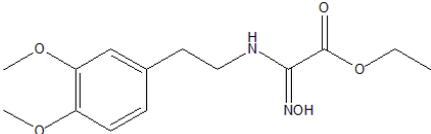
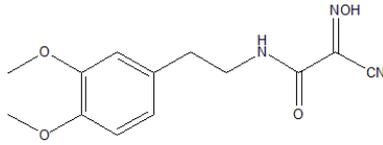
No.	Kode Senyawa	Struktur	$\log IC_{50}$
1	A1		1,840671

No.	Kode Senyawa	Struktur	logIC ₅₀
2	A2		2,01536
3	A3		1,802705
4	A4		3,422754

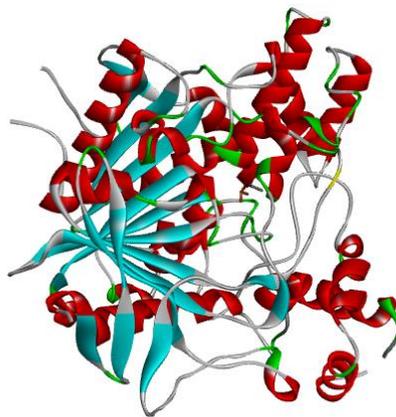
No.	Kode Senyawa	Struktur	logIC ₅₀
5	A5		2,585574
6	A6		2,098644
7	A7		2,371806
8	A8		2,484727
9	A9		2,446537

No.	Kode Senyawa	Struktur	logIC ₅₀
10	A10		0,367356
11	A11		2,453777
12	A12		0,274158
13	A13		3,526598
14	A14		3,628797
15	A15		2,979184

No.	Kode Senyawa	Struktur	logIC ₅₀
16	A16		3,307924
17	A17		2,802637
18	A18		2,565021
19	A19		2,030397
20	A20		3,4843
21	A21		3,595717

No.	Kode Senyawa	Struktur	logIC ₅₀
22	A22		3,4777
23	A23		3,509471

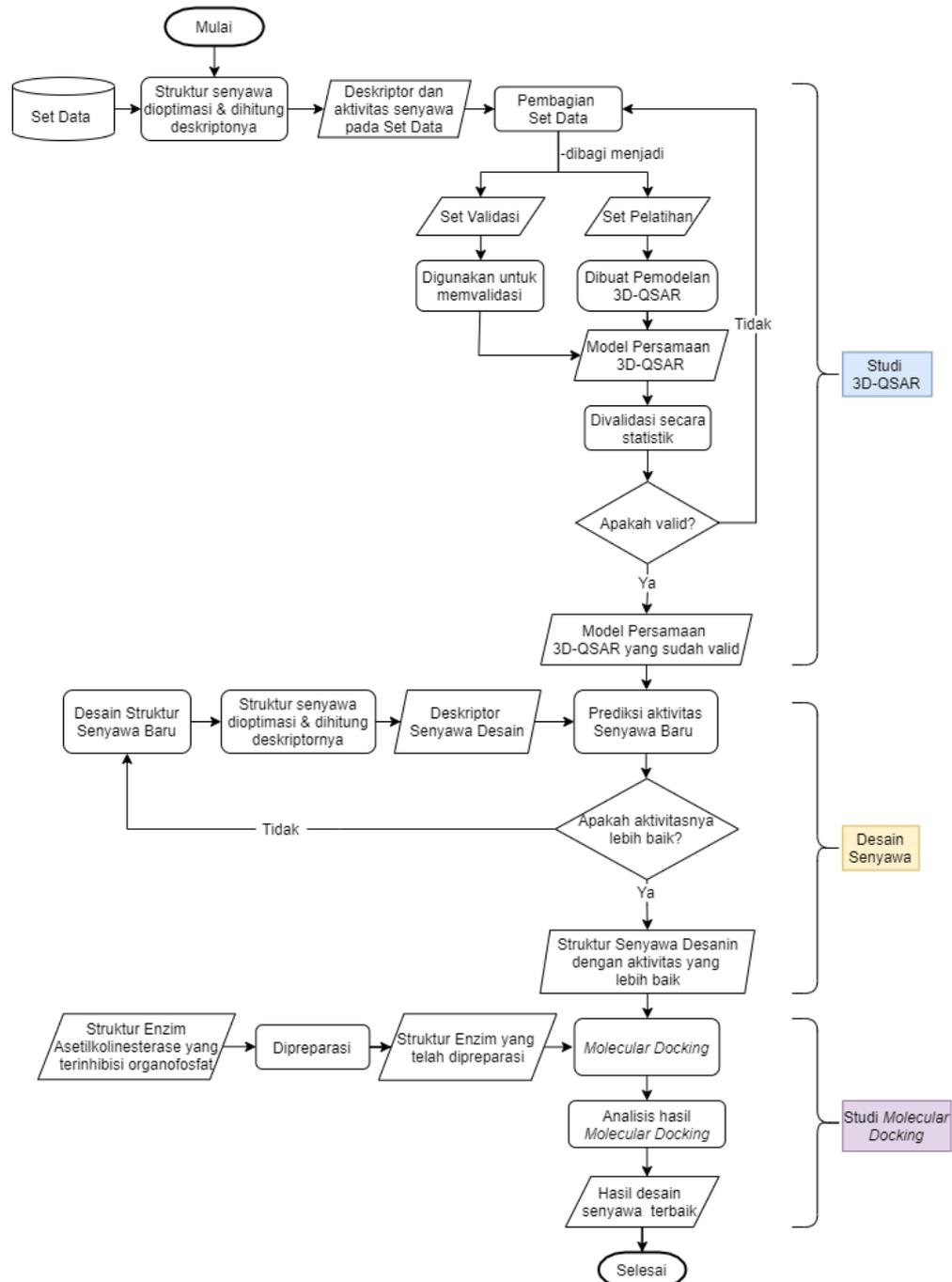
Selain itu, bahan yang digunakan dalam studi *molecular docking* diperlukan pula struktur kompleks enzim asetilkolinesterase yang terinhibisi organofosfat (PDB ID: 6CQW) sebagaimana yang disajikan pada Gambar 3.1 berikut.



Gambar 3.1 Struktur enzim asetilkolinesterase terinhibisi VX (PDB ID: 6CQW) yang sudah dipreparasi.

3.2 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang dilakukan pada penelitian ini secara garis besar dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2 Bagan alir proses penelitian *Screening* Antidote Senyawa Oksim Non-kuarterner dan Non-oksime sebagai Reaktivator Asetilkolinesterase yang Terinhibisi Organofosfat dengan Studi 3D-QSAR dan *Molecular Docking*.

3.2.1 Optimasi Struktur Senyawa dan Perhitungan Deskriptor

Set data dari aktivitas IC_{50} dan struktur senyawa golongan oksime non-kuarterner dan non-oksime sebanyak 23 senyawa didapatkan dari referensi (Bi et al., 2020) kemudian dibuat menjadi $\log IC_{50}$ untuk homogenitas data. Struktur molekul-molekul tersebut kemudian digambar

secara 3D (*ball and bond type*) dilengkapi dengan atom hidrogen menggunakan perangkat lunak Avogadro. Struktur-struktur yang telah digambar, selanjutnya dioptimasi dengan metode mekanika molekuler hingga mencapai struktur yang paling stabil. Struktur-struktur tersebut kemudian dihitung deskriptornya menggunakan perangkat lunak PaDEL Deskriptor. Deskriptor yang digunakan dalam penelitian ini adalah deskriptor 3D, yaitu 3D *autocorrelation*, *charged partial surface area*, *gravitational index*, *length over breadth*, *moment of inertia*, *petitjean shape index*, *Radial Distribution Function (RDF)*, dan *Weighted Holistic Invariant Molecular (WHIM)*.

3.2.2 Penyusunan dan Validasi Model QSAR

Set data dibagi menjadi set pelatihan yang digunakan untuk membuat pemodelan dan set validasi yang digunakan untuk memvalidasi model persamaan QSAR dengan rasio 4:1. Data aktivitas $\log IC_{50}$ dan deskriptor dari set pelatihan kemudian digunakan untuk membangun pemodelan QSAR dengan perangkat lunak Build QSAR menggunakan metode *Multi Linear Regression (MLR)* dan algoritma pencarian model persamaan berupa *systematic search*. Keluaran dari pemodelan QSAR adalah sebuah persamaan yang dapat digunakan untuk memprediksi nilai $\log IC_{50}$ dari desain senyawa baru.

Model persamaan dengan nilai regresi terbaik yang diperoleh dari hasil analisis menggunakan metode *Multi Linear Regression (MLR)*, kemudian divalidasi dengan memasukkan deskriptor dari set validasi ke dalam persamaan tersebut dan membandingkan hasil perhitungannya dengan nilai $\log IC_{50}$ hasil eksperimen masing-masing struktur senyawa. Pemilihan model persamaan didasarkan beberapa parameter berikut,

1. R^2 pada set pelatihan $> 0,8$ dan nilai R^2 pada set validasi $> 0,6$;
2. Nilai Q^2 pada set pelatihan $> 0,8$;
3. Perbedaan nilai Q^2 dengan nilai R^2 tidak lebih dari 0,3;
4. Nilai RMSE dari set validasi < 1 ;
5. Nilai F dari set pelatihan bernilai tinggi.

3.2.3 Desain Senyawa Reaktivator

Data tiga senyawa dengan aktivitas paling baik dari referensi, kemudian dimodifikasi dengan penggantian substituenya. Struktur senyawa yang telah dimodifikasi tersebut dihitung deskriptornya menggunakan PaDEL Deskriptor, kemudian nilai deskriptor yang didapatkan dimasukkan ke dalam persamaan QSAR yang sudah didapatkan dari tahap sebelumnya. Analisis QSAR memungkinkan untuk memprediksi aktivitas biologis berupa nilai $\log IC_{50}$ untuk mencari struktur senyawa dengan reaktivitas yang lebih baik dari senyawa-senyawa yang sudah ada.

3.2.4 Studi *Molecular Docking*

Tiga senyawa dengan prediksi aktivitas yang paling baik dari tiap jenis desain senyawa yang telah dibuat selanjutnya digunakan dalam studi *molecular docking*. Tahap pertama adalah preparasi molekul protein enzim. Kompleks enzim asetilkolinesterase yang terinhibisi VX (PDB ID: 6CQW) diunduh pada situs web *Protein Data Bank*, lalu molekul-molekul air dan non ligan dihilangkan dengan menggunakan perangkat lunak Chimera.

Proses *docking* dilakukan dengan *1-click docking* pada situs web <http://mcule.com>. Hasil *docking* berupa *docking score* dan pose interaksi molekul ligan dengan enzim dalam bentuk 3D. Analisis *molecular docking* juga dibuat dalam bentuk diagram 2D untuk menunjukkan interaksi ligan dengan residu asam amino pada enzim. Diagram 2D didapatkan dengan menggunakan perangkat lunak Biova. Berdasarkan artikel yang dimuat pada situs web mcule.com oleh Sanmark, (2013) berikut ini protokol yang dijalankan pada perangkat lunak *1-click docking*;

1. Konversi ligan 2D MOL ke 3D MOL : konversi dilakukan dengan OpenBabel atau Plugin Conformers ChemAxon.
2. Konversi ligan 3D MOL ke PDBQT : ligan input dikonversi ke format PDBQT menggunakan AutoDockTools dengan parameter dasar.
3. Preparasi target *docking*: preparasi secara otomatis dilakukan menggunakan AutoDockTools dengan opsi dasar kecuali penghapusan setiap residu non-standar dari rantai manapun.

4. Penambatan (*Docking*): perhitungan *docking* dilakukan oleh AutoDock Vina dengan parameter dasar. Empat pose *docking* terbaik ditampilkan. Untuk memastikan bahwa identitas molekul tidak berubah selama *docking*, string InChI dari ligan input dan konformer *output* dibandingkan dan jika terjadi ketidakcocokan InChI, hasilnya dibuang.