

HUBUNGAN KUANTITATIF STRUKTUR MOLEKUL DAN AKTIVITAS MODULATOR RESEPTOR ASETILKOLIN NIKOTINIK $\alpha 4\beta 2$: PENGARUH PEMODELAN MOLEKUL BERBASIS PERHITUNGAN SEMIPEMIRIK MNDO

Dono Panggarjito¹, Enade Perdana Istyastono¹ dan Iqmal Tahir²

¹*Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma,
Kampus Paingan III, Maguwoharjo, Yogyakarta 55281*

²*Austrian – Indonesian Centre for Computational Chemistry (AIC), Jurusan Kimia,
Fakultas MIPA Universitas Gadjah Mada, Sekip Utara, Yogyakarta 55281
Tel/Fax : 0274-545188; Email : iqmal.tahir@gadjahmada.edu*

INTISARI

Munculnya penelitian ini didasari oleh beralihnya fokus pengembangan obat dari reseptor asetilkolin muskarinik menjadi asetilkolin nikotinik yang diduga mempunyai aktivitas yang sama. Beberapa senyawa obat telah terbukti mempunyai aksi modulasi reseptor asetilkolin nikotinik, misalnya A-85380 dan turunan pridin lain. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui hubungan secara kuantitatif antara struktur senyawa modulator reseptor asetilkolin nikotinik dan aktivitas biologis IC_{50} (konsentrasi aktivitas penghambatan 50% populasi).

Penelitian ini bersifat kuantitatif eksperimental quasi, dilakukan dengan menganalisis statistik prediktor teoritik hasil perhitungan metode MNDO dengan metode regresi multivariat. Data prediktor teoritik didapat dari perhitungan menggunakan paket program *HyperChem 6.0*, dan perhitungan statistik dilakukan dengan menggunakan paket program *SPSS 11.0 for Windows*. Analisis dilakukan berdasarkan persyaratan statistik dari beberapa model persamaan sehingga didapatkan satu model persamaan terbaik yang secara signifikan mampu menggambarkan hubungan sifat fisikakimia senyawa modulator dan aktivitasnya.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa model persamaan terbaik HKSA senyawa modulator reseptor asetilkolin nikotinik $\alpha 4\beta 2$ adalah sebagai berikut:

$$\log \left(\frac{1}{IC_{50}} \right) = 14,063 - 5,734 (qC_1) + 43,574 (qN) + 5,967 (qC_4) \\ - 0,369 (\mu) + 2,368 (E_{LUMO}) - 0,0720 (SA) + 0,0460 (V) \\ - 0,254 (\log \rho) - 0,0562 (MR) + 0,0102 (M)$$

(n = 29; m = 11; R = 0,909; R² = 0,827; SE = 0,480; rasio F = 3,053)

Hasil model persamaan dapat digunakan untuk memprediksi aktivitas senyawa baru untuk mendapatkan aktivitas modulasi reseptor yang lebih baik, oleh karena itu masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan usulan senyawa baru untuk sintesis.

Kata kunci : QSAR, regresi multilinear, reseptor asetilkolin, desain obat

PENDAHULUAN

Perkembangan ilmu pengetahuan kesehatan terutama tentang reseptor, telah menjadi sarana dalam penemuan senyawa berpotensi sebagai obat dengan struktur yang spesifik. Contohnya adalah pada pengembangan obat beberapa kasus gangguan CNS (*Central Nervous System*) seperti penyakit Alzheimer, Parkinson, sindrom Tourette dan manajemen rasa nyeri, yang erat berhubungan dengan defisiensi kolinergik termasuk di antaranya adalah reseptor asetilkolin nikotinic dan muskarinik. Dilaporkan bahwa *mAChRs* (*muscarinic acetylcholine receptors/mAChRs*) mendominasi secara kuantitatif dibanding *nAChRs* (*nicotinic acetylcholine receptors/nAChRs*) di area otak serta memegang peran penting dalam sistem memori dan kognitif, sehingga penelitian-penelitian untuk perawatan penyakit-penyakit berkaitan dengan memori cenderung diarahkan pada pengembangan senyawa-senyawa modulator *mAChRs*. Meskipun demikian, akhir-akhir ini berkembang minat untuk mengembangkan senyawa-senyawa modulator *nAChRs* untuk tujuan yang relatif sama. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut berfokus pada *nAChRs*. Subtipe *nAChRs* yang banyak ditemukan di jaringan otak adalah $\alpha 4\beta 2$. Beberapa senyawa dilaporkan memiliki afinitas terhadap *nAChRs*, misal : epibatidine, dan A-85380 (Nielsen dkk., 2000).

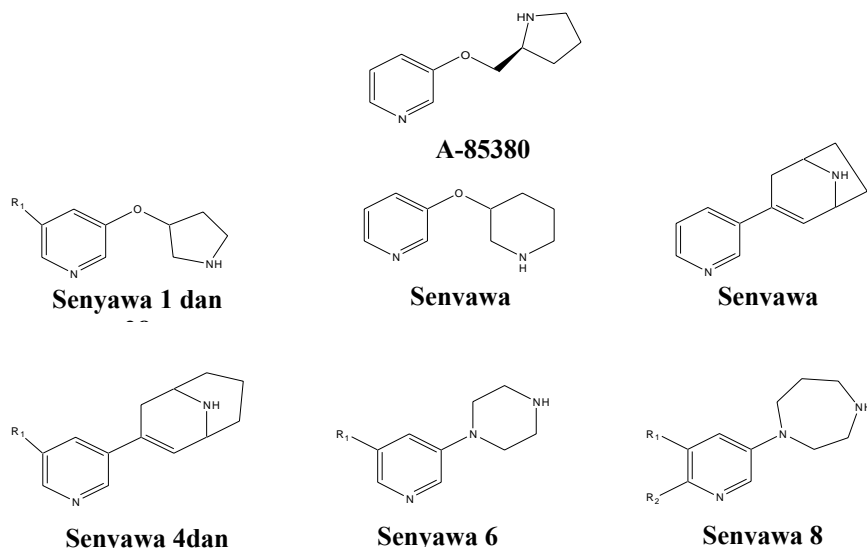
Asetilkolin merupakan neurotransmitter kolinergik endogen, yang menimbulkan efek biologis melalui kedua tipe reseptor kolinergik : reseptor asetilkolin muskarinik dan reseptor asetilkolin nikotinic (Schapira dkk., 2002). Nikotin merupakan salah satu senyawa yang spesifik terhadap *nAChRs* dan tidak dapat mengaktivasi *mAChRs*. Hal tersebut diakibatkan karena sifat yang spesifik terutama jarak interatom yang berkesesuaian dengan asetilkolin namun tidak dengan muskarin. Perbedaan tersebut diduga berhubungan dengan afinitas terhadap reseptor kolinergik.

Sebagai langkah awal pengembangan senyawa berpotensi sebagai modulator perlu dilakukan pendekatan terhadap senyawa dengan afinitas yang besar terhadap reseptor asetilkolin nikotinic $\alpha 4\beta 2$. Salah satu metode pendekatan yang dapat digunakan adalah melakukan permodelan molekul dengan menggunakan senyawa penuntun *ligand* reseptor asetilkolin nikotinic spesifik yaitu nikotin. Rekayasa senyawa teoritik telah menjadi salah satu point penting dalam proses pengembangan obat, dengan melihat perubahan sifat fisika kimia senyawa-senyawa dan membandingkan dengan nilai aktivitas, maka kita dapat menentukan sifat fisika kimia paling berpengaruh dalam menimbulkan aktivitas. Metode tersebut seringkali disebut dengan kajian/analisis hubungan struktur dan aktivitas (Silverman, 1991).

Analisis Hubungan Kuantitatif Struktur dan Aktivitas (HKSA) merupakan salah satu cara yang dapat digunakan untuk menggambarkan hubungan struktur senyawa dan aktivitas secara kuantitatif. Seiring dengan pesatnya perkembangan teknologi yaitu munculnya ilmu kimia komputasi, maka penetapan hubungan secara kuantitatif menjadi semakin mudah, salah satu keuntungan pendekatan HKSA dengan bantuan ilmu kimia komputasi adalah mengurangi *trial and error* dalam kepentingan sintesis obat baru, mempersempit fokus sintesis obat baru, dan efisiensi waktu dan biaya. Pendekatan tersebut didasari oleh nilai sifat fisika kimia senyawa teoritik (hasil perhitungan kimia komputasi) yang berkesesuaian dengan aktivitas biologis, yang diolah secara statistik sehingga didapatkan hubungan yang signifikan.

Telah dilakukan uji terdahulu oleh Nielsen dkk. (2000) terhadap 6 seri senyawa poten baru dengan perhitungan afinitas (3D-QSAR). Metode yang digunakan adalah GRID/GOLPE, metode GRID digunakan untuk menghitung energi interaksi antara senyawa-senyawa untuk menggambarkan kemungkinan reaksi dengan reseptor. Akhirnya, variabel-variabel yang digunakan sebagai faktor penentu dalam prediksi model senyawa seperti dapat dilihat pada tabel 1 (Nielsen dkk., 2000). Nilai aktivitas biologis yang dipakai adalah IC_{50} dalam μM , yang didapat dari daya hambat senyawa turunan piridin terhadap pengikatan [3H]cytisine pada *nAChrs* $\alpha 4\beta 2$. Telah diketahui bahwa [3H]cytisine sebagai *radioligand*, mempunyai afinitas yang signifikan terhadap reseptor $\alpha 4\beta 2$. Pendekatan 3D-QSAR senyawa-senyawa yang mempunyai afinitas terhadap $\alpha 4\beta 2$ *nAChRs* telah dilakukan pertama kali oleh Nielsen dkk. (2000).

Untuk dapat dilakukan analisis QSAR 3D diperlukan perangkat komputasi yang cukup besar, dan sebagai alternatif adalah dengan melakukan analisis QSAR menggunakan model Hansch. Dalam hal ini penggunaan deskriptor teoritik yang diterapkan pada analisis Hansch dapat membantu percepatan pengumpulan data serta mengurangi beban kerja perhitungan komputasi. Metoda yang ini telah berhasil diterapkan oleh beberapa peneliti sebelumnya seperti Kokpol *et al* (1989) dan Rode *et al* (1988) yang menggunakan muatan bersih atom sebagai prediktor pada kajian QSAR untuk senyawa-senyawa antimalaria. Alim *et al* (2000) juga menggunakan pendekatan QSAR untuk mempelajari toksisitas suatu seri senyawa fenol. Metoda yang sama telah berhasil digunakan untuk kajian QSAR senyawa fenil etil amina (Tahir *et al*, 2001), senyawa beraroma turunan nitrobenzena (Tahir, 2000), senyawa tabir surya turunan isoamil sinamat (Tahir *et al*, 2001). Dalam penelitian ini dilakukan pendekatan hubungan senyawa-senyawa hasil dari analisis Nielsen dkk. dengan prediktor Hansch meliputi prediktor elektronik, hidrofobisitas dan sterik.



Gambar 1. Struktur senyawa-senyawa turunan piridin (Nielsen dkk., 2000)

Tujuan penelitian untuk mengetahui bagaimana hubungan antara struktur dan aktivitas dari modulator reseptor asetilkolin $\alpha 4\beta 2$ berdasarkan prediktor teoritik hasil perhitungan menggunakan metode semiempirik MNDO.

METODE PENELITIAN

1. Bahan

Berupa data set struktur dan aktivitas senyawa-senyawa modulator reseptor asetilkolin nikotinic $\alpha 4\beta 2$ diperoleh dari Nielsen dkk.(2000). Pada penelitian tersebut telah disintesis 29 senyawa (tabel 1).

Tabel 1. Struktur dan afinitas senyawa terhadap *nAChRs* (Nielsen dkk., 2000)

Kode	Nama IUPAC	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μ M)
A-85380		-	-	0,0015
1	3-oksi(3-piridil)pirolidin	H	-	0,10
2	3-oksi(3-piridil)piperidin	-	-	0,19
3	3-(3-piridil)-8-azabisiklo[3.2.1]okt-2-en	-	-	0,0067
4	9H-3-(3-piridil)-azabisiklo[3.2.1]non-2-en	H	-	0,0045
5	9H-3-(3-(5-metoksipiridil))-9-azabisiklo[3.2.1]non-2-en	OCH ₃	-	0,0030
6	1-(5-kloro-3-piridil)piperazin	Cl	-	0,31
7	1-(5-etoksi-3-piridil)piperazin	OCH ₂ CH ₃	-	0,50
8	1-(3-piridil)homopiperazin	H	H	0,0019
9	1-(5-(3-aminofenil)-3-piridil)homopiperazin	-(3-anilin)	H	0,0040
10	1-(5-etilenoksi-3-piridil)homopiperazin	OCH=CH ₂	H	0,0050
11	1-(5-(3-piridil)-3-piridil)homopiperazin	-(3-piridil)	H	0,0028
12	1-(5-tiofenil-3-piridil)homopiperazin	SC ₆ H ₅	H	0,0040
13	1-(5-karboksamido-3-piridil)homopiperazin	CONH ₂	H	0,020
14	1-(5-hidroksi-3-piridil)homopiperazin	OH	H	0,0024
15	1-(5-(2-hidroksietoksi)-3-piridil)homopiperazin	OCH ₂ CH ₂ OH	H	0,0018
16	1-(5-fenil-3-piridil)homopiperazin	C ₆ H ₅	H	0,0030
17	1-(5-metoksi-3-piridil)homopiperazin	OCH ₃	H	0,0019
18	1-(6-bromo-3-piridil)homopiperazin	H	Br	0,0010
19	1-(6-tioetoksi-3-piridil)homopiperazin	H	SCH ₂ CH ₃	0,17
20	1-(6-metoksi-3-piridil)homopiperazin	H	OCH ₃	0,17
21	1-(6-bromo-5-etoksi-3-piridil)homopiperazin	OCH ₂ CH ₃	Br	0,00087
22	1-(5,6-dimetoksi-3-piridil)homopiperazin	OCH ₃	OCH ₃	0,17
23	1-(6-kloro-5-metoksi-3-piridil)homopiperazin	OCH ₃	Cl	0,00068
24	1-(3-quinolinil)homopiperazin	Quinolin	-	0,0066
25	1-(5-metoksietoksi-3-piridil)homopiperazin	OCH ₂ CH ₂ OCH ₃	H	0,0024
26	1-(5-(2-metil-1-propoksi)-3-piridil)homopiperazin	OCH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	0,0022
27	1-(5-tiobenzil-3-piridil)homopiperazin	SCH ₂ C ₆ H ₅	H	0,0080
28	3-oksi(5-kloro-3-piridil)pirolidin	Cl	-	0,22

2. Alat

Perangkat keras berupa satu set komputer Pentium IV 2,8 GHz dengan kapasitas memori 512 MB yang mampu melakukan perhitungan kimia komputasi. Perangkat lunak paket program *Hyperchem Pro ver.6.0* untuk

melakukan perhitungan kimia kuantum dan mengeksplorasi sifat fisikokimiadan program statistik berupa program *SPSS 11.0 for Windows*

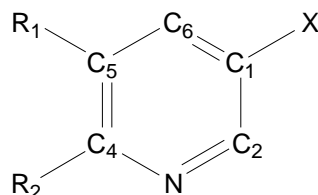
Tabel 2. Parameter menurut prediktor Hansch yang dihitung dengan metode semiempirik MNDO.

Parameter	Simbol	Satuan
Parameter elektronik		
Muatan bersih atom C ₁	qC ₁	Coulomb
Muatan bersih atom C2	qC ₂	Coulomb
Muatan bersih atom N	qN	Coulomb
Muatan bersih atom C4	qC ₄	Coulomb
Muatan bersih atom C5	qC ₅	Coulomb
Muatan bersih atom C6	qC ₆	Coulomb
Energi orbital molekul terendah tidak diduduki elektron	E _{LUMO}	kkal/mol
Energi orbital molekul tertinggi diduduki elektron	E _{HOMO}	kkal/mol
Momen dipol	μ	Debye
Polarisabilitas molekular	α	Å ³
Parameter hidrofobik		
Koefisien partisi	log ρ	-
Parameter sterik		
Luas permukaan (grid)	SA	Å ²
Refraktifitas molar	MR	Å ³
Volume molekular	V	Å ³
Massa A _r	M	Amu
Energi hidrasi	E _h	kkal/mol

3. Prosedur

Pemodelan molekul

Penggambaran struktur dua dimensi seri senyawa turunan piridin dikerjakan menggunakan paket program *HyperChem 6.0*, yang kemudian dilanjutkan pada perubahan menjadi struktur tiga dimensi serta penambahan atom H (gambar 1). Penomoran atom pada seri senyawa harus dilakukan dengan pasti dan konsisten untuk 29 senyawa yang terlibat. Penomoran dapat dilihat seperti pada gambar 5.



Gambar 2. Penomoran atom pada gugus piridin

Muatan bersih tiap atom C pada gugus piridin mengikuti pola seperti gambar 5, qC_1 untuk muatan bersih atom C_1 , dan seterusnya sampai qN dan qC_6 . Penomoran ini akan memudahkan dalam pengamatan nilai muatan bersih atom dalam *file log*.

Struktur dua dimensi kemudian dilengkapi dengan atom H dan disiapkan menjadi model bangun 3 dimensi untuk proses optimasi. Masing - masing senyawa yang digunakan sebagai bahan penelitian (Tabel 1) dibuat struktur dua dimensi (2D) menggunakan paket program *Hyperchem*. Selanjutnya dilakukan penambahan atom H untuk melengkapi strukturnya dan dibentuk menjadi struktur tiga dimensi (3D). Struktur yang terbentuk dioptimasi geometri menggunakan metode MNDO menggunakan algoritma Polak-Ribiere. Batas konvergensi ditentukan setelah tercapai gradien 0,001 kkal/Å.mol. Struktur yang telah teroptimasi disimpan sebagai *file.hin* (Tahir, 2003).

Untuk memperoleh deskriptor maka dilakukan perhitungan *single point* pada struktur yang teroptimasi dengan perhitungan *QSAR properties* pada paket program *Hyperchem* untuk memperoleh prediktor non-elektronik (Kubinyi, 1993). Prediktor elektronik diperoleh dari *file log* setelah dilakukan optimasi geometri.

Analisis statistik

Data sifat fisika kimia yang diperoleh divalidasi menggunakan metode *leave-one-out* (LOO) (Kubinyi, 1993), kemudian dianalisis dengan menggunakan regresi linear berganda yang akan menghasilkan beberapa model persamaan regresi menggunakan paket program *SPSS 11.0 for Windows*. Hasil pengolahan regresi menghasilkan persamaan-persamaan yang kemudian dianalisis menurut keterwakilan sifat fisika kimia Hansch dan kriteria statistik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Hubungan Kuantitatif Struktur-Aktivitas Senyawa Modulator Reseptor Asetilkolin Nikotinik $\alpha 4\beta 2$

Setelah mendapatkan semua data prediktor pada 29 senyawa, kemudian dilakukan analisis statistik menggunakan paket program *SPSS for Windows 11.0*. Metode analisis yang digunakan adalah regresi linear dengan variabel bebas : prediktor-prediktor elektronik, sterik dan hidrofobisitas; dan variabel tergantung adalah IC_{50} . Variabel bebas yang digunakan dalam pengolahan regresi linear berjumlah 16 variabel, untuk mengetahui kontribusi secara terpisah ataupun kolektif dua atau lebih variabel tersebut terhadap variabel tergantung ($\log \frac{1}{IC_{50}}$), maka jenis regresi yang digunakan adalah regresi linear berganda (*multiple linear regression*). Dalam menganalisis pengaruh variabel-variabel terhadap nilai $\log \frac{1}{IC_{50}}$ digunakan metode *backward*, yaitu penghilangan satu-satu variabel bebas berdasarkan penurunan nilai R^2 . Dengan demikian variabel yang tidak memberikan pengaruh atau tidak signifikan terhadap prediksi dapat ditentukan. Pengolahan statistik dengan regresi linear berganda pada

penelitian ini menghasilkan 11 model formula (persamaan) yang meliputi variabel-variabel yang berpengaruh dalam persamaan tersebut. Model persamaan hasil pengolahan statistik ditampilkan dalam tabel IV.

Setiap model persamaan akan memberikan kekuatan prediksi yang berbeda-beda terhadap aktivitas biologis ($\log \frac{1}{IC_{50}}$) eksperimen. Oleh karena itu selanjutnya dilakukan pemilihan model persamaan terbaik dengan mempertimbangkan beberapa kriteria yaitu keterwakilan tiga prediktor Hansch dan kriteria statistik. Keterwakilan prediktor Hansch menjadi penting mengingat aktivitas biologis merupakan fungsi dari sifat fisika kimia struktur yang dikategorikan dalam tiga prediktor Hansch (elektronik, sterik dan hidrofobisitas), yang artinya adalah dalam setiap model harus terdapat setidaknya satu dari tiap-tiap prediktor yang telah ditetapkan Hansch. Model persamaan terbaik menurut statistik merupakan model persamaan yang memenuhi kriteria-kriteria statistik yang mampu menggambarkan hubungan signifikan. Terkait dengan kriteria statistik, deviasi hasil validasi silang nilai selisih kuadrat residual dapat digunakan sebagai pertimbangan terakhir dalam menentukan model persamaan terbaik, data disajikan pada tabel V. Metode validasi yang digunakan adalah *Leave One Out-Cross Validation* (LOO-CV), yaitu dengan melakukan uji model persamaan dari data sejumlah (n-1) untuk melakukan ekstrapolasi terhadap tiap-tiap data yang ada sejumlah (n), atau dengan kata lain masing-masing data dihitung menggunakan persamaan yang diperoleh dari regresi data-data yang lain. Dengan melihat deviasi hasil validasi aktivitas prediksi dan eksperimen, maka dapat ditentukan suatu pola regresi dengan tingkat keakuratan yang paling tinggi.

Pertama kali yang dipertimbangkan adalah kelengkapan prediktor Hansch. Dari semua model persamaan yang diperoleh (tabel III), terdapat dua model persamaan yang tidak melibatkan prediktor hidrofobisitas ($\log \rho$) yaitu model persamaan 10 dan 11, dan untuk selanjutnya model tersebut dikeluarkan dari kriteria pemilihan persamaan terbaik.

Dalam melakukan analisis statistik permodelan molekul, terdapat teori yang menentukan batas penerimaan suatu model. *The Australian Computational Chemistry* mempersyaratkan nilai koefisien korelasi linear (R) paling tidak 0,9 atau nilai R^2 sebesar 0,81. Beranjak dari persyaratan tersebut model persamaan 8, 9, 10, 11 harus tereliminasi (tabel IV). Dalam penelitian yang melibatkan multi variabel, peran R^2 lebih dominan daripada R dalam menggambarkan korelasi variabel tergantung dengan variansi variabel bebas. Nilai R terbesar adalah 0,919 dan $R^2 = 0,845$ pada model persamaan 1 sampai dengan 4. Nilai R^2 tersebut menggambarkan model persamaan terkait mampu menjelaskan hubungan sebesar 84,5%, yang artinya masih terdapat $\pm 15,5\%$ hubungan yang belum dapat dijelaskan dengan keberadaan variabel-variabel bebas yang digunakan saat penelitian. Adanya *missing link* tersebut diduga karena masih terdapat variabel-variabel lain (sifat fisika kimia lain) yang belum terlibat dalam analisis regresi.

Tabel 3. Model-model persamaan dengan metode backward regresi linear berganda.

Model	variabel	n	m
1	qC ₁ , qC ₂ , qN, qC ₄ , qC ₅ , qC ₆ , E _{HOMO} , E _{LUMO} , LOGP, P, μ, SA, MR, V, M, EH,	29	16
2	qC ₁ , qC ₂ , qN, qC ₄ , qC ₅ , qC ₆ , E _{HOMO} , E _{LUMO} , LOGP, μ SA, MR, V M, EH,	29	15
3	qC ₁ , qC ₂ , qN, qC ₄ , qC ₅ , qC ₆ , E _{LUMO} , LOGP, μ, SA, MR, V M, EH,	29	14
4	qC ₁ , qC ₂ , qN, qC ₄ , qC ₅ , E _{LUMO} , LOGP, μ, SA, MR, V M, EH,	29	13
5	qC ₁ , qN, qC ₄ , qC ₅ , E _{LUMO} , LOGP, μ, SA, MR, V M, EH,	29	12
6	qC ₁ , qN, qC ₄ , qC ₅ , E _{LUMO} , LOGP, μ, SA, MR,, V M	29	11
7	qC ₁ , qN, qC ₄ , E _{LUMO} , LOGP, μ, SA, MR, V M	29	10
8	qC ₁ , qN, qC ₄ , E _{LUMO} , LOGP, μ, SA, V M	29	9
9	qC ₁ , qN, qC ₄ , E _{LUMO} , LOGP, μ SA, V	29	8
10	qC ₁ , qN, qC ₄ , E _{LUMO} , μ, SA, V	29	7
11	qN, qC ₄ , E _{LUMO} , μ, SA, V	29	6

Keterangan : n = jumlah senyawa uji ; m = variabel yang terlibat ; R = korelasi

Tabel 4. Data parameter statistik model-model persamaan

Model	Variabel	n	m	R	R ²	SE	Signifikansi	F	F _{hitung} /F _{tabel}
1	qC ₁ , qC ₂ , qN, qC ₄ , qC ₅ , qC ₆ , E _{HOMO} , E _{LUMO} , LOGP, P μ, SA, MR, V, M, EH	29	16	0,919	0,845	0,539	0,009	4.103	1,578
2	qC ₁ , qC ₂ , qN, qC ₄ , qC ₅ , qC ₆ , E _{HOMO} , E _{LUMO} , LOGP, μ, SA, MR, V, M, EH,	29	15	0,919	0,845	0,517	0,004	4.740	1,871
3	qC ₁ , qC ₂ , qN, qC ₄ , qC ₅ , qC ₆ , E _{LUMO} , LOGP, μ, SA, MR, V, M, EH	29	14	0,919	0,845	0,499	0,002	5.463	2,199
4	qC ₁ , qC ₂ , qN, qC ₄ , qC ₅ , E _{LUMO} , LOGP, μ, SA, MR, V, M, EH	29	13	0,919	0,844	0,483	0,001	6.261	2,557
5	qC ₁ , qN, qC ₄ , qC ₅ , E _{LUMO} , LOGP, μ, SA, MR, V, M, EH	29	12	0,914	0,835	0,481	0,000	6.769	2,791
6	qC ₁ , qN, qC ₄ , qC ₅ , E _{LUMO} , LOGP, μ, SA, MR, V, M	29	11	0,909	0,827	0,479	0,000	7.364	3,052
7	qC ₁ , qN, qC ₄ , E _{LUMO} , LOGP, μ, SA, MR, V, M	29	10	0,900	0,809	0,488	0,000	7.644	3,169
8	qC ₁ , qN, qC ₄ , E _{LUMO} , LOGP, μ, SA, V, M	29	9	0,894	0,800	0,487	0,000	8.425	3,477
9	qC ₁ , qN, qC ₄ , E _{LUMO} , LOGP, μ, SA, V	29	8	0,888	0,788	0,489	0,000	9.291	3,797
10	qC ₁ , qN, qC ₄ , E _{LUMO} , μ, SA, V	29	7	0,870	0,758	0,510	0,000	9.380	3,770
11	qN, qC ₄ , E _{LUMO} , μ, SA, V	29	6	0,855	0,731	0,525	0,000	9.941	3,900

Nilai F melambangkan kebolehjadian kebenaran hubungan atau nilai signifikansi model regresi linear, nilai F yang semakin besar mengartikan kuatnya hubungan antara variabel bebas dan variabel tergantung. Dalam aplikasi yang lebih luas, nilai F berperan dalam perhitungan rasio antara F_{hitung} dan F_{tabel} . Berdasarkan tingkat kepercayaan 95%, maka nilai signifikansi yang memenuhi syarat adalah $< 0,05$. Dapat dilihat bahwa semua model persamaan memenuhi syarat signifikansi dengan nilai paling besar adalah 0,009 pada model 1. Selain itu, signifikansi dapat dilihat dari nilai rasio $F_{hitung/tabel}$ dengan nilai yang lebih besar dari satu ($F_{hitung/tabel} > 1$), maka dapat disimpulkan bahwa semua model persamaan mampu menggambarkan hubungan secara signifikan. Berdasarkan pertimbangan sebelumnya, dapat dilihat pada tabel 3, model persamaan dengan angka kebolehjadian kebenaran paling besar adalah model persamaan 7.

Nilai standar error statistik model-model yang tersisa mempunyai variasi yang tidak jauh berbeda. Namun dapat dilihat bahwa terdapat selisih yang besar pada model persamaan 1, 2 dan 3 dari pada model-model yang lain, sehingga model persamaan tersebut dikeluarkan untuk pertimbangan selanjutnya.

Setelah dilakukan analisis menurut parameter statistik maka didapatkan bahwa model-model yang memenuhi syarat adalah model persamaan 4, 5, 6 dan 7. Kemudian dilakukan validasi nilai prediksi setiap model tersisa dengan metode LOO untuk mendapatkan nilai standar error prediksi (s) garis regresi. Standar error prediksi (s) mampu mengukur kemampuan prediksi model terkait, semakin kecil nilai standar error prediksi maka semakin baik pula model persamaan HKSA. Dengan diketahuinya nilai variasi antara nilai aktivitas prediksi dan eksperimen, maka dapat ditentukan model dengan simpangan data terkecil, atau dapat dikatakan bahwa kita dapat mengetahui nilai variasi kesalahan yang terjadi untuk setiap model terpilih. Pada tabel 5 dapat dilihat bahwa selisih kuadrat hasil prediksi dan eksperimen terkecil adalah 9,409 pada model persamaan 7. Menurut persamaan (7), nilai standar error prediksi terkecil adalah pada model persamaan 7 yaitu sebesar 0,723.

Tabel 5. Model terbaik berdasarkan nilai standar error prediksi (s)

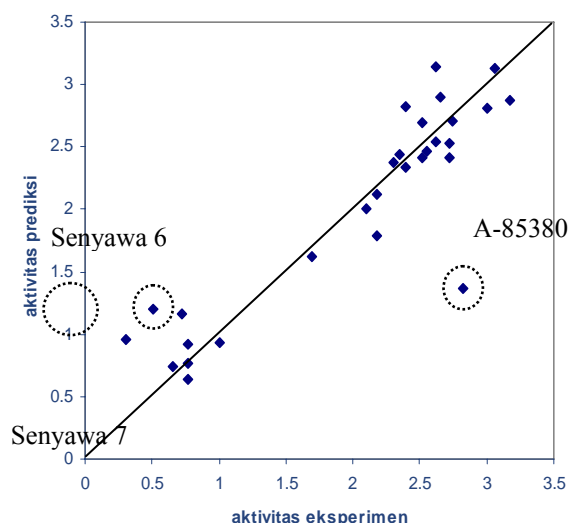
Model	Variabel	Validasi LOO $\Sigma(y_{eksperimen} - y_{prediksi})$	Standar error prediksi (s)
4	$qC_1, qC_2, qN, qC_4, qC_5, E_{LUMO}, \log \rho, \mu, SA, MR, V, M, EH$	12,8775	0,927
5	$qC_1, qN, qC_4, qC_5, E_{LUMO}, \log \rho, \mu, SA, MR, V, M, EH$	11,41991	0,845
6	$qC_1, qN, qC_4, qC_5, E_{LUMO}, \log \rho, \mu, SA, MR, V, M$	10,56104	0,788
7	$qC_1, qN, qC_4, E_{LUMO}, \log \rho, \mu, SA, MR, V, M$	9,409785	0,723

Setelah mempertimbangkan banyak kriteria, diketahui bahwa model persamaan 7 merupakan model persamaan terbaik yang secara signifikan mampu menggambarkan hubungan antara aktivitas dan sifat fisika kimia, serta mampu menghasilkan kesalahan prediksi terkecil. Selanjutnya model persamaan 7 dengan variabel-variabel yang terlibat yaitu : qC_1 , qN , qC_4 , E_{LUMO} , $\log \rho$, μ , SA , MR , V dan M dapat dituliskan dalam persamaan sebagai berikut :

$$\log \left(\frac{1}{IC_{50}} \right) = 14,063 - 5,734 (qC_1) + 43,574 (qN) + 5,967 (qC_4) - 0,369 (\mu) + 2,368 (E_{LUMO}) - 0,0720 (SA) + 0,0460 (V) - 0,254 (\log \rho) - 0,0562 (MR) + 0,0102 (M) \quad (7)$$

$$(n = 29; m = 10; R = 0,900; R^2 = 0,809; SE = 0,488; \text{rasio } F_{\text{hitung}}/F_{\text{tabel}} = 3,169)$$

Dapat dikatakan bahwa model persamaan 7 mempunyai kekuatan prediksi terhadap aktivitas biologis (IC_{50}) sebesar 80,9%, dan terdapat $\pm 20\%$ variansi yang tidak dapat dijelaskan hubungannya, atau dengan kata lain masih terdapat variabel-variabel (sifat fisika kimia) lain yang berpotensi dalam penentuan korelasi senyawa modulator Reseptor Asetilkolin Nikotik $\alpha 4\beta 2$.



Gambar 3. Grafik PRESS model persamaan 7

Gambar 3 menunjukkan sebaran korelasi aktivitas prediksi dan eksperimen, jarak titik-titik terhadap garis menunjukkan kedekatan antara hasil prediksi dan eksperimen. Penyimpangan prediksi terbesar terdapat pada senyawa A-85380, senyawa 6 dan 7, hasil prediksi dapat dilihat pada tabel VI. Dilihat dari model struktur senyawa-senyawa A-85380, senyawa 6 dan 7 mempunyai struktur inti yang hampir sama (gambar 8 dan tabel I), perbedaan utama terletak pada rantai samping (R substituen) yaitu adanya Cl dan OCH_2CH_3 . Diduga dengan adanya kedua substituen Cl sebagai penarik elektron, dan OCH_2CH_3 sebagai pendorong elektron memberikan profil elektronik dan non elektronik yang berbeda terhadap sistem. Dengan adanya perbedaan tersebut, pengaruh koefisien terhadap variasi nilai sifat fisika kimia akan sangat berperan dalam

penentuan nilai prediksi, dan mengingat bahwa nilai aktivitas prediksi merupakan penjumlahan dari semua unsur dalam persamaan, maka dapat dikatakan bahwa variasi sifat fisika kimia akan memberikan nilai aktivitas berdasarkan pola besaran tiap variabel bebas terhadap koefisiennya.

Strategi Rancangan Obat dengan model persamaan 7

Prediktor Hansch yang terlibat dalam model persamaan 7 adalah : (a) prediktor elektronik meliputi muatan bersih atom C_1 , N , C_4 , E_{LUMO} , μ ; (b) prediktor sterik yang terlibat adalah, SA , MR , V , M ; dan (c) prediktor hidrofobisitas yang diwakili oleh $\log \rho$. Nilai $\log\left(\frac{1}{IC_{50}}\right)$ dalam model persamaan 7 berbanding lurus dengan qN , qC_4 , E_{LUMO} , volume, massa; dan berbanding terbalik dengan qC_1 , $\log \rho$, μ , luas permukaan (SA) dan refraktivitas molar (MR).

Menurut konsep awal model persamaan 7, muatan bersih atom N dan C_4 ; E_{LUMO} ; Volume; Massa yang bernilai semakin besar (relatif positif) akan meningkatkan nilai $\log\left(\frac{1}{IC_{50}}\right)$, sedangkan muatan bersih atom C_1 , $\log \rho$; μ ; Luas permukaan (SA) dan refraktivitas molar (MR) yang semakin kecil (relatif negatif) akan menurunkannya. Berdasarkan nilai mutlak koefisien dalam model persamaan (1) dapat dilihat koefisien $qN > qC_1 > qC_4 > E_{LUMO} > \mu > \log \rho > SA > MR > V > M$ (tabel VII). Hal tersebut mengartikan bahwa prediktor elektronik qN (dengan koefisien 43,574) mempunyai kontribusi paling besar dalam prediksi aktivitas biologis ($\log \frac{1}{IC_{50}}$), dalam arti dengan perubahan kecil harga muatan bersih atom N akan memberikan perubahan nilai aktivitas yang signifikan.

Nilai koefisien lain mempunyai perbedaan yang sangat jauh terhadap koefisien qN , dan dapat dikatakan bahwa pengaruh variabel-variabel tersebut terhadap prediksi aktivitas biologis sangat kecil, sehingga untuk mendapatkan hasil yang signifikan diperlukan harga variabel yang cukup besar. Walaupun mempunyai koefisien yang relatif kecil, namun keberadaan variabel-variabel tersebut tidak dapat ditiadakan, karena pengaruh kecil dapat dikatakan sebagai faktor koreksi dalam rancangan molekul dengan keberadaan variabel qN yang dominan.

Melihat profil variabel model persamaan 7, jelas sekali bahwa prediktor elektronik memegang peran yang lebih berpengaruh pada potensi aktivitas biologis dari pada prediktor sterik dan hidrofobisitas. Dengan demikian diduga ikatan elektronik antara reseptor dan gugus piridin (terutama atom N) mempunyai kontribusi besar dalam menentukan afinitas modulator asetilkolin, namun dugaan tersebut tidak dapat dimutlakkan karena terdapat faktor-faktor lain yang ikut mempengaruhi. Kehadiran E_{LUMO} sebagai bagian profil elektronik menandakan bahwa senyawa yang mempunyai aktivitas biologis terhadap reseptor asetilkolin nikotinik sub tipe $\alpha 4\beta 2$ cenderung mempunyai sifat sebagai elektrofil. Momen dipol memberikan gambaran delokalisasi muatan

molekular. Selain memberikan gambaran interaksi elektrostatik molekular dengan reseptor, momen dipol juga berhubungan dengan nilai polarisibilitas senyawa-senyawa modulator.

Nilai prediktor hidrofobisitas ($\log \rho$) mempunyai koefisien yang relatif kecil, namun keberadaannya tetap akan memberikan pengaruh pada aktivitas, pengaruhnya diduga pada saat proses farmakokinetik yaitu proses absorpsi, distribusi atau pada besarnya nilai afinitas senyawa terhadap protein plasma atau pada mekanisme penembusan halangan sawar darah otak yang bersifat lipofil. Faktor hidrofobisitas didukung oleh kepolaran senyawa modulator, semakin non polar senyawa tersebut maka akan lebih larut dalam fase minyak/non polar.

Prediktor sterik memegang peran paling kecil pada model persamaan 7, prediktor ini mampu menggambarkan besarnya ukuran relatif dari senyawa modulator. Dengan melihat variasi yang besar pada data sterisitas (massa, volume, luas permukaan) dan diterimannya prediktor ini dalam kriteria statistik, maka dapat diduga dua hal yaitu (1) bahwa reseptor mampu mengubah konformasinya atau konformasinya tidak rigid; dan (2) faktor sterik tidak menentukan kespesifikan senyawa terhadap reseptor asetilkolin nikotinik sub tipe $\alpha 4\beta 2$.

Hasil prediksi dengan model persamaan HKSA diharapkan mempunyai harga aktivitas biologis yang baik, atau lebih baik daripada senyawa yang sudah ada sebagai senyawa modulator reseptor asetilkolin sub tipe $\alpha 4\beta 2$, sebagai contoh misal A-85380. Perlu diketahui bahwa nilai aktivitas prediksi merupakan hasil dari ekstrapolasi korelasi regresi yang telah ditentukan sebelumnya, oleh karena itu seringkali didapatkan kesalahan dalam prediksi. Secara statistik kesalahan prediksi dapat disebabkan karena adanya korelasi antar variabel bebas. Selain itu, hubungan yang dicoba untuk digambarkan merupakan suatu keadaan yang kompleks dengan banyak kemungkinan yang terjadi mengingat banyaknya interaksi dalam sistem biologis.

Melihat banyaknya faktor yang terlibat dalam persamaan, maka banyak hal pula yang perlu diperhatikan dalam melakukan modifikasi molekular. Penambahan substituen akan mengubah kesatuan suatu senyawa terutama sifat fisika kimianya, sehingga tidak dapat dilakukan modifikasi dengan fokus pada sifat fisika kimia tertentu, misal : fokus pada profil elektronik muatan bersih atom N piridin karena koefisiennya relatif besar.

Beberapa poin penting yang dapat dijelaskan sebagai konsep penerapan persamaan HKSA adalah dugaan hubungan nilai relatif (berdasarkan nilai pada seri data sifat fisika kimia) dari setiap variabel terlibat terhadap aktivitas biologis (afinitas senyawa modulator terhadap reseptor asetilkolin nikotinik sub tipe $\alpha 4\beta 2$). Interaksi elektrostatik diwakili oleh besarnya muatan atom N, C₁ dan C₄. Diduga reseptor mempunyai sisi aktif yang berkesesuaian dengan muatan atom dalam piridin tersebut, nilai muatan relatif positif pada atom N dan C₄ cukup untuk menggambarkan adanya interaksi ion-dipol atau dipol-dipol pada sisi yang mengandung ion bermuatan negatif atau dipol negatif pada reseptor, sama halnya pada nilai muatan relatif C₁ negatif. Model ikatan tersebut menggambarkan interaksi obat-reseptor yang reversible, karena mempunyai jenis ikatan lemah. Profil elektronik energi LUMO menunjukkan bahwa senyawa

lebih bersifat sebagai elektrofil atau aseptor elektron. Nilai energi LUMO yang relatif positif menjelaskan kedudukan senyawa aktif pada tingkat orbital molekul tidak terokupasi yang lebih tinggi. Profil elektronik molekular tersebut diduga berhubungan dengan jenis ikatan transfer muatan, dimana senyawa berperan sebagai aseptor elektron dan reseptor sebagai donor elektron. Hal tersebut mendukung pernyataan sebelumnya bahwa ikatan obat-reseptor bersifat reversibel.

Profil hidrofobisitas diwakili oleh $\log \rho$, nilai yang relatif semakin kecil menunjukkan kelarutan lebih kepada fase polar. Hal tersebut tidak dapat selalu dibenarkan karena pada dasarnya nilai $\log \rho$ yang diharapkan adalah nilai yang optimal yang mampu berperan dalam proses farmakokinetik (keberadaan obat) serta ikatan dengan reseptor. Apabila dirancang senyawa dengan kelarutan yang terlalu tinggi pada fase non polar, dapat menyebabkan senyawa tersebut tidak terabsorpsi oleh karena kemungkinan interaksi dengan protein plasma yang berlebihan, dengan nilai kelarutan yang tinggi pada fase polar juga akan mengakibatkan senyawa susah untuk melewati membran.

Luas permukaan senyawa modulator berbanding terbalik dengan nilai aktivitas biologis, dengan nilai yang cenderung semakin kecil akan mendukung peningkatan aktivitas. Luas permukaan yang semakin kecil cenderung membentuk sudut-sudut pada konformasi senyawa dan kemungkinan kontak hanya pada sisi aktif tertentu, sehingga diduga bahwa pembentukan konformasi stabil dari senyawa modulator akan banyak berperan. Mengingat konformasi stabil diakibatkan adanya jarak optimal antar atom penyusun, maka dalam perancangan senyawa perlu dipertimbangkan pemilihan substituen dan kestabilan yang terbentuk setelahnya (jarak antar atom). Faktor sterik lain yang terlibat adalah volume dan massa senyawa modulator, hal itu menjelaskan bahwa afinitas senyawa modulator terhadap reseptor mempunyai karakteristik volume dan massa yang optimal atau sesuai dengan konformasi reseptor. Konformasi senyawa dengan luas permukaan cenderung kecil dan besarnya volume, massa dan refraktivitas yang optimal mengarah pada dugaan bahwa reseptor dapat diduduki oleh beberapa jenis senyawa dengan ukuran molekular yang sesuai (tidak hanya senyawa-senyawa modulator), namun aktivasi (aktivitas intrinsik) tetap dipengaruhi oleh adanya sisi aktif dari senyawa yang berkesesuaian dengan konformasi reseptor.

Perlu diingat bahwa pendekatan hubungan struktur–aktivitas yang telah dilakukan merupakan salah satu cara optimasi struktur, sehingga pengembangan senyawa dengan menggunakan persamaan yang telah dihasilkan harus berdasarkan seri senyawa uji yaitu turunan piridin atau sebagai analog nikotin. Perlu pertimbangan dalam pengembangan struktur senyawa yang akan menghasilkan dugaan yang rasional hubungan keseluruhan sifat fisika kimia yang berkontribusi pada persamaan terhadap peristiwa biologis yang mungkin terjadi.

PENUTUP

Hubungan kuantitatif struktur aktivitas senyawa modulator reseptor $\alpha 4\beta 2$ dilukiskan dalam persamaan matematis sebagai berikut:

$$\log \left(\frac{1}{IC_{50}} \right) = 14,063 - 5,734 (qC_1) + 43,574 (qN) + 5,967 (qC_4) \\ - 0,369 (\mu) + 2,368 (E_{LUMO}) - 0,0720 (SA) + 0,0460 (V) \\ - 0,254 (\log p) - 0,0562(MR) + 0,0102(M) \\ (n = 29; m = 10; R = 0,900; R^2 = 0,809; SE = 0,488; \text{rasio } F_{hitung}/F_{tabel} = 3,169)$$

DAFTAR PUSTAKA

- Alim, A.H., Pradipta, M.F., Tahir, I., 2000, Applying Hansch Analysis in The Study of Structure-Toxicity Correlation of Phenol Compound Based on Theoretical Parameter *Jurnal Nasional Kimia Fisik*, III, 2, 23-26.
- Kokpol, S.U., Hannongboa, S.V., Thongrit, N., Polman, S., Rode, B.M. and Schwendinger, M.G., 1988, Analysis of Structure-Activity Relation for Primaquine Antimalarial Drugs by a Quantum Pharmacological Approach, *Anal. Sci.*, 4, 565-568.
- Nielsen, F.S., Nielsen, E.O., Olsen, G.M., Liljefors, T., and Peter, D., 2000, Novel Poten Ligands for the Central Nicotinic Acetylcholine Receptor : Synthesis, Reseptor Binding, and 3D-QSAR Analysis, *J. Med. Chem.*, **43**, 2217-2226.
- Rode, B.M., Schwendinger M.G., Kokpol, S.U., Hannongboa S.V., Polman S., 1989, Quantum Pharamological Studies on Antimalarial Drugs, *Monatschefte fur Chemie*, 120, 913-921.
- Schapira, M., Abagyan, R., Totrov, M., 2002, Structural model of nicotinic acetylcholine receptor isotypes bound to acetylcholine and nicotine. *BioMed Central*, **2**(1) 1472-6807.
- Silverman, B.R., 1991, *The Organic chemistry of Drug Design and Drug Action*, 13-65, Academic Press, New York.
- Tahir, I., Setiaji, B. dan Alim, S.A., 2001, Hubungan Kuantitatif Struktur-Aktivitas Senyawa Fenil Etil Amina dengan Metoda Validasi Silang, *Berkala Ilmiah MIPA*, XI (1), 1-29
- Tahir, I., Wijaya, K., dan Putri, E.S.Y., 2004, Analisis Hubungan Kuantitatif Struktur Elektronik dan Aktivitas Senyawa Turunan Indolilalkilamina dengan Teknik Pemisahan Data Cara Acak, Seminar Nasional Hasil Penelitian Farmasi, 26 Juni, Jogjakarta
- Tahir, I., Siswandari, A., Setiaji, B., dan Wahyuningsih, T.D., 2001, Design of Substituted Isoamylcinnamic Using QSAR Approach, *Jurnal Nasional Kimia Fisik*, III, 3, 73-77