

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Rancangan Penelitian ini merupakan penelitian *pre experimental design* berbasis komputasional dari lima belas (15) senyawa flavonoid daun jambang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) terhadap SARS-CoV-2 M^{Pro}. Pengujian dilakukan dengan metode *Molecular Docking*.

3.2 Sampel

Sampel senyawa flavonoid daun jambang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) yang digunakan mengacu pada penemuan terdahulu dan diambil sampel sebanyak lima belas. Sampel berupa struktur tiga dimensi yang didapat dengan mengunduh dari website Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.3 Bahan dan Alat

3.3.1 Bahan

Bahan yang digunakan berupa struktur tiga dimensi dari Reseptor SARS-CoV-2 *Main Protease* dengan kode PDB ID : 7C6S, *Spike Protein* dengan kode PDB ID : 7LM8 dan *Angiotensin Converting Enzyme 2* (ACE 2) dengan kode PDB ID : 6LZG yang didapat dari *Protein Data Bank*, serta struktur dua dimensi senyawa flavonoid daun jambang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) yang diunduh dari website Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.3.2 Alat

Dalam penelitian ini digunakan perangkat keras berupa Laptop Asus . dengan spesifikasi Microsoft Windows 10 *enterprise 64-bit operating system*, *processor* Intel(R) Core(TM) i3-5005U CPU @ 2.00GHz, dengan 4,0GB RAM. Untuk perangkat lunak yang digunakan adalah sistem operasi windows 10,

Discovery Studio versi 16.1, *AutodockTools*-1.5.7, *Desmond* dari Schrödinger, *MarvinSketch* 5.2.5.0., *Molegro molecular viewer*. Serta program berbasis web berupa *pkCSM* dan *Protein Data Bank* (PDB).

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini berupa potensi penghambatan senyawa flavonoid daun jambang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) terhadap reseptor SARS-CoV-2 *Main protease*. sebanyak dua puluh dua (sebagai ligan) mengacu pada penelusuran literatur serta penemuan terbaru.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah energi bebas ikatan (ΔG) dan Konstanta inhibisi antara ligan dan reseptor.

3.4.3 Definisi Operasional Variabel

Berikut adalah tabel dari definisi operasional variabel pada penelitian ini:

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

No.	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil ukur
Variabel Bebas					
1.	Potensi penghambatan senyawa flavonoid daun jambang (<i>Syzygium cumini</i>) terhadap SARS-CoV-2 <i>Main Protease</i>	Hasil penambatan yang baik, salah satunya ialah dilihat dari perbandingan nilai energi bebas ikatan (ΔG) atau <i>binding energy</i> dan juga Konstanta Inhibisi (KI).	Pengujian dengan <i>Molecular Docking</i> untuk mengetahui energi bebas ikatan (ΔG) atau <i>binding energy</i> dan Konstanta Inhibisi (KI).	-	-

No.	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil ukur
Variabel Terikat					
1.	Energi bebas ikatan (ΔG)	Energi yang dibutuhkan untuk interaksi antara ligan dan reseptor	Uji penambatan	Rasio	Nilai energi bebas ikatan (ΔG)
2.	Konstanta Inhibisi (KI)	Indikasi seberapa kuat suatu penghambat atau inhibitor	Uji penambatan	Rasio	Nilai Konstanta Inhibisi (KI)

3.5 Tempat dan Waktu Penelitian

3.5.1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmasi Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Bakti Tunas Husada Tasikmalaya.

3.5.2. Waktu Penelitian

Penelitian ini berlangsung pada bulan Desember 2022 sampai dengan Februari 2023.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1. Preparasi Ligan

Struktur turunan flavonoid tersedia serta dapat diunduh dari database PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), lalu protonasi dilakukan pada rentang pH 7,4 dan konformasi pada struktur turunan flavonoid menggunakan perangkat lunak *MarvinSketch* versi 5.2.5.0 dari chemaxon. Struktur yang telah dipreparasi selanjutnya disimpan dengan format *file* .mol2 (Purnomo, 2013). Prosedur tersebut dilakukan untuk semua ligan turunan flavonoid (Ruswanto *et al.*, 2022).

3.6.2. Preparasi Reseptor

Reseptor SARS-CoV-2 *Main Protease* dengan kode PDB ID : 7C6S, *Spike Protein* dengan kode PDB ID : 7LM8 dan *Angiotensin Converting Enzyme 2* (ACE 2) dengan kode PDB ID : 6LZG diunduh dari *website Protein Data Bank* melalui link <http://www.rcsb.org/> dengan format .pdb. Reseptor ini kemudian dipisahkan dengan ligan alaminya lalu dilakukan preparasi dengan menghilangkan molekul air serta menambahkan proton pada molekulnya. Kemudian reseptor yang sudah dipreparasi disimpan dengan format .pdb (Ruswanto, *et al.*, 2018). Dari ketiga reseptor yang sudah di preprasi, akan diuji dengan parameter di bawah ini, untuk dipilih reseptor yang terbaik.

Parameter yang digunakan untuk memilih reseptor :

1. Data *organism(s)* : *homo sapiens* dan atau *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2* (SARS-CoV-2)
2. Resolusi : $< 3 \text{ \AA}$
3. Metode difraksi : X-RAY

data organisme dipilih *homo sapiens* (manusia), nilai resolusi berpengaruh pada kestabilan reseptor. dan baiknya kurang dari $3 \text{ \AA}$, metode difraksi X-RAY dipilih karena memiliki kesamaan pose dengan struktur protein asli, serta data native ligand menjadi pertimbangan.

3.6.3. Identifikasi reseptor Target

Identifikasi reseptor target dilakukan dengan meninjau profil reseptor target caranya dengan memasukan kode PDB dari reseptor yang terpilih pada *website* <http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>, kemudian muncul profil data dari reseptor tersebut (Ruswanto *et al.*, 2020).

3.6.4. Validasi Docking

Proses ini dilakukan guna mendapatkan metode yang valid. Reseptor target yang telah diunduh selanjutnya dipilih ligan alaminya sebagai proses validasi dari metode *docking*. Parameter analisis data ini menggunakan *root-mean-square-deviation* (RMSD). Metode *docking* dianggap valid jika nilai RMSD yang dihasilkan ≤ 2 Å (Ruswanto *et al.*, 2020).

3.6.5. Virtual Screening dan Docking Ligan Terhadap Reseptor Target

Setelah ligan dipreparasi selanjutnya dikonversi dari format *file .mol2* menjadi format *file PDBQT*, menggunakan *AutodockTools-1.5.7*. Proses *Virtual Screening* seluruh senyawa turunan flavonoid dilakukan menggunakan *software* *AutodockTools* yang merupakan alat untuk proses *docking*. *file* parameter *grid* dan *docking* dikonfigurasi menggunakan *autodock*. *Autodock* dan *autogrid*, terintegrasi dengan *Autodock4* digunakan dalam menghasilkan *grid map* untuk setiap atom ligan. Tiap ligan dianalisis dengan pengaturan *default docking* serta dijalankan LGA untuk 100 *running* pada tiap ligan. Selain itu, *File* parameter *grid* juga digunakan untuk memprediksi residu asam amino pada situs aktif reseptor target yang berinteraksi dengan ligan (Umesh *et al.*, 2020). Senyawa hasil docking dengan kandidat terbaik selanjutnya divisualisasikan menggunakan *software* *Discovery Studio* versi 16.1 dengan melihat gambaran interaksinya dalam bentuk 2 dan 3 dimensi (Ruswanto *et al.*, 2022).

3.6.6. Simulasi Dinamika Molekul

Struktur kompleks reseptor *Main Pro*, dengan kandidat terbaik senyawa flavonoid kemudian dilakukan proses simulasi dinamika molekul menggunakan perangkat lunak *Desmond* dan air model yang digunakan adalah *TIP3P*. Proses ini pertama-tama dilakukan parameterisasi ligan dan protein dengan ditambahkan medan gaya kemudian dilakukan penentuan koordinat awal serta minimisasi sistem. Tahap kedua dilakukan pemanasan bertahap untuk equilibrasi sistem dari 0°K –

300°K. Simulasi dinamika molekul dijalankan dengan keadaan tekanan dan suhu konstan selama 20 ns (Ruswanto *et al.*, 2022).

3.6.7. Prediksi profil farmakokinetik dan Toksisitas

Uji absorpsi, distribusi, metabolisme serta toksisitas dilakukan menggunakan program pkCSM yang di akses pada <https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/prediction> Struktur senyawa dari kandidat terbaik dikonversi terlebih dahulu ke dalam format molfile (*.mol2) sebelum menggunakan program pkCSM. Program akan secara otomatis menghitung profil farmakokinetik dengan parameter *Human Intestinal Absorption* (HIA), Caco-2 dan ikatan protein plasma. (Mardianingrum *et al.*, 2020).

