

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

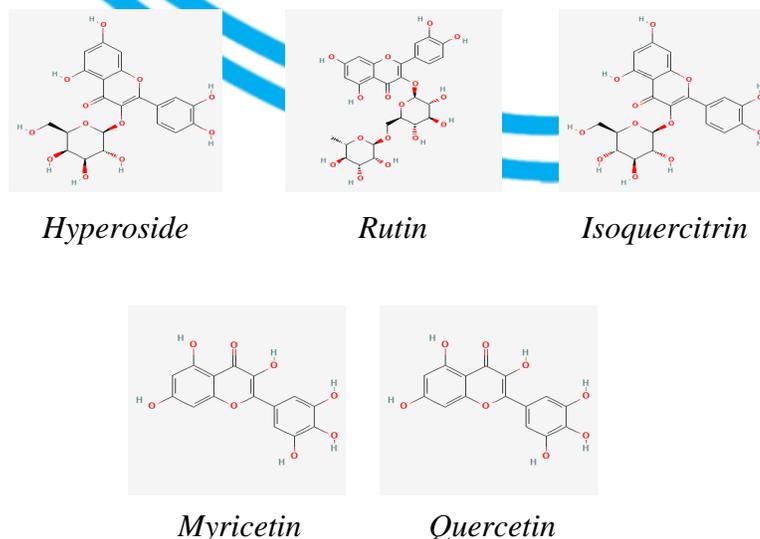
Penelitian ini dilakukan di Universitas Bakti Tunas Husada Tasikmalaya, penelitian ini dilaksanakan pada bulan januari 2023.

3.2 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis dan rancangan dari penelitian ini yaitu penelitian *pre experimental design* dengan basis komputasi dari lima senyawa flavonoid daun gedi terhadap reseptor COX-2 dan Interleukin-1 β Pengujian dilakukan menggunakan metode *molecular docking*, molekular dinamik dan farmakokinetik.

3.3 Sampel

Sample merupakan senyawa flavonoid daun gedi (*Abelmoschus manihot* L.) yang diambil mengacu pada penelitian terdahulu sebanyak 5 senyawa. Sample yang digunakan merupakan struktur tiga dimensi yang didapat dari *website* Pubchem. Berikut 5 gambar struktur senyawa flavonoid daun gedi (*Abelmoschus manihot* L.)



Gambar 3.1 5 Senyawa Flavonoid Daun Gedi (*Abelmoschus manihot* L.)

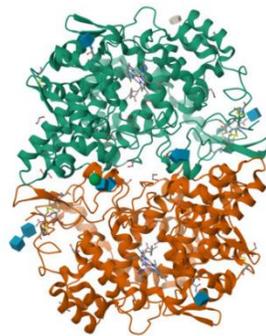
(Sumber: Pubchem)

3.4 Bahan dan Alat

3.4.1 Bahan

Bahan yang digunakan merupakan struktur tiga dimensi dari reseptor COX-2 (PDB ID: 4ph9), reseptor Interleukin-1 β (PDB ID: 5r85) dan struktur tiga dimensi dari turunan senyawa flavonoid daun gedi (*Abelmoschus manihot* L.) yang didapat dari website Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

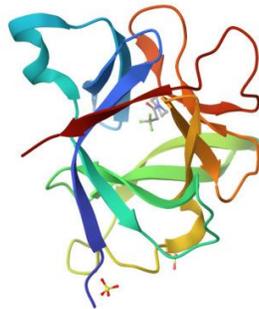
- PDB ID: 4ph9



Gambar 3.2 Struktur Tiga Dimensi Reseptor 4ph9
(Sumber: Protein Data Bank)

- PDB ID: 5r85

KARAWANG



Gambar 3.3 Struktur Tiga Dimensi Reseptor 5r85
(Sumber: Protein Data Bank)

3.4.2 Alat

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan perangkat keras dan lunak. Perangkat keras yang digunakan dalam penelitian ini yaitu laptop toshiba dengan spesifikasi intel(R) CoreTM i5-8400 CPU @ 2.80 GHz x 6, 7.00 GB of Ram 64- Bit

Operating Sistem Linux of Ubuntu 16.04 LTS, intel(R) CoreTM i5-6400 CPU @ 2.70 GHz x 16.00 GB of Ram 64-Bit Operating Sistem of Window 10 , dan perangkat lunak yang digunakan dalam penelitian ini yaitu AutodockTools-1.5.7., PyRx., MarvinSketch versi 5.2.5.0, AmberTools versi 16.00, Discovery Studio versi 16.1, Molegro molecular viewer dan beberapa program berbasis web seperti Protein Data Bank (PDB) dan PreADMET.

3.5 Variabel penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah potensi penghambatan senyawa flavonoid daun gedi (*Abelmoschus manihot* L.) terhadap reseptor COX-2 dan interleukin-1 β . Sebanyak lima senyawa (sebagai ligan) mengacu pada penemuan sebelumnya.

3.5.2 Variabel Terikat

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

3.5.3 Definisi Oprasional Variabel

Tabel 4.1 Definisi Oprasional Variabel

No.	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil ukur
Variabel Bebas					
1.	Potensi penghambatan senyawa flavonoid gedi(<i>Abelmoschus manihot</i> L.) terhadap COX-2	Hasil penambatan yang baik, salah satunya dilihat dari perbandingan energi bebas ikatan (ΔG) atau <i>binding energy</i> dan juga Konstanta Inhibisi(KI).	Pengujian dengan molecular docking untuk mengetahui energi bebas ikatan (ΔG) atau <i>binding energy</i> dan Konstanta Inhibisi (KI).	-	-

Variabel Terikat

1.	Energi bebas ikatan(ΔG)	Energi dibutuhkan untuk interaksi antara ligan dan reseptor	yang	Ujipenambatan	Rasio	Nilai energi bebas ikatan (ΔG)
2.	Konstanta Inhibisi (KI)	Indikasi kuat penghambat inhibitor	seberapa kuat atau	Ujipenambatan	Rasio	Nilai Konstanta Inhibisi (KI)

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Analisis Reseptor

Dengan melihat profil protein data bank (PDB) pada website (<https://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>) merupakan proses analisis reseptor target dilakukan Hasil analisis protein yang digunakan untuk melihat bahwa protein yang digunakan baik adalah plot Ramachandran (Ruswanto et al., 2018).

3.6.2 Preparasi Ligan

Unduh struktur turunan flavonoid daun gedi (*Abelmoschus manihot* L.) yang tersedia pada database PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), lalu lakukan protonasi pada pH 7,4 kemudian konformasi pada struktur turunan flavonoid daun gedi (*Abelmoschuhs manihot* L.) menggunakan software MarvinSketch versi 5.2.5.0 dari chemaxaon. Struktur turunan flavonoid yang telah dipreparasi kemudian disimpan dengan format file.mol2 (Purnomo, 2013). Prosedur ini dilakukan untuk semua ligan turunan falvonoid daun gedi (*Abelmoschus manihot* L.)

3.6.3 Preparasi Reseptor

Unduh reseptor COX-2 dan interleukin-1 β di website (<http://www.rcsb.org/>) Protein Data Bank dengan kode PDB 4ph9 untuk COX-2 dan 5r85 untuk Interleukin-1 β , dengan format .pdb. Kemudian ligan dipisahkan dari reseptor alaminya setelah itu dipreparasi dengan penambahan proton pada molekul dan menghilangkan molekul air. Setelah mendapatkan hasil, hasil preparasi disimpan dengan format .pdb (Ruswanto,

Nofianti, *et.al.*, 2018).

3.6.4 Identifikasi Reseptor Target

Reseptor target dianalisis dengan cara melihat profil reseptor target pada website <http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>, kemudian masukan kode PDB 4ph9 Cox-2 dan 5r85 interleukin-1 β . Setelah itu data profil dari reseptor target akan muncul (Ruswanto *et.al.*, 2020).

3.6.5 Validasi Docking

Validasi docking dikerjakan agar mendapatkan suatu metode yang valid. Pilih ligan alami untuk melakukan proses validasi metode docking dengan reseptor target yang sudah di download sebelumnya. Root-mean-square-deviation (RMSD) merupakan parameter yang digunakan untuk menganalisis data. Jika nilai RMSD yang dihasilkan $\leq 2 \text{ \AA}$ maka metode docking dikatakan valid. (Ruswanto *et.al.*, 2020).

3.6.6 Virtual Screening dan Docking Ligan Terhadap Reseptor Target

Konversi ligan yang telah dipreparasi dari format file .mol2 ke format file PDBQT menggunakan AutodockTools 1.5.7. Kemudian dilakukan proses virtual screening 5 senyawa flavonoid pada daun gedi (*Abelmoschus manihot* L.) dengan software pyRx yang berfungsi sebagai alat untuk proses docking. File parameter grid dan docking dikonfigurasi menggunakan autodock. Cara menghasilkan grid map untuk setiap atom ligan yaitu menggunakan autodock dan autogrid yang telah terintegrasi dengan autodock4. Setiap ligan dianalisis dalam default docking dan dijalankan LGA untuk 20 running pada setiap ligan. Residu asam amino pada situs aktif reseptor target yang berinteraksi dengan ligan dapat diprediksi menggunakan file parameter grid (Umesh *et.al.*, 2020). Kemudian senyawa kandidat hasil docking terbaik dilakukan visualisasi menggunakan software Discovery Studio version 16.1 amati hasil interaksinya dalam bentuk 2 dimensi dan 3 dimensi.

3.6.7 Simulasi Dinamika Molekul

Dilakukan proses simulasi dinamika molekul menggunakan software AmberTools versi 16.00 dengan air model TIP3P pada struktur kompleks reseptor COX-2, interleukin-1 β dan kandidat terbaik senyawa flavonoid daun gedi (*Abelmoschus manihot* L.) Langkah pertama simulasi dinamika molekul yaitu parameterisasi ligan dan protein lalu ditambahkan medan gaya dilanjutkan dengan

penentuan koordinat awal dan minimisasi sistem. Langkah kedua yaitu melakukan equilibrasi sistem dengan pemanasan bertahap $0^{\circ}\text{K} - 300^{\circ}\text{K}$. Simulasi dinamika molekul berjalan pada tekanan dan suhu konstan selama 20 ns.

3.6.8 Prediksi Profil Farmakokinetik dan Toksisitas

Uji farmakokinetik yang meliputi uji absorpsi, distribusi, metabolisme ditambah dengan uji toksisitas yang dianalisis melalui PreADMET pada akses <https://preadmet.bmdrc.kr>. Struktur senyawa kandidat terbaik terlebih dahulu dikonversi kedalam format molfile (*.mol2) agar dapat menggunakan program tersebut. Program ini otomatis akan menghitung profil farmakokinetik yang meliputi human intestinal absorption (HIA), ikatan protein plasma dan caco-2. Uji ames dan uji karsinoma pada tikus merupakan parameter yang digunakan untuk memprediksi toksisitas (Mardianingrum *et al.*, 2020).

3.7 Analisis Data

Proses analisis data yaitu dengan perangkat lunak AutodockTools yang digunakan untuk melihat interaksi antara ligan dan reseptor menggunakan perangkat lunak BIOVIA *Discovery Studio*. Dan perangkat lunak *Notepad* untuk melihat Rank energi bebas ikatan dan Konstanta Inhibisi.

