

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian kuantitatif dan dirancang dengan metode pra eksperimental design di Universitas Bakti Tunas Husada berbasis komputasional dari senyawa flavonoid daun saga (*Abrus precatorius* L.) terhadap COX-2 dan IL-1. Pengujian dilakukan dengan metode *molecular docking*.

### 3.2 Sampel

Sampel senyawa flavonoid daun saga (*Abrus precatorius* L.) yang digunakan mengacu pada penemuan terdahulu dan diambil sample sebanyak 7 senyawa. Sampel berupa struktur tiga dimensi yang didapat dengan membuat struktur kimia menggunakan perangkat lunak *Marvin sketch*.

### 3.3 Bahan Penelitian

#### a. Senyawa Uji

Senyawa uji yang digunakan yaitu senyawa flavonoid (hemiphloin, (2 R)-naringenin 6-C- $\beta$ -D-glucopyranoside, isohemiphloin, hispidulin 4'-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, cirsimaritin, hispidulin dan cirsimaritin) dari daun saga (*Abrus precatorius* L.).

#### b. Reseptor

Data struktur 3D Kristal reseptor yang digunakan untuk analisis *molecular docking* diperoleh dari Protein Data Bank (PDB) dengan laman <http://www.rcsb.org/pdb>, reseptor yang digunakan yaitu COX-2 dengan kode 4PH9 dan IL-1 dengan kode 5R85.

### 3.4 Alat Penelitian

#### 3.4.1 Perangkat Keras Komputer

Perangkat yang digunakan adalah Laptop dengan Intel® Core 5i 8.00 GB of RAM (*Random Acces Memory*) 64-bit *Operating System Windows 10* dan *Operating Sistem of Linux Ubuntu 18.04.5 LTS*.

#### 3.4.2 Perangkat Lunak Komputer

*MarvinSketch, AutodockTools-1.5.7, Discovery studio* versi 21.1, *Molegro Molecul Viewer, Desmond software for academic* dan program pembantu lain yang berbasis server online seperti *pkCSM, Protein Data Bank (PDB), PubChem, SAVES, dan Lipinski's Rule of FiveAutodockTools.*

### 3.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di *Laboratorium Riset Universitas Bakti Tunas Husada* yang berlokasi di *Kabupaten Tasikmalaya, Jawa Barat* pada bulan Januari 2023.

### 3.6 Variabel Penelitian

#### 3.6.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu senyawa flavonoid dari daun saga (*Abrus precatorius L.*) yang memiliki potensi menghambat reseptor COX-2 dan reseptor IL-1 masing-masing tujuh senyawa (sebagai ligan) yang sama dengan mengacu pada penemuan sebelumnya.

#### 3.6.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu berupa energi bebas ikatan ( $\Delta G$ ) dan konstanta inhibisi antara ligan an reseptor.

### 3.6.3 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional dapat dilihat pada tabel 3.1.

**Tabel 3.1** Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat ukur	Skala	Hasil ukur
<b>Variabel bebas</b>					
1	Potensi penghambatan senyawa flavonoid daun (Abrus precatorius L.) terhadap reseptor COX-2	Hasil dari hambatan yang baik, yakni dapat dilihat dari perbandingan nilai energi bebas ikatan ( $\Delta G$ ) atau konstanta inhibisi (KI)	Hasil dari Pengujian dengan molecular docking untuk mengetahui energy bebas ikatan ( $\Delta G$ ) atau <i>binding energy</i> dan Konstanta Inhibisi (KI)	-	-
2.	Potensi penghambatan senyawa flavonoid daun (Abrus precatorius L.) terhadap reseptor IL-1	Hasil dari hambatan yang baik, yakni dapat dilihat dari perbandingan nilai energi bebas ikatan ( $\Delta G$ ) atau konstanta inhibisi (KI)	Hasil dari Pengujian dengan molecular docking untuk mengetahui energy bebas ikatan ( $\Delta G$ ) atau <i>binding energy</i> dan Konstanta Inhibisi (KI)		

<b>Variabel Terikat</b>						
1	Energi bebas ikatan ( $\Delta G$ )	Energi yang dibutuhkan untuk interaksi antara ligan dan reseptor	Uji penambahan	Rasio	Nilai	energi bebas ikatan ( $\Delta G$ )
2	Konstanta Inhibisi (KI)	Indikasi seberapa kuat suatu penghambat atau inhibitor	Uji penambatan	Rasio	Nilai	konstanta inhibisi (KI)

### 3.7 Prosedur Penelitian

#### 3.7.1 Preparasi Struktur Ligan

Ligan disebut juga senyawa uji flavonoid dari daun saga (*Abrus Precatorius L.*) digambar menggunakan perangkat lunak *Marvinsketch*, lalu dilakukan preparasi geomteri dan protonasi pada pH 7,4 dan file disimpan dengan format file mrv, kemudian dilakukan optimasi konformasi molekul pada ligan untuk mendapatkan konformasi paling konstan dengan cara menghitung energi sampai didapat energi yang paling kecil dan selanjutnya disimpan dalam format mol2/pdb (Ruswanto *et al.*, 2015).

#### 3.7.2 Identifikasi Reseptor Target

Lakukan analisis reseptor target yang dapat dilakukan dengan melihat pada propil reseptor target, dengan cara memasukan kode 4PH9 dan 5R85 melalui laman <https://www.ebi.ac.uk/pdbsum>. Dari hasil analisis pada reseptor yang digunakan untuk mengetahui bahwa protein yang digunakan dapat sesuai dengan parameter plot Ramachandran dan ERRAT melalui laman untuk melihat parameter *overall quality factor* pada reseptor yang digunakan melalui laman [www.doe-mbi.ucla.edu/errata](http://www.doe-mbi.ucla.edu/errata).

### 3.7.3 Preparasi Reseptor Dengan Ligan Alami

Reseptor COX-2 kode 4PH9 dan reseptor Interleukin 1 kode 5R85 dari protein data bank melalui website <http://www.rscb.org/> dalam format .pdb. Reseptor tersebut dipisahkan dari ligan alaminya kemudian dilakukan preparasi dengan cara menghilangkan air dan penambahan proton pada molekulnya. Selanjutnya hasil preparasi disimpan dalam format .pdb (Ruswanto, 2015).

### 3.7.4 Validasi Reseptor

Proses ini bertujuan untuk melihat reseptor yang digunakan sudah memenuhi persyaratan atau tidak. Persyaratan berdasarkan data biologi dan organisme yaitu reseptor permukaan yang tidak memiliki aktivitas sebagai enzim akan lebih baik menggunakan terminologi agonis dan antagonis dan data *organism(s)* dinyatakan *homo sapiens* (manusia). Persyaratan berdasarkan data metode penapisan tiga dimensi yaitu metode yang digunakan *X-ray diffraction* yang merupakan metode terbaik untuk menggambarkan struktur tiga dimensi dari senyawa makromolekul dan nilai RMSD <2 Angstrom. RMSD (*Root Mean Square Deviation*) adalah suatu parameter yang dapat mengevaluasi parameter proses docking yang dijalankan sudah sesuai atau tidak, sehingga mewujudkan perubahan yang besar terhadap konformasi ligan alami sebelum atau sesudah dilakukan validasi (Dwitiyanti *et al.*, 2019). Proses untuk mendapatkan RMSD diperlukan pengaturan *grid box* yang sesuai berdasarkan letak posisi ligan dengan situs aktif reseptor. *Grid box* reseptor 4PH9 yaitu x, y, z (13.578, 23.024, 25.205) dan reseptor 5R85 yaitu x, y, z (39.191, 2.757, 73.41).

### 3.7.5 Virtual Screening dan Docking Terhadap Reseptor Target

Kemudian ligan yang sudah dilakukan preparasi dikonversi dari format file .mol2 menjadi format file PDBQT dengan menggunakan *AutodockTools*. Proses *Virtual Screening* dilakukan terhadap semua senyawa flavonoid yang dilakukan melalui laman pyRx sebagai alat untuk proses *docking*. Pengaturan untuk file parameter grid dan *docking* dibuat

menggunakan *Autodock*. *Autodock* dan *Autogrid* bawaan *Autodock4* digunakan untuk menghasilkan peta kisi untuk setiap atom ligan. Analisis setiap ligan diatur ke *docking* standar dan LGA dilakukan 20 kali dengan masing-masing ligan. File parameter grid juga digunakan untuk memprediksi residu asam amino di situs aktif reseptor target yang akan berinteraksi dengan ligan (Ruswanto *et al.*, 2015). Hasil senyawa dengan kandidat yang terbaik dari hasil docking dilakukan visualisasi menggunakan *software Pymol* dengan melihat residu dan interaksinya dalam bentuk 2D dan 3D.

### 3.7.6 Visualisasi Hasil Docking

Interaksi reseptor target dengan ligan uji divisualisasikan menggunakan *software Pymol* dalam bentuk dimensi 2D dan 3D. Interaksi reseptor target dengan ligan uji dan asam amino ditunjukkan oleh ikatan yang terbentuk. Hasil simulasi antara reseptor dengan ligan alami sebagai kontrol positif dan ligan uji terbaik juga divisualisasikan secara *overlay*. Rendering dengan *software* ini dibuat semenarik mungkin dengan format penyajian warna kontras yang membantu menyampaikan informasi secara visual dengan jelas, dan hasil render disimpan dalam format *.jpg*.

### 3.7.7 Simulasi Molekular Dinamik

Struktur kompleks pada reseptor dengan kandidat molekul senyawa flavonoid terbaik yang sudah dipersiapkan untuk dilakukan proses simulasi *molecular* dinamik menggunakan *Desmon software for academic license* (D.E. Shaw Research, New York) untuk melihat kestabilan ikatan dari COX 2 dan IL-1 (reseptor). Sistem simulasi ini menggunakan air dengan model TIP3P dan 0,15 M NaCl untuk mensimulasikan konsentrasi ion fisiologus yang dilakukan memperkecil energi selama 100 ps. Kemudian simulasi MD berjalan selama 20 ns pada  $10 \text{ \AA}^0 \times 10 \text{ \AA}^0$  dan NPT esembel. Energi dicatat setiap 1,2 ps. Netralisasi kompleks ligan dengan penahan ion  $\text{Na}^+$  atau  $\text{Cl}^-$  dilakukan untuk menyeimbangkan muatan bersih dari sistem simulasi *molecular* dinamik. Rantai *Nose-Hoover* dan algoritma dinamis *martyana-*

*Tobias\_klein* digunakan untuk menjaga suhu semua sistem *molecular* dinamik masing-masing pada 300 K dan 1,01325 bar (Kumar *et al.*, 2020).

### 3.7.8 Lipinski's rule of five

Lakukan pengamatan terhadap obat yang dilakukan dengan senyawa flavonoid yang berasal dari daun saga (*Abrus precatorius* L.) dengan mempertimbangkan ketentuan *the rule of good medicine (Lipinski's rule of five)* dengan hasil yang diperoleh yaitu berat molekul <500 g/mol, lipofilitas <5, donor hidrogen <5, akseptor hidrogen <10, dan *refactory* molar antara 40-130 (Ruswanto *et al.*, 2015).

### 3.7.9 Prediksi Farmakokinetik dan Toksisitas

Untuk melakukan uji senyawa flavonoid dengan menggunakan *pkCSM* didapatkan pada laman <http://structure.bioc.cam.ac.uk/pkcsm>. Prediksi yang dicari meliputi absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi dan toksisitas dari *SMILES* senyawa flavonoid tersebut. Dengan parameter yang dapat dilihat yaitu *Caco2* (log cm/s) dan *Intestinal absorption (human)* (%). *VDss (human)* (Log L/Kg). *BBB permeability* (log BB). *Renal OCT2 substrate* dan toksisitas.

### 3.8 Diagram Penelitian

Berikut adalah diagram kegiatan ketika melakukan penelitian.

