

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 Buana Perjuangan Karawang berbasis komputasional dari turunan flavonoid bunga telang terhadap RE- α dan PR+. Pengujian dilakukan dengan metode *molecular docking*.

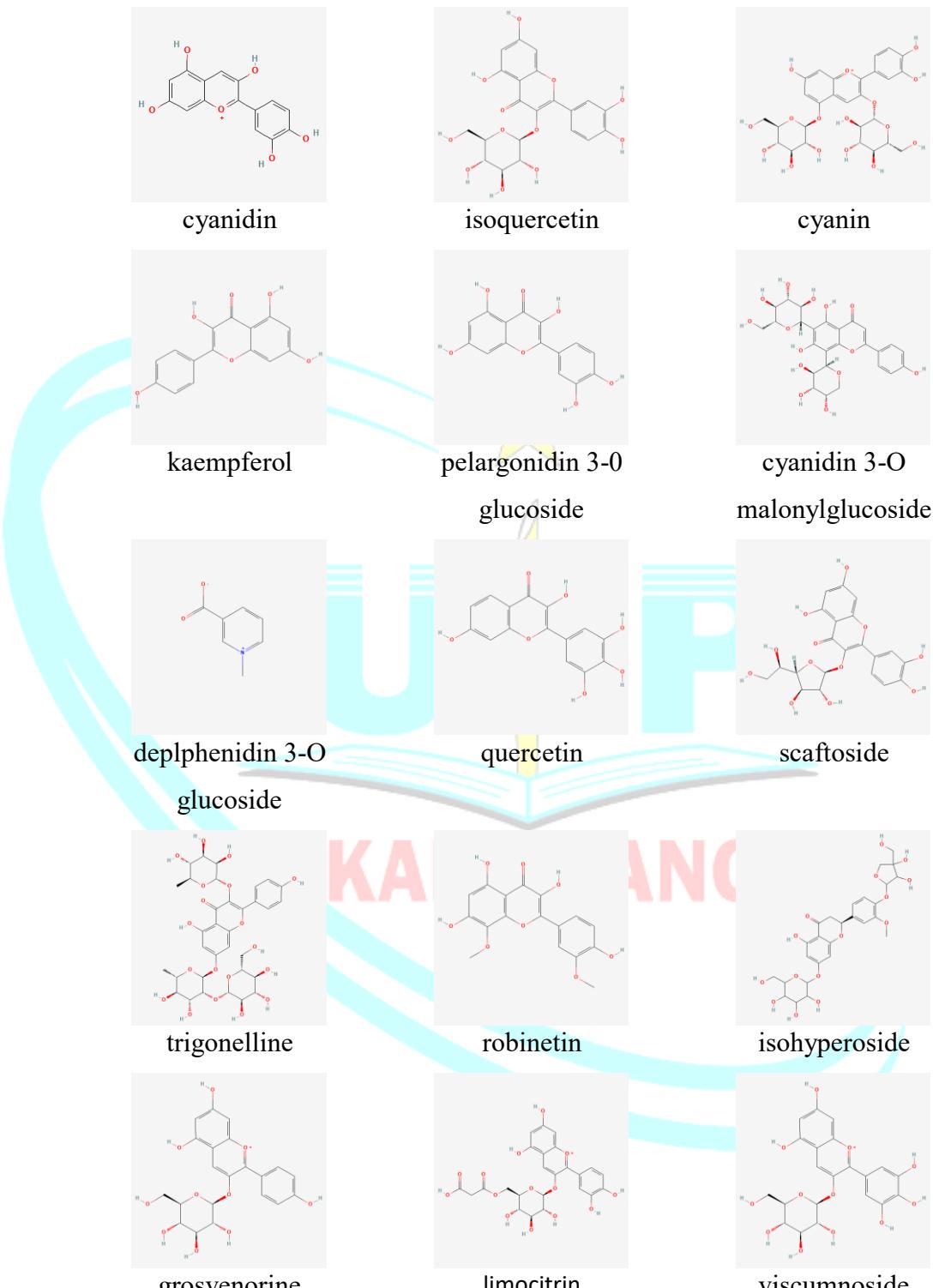
3.2. Sampel

Sampel turunan falvonoid bunga telang yang digunakan mengacu pada penemuan terdahulu dan diambil sampel antosianin (cyanidin, isoquercetin, cyanin, kaempferol, pelargonidin 3-O-glucoside, cyanidin 3-O malonylglucoside, delphenidin 3-O-glucoside), flavonol (quercetin, schaftoside, trigonelline, robinetin, isohyperoside), dan flavon (grosvenorine, limocitrin, viscumnoside) dari bunga telang. Sampel berupa struktur tiga dimensi yang didapat dengan membuat struktur kimia menggunakan perangkat lunak *Marvin Sketch*.

3.3. Bahan Penelitian

3.3.1 Senyawa Uji

Senyawa uji yang digunakan yaitu turunan flavonoid yaitu antosianin (cyanidin, isoquercetin, cyanin, kaempferol, pelargonidin 3-O-glucoside, cyanidin 3-O malonylglucoside, delphenidin 3-O-glucoside), flavonol (quercetin, schaftoside, trigonelline, robinetin, isohyperoside), dan flavon (grosvenorine, limocitrin, viscumnoside) dari bunga telang.



Gambar 3. 1 Senyawa Turunan Flavonoid
(Sumber: Pubchem, 2021)

3.3.2 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 RE- α dengan kode 5W9C dan PR+ dengan kode 1ZUC.

3.4. Alat Penelitian

3.4.1 Perangkat Keras Komputer

Perangkat yang digunakan adalah laptop dengan Intel Core I3 8,00 GB of RAM (*Random Acces Memory*) 64-Bit *Operating system windows* 10 dan *Operating sistem of linux Ubuntu* 18.04.LTS.

3.4.2 Perangktal Lunak Komputer

MarvinSketch, AutodockTools-1.5.7, Discovery Studio versi 21.1, *Molegro Molecule Viewer, Desmond software for academic, Pyrex* dan program pembantu lain yang berbasis server onliene seperti *pkCSM, Protein Data Bank (PDB), Pubchem, SAVES, dan Lipinski's Rule of Five.*

3.5. Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

Penelitian telah dilaksanakan di Laboratorium Kimia Komputasi Universitas Buana Perjuangan Karawang yang berlokasi di Kabupaten Karawang, Jawa Barat pada bulan Januari 2024 dan penelitian juga dilaksanakan di Laboratorium Komputasi Universitas Bakti Tunas Husada yang berlokasi di Kabupaten Tasikmalaya, Jawa Barat pada bulan Mei 2024.

3.6. Prosedur Penelitian

3.6.1 Preparasi Struktur Ligan

Ligan disebut juga senyawa uji flavonoid dari bunga telang digambar menggunakan perangkat lunak *MarvinSketch*, lalu dilakukan preparasi geometri 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 samapi didapat energi yang paling kecil dan selanjutnya disimpan dalam format mol2/pdb

3.6.2 Identifikasi Reseptor Target

Lakukan analisis reseptor target yang dapat dilakukan dengan melihat pada profil reseptor target, dengan cara memasukan kode 5W9C. Dan 1ZUC Melalui laman (<https://www.ebi.ac.uk/pbsum>). 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/errat).

3.6.3 Preparasi Reseptor dengan Ligan Alami

Reseptor ER kode 5W9C Dan reseptor PR kode 1ZUC dari protein data bank melalui laman (<http://www.rcsb.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

3.6.4 Validasi Reseptor

Proses ini bertujuan untuk melihat reseptor yang digunakan sudah memenuhi persyaratan atau tidak. Persyaratan bedasarkan 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 bedasarkan 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 Angstrong. RMSD (*Root Mean Square Devition*) adalah suatu parameter yang dapat mengevaluasi parameter proses docking yang dijalankan sudah susai atau tidak, sehingga mewujudkan perubahan yang besar terhadap konformasi ligan alami sebelum atau sesudah dilakukan validasi. Proses untuk mendapatkan RMSD diperlukan pengaturan *grid box* yang sesuai bedasarkan posisi ligan dengan situs aktif reseptor.

3.6.5 *Vitrual 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 perseptor target yang akan berinteraksi dengan ligan. Hasil senyawa dengan kandidat yang terbaik dari hasil docking dilakukan

visualisasi menggunakan software *Pymol* dengan melihat residu dan interaksinya dalam bentuk dua dimensi dan tiga dimensi.

3.6.6 Visualisasi Hasil Docking

Interaksi reseptor target dengan ligaan uji divisualisasikan menggunakan software *Pymol* dalam bentuk dua dimensi dan tiga dimensi. Interaksi reseptor target dengan ligan uji dan asam amino ditunjukkan oleh ikatan yang terbentuk. Hasil simulasi antara reseptor dan 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.

3.6.7 Simulasi Molekuler Dinamik

Struktur kompleks pada reseptor dengan kandidat molekul senyawa flavonoid terbaik yang sudah dipersiapkan untuk dilakukan proses simulasi molekuler dinamik menggunakan *Desmon software for academic license* (D.E. Shaw Research, New York) untuk melihat kestabilan ikatan dari reseptor Estrogen dan Progesteron. Sistem simulasi ini menggunakan air dengan model T1P3P dan 0,15 M NaCl untuk mensimulasikan konsentrasi ion fisiologis yang dilakukan memperkecil energi selama 100 ps. Kemudian simulasi MD berjalan selama 20 ns pada 10 A 10 A dan NPT esambel. Energi dicatat 1,2ps. Netralisasi kompleks ligan dengan penahan ion Na⁺ atau Cl⁻ dilakukan untuk menyeimbangkan muatan bersih dari sistem simulasi molekuler dinamik. Rantai *Nose-Hoover* dan algoritma dinamis *martayana-Toblas_Klein* digunakan untuk menjaga suhu semua sistem molekuler dinamik masing-masing pada 300 K dan 1,01325 bar.

3.6.8 Lipinski's rule of five

Lakukan pengamatan terhadap obat yang dilakukan dengan senyawa flavonoid yang berasal dari bunga telang 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, *refactory molar* antara 40-130.

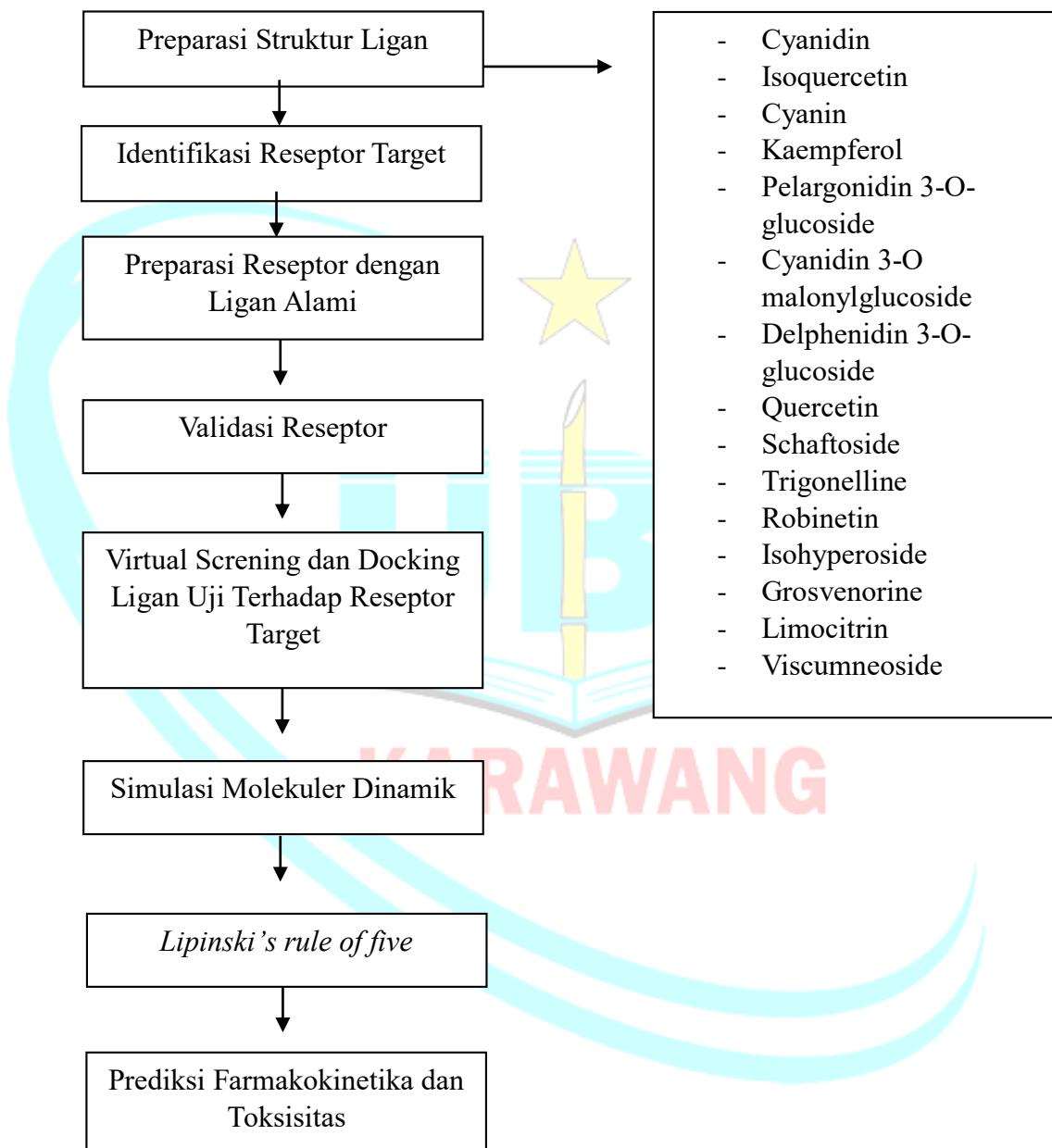
3.6.9 Prediksi Farmakokinetik dan Toksisitas

Untuk melakukan uji senyawa flavonoid dengan menggunakan *pkCSM* didapatkan pada laman (<http://structure.bioc.cam.ac.uk/pkcsd>). 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.

KARAWANG

3.7. Diagram Penelitian

Berikut adalah diagram kegiatan ketika melakukan penelitian



Gambar 3. 5 Diagram Penelitian