

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Rancangan Penelitian ini merupakan penelitian *pre experimental design* berbasis komputasional dari sepuluh (10) senyawa flavonoid tanaman krokot (*Portulaca Oleracea* L) terhadap SARS-CoV-2 *Mpro*. Pengujian dilakukan dengan metode *Molecular Docking*.

3.2 Sampel

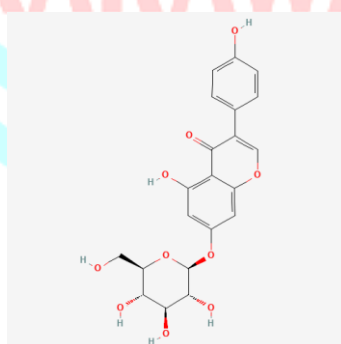
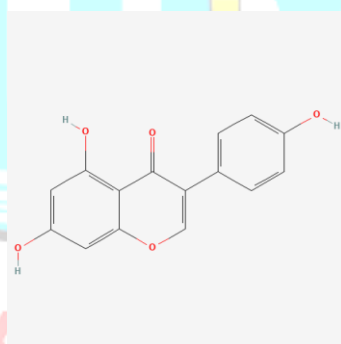
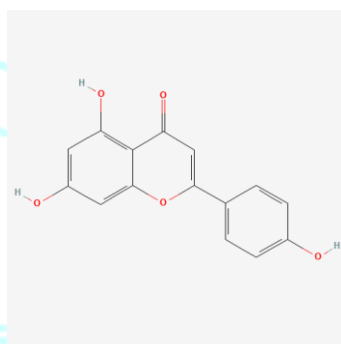
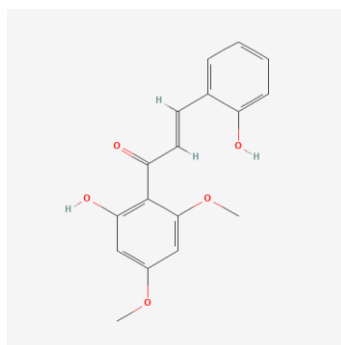
Sampel senyawa flavonoid tanaman krokot (*Portulaca Oleracea* L) yang digunakan mengacu pada penemuan terdahulu dan diambil sampel sebanyak sepuluh. Sampel berupa struktur tiga dimensi yang didapat dengan mengunduh dari website Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

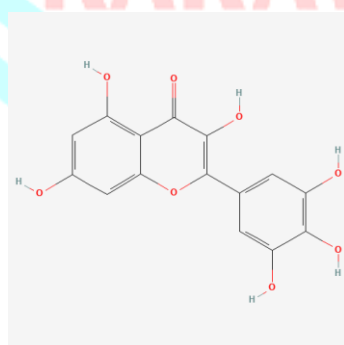
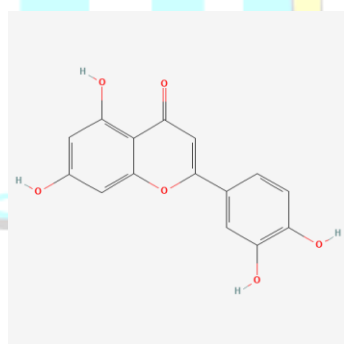
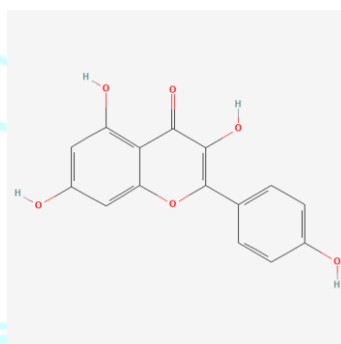
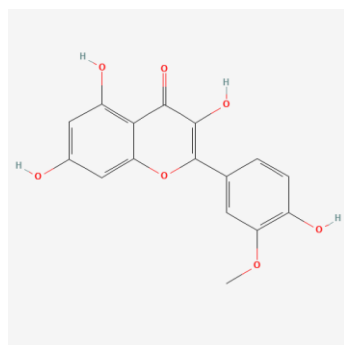
3.3 Alat Penelitian

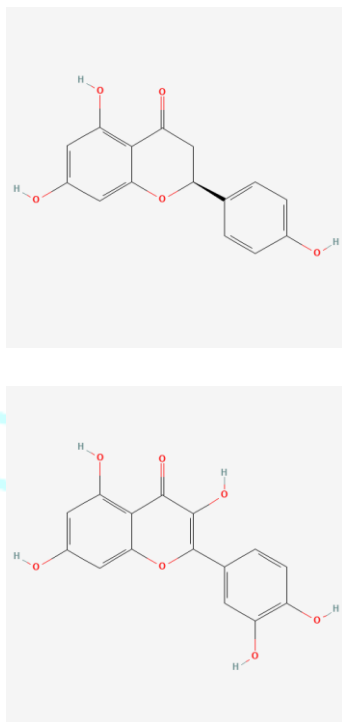
Dalam penelitian ini digunakan perangkat keras berupa Laptop HP, dengan spesifikasi Microsoft Windows 10 enterprise 64-bit operating system, *processor Intel* (R) Core (TM) i3-5005U CPU @ 2.00GHz, dengan 4,0GB RAM. Perangkat keras lainnya yaitu komputer LG dengan spesifikasi memori 7,7GiB, prosesor Intel Xeon® CPU E5-2697 v2 @ 2.70GHz x 24, Grapich NVIDIA GeForce RTX 3060/PCIe/SSE2, GNOME 3.28.2, OS type 64-bit, Disk 245,1 GB. 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*, *Lipinski Rule of Five* dan *Protein Data Bank* (PDB).

3.4 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan berupa stuktur tiga dimensi dari Reseptor SARS-CoV-2 *Main Protease* dengan kode PDB ID : 6XBG yang didapat dari *Protein Data Bank*, serta struktur tiga dimensi senyawa flavonoid tanaman krokot (*Portulaca Olerecae* L) yang diunduh dari website Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dibawah merupakan gambar 3.1 yang menampilkan sepuluh senyawa turunan flavonoid dari tanaman Krokot.







Gambar 3. 1 Turunan Flavonoid dari Tanaman Krokot (Sumber : PubChem, 2024)

3.5 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di ruang Laboratorium Komputasi, Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Buana Perjuangan Karawang, dan Universitas Bakti Tunas Husada, Tasikmalaya.

3.6 Waktu Penelitian

Penelitian ini berlangsung pada bulan Februari 2024 sampai dengan Mei 2024.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 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 (Agistia, Purnomo, Tegar, & Nugroho, 2013). Prosedur tersebut dilakukan untuk semua ligan turunan flavonoid.

3.7.2 Preparasi Reseptor

Reseptor SARS-CoV-2 *Main Protease* dengan kode PDB ID : 6XBG 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). 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.

3.7.3 Identifikasi reseptor Target

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

3.7.4 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 *rootmean-square-deviation* (RMSD). Metode *docking* dianggap valid jika nilai RMSD yang dihasilkan $\leq 2 \text{ \AA}$ (Ruswanto *et al.*, 2020).

3.7.5 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 150 *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, Kundu, Selvaraj, Singh, & Dubey, 2021). 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).

3.7.6 Simulasi Molecular Docking

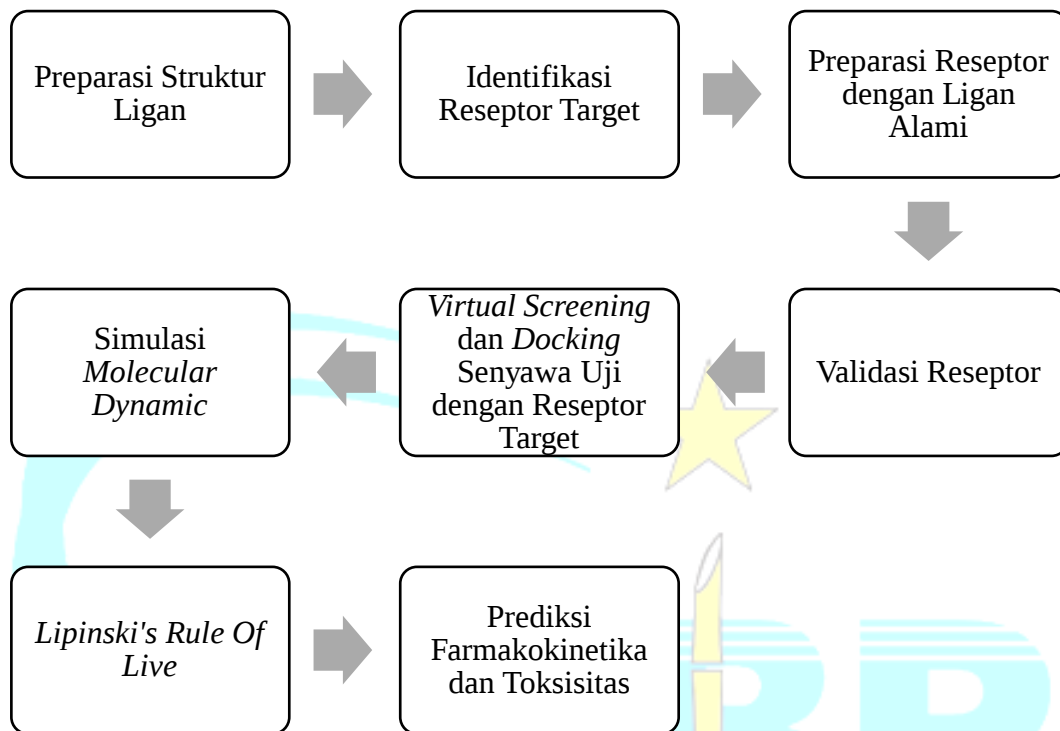
Struktur kompleks reseptor *Main Protease*, dengan kandidat terbaik senyawa flavonoid kemudian dilakukan proses simulasi *molecular docking* menggunakan perangkat lunak *Desmond* dan air model yang digunakan adalah TIP3P. Proses ini pertama-tama dilakukan parameterisasi ligan dan protein dengan ditambahkan medan gaya kemudian dilakukan penentuan koordinat awal serta minimisasi sistem. Tahap kedua dilakukan pemanasan bertahap untuk equilibrasi sistem dari 0°K – 300°K. Simulasi *molecular dynamic* dijalankan dengan keadaan tekanan dan suhu konstan selama 20 ns (Tjitraresmi *et al.*., 2022).

3.7.7 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. (Ruswanto *et al.*., 2020).

3.7.8 Diagram penelitian

Berikut adalah diagram kegiatan ketika melakukan penelitian :



Gambar 3. 2 Diagram Alir Penelitian (Sumber : Dokumen Pribadi)