

BAB III

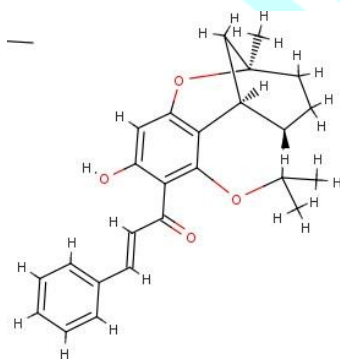
METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

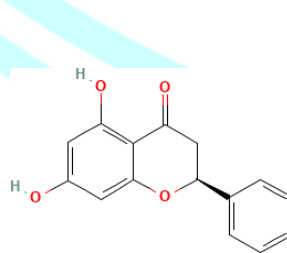
Jenis penelitian ini adalah penelitian kuantitatif dan dirancang dengan metode pra eksperimental *molecular docking* berbasis komputasional dari turunan flavonoid rimpang temu kunci terhadap *BCL-2*. Pengujian dilakukan dengan metode *molecular docking* dan *molecular dynamic*.

3.2 Sampel

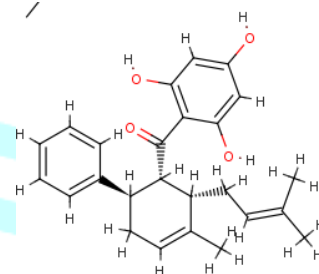
Sampel turunan flavonoid rimpang temu kunci adalah Flavanones (naringin dan pinocembrin). Flavones (apigenin, luteolin, 5-hydroxy, 7,4-dimethoxyflavone, 5-hydroxy, 3,7-dimethoxyflavone, 5,7,3,4-tetramethoxyflavone, 5-hydroxy-3,7,4-trimethoxyflavone, 5,7,4-trimethoxyflavone). Chalcones (pinocembrin chalcone, helichrysetin, flavokawain C, boesenbergin A, boesenbergin B, panduratin C, 4-hydroxypanduratin A, panduratin A), Flavonol (quercetin, kaempferol, helichrycetin), Antosianin (rubranine) dari rimpang temu kunci. Sampel berupa struktur tiga dimensi yang diperoleh dengan membuat struktur kimia menggunakan perangkat lunak *Marvinsketch* 5.2.



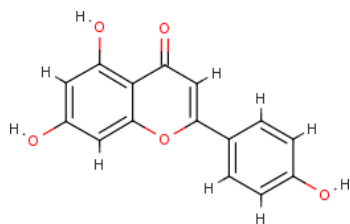
Rubranine



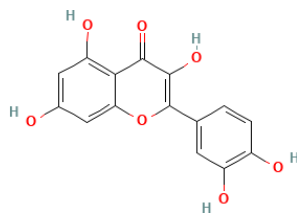
Pinocembrin



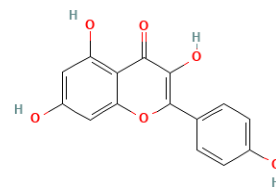
4-hydroxypanduratin A



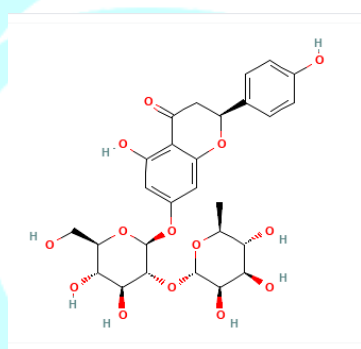
Apigenin



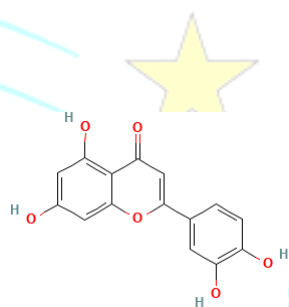
Quercetin



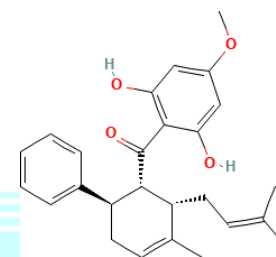
Kaempferol



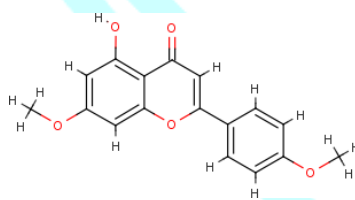
Naringin



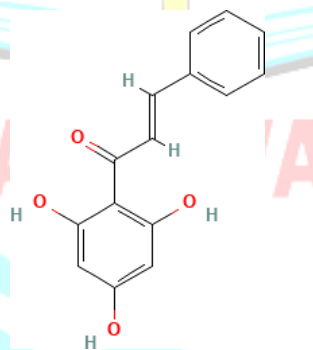
Luteolin



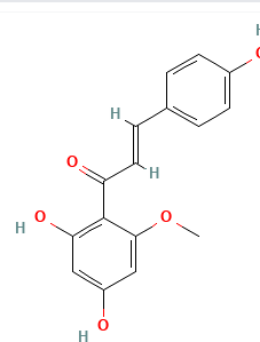
Panduratin A



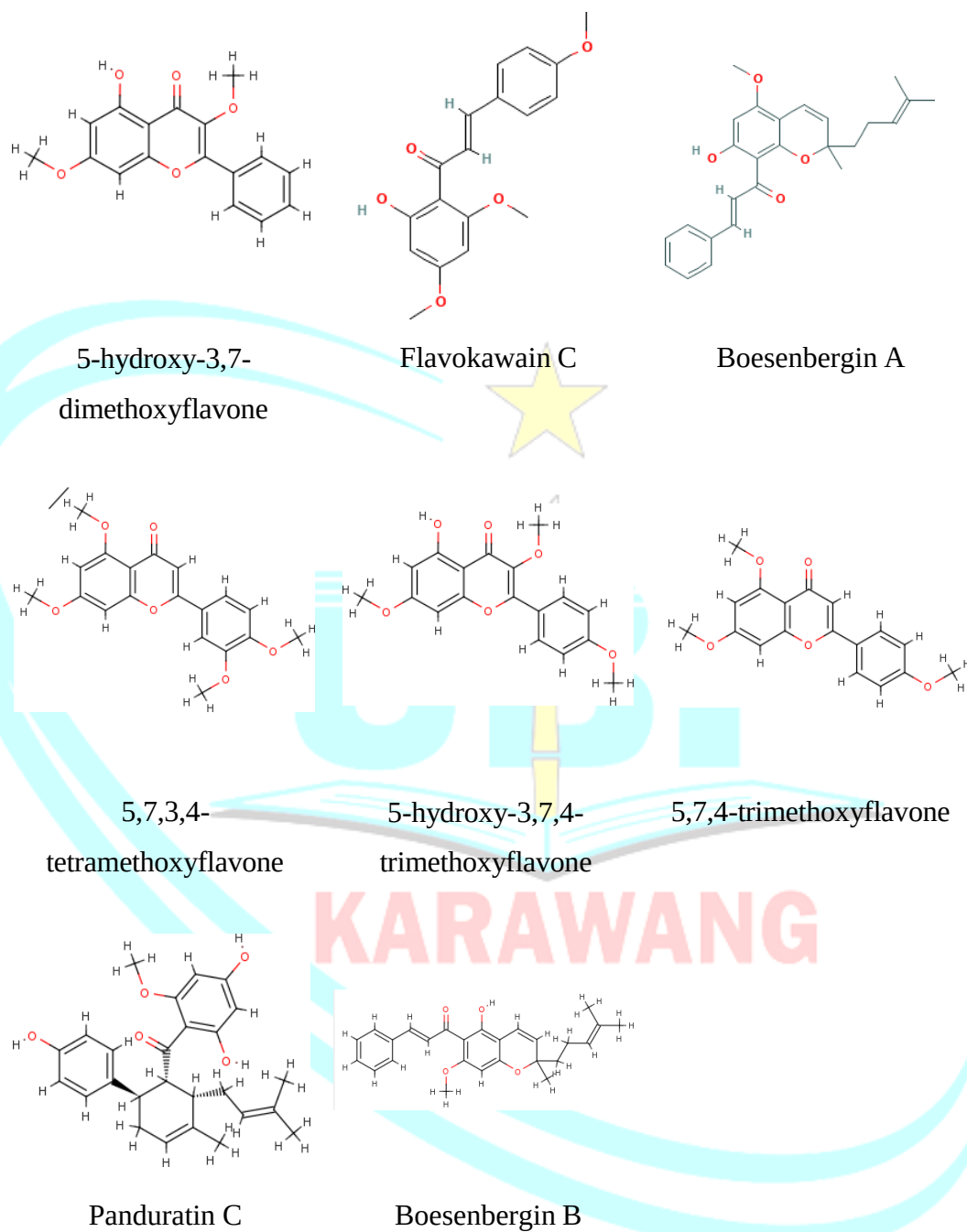
5-hydroxy-7,4-dimethoxyflavone



Pinocembrin Chalcone



Helichrysetin



Gambar 3.1 Struktur Senyawa Flavonoid

(Sumber: *PubChem*, 2021)

3.3 Bahan Penelitian

Turunan uji yang digunakan yaitu turunan flavonoid yaitu flavon, flavonon, chalcone, dan antosianin dari rimpang temu kunci. Data struktur tiga dimensi reseptor yang digunakan untuk analisis *molecular docking* diperoleh dari *Protein Data Bank* (PDB) dengan laman <http://www.rscb.org/pdb>, reseptor yang digunakan yaitu *BCL-2* dengan kode 4AQ3.

3.4 Alat Penelitian

Perangkat yang digunakan adalah laptop HP 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*. *Marvinsketch 5.2*, *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 Five*.

3.5 Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Komputasi Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang yang dan Laboratorium Komputasi Fakultas Farmasi Universitas Bakti Tunas Husada di Tasikmalaya Jawa Barat pada bulan Maret – April 2025.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Preparasi Struktur Ligan

Ligan, yang juga dikenal sebagai turunan uji flavonoid, diperoleh dari rimpang temu kunci pertama ligan yang di *download* di *Pubchem*, kemudian dipersiapkan menggunakan perangkat lunak *Marvinsketch*, dilakukan preparasi geometri dan protonasi pada pH 7,4, dan file disimpan dalam format

file mrv. Selanjutnya, untuk mendapatkan konformasi molekul yang paling konstan, energi dihitung untuk menghasilkan jumlah energi yang paling kecil, dan kemudian disimpan dalam format (Oktaviani *et al.*, 2021).

3.6.2 Identifikasi Reseptor Target

Lakukan analisis reseptor target yang dapat dilakukan dengan melihat pada profil reseptor target, dengan cara memasukkan kode 4AQ3 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) (Rezeki *et al.*, 2018).

Dalam *plot Ramachandran*, ada empat kuadran. Kuadran I adalah yang paling disukai; Kuadran II adalah yang lebih diizinkan; Kuadran III adalah yang diizinkan secara umum; dan Kuadran IV adalah yang diizinkan. Daerah yang diizinkan dari ruang konformasi yang tersedia untuk rantai protein ditunjukkan oleh *plot Ramachandran*, yang merupakan *scatter plot* antara ϕ dan ψ . Daerah dengan kepadatan titik tertinggi pada *plot Ramachandran* menunjukkan konformasi yang paling stabil untuk asam amino tersebut, dan daerah yang tidak diizinkan berada di luar daerah yang diizinkan (Najibi *et al.*, 2017).

Struktur protein yang diidentifikasi melalui kristalografi divalidasi dengan program ERRAT. Nilai kesalahan diplot sebagai fungsi posisi jendela geser residu. Statistik interaksi atom-atom yang tidak terikat dalam struktur yang dilaporkan dibandingkan dengan basis data struktur resolusi tinggi yang andal. Daerah struktur yang dapat ditolak pada tingkat keyakinan 95 persen berwarna kuning, dan 5 persen struktur protein yang baik dianggap memiliki nilai kesalahan di atas tingkat ini. Daerah struktur yang dapat ditolak pada tingkat keyakinan 99 persen berwarna merah. Menurut analisis ERRAT

(UCLA-DOE *Institute for Genomics and Proteomics* (IGP), model terakhir menunjukkan peningkatan yang signifikan dibandingkan dengan model awal.

3.6.3 Preparasi Reseptor dengan Ligan Alami

Reseptor *BCL-2* kode 4AQ3 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 (Oktaviani *et al.*, 2021).

3.6.4 Validasi Reseptor

Validasi metode *molecular docking* dengan mendocking kembali (*redocking*) ligan asli pada protein *BCL-2* yang ligand asli telah dihilangkan menggunakan aplikasi *Autodock Tools* (*Autodock 4.2* dan *Autogrid*). Tujuan memvalidasi metode adalah untuk memastikan bahwa metode yang digunakan divalidasi secara efektif dan bahwa mereka dapat mendapatkan metode yang tepat dan berkualitas tinggi untuk digunakan dalam penelitian selanjutnya. Parameter yang digunakan untuk memverifikasi reseptor adalah RMSD atau *Root Mean Square Deviation*. Nilai RMSD metode *docking* adalah pengukuran dua pose yang dilakukan dengan membandingkan posisi atom antara struktur eksperimental dan struktur yang akan didocking pada protein. Nilai RMSD dianggap baik jika nilainya kurang dari 2 Å jika nilainya lebih dari 2 Å, metode tersebut tidak dapat dipercaya (Ruswanto *et al.*, 2018).

Parameter hasil validasi metode *molecular docking* yang memenuhi persyaratan dan dideklarasikan memenuhi syarat validitas. Nilai RMSD menunjukkan perbandingan konformasi bahan alami pada posisi awal sebelum dan sesudah *redocking*. Nilai RMSD lebih rendah karena mendekati posisi ligan pada sisi aktif pengikatan reseptor non struktural protein 15 (Nsp15) (Fakih *et al.*, 2022).

3.6.5 *Virtual Screening dan Docking Terhadap Reseptor Target*

Setelah itu, menggunakan *AutodockTools* untuk mengubah ligan yang telah dipersiapkan dari format file.mol2 menjadi format file PDBQT. Semua senyawa flavonoid melalui proses *virtual screening* yang dilakukan melalui laman *PyRx* sebagai alat untuk proses *docking*. *Autodock* dan *AutoGrid* bawaan *Autodock4* digunakan untuk membuat peta kisi untuk setiap atom ligan. Ini juga digunakan untuk mengatur file parameter *grid* dan *docking*. Setiap ligan menerima analisis yang diatur ke *docking* standar, dan setiap LGA diuji dua puluh kali. Residu asam amino di situs aktif reseptor target yang akan berinteraksi dengan ligan juga dapat diprediksi dengan menggunakan file parameter *grid*. Dengan menggunakan *software DS Visualizer*, visualisasi hasil senyawa dengan kandidat terbaik dari hasil *docking* dilakukan. Ini melihat residu dan interaksinya dalam dua dan tiga dimensi (Oktaviani *et al.*, 2021).

3.6.6 *Visualisasi Hasil Docking*

Visualisasi dilakukan menggunakan *DS Visualizer* untuk menentukan hasil *docking* dengan pose terbaik dengan melihat konformasi ligan dengan energi ikatan paling rendah. Beberapa parameter dipelajari, termasuk ikatan hidrogen, konstanta inhibisi prediksi, energi bebas ikatan, dan residu asam amino (Sari *et al.*, 2020).

3.6.7 *Simulasi Molecular Dynamic*

Struktur kompleks reseptor dengan kandidat molekul senyawa flavonoid terbaik telah disiapkan untuk simulasi *molecular dynamic* menggunakan program *desmond* untuk lisensi akademik (D.E. Shaw Research, New York). Proses simulasi ini menggunakan air dengan model T1P3P dan 0,15 mol natrium klorida untuk mensimulasikan konsentrasi ion fisiologis dengan mengurangi energi selama 100 milidetik. Simulasi *molecular* dinamik kemudian dilakukan selama 20 ns pada 10x10x10 Angstrom dan NPT esambel. Energi dicatat dalam 1,2 ps. Untuk menyeimbangkan muatan bersih sistem simulasi *molecular dynamic*, ligan dengan penahan ion Na⁺ atau Cl-

dinetralisasi. Suhu semua sistem *molecular dynamic* dijaga oleh rantai Nose-Hoover dan algoritma dinamis martayana-Toblas_Klein, masing-masing pada 300 K dan 1,01325 bar (Allen *et al.*, 2017).

3.6.8 *Lipinski's Rule of Five*

Kemudahan penyerapan dan permeabilitas senyawa yang diuji dapat ditunjukkan dengan metode Lipinski. Sifat fisikokimia seperti berat molekul, koefisien logaritmik partisi oktanol/air (Log P), jumlah ikatan atom-ke-atom yang dapat berputar (torsion), akseptor ikatan hidrogen, dan aktivitas permukaan polar dapat diprediksi dengan alat *pKCSM online* (Kesuma *et al.*, 2018).

Situs web <http://scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp> digunakan dalam uji *Lipinski* untuk menghitung berat molekul dan nilai Log P donor dan akseptor ikatan hidrogen molar *refractivity* (Abdillah *et al.*, 2021). Berdasarkan lima aturan *Lipinski*, bahan alam dengan bobot molekul kurang dari 500 Dalton dapat dianggap sebagai obat. Sifat kimia polimer dalam senyawa ditentukan oleh parameter bobot molekul, dan polimer dengan bobot molekul tinggi memiliki sifat kimia yang lebih kuat. Menurut aturan *Lipinski*, kapasitas ikatan hidrogen meningkat ketika jumlah ikatan donor hidrogen kurang dari lima dan jumlah ikatan akseptor hidrogen kurang dari sepuluh. Oleh karena itu, proses absorpsi membutuhkan lebih banyak energi (La Kilo *et al.*, 2019).

Proses *Lipinski* ini terkait dengan permeabilitas atau absorpsi lipid berlapis dua tubuh. Tingkat toksisitas senyawa meningkat jika nilai Log P lebih dari lima. Ini disebabkan oleh fakta bahwa senyawa tersebut tidak dapat terikat pada lipid bilayer dan sensitifitas ikatan ligan terhadap molekul target berkurang (Ruswanto *et al.*, 2015).

3.6.9 Prediksi Farmakokinetik dan Toksisitas

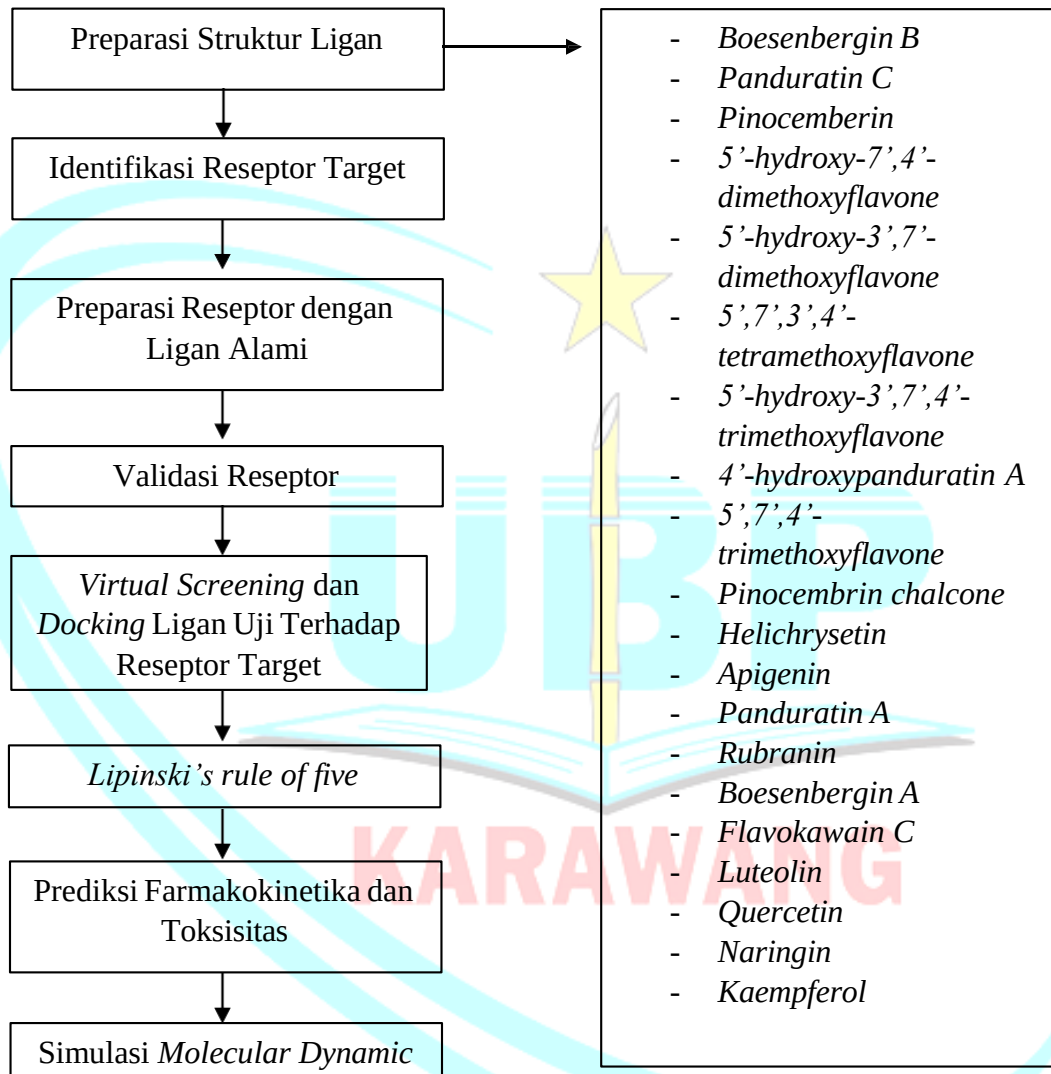
Uji turunan flavonoid dengan *pKCSM* dapat dilakukan di <http://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsml/>. Absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, dan toksisitas SMILES senyawa flavonoid adalah prediksi yang

dicari. Dengan parameter yang dapat dilihat, CaCo-2 (log cm/s), absorpsi usus manusia (%). VDss (manusia) (log L/kg), dan permeabilitas BBB (log BB). Toksisitas dan substrate OCT2 renal (Oktaviani *et al.*, 2021).



3.7 Diagram Penelitian

Berikut adalah diagram kegiatan melakukan penelitian dapat dilihat pada **Gambar 3.2**



Gambar 3.2 Diagram Alir Penelitian

3.8 Analisis Data

Hasil *molecular docking* dianalisis berdasarkan nilai energi ikatan bebas, nilai RMSD, RMSF interaksi asam amino, visualisasi hasil *docking* dan aturan *Lipinski's rule of five*.