

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini merupakan penelitian *pra eksperimental design* berbasis komputasional dari sembilan belas (19) senyawa flavonoid lidah buaya terhadap PPAR- γ . Pengujian dilakukan menggunakan metode molecular docking.

3.2 Sampel

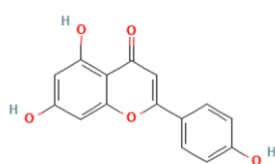
Sampel turunan flavonoid lidah buaya yang digunakan Flavon (*apigenin*, *lutonarin*, *luteolin-7- glukosida*, *isoviteksin*), Flavonol (*quersetin*, *mirisetin*, *kaempferol*, *quersitrin*), Flavonon (*naringin*, *naringenin*), Flavanol (*katekin*, *epicatecin*, dan *galocatecin*), Antosianin (*cyanidin*, *pelargonidin*, *delphinidin*, *malvidin*, *petunidin*, dan *peonidin*) dari lidah buaya. Sampel berupa struktur tiga dimensi yang didapat dengan membuat struktur kimia menggunakan pengikat lunak *Marvin Sketch*.

3.3 Bahan Penelitian

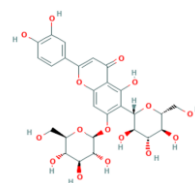
3.3.1 Senyawa Uji

Senyawa uji yang digunakan yaitu turunan flavonoid dari lidah buaya Flavon (*apigenin*, *lutonarin*, *luteolin-7- glukosida*, *isoviteksin*), Flavonol (*quersetin*, *mirisetin*, *kaempferol*, *quersitrin*), Flavonon (*naringin*, *naringenin*), Flavanol (*catecin*, *epicatecin*, dan *galocatecin*), Antosianin (*cyanidin*, *pelargonidin*, *delphinidin*, *malvidin*, *petunidin*, dan *peonidin*) (Tizazu & Bekele, 2024; Zhu *et al.*, 2020).

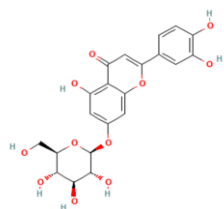
Berikut tampilan 19 struktur dari senyawa flavonoid lidah buaya dapat dilihat pada gambar 3.1



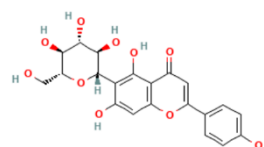
Apigenin



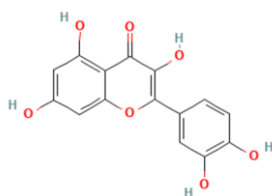
Lutonarin



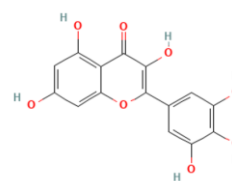
Luteolin-7- glukosida



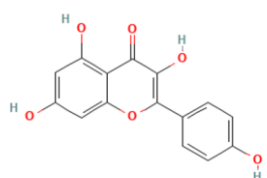
Isovitexin



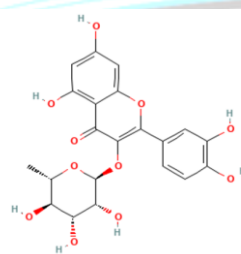
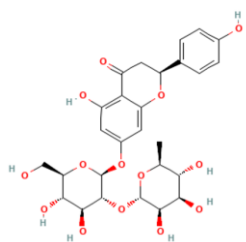
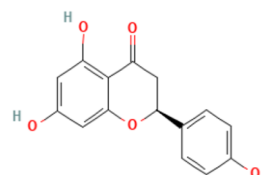
Quersetin



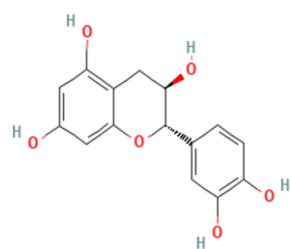
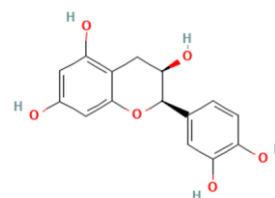
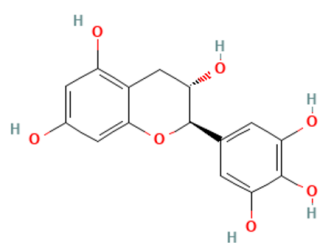
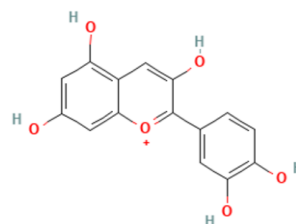
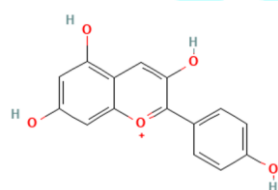
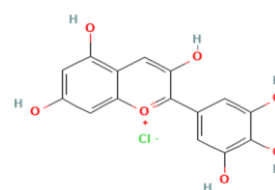
Mirisetin



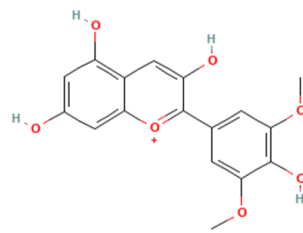
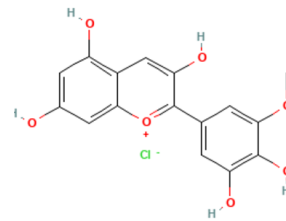
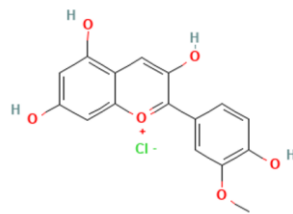
Kaempferol

*Quersitrin**Naringin*

Naringenin

*Catechin**Epicatechin**Galocatechin**Cyanidin**Pelargonidin**Delphinidin*

KARAWANG

*Malvidin**Petunidin**Peonidin***Gambar 3.1** Struktur Senyawa Flavonoid Lidah Buaya

(Sumber : Pubchem, 2024)

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 *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* (PPAR- γ) dengan kode 2PRG.

3.4 Alat Penelitian

3.4.1 Perangkat Keras Komputer

Perangkat yang digunakan adalah laptop Acer Aspire 3 detail *Processor Intel Core i3-N305 processor* (6M Cache; up to 3.80 GHz), RAM 8GB, *Storage* 512GB SSD.

3.4.2 Perangkat Lunak Komputer

MarvinSketch, AutodockTools-1.5.7, Discovery Studio versi 21.1, Molegro Molecul 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 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini berupa Potensi turunan senyawa flavonoid lidah buaya (*Aloe vera*) terhadap *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* (PPAR- γ). Sebanyak Sembilan belas (sebagai ligan) mengacu pada penelusuran literature serta penemuan terbaru.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah energy bebas ikatan (ΔG) antara ligan dan reseptor.

3.5.3 Definisi Operasional Variabel

Berikut adalah tabel dari definisi operasional variabel pada penelitian ini :

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
Variabel Bebas					
1	Potensi turunan flavonoid lidah buaya (<i>Aloe vera</i>) terhadap reseptor (PPAR- γ).	Hasil penambatan yang baik, salah satunya ialah dilihat dari perbandingan nilai energi bebas ikatan (ΔG) atau binding energy.	Pengujian dengan <i>Molecular Docking</i> untuk mengetahui energi bebas ikatan (ΔG) atau binding energy.	-	-

Variable Terikat					
1	Energi bebas ikatan (ΔG)	Energi yang dibutuhkan untuk interaksi antara ligan dan reseptor	Uji penambatan	Rasio	Nilai energi bebas ikatan (ΔG)

3.6 Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

Penelitian telah dilaksanakan di Laboratorium Kimia Komputasi Universitas Buana Perjuangan Karawang yang berlokasi di Kabupaten Karawang, Jawa Barat dan di Laboratorium Komputasi Universitas Bakti Tunas Husada Tasikmalaya yang berlokasi di Kabupaten Tasikmalaya, Jawa Barat.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Preparasi Struktur Ligan

Ligan disebut juga senyawa uji flavonoid dari lidah buaya gambar ligan dibuat menggunakan *Marvin Sketch* 5.2, yang kemudian melakukan optimasi geometri dan protonasi pada pH 7,4. Setelah itu, file disimpan dalam format (.mrv). Selanjutnya, pencarian conformational dilakukan dan file disimpan dalam bentuk pdb dan mol2 (Ruswanto, 2015).

3.7.2 Identifikasi Reseptor Target

Lakukan analisis reseptor target yang dapat dilakukan dengan melihat pada profil reseptor target, dengan cara memasukkan kode 2PRG Melalui laman <https://www.ebi.ac.uk/pdbsum>. Untuk mengetahui kualitas struktur protein, analisis reseptor target menggunakan plot Ramachandran untuk melihat struktur 3D protein hasil kristalografi X-ray atau NMR. Plot ini digambarkan dengan melihat residu non-glisin di daerah yang paling disukai dan daerah yang dilarang. Jika jumlah residu non-glisin di daerah yang paling disukai lebih besar dari 50% dan di daerah yang dilarang lebih kecil dari 15% m, plot Ramachandran digunakan (Ruswanto et al., 2021).

3.7.3 Preparasi Reseptor dengan Ligan Alami

Reseptor PPAR- γ kode 2PRG dari protein data bank melalui laman <http://www.rcsb.org/pdb/> dalam format (.pdb). Reseptor diubah untuk melakukan penghapusan molekul air dan pemisahan ligan menggunakan aplikasi *BIOVIA Discovery Studio* 2020. Kemudian, dengan bantuan *Autodock Tools* 4.2.6, atom hidrogen ditambahkan dan muatan kollman ditambahkan. Ligan juga dipreparasi dengan bantuan *Autodock Tools* 4.2.6 dengan penambahan atom hidrogen, merging nonpolar, penambahan muatan *compute gasteiger*, dan torsi. Hasil pengaturan reseptor dan ligan disimpan dalam format file (pdbqt) (Lestari et al., 2023).

3.7.4 Validasi Reseptor

Validasi program dilakukan dengan mendocking senyawa ligan asli pada reseptor PPAR- γ . Parameter yang digunakan dalam validasi program yaitu nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD). Program dinyatakan valid apabila nilai RMSD hasil redocking $\leq 2 \text{ \AA}$ (Pratiwi, 2021).

3.7.5 Virtual Screening dan Docking Terhadap Reseptor Target

Setelah ligan dibuat, gunakan *Autodock Tools* 1.5.7 untuk mengubah file ligan dari format (.mol 2) ke format PDBQT. *Autodock Tools*, alat bantu untuk proses *docking*, digunakan untuk melakukan skrining virtual dari semua turunan flavonoid. Untuk mengkonfigurasi file parameter kisi-kisi dan *docking*, *Autodock* dan grid otomatis, yang terintegrasi dengan *Autodock* 4, digunakan untuk membuat kisi peta untuk setiap atom ligan. Setiap ligan dianalisis dengan pengaturan *docking* standar, dan setiap LGA dijalankan selama 100. Residu asam amino pada situs reseptor target yang berinteraksi dengan ligan juga dapat diprediksi dengan file parameter grid. Dengan menggunakan perangkat lunak *Discovery Studio* versi 16.1, senyawa yang dihasilkan dari docking dengan ligan kandidat terbaik berikutnya divisualisasikan dengan melihat gambar interaksinya dalam bentuk 2D dan 3D (Hidayah et al., 2024).

3.7.6 Visualisasi Hasil Docking

Interaksi ligan dengan reseptor dalam bentuk 2D dan Bentuk 3D dapat ditentukan melalui hasil *docking visualisasi*. Hasilnya, posisi ligan- konformasi ligan-reseptor dengan BFE terendah diperoleh, dan file kompleks dibuat dalam format (.pdb) untuk visualisasi menggunakan perangkat lunak *Discovery Studio Visualizer* (Ruswanto et al., 2022).

3.7.7 Simulasi *Molecular Dinamic*

Untuk melihat kestabilan interaksi dari hasil *docking molecular* terbaik antara reseptor dengan flavonoid dilakukan simulasi *Molecular Dinamic* dengan menggunakan perangkat lunak *Desmond*. Model air yang digunakan adalah TIP3P. Pertama, bidang gaya ditambahkan untuk memparameterisasi ligan dan protein, kemudian penandaan koordinat awal dan minimalisasi sistem. Untuk menyeimbangkan sistem, fase kedua melibatkan pemanasan bertahap dari 0 K hingga 300 K. Ini dilakukan dengan kondisi tekanan dan suhu konstan selama 20 ns (Hidayah et al., 2024).

3.7.8 Lipinski's rule of five

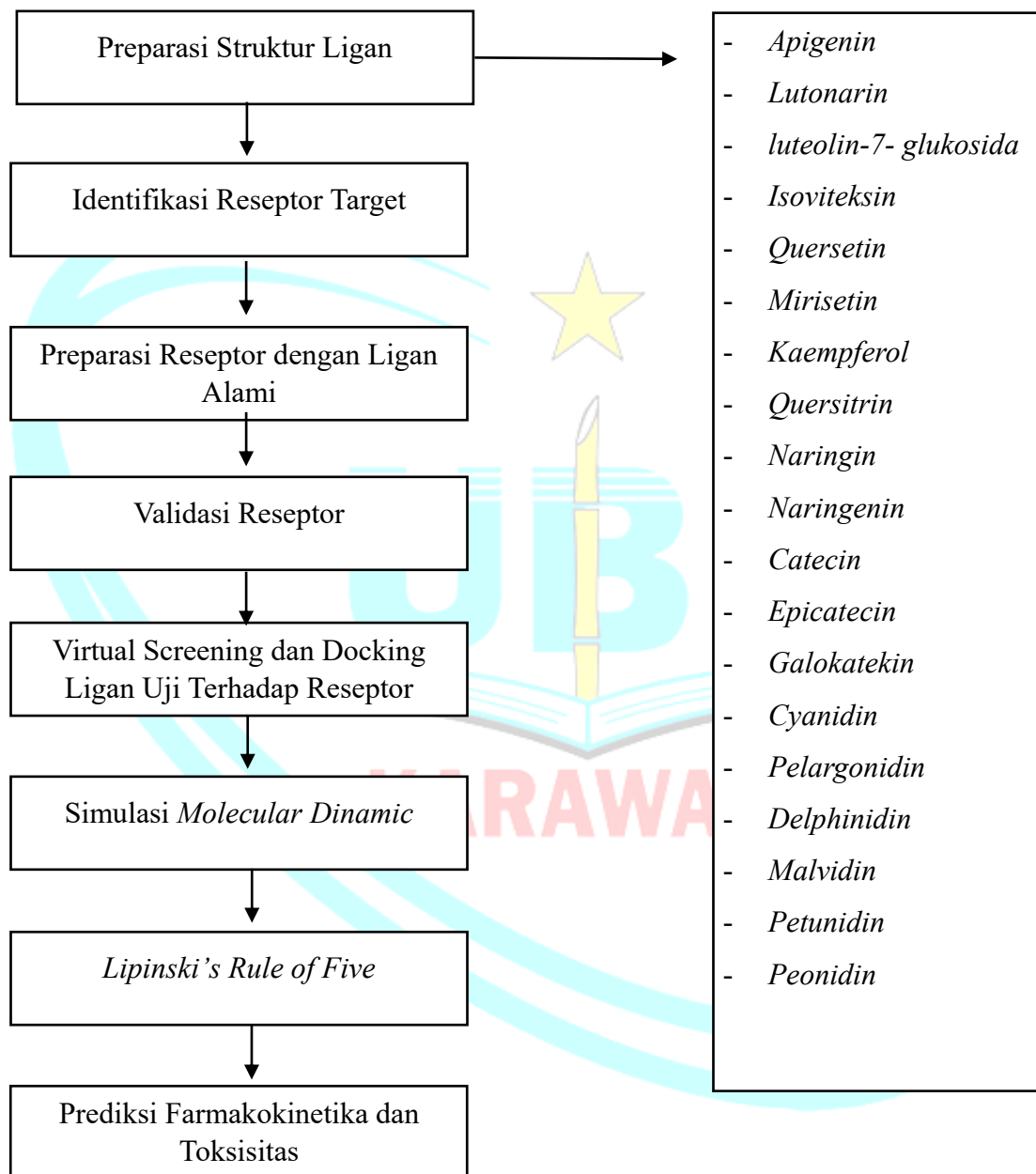
Struktur senyawa uji diunggah pada situs <https://preadmet.bmdrc.kr/> dengan format file (.mol). Kemudian situs ini akan memprediksi beberapa informasi dari senyawa yang diunggah. Beberapa informasi tersebut berupa massa molekul, ikatan hidrogen donor dan akseptor, nilai log P, dan *druglikeness* (Lestari et al., 2023).

3.7.9 Prediksi Farmakokinetik dan Toksisitas

Setelah struktur senyawa uji diunggah ke file (.mol) ke situs <https://preadmet.bmdrc.kr/> situs ini akan secara otomatis memprediksi parameter ADME dan toksisitas senyawa uji yang diuji. ditambahkan. Beberapa parameter termasuk pengikatan protein plasma (PPB), barier darah otak (BBB), penyerapan usus manusia (HIA), Caco-2, dan potensi mutagen dan racun (Lestari et al., 2023).

3.8 Diagram Penelitian

Berikut merupakan diagram kegiatan penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.2



Gambar 3.2 Diagram Penelitian

3.9 Analisis Data

Analisis data penelitian bertujuan untuk mencari turunan flavonoid dari tanaman *Aloe vera* yang mempunyai terhadap resptor PPAR- γ hingga dapat berpotensi memiliki aktivitas antidiabetes, melibatkan penilaian deviasi akar kuadrat rata-rata (RMSD) untuk memastikan ambang batas validitas kurang dari 2 Å. Kesamaan residu asam amino yang terikat pada senyawa, jumlah ikatan hidrogen, dan jarak ikatan juga dihitung menggunakan perangkat lunak *Biovia Discovery Studio* dan *AutoDock*.

