

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Rancangan Penelitian ini merupakan penelitian pre experimental design berbasis komputasional dari dua belas (12) senyawa flavonoid daun sambung nyawa terhadap COX-1 dan COX-2. Pengujian dilakukan dengan metode *Molecular docking*.

3.2 Sampel

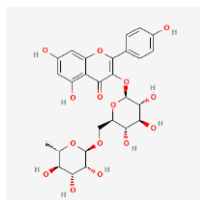
Sampel turunan flavonoid daun sambung nyawa yang digunakan mengacu pada penemuan terdahulu dan diambil sampel *nicotiflorin*, *rutin*, *ericiotin*, *astragalin*, *luteolin*, *myricetin*, *negletein*, *quercetin*, *apigenin*, *homoorientin*, *kaemferol* dan *luteolin 7-rutinoside* (Tahsin, 2022) dari daun sambung nyawa. Sampel berupa struktur tiga dimensi yang didapat dengan membuat struktur kimia menggunakan perangkat lunak *Marvin Sketch*.

3.3 Bahan Penelitian

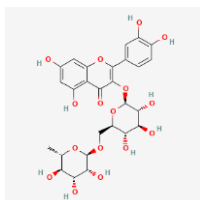
3.3.1 Senyawa Uji

Senyawa uji yang digunakan yaitu turunan flavonoid antara lain *nicotiflorin*, *rutin*, *ericiotin*, *astragalin*, *luteolin*, *myricetin*, *negletein*, *quercetin*, *apigenin*, *homoorientin*, *kaemferol* dan *luteolin 7-rutinoside* (Tahsin, 2022) dari daun sambung nyawa. Penampakan 13 struktur dari senyawa turunan flavonoid dapat terlihat pada

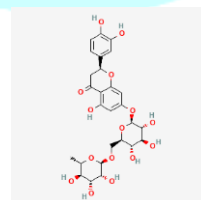
Gambar 3.1



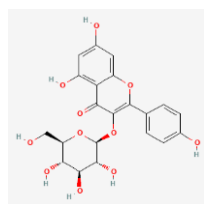
Nicotiflorin



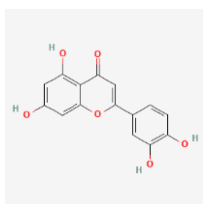
Rutin



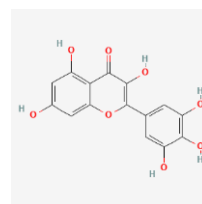
Eriocitrin



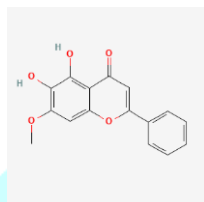
Astragalin



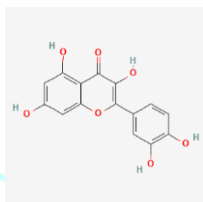
Luteolin



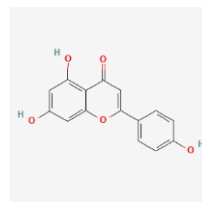
Myricetin



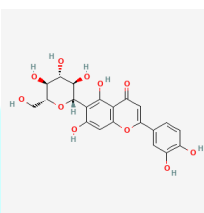
Negleitin



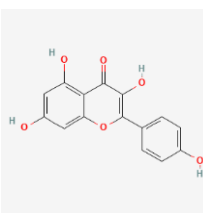
Quercetin



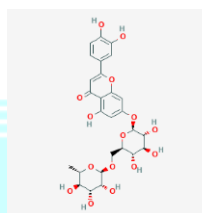
Apigenin



Homoorientin



Kaemferol



Luteolin 7-rutinoside

Gambar 3. 1 Senyawa Turunan Flavonoid

(Sumber: Pubchem, 2024)

3.3.2 Reseptor

Untuk analisis molecular docking, data struktur kristal 3D dari reseptor diperoleh dari *Protein Data Bank (PDB)*, yang dapat ditemukan di <http://www.rcsb.org.pdb>. Reseptor yang digunakan adalah COX-1 dengan kode 1EQG dan COX-2 dengan kode 3LN1.

3.4 Alat Penelitian

3.4.1 Perangkat Keras Komputer

Perangkat yang digunakan adalah laptop dengan Intel Core 13 8,00 GB of RAM (*Random Acces Memory*) 64-Bit Operating system windows 10 dan Operating of linux Ubuntu 18.04.LTS

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 online 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 penghambatan senyawa flavonoid daun sambung nyawa (*Gynura procumbens* [Lour.] Merr) terhadap enzim COX-1 dan COX-2. Sebanyak tiga 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) dan konstanta inhibisi 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 Penghambatan Senyawa flavonoid Daun Sambung Nyawa (<i>Gynura procumbens</i> [Lour.] Merr) Terhadap Enzim COX-1 dan COX-2	Hasil penambatan yang baik, salah satunya ialah dilihat dari perbandingan nilai energi bebas ikatan (ΔG) atau binding <i>energy</i> dan juga	Pengujian dengan <i>Molecular Docking</i> untuk mengetahui energi bebas ikatan (ΔG) atau binding <i>energy</i> dan Konstanta Inhibisi (KI).	-	-

Konstanta					
Inhibisi (KI).					
No.	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil ukur
Variabel Terikat					
1.	Energi bebas ikatan (ΔG)	Energi yang dibutuhkan untuk interaksi antara ligan dan reseptor	Uji penambatan	Rasio	Nilai energi bebas ikatan (ΔG)
2.	Konstanta Inhibisi (KI)	Indikasi seberapa kuat suatu penghambat atau inhibitor	Uji penambatan	Rasio	Nilai Konstanta Inhibisi (KI)

3.6 Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Laboraturium Kimia Komputasi Universitas Buana Perjuangan Karawang yang berlokasi di Kabupaten Karawang, dan di Laboratorium Komputasi Universitas Bakti Tunas Husada yang berlokasi di Kabupakten Tasikmalaya, pada bulan Januari 2025 – Maret 2025.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Preparasi Struktur Ligan

Struktur turunan flavonoid ditemukan dan diunduh dari database *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Hidayah, 2024). Ligan digambar menggunakan perangkat lunak *Marvin sketch*, dilakukan preparasi geometris dan protonasi pada ph 7,4, dan file disimpan dalam format file mrv (Hidayah, 2024). Selanjutnya, untuk mendapatkan konformasi yang paling konstan, optimasi molekul dilakukan pada ligan dengan menghitung energi hingga tingkat yang paling rendah, dan kemudian disimpan dalam format mol2/pdb. (Hidayah, 2024).

3.7.2 Identifikasi Reseptor Target

Identifikasi reseptor target dilakukan dengan melihat profil reseptor target dengan memasukkan kode 1EQG dan 3LN1 melalui situs web (<https://www.ebi.ac.uk/pdbsum>) kemudian, profil data dari reseptor akan muncul (Hidayah, 2024). Dari hasil analisis pada reseptor yang digunakan, untuk dapat mengetahui apakah protein yang digunakan sesuai dengan plot parameter Ramachandra dan ERRAT melalui laman untuk melihat parameter *overall quality factor* pada reseptor yang digunakan melalui laman (www.doe-mbi.ucla.edu/errata) (Hidayah, 2024).

3.7.3 Preparasi Reseptor dengan Ligan Alami

Enzim COX-1 dengan kode 1EQG dan COX-2 dengan kode 3LN1 dari protein data bank laman (<http://www.rcsb.org/>) dalam format .pdb. Enzim tersebut dipisahkan dari ligan alaminya kemudian dilakukan preparasi dengan cara menghilangkan air dan penambahan proton pada molekulnya. selanjutnya hasil preparasi disimpan dalam format.pdb (Hidayah, 2024).

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 terminology agonis dan antagonis dan dat 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 struktur tiga dimensi dari senyawa makromolekul dan nilai RSMD <2 Angstrong. Parameter analisis data ini menggunakan *root-mean-square-deviation* (RMSD). Metode docking akan dianggap valid jika nilai RMSD yang dihasilkan $\leq 2 \text{ \AA}$ (Angstrong) (Hidayah, 2024). RMSD (*Root Mean Square Devition*) 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. Proses untuk mendapatkan RMSD diperlukan pengaturan grid boc yang sesuai berdasarkan posisi ligan dengan situs aktif reseptor (Hidayah, 2024).

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 1.5.7*. Proses *Virtual Screening* dilakukan terhadap semua senyawa turunan flavonoid yang dilakukan melalui laman pyRx sebagai alat untuk proses docking. Pengaturan untuk file parameter grid dan *docking* dibuat menggunakan *autodock* (Hidayah, 2024). *Autodock* dan *AutoGrid* bawaan *autodock4* digunakan untuk menghasilkan peta kisi untuk setiap atom ligan (Hidayah, 2024). 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 (Hidayah, 2024). Hasil senyawa dengan kandidat yang terbaik dari hasil *docking* dilakukan visualisasi menggunakan *software discovery studio* dengan melihat residu dan interaksinya dalam bentuk dua dimensi dan tiga dimensi.

3.7.6 Visualisasi Hasil Docking

Interaksi reseptor target dengan ligan uji divisualisasikan menggunakan *software discovery studio* dalam bentuk dua dimensi dan tiga dimensi. Hasil docking divisualisasikan untuk menganalisis interaksi antara residu asam amino dari ligan. Ligan dianggap berinteraksi dengan target reseptor jika ada interaksi asam amino (Hidayah, 2024). 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 (Hidayah, 2024).

3.7.7 Simulasi Molekuler Dinamik

Struktur kompleks pada reseptor dengan kandidat molekul senyawa flavonoid terbaik yang sudah dipersiapkan untuk dilakukan proses simulasi molekul dinamik menggunakan *Desmon software for academic license (D.E. Shaw Research, New York)* untuk melihat kestabilan ikatan dari enzim COX-1 dan COX-2. 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 (Hidayah, 2024). 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 (Hidayah, 2024).

3.7.8 *Lipinski's rule of Five*

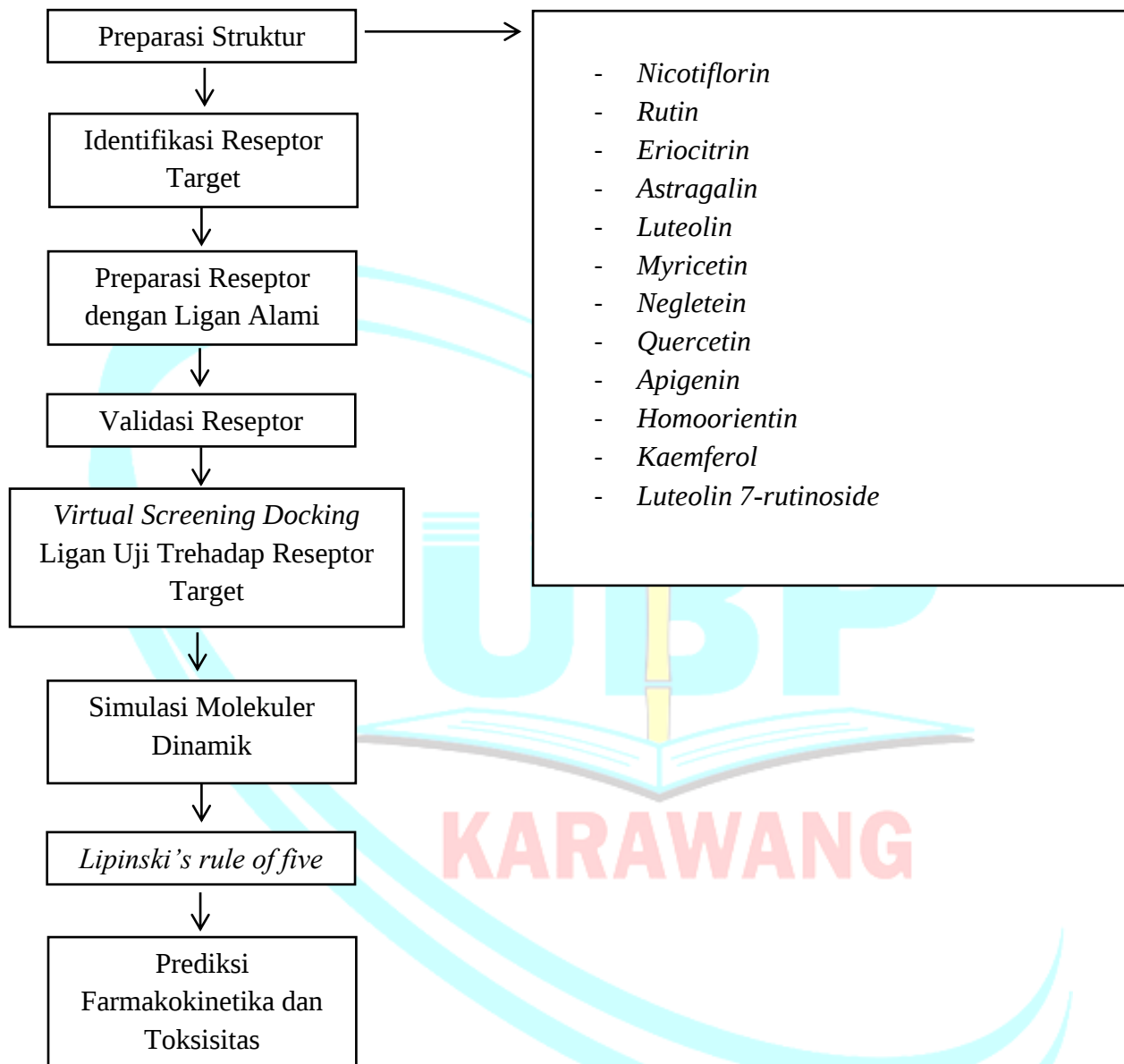
Pengamatan terhadap kandidat obat yang dilakukan pada turunan flavonoid yang berasal dari daun sambung nyawa dengan mempertimbangkan ketentuan *the rule of good medicine (Lipinski's rule of five)* melalui situs web <http://www.scfbio-iitd.res.in>, analisis difokuskan pada bahan kimia dan sifat fisik yang penting untuk ketersediaan hayati oral. dengan parameter hasil yang diperoleh yaitu berat molekul (<500 g/mol), lipofilitas (<5), ikatan hidrogen donor (<5), akseptor ikatan hidrogen (<10), dan molar refraktivitas (antara 40 dan 130). Kriteria ini membantu menentukan kemungkinan senyawa tersebut obat oral yang efektif (Hidayah, 2024).

3.7.9 Prediksi Farmakokinetik dan Toksisitas

Penyerapan, distribusi, metabolisme, dan uji toksisitas dilakukan dengan menggunakan program pkCSM di <https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/prediction> (Hidayah, 2024). 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.

3.7 Diagram Penelitian

Berikut adalah diagram kegiatan ketika melakukan penelitian :



Gambar 3.2 Alur Penelitian

3.8 Analisis Data

Analisis data In Silico diperoleh dari hasil nilai energi ikatan bebas, nilai RMSD, interaksi asam amino dan visualisasi menggunakan *software discovery studio* dengan melihat residu dan interaksi reseptor target dengan ligan uji dan asam amino ditunjukkan oleh ikatan yang terbentuk dalam bentuk dua dimensi dan tiga dimensi. Hasil dipertimbangkan dengan ketentuan *the rule of good medicine (Lipinski's rule of five)* dengan hasil yang diperoleh yaitu berat molekul <500 g/mol, lipofilitas <5. donor. Prediksi farmakokinetik menggunakan

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 absorbption (human)* (%), *VDss (human)* (Log L/kg). *BBB permeability* (log BB).*Renal OCT2 subtrate* dan toksisitas.

