

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian dengan metode pra *experimental design* berbasis komputasi dari turunan flavonoid yang ada pada tanaman daun bawang terhadap reseptornya. Pengujian ini dilakukan dengan metode penambatan molekul (*Molecular Docking*).

3.2 Sampel

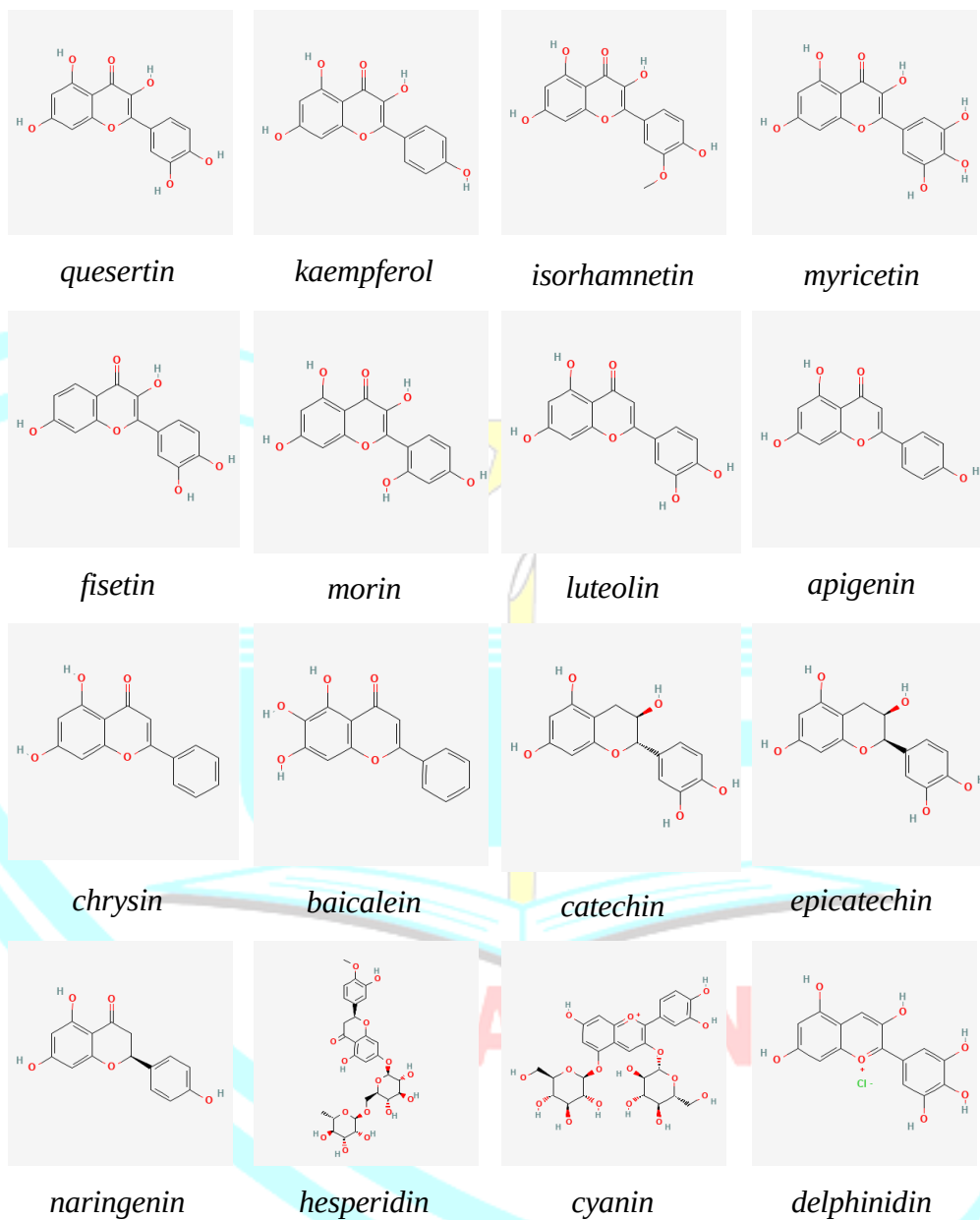
Sampel yang akan digunakan adalah turunan dari flavonoid daun bawang seperti flavonol (*quesertin*, *kaempferol*, *isorhamnetin*, *myricetin*, *fisetin*, dan *morin*), flavon (*luteolin*, *apigenin*, *chrysin*, dan *baicalein*), flavanol (*catechin* dan *epicatechin*), flavanon (*naringenin* dan *hesperidin*), dan antosianin (*cyanin* dan *delphinidin*) (Kim *et al.*, 2023). Sampel berupa struktur 3D yang didapatkan dengan membuat struktur kimia menggunakan perangkat lunak.

3.3 Bahan Penelitian

3.3.1 Senyawa Uji

Senyawa uji yang digunakan merupakan turunan dari flavonoid yaitu flavonol (*quesertin*, *kaempferol*, *isorhamnetin*, *myricetin*, *fisetin*, dan *morin*), flavon (*luteolin*, *apigenin*, *chrysin*, dan *baicalein*), flavanol (*catechin* dan *epicatechin*), flavanon (*naringenin* dan *hesperidin*), dan antosianin (*cyanin* dan *delphinidin*) (Kim *et al.*, 2023). dari tanaman daun bawang. Tampilan 16 struktur dari senyawa flavonoid pada daun bawang dapat dilihat pada **gambar**

3.1



Gambar 3. 1 Senyawa Turunan Flavonoid pada Daun Bawang
(Sumber: Dokumen Pribadi, 2024)

3.3.2 Reseptor

Data struktur 3D Kristal reseptor yang digunakan untuk menganalisis *molecular docking* diperoleh dari *Protein Data Bank* (PDB) dengan laman <http://www.rscb.org/pdb>, reseptor yang digunakan yaitu *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma* (PPAR γ) dengan kode 2PRG.

3.4 Alat Penelitian

Penelitian ini menggunakan perangkat keras seperti laptop Advan Workpro dengan spesifikasi untuk perusahaan Microsoft Windows 11 64-Bit dan sebuah prosesor, yaitu Intel (R) Core i5 8,00 GB of RAM (*Random Acces Memory*) dan perangkat lunak yang digunakan berupa *MarvinSketch*, *AutodockTools-1.5.7*, *Discovery Studio versi 21.1*, *Molegro Molecul Viewer*, *Desmond software for academic*, *Pyrex* dan program lainnya berbasis website seperti Pubchem, *Protein Data Bank* (PDB), *pKCSM*, *SAVEs*, dan *Lipinski's Rule of Five*.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah senyawa flavonoid yang diuji pada daun bawang (*Allium fistulosum* L.) terhadap reseptor PPAR γ . Sebanyak enam belas (sebagai ligan) mengacu pada penelusuran literatur serta penemuan terbaru.

3.5.2. Variabel terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah energi bebas gibbs (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 Senyawa Flavonoid pada Daun Bawang (<i>Allium fistulosum</i> L.) terhadap reseptor PPAR γ	Hasil penambatan yang baik, salah satunya ialah dari perbandingan nilai energi bebas gibbs (ΔG) atau <i>binding energy</i> .	Pengujian dengan <i>Molecular Docking</i> untuk mengetahui energi bebas gibbs (ΔG) atau <i>binding energy</i> .	-	-
No.	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil ukur
Variabel Terikat					
1.	Energi bebas gibbs (ΔG)	Energi yang dibutuhkan untuk interaksi antara ligan dan reseptor	Uji penambatan	Rasio	Nilai energi bebas gibbs (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 pada Januari 2025 dan di laboratorium komputasi Universitas Bakti Tunas Husada Tasikmalaya yang berlokasi di Kabupaten Tasikmalaya, Jawa Barat pada Februari – Maret 2025.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Preparasi Struktur Ligan

Struktur turunan flavonoid dari daun bawang tersedia dan diunduh dari website PubChem database (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dilakukan protonasi pada pH 7,4, dan konformasi dari struktur turunan flavonoid dimodelkan menggunakan perangkat lunak MarvinSketch kemudian file disimpan dengan format file mrv. Struktur yang telah dibuat kemudian disimpan dalam format .mol. Struktur yang disiapkan kemudian disimpan dalam format file .mol2. Prosedur ini dilakukan untuk semua senyawa flavonoid pada ligan turunan flavonoid (Hidayah *et al.*, 2024).

3.7.2 Identifikasi Reseptor Target

Identifikasi reseptor target dengan cara memasukkan kode 2PRG melalui situs website (<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/errata) (Hidayah *et al.*, 2024).

3.7.3 Preparasi Reseptor dengan Ligan Alami

Reseptor Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR γ) dengan kode 2PRG diunduh dari protein data bank melalui laman (<http://www.rcsb.org>) dalam format .pdb. Reseptor berupa makromolekul dipisahkan dari molekul lain seperti molekul air dan ligan alaminya. Proses preparasi dengan cara ligan dipisahkan dari beberapa molekul lain seperti molekul air, ko-faktor dan reseptornya. Pemisahan dilakukan menggunakan software Biovia Discovery Studio (Syahputra *et al.*, 2022).

3.7.4 Validasi Reseptor

Proses ini dilakukan 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 terminologi agonis dan antagonis dan data 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 menggambarkan struktur tiga dimensi dari senyawa makromolekul dan nilai RMSD $< 2 \text{ \AA}$. 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 box* yang sesuai berdasarkan posisi ligan dengan situs aktif reseptor (Hidayah *et al.*, 2024).

3.7.5 Virtual Screening dan Docking terhadap Reseptor Target

Setelah ligan dipersiapkan, ligan tersebut dikonversi dari format file .mol2 menjadi format file PDBQT dengan menggunakan *AutodockTools*. Proses *Virtual Screening* pada semua turunan flavonoid daun bawang dilakukan melalui laman *pyRex* sebagai alat untuk proses *docking*. Pengaturan untuk file parameter *grid* dan *docking* dibuat menggunakan *Autodock*. *Autodock* dan *AutoGrid* bawaan *Autodock4* digunakan untuk menghasilkan kisi peta untuk setiap atom ligan. Setiap ligan dianalisis dan 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 reseptor target yang akan berinteraksi dengan ligan. 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 (Hidayah *et al.*, 2024).

3.7.6 Visualisasi Hasil Docking

Interaksi reseptor target dengan ligan uji divisualisasikan menggunakan *software Discovery Studio* 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. (Hidayah *et al.*, 2024).

3.7.7 Simulasi Molecular Dynamic (MD)

Untuk melihat interaksi stabil dari hasil *docking* antara struktur reseptor kompleks PPAR γ dengan kandidat terbaik senyawa flavonoid, disimulasikan menggunakan perangkat lunak Desmond (Maestro). Model air yang digunakan adalah TIP3P. Proses pertama, parameterisasi ligan dan protein dengan menambahkan bidang gaya, kemudian penandaan koordinat awal dan minimalisasi sistem. Fase kedua adalah pemanasan bertahap untuk menyeimbangkan sistem dari 0 K hingga 300 K. Simulasi molekuler dinamik 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 sebagai file (a.mol) di situs *website* <https://preadmet.bmdrc.kr/>. Situs web ini kemudian akan memperkirakan data tertentu yang diunggah dari kompleks. Massa molekul, ikatan hidrogen donor dan akseptor, nilai log P, dan kemiripan obat adalah beberapa detailnya (Lestari *et al.*, 2023).

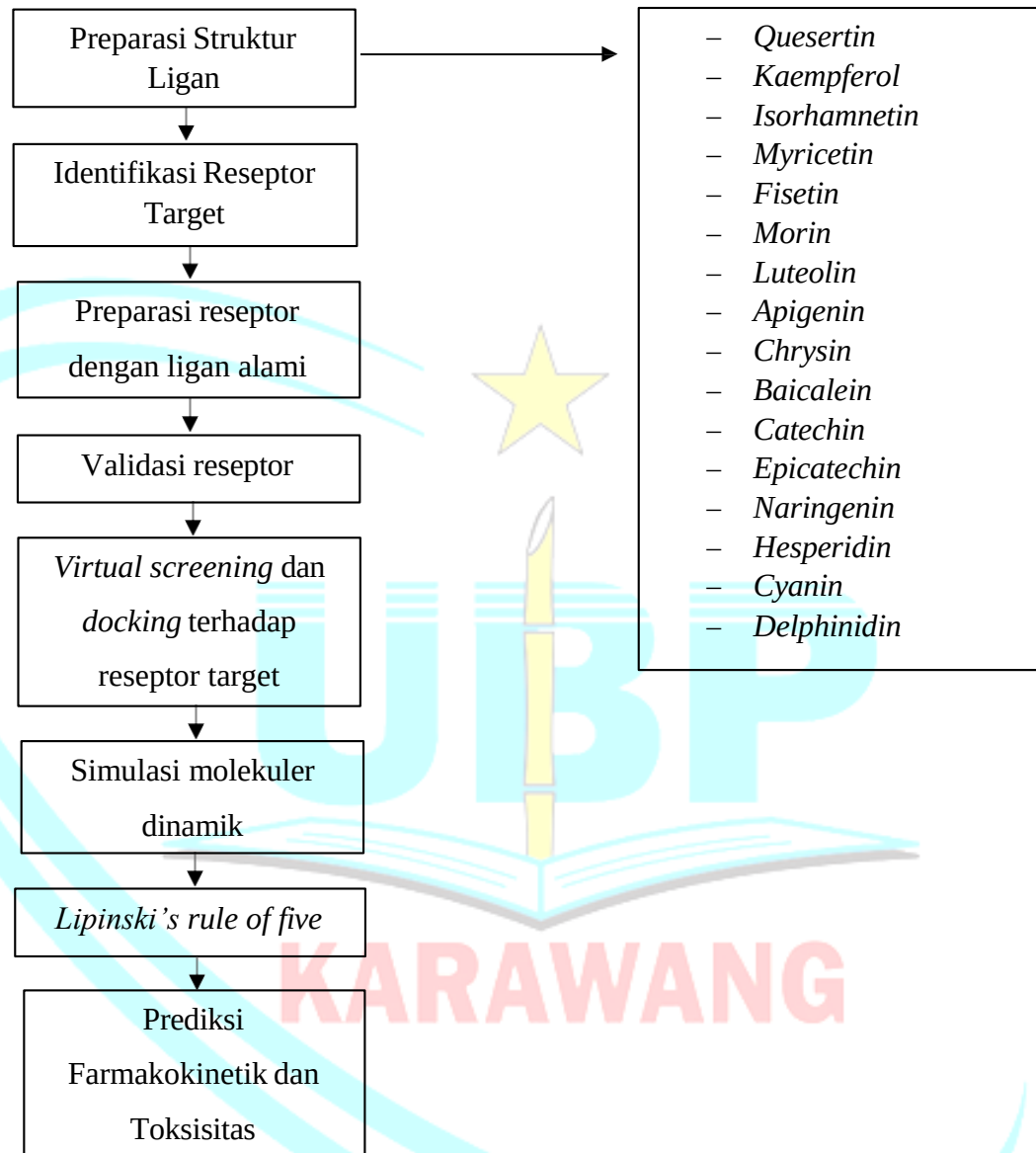
3.7.9 Prediksi Farmakokinetik dan Toksisitas

Profil farmakokinetik dan toksisitas absorpsi, distribusi, metabolisme, dan uji toksisitas dilakukan dengan menggunakan program *pKCSM* di <https://biosig.lab.uq.edu.au/pKCSM/prediction>, Struktur senyawa dari kandidat terbaik dikonversi berbentuk kode *SMILES* pada struktur senyawa dan dilanjutkan ke *website pKCSM* untuk pengujian prediksi fitokimia serta melakukan prediksi ADMET (Pramudiyawati *et al.*, 2024). Program ini secara otomatis menghitung profil farmakokinetik dengan usus manusia penyerapan usus manusia (HIA), CACO-2, dan pengikatan protein plasma parameter (Hidayah *et al.*, 2024).



3.8 Diagram Penelitian

Berikut adalah diagram kegiatan ketika melakukan penelitian:



Gambar 3. 2 Alur Penelitian

3.9 Analisis Data

Analisis data penelitian ini bertujuan untuk mencari turunan dari senyawa flavonoid yang terkandung dalam daun bawang yang mempunyai interaksi stabil terhadap reseptor *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* γ (sehingga dapat berpotensi mempunyai aktivitas sebagai kandidat antidiabetes, melibatkan parameter RMSD untuk memastikan ambang batas validitas $<2 \text{ \AA}$. Kesamaan residu asam amino yang terikat pada senyawa jumlahh ikatan hidrogen, dan jarak ikatan juga dihitung menggunakan perangkat lunak *BIOVIA Discovery Studio* dan *AutodockTools*.

