

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah senyawa yang terkandung dalam kulit kayu manis yang diperoleh dari penelitian Zhang *et al.* (2019).

2. Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah senyawa tanaman kulit kayu manis yang diduga memiliki aktivitas sebagai kandidat obat anti kanker paru-paru.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah senyawa tanaman kayu manis, makromolekul target, nilai energi ikatan, persentase kemiripan asam amino yang berinteraksi.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas yang dimaksud adalah variabel yang diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah senyawa kulit tanaman kayu manis yang diduga memiliki aktivitas sebagai kandidat obat antikanker paru-paru dan makromolekul protein target.

Variabel terkendali adalah yang dimaksud adalah variabel yang dianggap berpengaruh selain variabel bebas. Sehingga perlu ditetapkan kualitasnya agar hasil yang diperoleh dapat diulang dalam penelitian lain secara tepat. Variabel terkendali yang digunakan pada penelitian ini adalah penambatan molekul, origin makromolekul protein target, nilai resolusi, ligan alami, dan validasi metode.

Variabel tergantung adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria dari penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah nilai energi bebas ikatan dan persentase kemiripan asam amino yang berinteraksi.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, senyawa kulit tanaman kayu manis adalah senyawa yang terkandung dalam tanaman kayu manis yang diperoleh informasinya dari artikel ilmiah yang telah terindeks di *Pubmed*.

Kedua, ligan uji adalah senyawa kulit kayu manis yang diseleksi berdasarkan kelayakan sebagai obat jika lolos minimal tiga dari empat parameter *drug-likeness* menurut Lipinski melalui analisis menggunakan *webservice SwissADME*

Ketiga, makromolekul protein target adalah protein yang berperan dalam mekanisme biologis kanker paru-paru, digunakan sebagai target penambatan ligan uji. Protein ini diambil dari manusia (*Homo sapiens*) dan diperoleh dari basis data Protein Data Bank (RCSB PDB) dengan kode PDB 2WOT (TGF- β 1), 2Q8G (PDK1), dan 6YQ1 (FAK).

Keempat, origin makromolekul protein target adalah struktur protein target hasil unduhan dari PDB yang telah dipisahkan dari ligan alaminya, sehingga siap digunakan untuk proses penambatan molekuler dengan ligan uji.

Kelima, ligan alami adalah molekul endogen yang secara alami berikatan dengan situs aktif dari masing-masing makromolekul protein target, berfungsi sebagai kontrol pembandingan dalam analisis interaksi molekuler.

Keenam, penambatan molekuler adalah metode komputasi untuk memprediksi afinitas dan orientasi ikatan antara senyawa uji dan protein target yang dilakukan menggunakan *SwissDock*, yang sebelumnya telah divalidasi menggunakan ligan alami dan protein target yang ditunjukkan dengan nilai energi bebas ikatan, kemudian struktur kompleks ligan protein dibentuk menggunakan PyMOL, dan divisualisasikan dengan *LigPlot+* untuk mengidentifikasi interaksi asam amino dengan menghitung persentase kemiripan interaksi asam amino dan menganalisis pola interaksi antara ligan uji dan ligan alami pada situs aktif protein target.

Ketujuh, nilai energi bebas ikatan (ΔG) adalah hasil dari proses penambatan molekuler yang merepresentasikan kekuatan afinitas antara ligan uji dan protein target yang semakin negatif nilai energi bebas ikatan, semakin tinggi afinitas ligan terhadap protein dan apabila nilai di bawah $-7,0$ kcal/mol dipertimbangkan sebagai interaksi yang kuat.

Kedelapan, persentase kemiripan interaksi asam amino adalah ukuran kuantitatif untuk membandingkan kesamaan residu asam amino antara ligan uji dan ligan alami pada protein target pada senyawa yang telah lolos seleksi berdasarkan nilai energi bebas ikatan, dan hanya senyawa dengan persentase kemiripan residu interaksi di atas 50% yang dianggap memiliki kemiripan pola pengikatan yang signifikan.

Kesembilan, pola interaksi asam amino adalah analisis kualitatif terhadap jenis dan posisi residu asam amino pada situs aktif protein target yang berinteraksi dengan ligan uji yang ini dilakukan hanya pada senyawa yang telah memenuhi kriteria nilai energi bebas ikatan dan memiliki persentase kemiripan interaksi dimana pola interaksi dinilai relevan apabila ligan uji membentuk ikatan dengan residu-residu kunci yang juga dikenali oleh ligan alami, sehingga menunjukkan potensi ligan uji sebagai inhibitor kompetitif.

Kesepuluh, prediksi profil ADMET adalah profil farmakokinetika dan toksisitas yang dilakukan terhadap senyawa yang telah memenuhi kriteria energi ikatan $< -7,0$ kcal/mol, persentase interaksi $> 50\%$, dan berikatan dengan residu kunci dengan penilaian dilakukan berdasarkan lima parameter utama (absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, dan toksisitas), dengan mempertimbangkan nilai probabilitas setiap parameter, dimana senyawa terbaik jika nilai probabilitas baik (0,00–0,30) pada 3 atau lebih aspek ADMET.

Kesebelas, Nilai probabilitas dalam output ADMET adalah angka antara 0–1 yang menunjukkan kemungkinan suatu senyawa memiliki sifat farmakokinetik atau toksikologis tertentu dengan diinterpretasikan sebagai baik (0,00–0,30), sedang (0,31–0,69), atau buruk (0,70–1,00).

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

1.1 Kode SMILES ligan uji. Kode SMILES ligan uji yang diperoleh dari *PubChem* disimpan dalam *notepad*.

1.2 Kode ID PDB makromolekul. Kode ID PDB makromolekul 2WOT, 2Q8G, dan 6YQ1 yang diperoleh dari *webserver* PDB disimpan dalam *notepad*.

1.3 Kode SMILES ligan alami. Kode SMILES ligan alami yang diperoleh dari Protein Data Bank (PDB) disimpan dalam *notepad*.

2. Alat

2.1 Perangkat keras. Asus E402Y dengan spesifikasi processor AMD Dual core E2-7015 1.5GHz, RAM 4 Giga Byte, HDD 1 Tera Byte.

2.2 Perangkat lunak dan laman web. *SwissADME* (<http://www.SwissADME.ch/>), *PubChem* (<https://PubChem.ncbi.nlm.nih.gov>), *Protein Data Bank (PDB)* (<https://www.rcsb.org/>), *ADMETLab* 2.0 (<https://admetmesh.scbdd.com/>) *SwissDock* (<https://www.SwissDock.ch/>), *LigPlot+*

D. Metode Penelitian

1. Skrining *drug-likeness*

Skrining yang dilakukan pada ligan uji adalah skrining *drug-likeness*. Diuji *Drug-likeness* dari senyawa tanaman kayu manis untuk dijadikan sebagai ligan uji menggunakan *SwissADME*. Kanonikal SMILES dari senyawa tanaman kayu manis didapatkan dari *PubChem* lalu disimpan dalam *notepad*. Laman *SwissADME* dapat diakses pada <http://www.SwissADME.ch/>. Kode Kanonikal SMILES disalin lalu ditempelkan ke dalam kotak "*Enter a list of SMILES here*" yang terdapat pada laman *SwissADME*, kemudian tombol "*Run!*" ditekan. Berdasarkan profil *Drug-likeness* dari senyawa tersebut ditentukan senyawa memenuhi minimal 3 dari 4 kriteria kriteria *drug-likeness* yang diperoleh dari *webserver SwissADME* atau tidak sebagai kandidat obat oral (Lalu *et al.*, 2023).

2. Penyimpanan ID makromolekul

Struktur makromolekul TGF- β 1 dengan kode PDB 2WOT, PDK1 dengan kode PDB 2Q8G, FAK dengan kode PDB 6YQ1 disimpan ID-nya untuk selanjutnya dimasukkan di *webserver SwissDock* dan diunduh dalam format .pdbqt untuk penentuan *gridbox* di *software Autodock tools*. Makromolekul ini memenuhi kriteria, yaitu memiliki struktur tiga dimensi yang diperoleh dari hasil kristalografi sinar-X dengan resolusi $< 3 \text{ \AA}$ dan kompleks dengan ligan alami (Lalu *et al.*, 2023).

Ligan alami dari makromolekul 2WOT, 2Q8G, 6YQ1, disimpan dalam format Kanonikal SMILES. Penyimpanan SMILES dilakukan dengan mencari ID makromolekul, kemudian diarahkan ke bagian *small molecules*, nama atau ID ligan ditekan, dan setelah halaman detail ligan

terbuka, Kanonikal SMILES dicari, lalu disalin dan disimpan di *Notepad* untuk selanjutnya dimasukkan ke dalam situs web *SwissDock* (Bugnon *et al.*, 2024).

3. Validasi metode penambatan molekuler

Sebelum dilakukan validasi metode dan penambatan molekul, perlu mempersiapkan ukuran *gridbox* untuk mengetahui titik koordinat pada situs aktif dari makromolekul. Penentuan ukuran *gridbox* dilakukan menggunakan *software Autodock tools* dengan menentukan situs aktif berdasarkan jurnal pendukung makromolekul. Aplikasi *Autodock tools* dibuka > protein dimuat (*load protein*) > asam amino yang berikatan di sisi aktif dipilih > menu *grid* ditekan lalu *gridbox* dipilih > penentuan dilakukan sesuai dengan lokasi asam amino pada situs aktif > ligan dipastikan berada di tengah kotak dan seluruh bagiannya tertutup oleh grid > konfigurasi grid disimpan (Puteri & Nugraha, 2021).

Tabel 2. Parameter pengaturan *gridbox*

Kode makromolekul	<i>Gridbox</i>					
	Center (Å)			Dimensi (Å)		
	X	Y	Z	X	Y	Z
2WOT	7,136	8,245	3,334	24,000	22,000	20,000
2Q8G	-6,281	41,313	0,836	22,000	20,000	20,000
6YQ1	26,64	-5,451	34,692	20,000	20,000	20,000

Validasi metode penambatan molekuler terhadap ligan alami dilakukan untuk menemukan konformasi ligan yang sebenarnya. Konformasi hasil penambatan molekuler yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan dengan konformasi ligan alami dari data kristalografi yang dinyatakan dalam nilai RMSD (Pratama *et al.*, 2021).

Validasi dilakukan terhadap *webserver SwissDock* dengan algoritma Autodock Vina. Kanonikal SMILES ligan dimasukkan > tombol *Prepare ligand* ditekan hingga muncul tanda centang berwarna hijau yang menandakan ligan telah dipreparasi. Target dimasukkan dengan menuliskan kode PDB > setelah itu, dua kotak pemilihan baru akan ditampilkan > rantai yang ingin digunakan dipilih dengan menekan huruf A > pada bagian heteroatom, opsi '*None*' dipilih > tombol *Prepare ligand* kembali ditekan hingga muncul tanda centang berwarna hijau sebagai indikasi preparasi berhasil. Nilai *gridbox* sesuai tabel 2 dan parameter penambatan molekuler dimasukkan > tombol *Check parameters* ditekan, dan setelah muncul tanda centang, proses penambatan molekuler dapat dilakukan. Nama email dan nama proyek penambatan (opsional) diisi terlebih dahulu, kemudian tombol *Start*

docking ditekan. Hasil penambatan akan dikirim ke email yang telah diisikan (Bugnon *et al.*, 2024).

Hasil penambatan ulang yang diperoleh selanjutnya dianalisis nilai RMSD nya menggunakan *PyMOL* dan divisualisasi dengan *LigPlot+* untuk melihat pola interaksi asam amino yang terlibat dan menganalisis ikatan yang terbentuk antara protein target dan ligan alami dalam model visualisasi 2D untuk selanjutnya dibandingkan dengan dengan protein dan ligan alami sebelum diuji.

Dua struktur molekul dimuat ke dalam aplikasi *PyMOL* dengan menggunakan perintah *load*, dimana salah satu struktur digunakan sebagai referensi dan yang lainnya sebagai hasil penambatan molekuler. Setelah kedua struktur dimuat, proses penyelarasan (superimposisi) dilakukan menggunakan perintah *align*, sehingga struktur hasil penambatan molekuler diselaraskan terhadap struktur referensi. Perintah *align* juga secara otomatis menghitung nilai RMSD berdasarkan perbedaan posisi atom dari kedua struktur. Nilai RMSD yang dihasilkan ditampilkan di jendela log *PyMOL* setelah perintah dijalankan (Del *et al.*, 2023).

4. Proses penambatan molekuler

Proses penambatan molekuler dilakukan dengan menggunakan *webserver SwissDock* pilih metode yang berbasis algoritma Autodock Vina. Proses penambatan molekuler dilakukan dengan cara yang sama dengan validasi metode. Hanya saja ligan alami yang digunakan diganti dengan kode SMILES dari senyawa yang sudah diuji *drug-likeness*-nya dan parameter *gridbox* makromolekul yang digunakan sama dengan parameter *gridbox* validasi metode (tabel 2).

Parameter utama yang diamati dalam proses penambatan molekuler adalah nilai energi ikatan (ΔG) dan kemiripan residu asam amino yang berinteraksi. Nilai ΔG diperoleh secara langsung setelah proses penambatan selesai, sedangkan analisis interaksi residu divisualisasikan menggunakan *LigPlot+* berdasarkan kompleks ligan-reseptor yang dibentuk di *PyMOL*. Energi ikatan yang lebih rendah menunjukkan ikatan ligan-reseptor yang lebih stabil, yang mengindikasikan potensi aktivitas biologis ligan yang lebih tinggi. Kemiripan interaksi ligan uji dengan ligan alami, baik dari jenis residu maupun tipe ikatan, dapat mengindikasikan kemiripan dalam aktivitas biologisnya (Lalu *et al.*, 2023)

5. Prediksi profil ADMET

Analisis profil ADMET dilakukan untuk mengevaluasi potensi senyawa uji dalam proses biologis yang meliputi absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, dan toksisitas. Tahapan ini dilakukan dengan menggunakan platform *ADMETlab 3.0* yang dapat diakses melalui laman <https://admetmesh.scbdd.com/>. Kode SMILES dari senyawa yang menunjukkan hasil energi ikatan dan persentase interaksi asam amino terbaik disalin dan dimasukkan ke dalam kolom input “Enter SMILES” pada halaman utama *ADMETlab 3.0*. Setelah kode dimasukkan, proses prediksi dijalankan secara otomatis oleh sistem dengan menampilkan hasil analisis dari berbagai parameter farmakokinetik. Data hasil prediksi tersebut kemudian digunakan untuk menilai sejauh mana karakteristik farmakokinetik senyawa sesuai untuk dikembangkan sebagai kandidat obat.

E. Analisis Hasil

1. *Drug-likeness*

Drug-likeness adalah kriteria yang berguna dan sederhana untuk menyaring molekul obat yang potensial. Metode paling umum untuk menilai *drug-likeness* adalah aturan *Lipinski rules of five*, yang merupakan pedoman praktis untuk obat yang diberikan secara oral. Aturan ini meliputi empat kriteria yaitu :

Tabel 3. Evaluasi kriteria Drug-Likeness berdasarkan aturan Lipinski

Kriteria	Batas Maksimum
Berat Molekul (BM)	≤ 500
Logaritma Clog P (Koefisien partisi)	≤ 5
Akseptor Ikatan Hidrogen (HBA)	≤ 5
Donor Ikatan Hidrogen (HBD)	≤ 5

Tabel 3 menyajikan batas maksimum kriteria aturan *Lipinski rules of five*, senyawa kulit kayu manis yang memenuhi batas maksimum minimal 3 dari 4 kriteria *drug-likeness* yang diperoleh dari *webserver SwissADME*, maka senyawa dianggap memiliki kemiripan obat (Mochizuki *et al.*, 2019).

2. Validasi metode penambatan molekuler

Validasi metode penambatan molekuler dilakukan untuk memastikan keakuratan dan ketepatan penambatan molekuler dengan membandingkan konformasi kristalografi ligan alami dan ligan yang diulang penambatannya terhadap protein target menggunakan

SwissDock. Proses ini melibatkan penentuan *gridbox* berdasarkan pusat massa ligan alami dan ukuran situs pengikatan pada protein. Parameter utama yang diamati adalah nilai RMSD dan interaksi antara ligan kristalografi dan ligan yang dilakukan penambatan ulang. Nilai RMSD yang lebih kecil menunjukkan posisi ligan lebih mirip dengan konformasi ligan alami, dengan nilai $\text{RMSD} < 2 \text{ \AA}$ menunjukkan akurasi yang baik, sementara nilai $\text{RMSD} > 2 \text{ \AA}$ menunjukkan penyimpangan signifikan dan ketidakakuratan dalam penambatan (Kartasasmita *et al.*, 2010). Validasi ini memastikan bahwa metode penambatan molekuler yang digunakan dapat diandalkan untuk penelitian lebih lanjut.

3. Energi ikatan

Penilaian terhadap kekuatan interaksi ligan dan protein target dilakukan berdasarkan nilai energi ikatan yang dihasilkan dari proses penambatan molekuler. Berdasarkan Vijayakumar *et al.* (2022) nilai energi ikatan sebesar -6 kcal/mol merupakan batas ambang yang umum digunakan untuk menilai afinitas ikatan ligan terhadap reseptor. Namun, untuk keperluan interpretasi dalam penelitian ini, digunakan *cut-off* di bawah -7 kcal/mol guna memberikan ruang evaluasi yang lebih untuk mempertajam seleksi senyawa dengan afinitas ikatan yang lebih kuat.

4. Persentase kemiripan interaksi asam amino

Analisis interaksi reseptor-ligan dilakukan untuk mengevaluasi kemiripan pola ikatan antara ligan uji dan ligan alami terhadap residu asam amino pada protein target. Visualisasi interaksi menggunakan *LigPlot+* membantu mengidentifikasi jenis dan lokasi ikatan yang terbentuk, baik secara dua dimensi maupun tiga dimensi. Persentase kemiripan dihitung dengan rumus:

$$\text{Persentase kemiripan interaksi asam amino} = \frac{\text{Jumlah asam amino senyawa uji}}{\text{Jumlah asam amino senyawa alami}} \times 100\%$$

Semakin tinggi nilai persentase kemiripan, maka semakin mirip pola interaksinya dengan ligan alami. Hal ini menunjukkan bahwa ligan uji memiliki potensi aktivitas biologis yang serupa, serta kemungkinan menempati situs aktif dengan cara yang setara atau mendekati ligan alami (Lalu *et al.*, 2023). Dalam penelitian ini, analisis kemiripan interaksi dilakukan pada senyawa dengan nilai energi ikatan di bawah -7 kcal/mol , sesuai batas *cut-off* yang ditetapkan sebelumnya. Selanjutnya, hanya senyawa dengan persentase kemiripan interaksi $\geq 50\%$ yang dipertimbangkan memiliki kesesuaian interaksi yang signifikan. Untuk menguatkan prediksi aktivitasnya, dipertimbangkan pula keterlibatan

residu-residu kunci dalam interaksi, yaitu residu yang juga dikenali oleh ligan alami, guna menunjukkan potensi kesamaan mekanisme pengikatan pada situs aktif target protein.

5. Farmakokinetik dan toksisitas

Prediksi parameter farmakokinetika dan toksisitas senyawa yang diperoleh melalui *ADMETlab 3.0* disajikan dalam dua bentuk utama, yaitu nilai probabilitas dan nilai numerik asli. Nilai probabilitas memiliki rentang antara 0 hingga 1 dan digunakan untuk memprediksi kemungkinan senyawa menunjukkan sifat atau efek biologis tertentu. Interpretasi nilai ini dikategorikan ke dalam tiga kelas visual: nilai 0,00–0,30 dianggap baik (warna hijau), nilai 0,31–0,69 dikategorikan sedang (warna kuning), dan nilai 0,70–1,00 menunjukkan prediksi yang buruk (warna merah). Kategori ini memudahkan dalam mengidentifikasi parameter mana yang memerlukan perhatian khusus dalam proses evaluasi senyawa uji (Fu *et al.*, 2024).

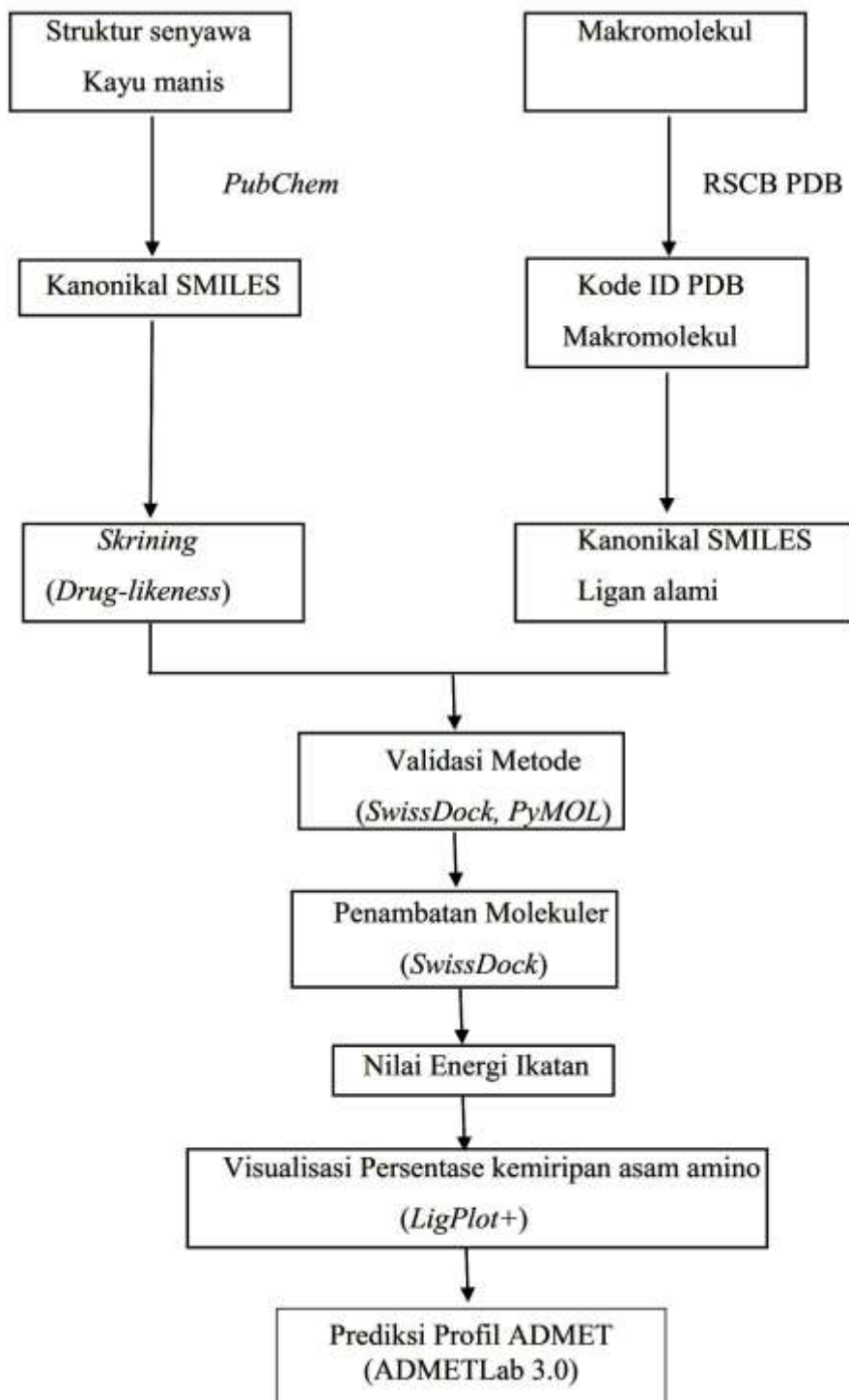
Klasifikasi probabilitas ini diterapkan pada berbagai parameter, antara lain aspek absorpsi (misalnya *P-glycoprotein substrate*, *Human Intestinal Absorption*, dan bioavailabilitas oral seperti F20, F30, F50), distribusi (*Blood-Brain Barrier permeability*), metabolisme (substrat enzim CYP450 seperti CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2B6, dan CYP3A4), serta ekskresi, yang dievaluasi berdasarkan nilai waktu paruh (*half-life/T1/2*) dan *clearance*. Penilaian *clearance* dibedakan menjadi tiga kategori: *clearance* tinggi (>15 mL/menit/kg, merah), sedang (5–15 mL/menit/kg, kuning), dan rendah (<5 mL/menit/kg, hijau). Untuk parameter waktu paruh, dikategorikan sebagai buruk jika <1 jam (merah), sedang jika 1–8 jam (kuning), dan sangat baik jika >8 jam (hijau). Selain itu, aspek toksisitas juga dianalisis berdasarkan prediksi terhadap potensi inhibisi kanal hERG, hepatotoksitas (H-HT), mutagenisitas (*Ames test*), karsinogenisitas, *Drug-Induced Liver Injury* (DILI), dan estimasi dosis aman menurut FDA (FDAMDD) (Fu *et al.*, 2024).

Tabel 4. Evaluasi kriteria profil ADMET berdasarkan ADMETLab 3.0

Kriteria	Batas Maksimum
Fisikokimia	
Log S	$(-4) - 0,5 \log \text{ mol/L}$
Log D	$1 - 3 \log \text{ Mol/L}$
Log P	$0 - 3 \log \text{ Mol L}$
Absorpsi	
Permeabilitas Caco-2	$> -5,15 \log \text{ cm/s}$
Distribusi	
PPB	$< 90\%$
VD	$0,4 - 20 \text{ L/kg}$

Tabel 4 mencantumkan nilai numerik dari parameter hasil *ADMETLab 3.0*. yang tidak disajikan dalam nilai probabilitas, senyawa yang memenuhi batas maksimum semua kriteria dianggap memiliki profil ADMET yang baik (Fu *et al.*, 2024).

F. Skema Penelitian



Gambar 18. Skema penelitian