

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah keseluruhan objek yang akan diteliti dalam tanaman brotowali.

2. Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah dataset struktur senyawa tanaman brotowali yang diduga memiliki aktivitas sebagai kandidat agen antiinflamasi

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah struktur senyawa tanaman brotowali, makromolekul target, dan perangkat lunak yang digunakan untuk penambatan analisis hasil penambatan molekuler.

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 struktur senyawa tanaman brotowali yang diduga memiliki aktivitas terhadap makromolekul protein target antiinflamasi.

Variabel terkendali adalah variabel yang memengaruhi hasil penelitian selain variabel bebas. Kualitas variabel ini ditetapkan agar hasil penelitian dapat direplikasi secara konsisten. Variabel terkendali pada penelitian ini meliputi asal makromolekul, nilai resolusi, ligan asli.

Variabel tergantung adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria dari penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah nilai energi bebas ikatan dan pola interaksi ligan-protein.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, struktur senyawa tanaman brotowali sebagai ligan uji adalah struktur kimia yang terkandung dalam tanaman brotowali

Kedua, makromolekul adalah kompleks ligan *native*-protein yang berasal dari manusia (*homo sapiens*) yang diunduh dari *Protein*

Data Bank (RCSB PDB) dengan kode iNOS(3HR4), LOX(7LAF), dan MMP-9(4XCT).

Ketiga, *Drug-likeness* adalah peluang suatu molekul untuk menjadi obat oral sehubungan dengan bioavailabilitas.

Keempat, energi bebas ikatan adalah nilai yang diperoleh dari hasil penambatan molekul, yang dapat memprediksi kemampuan ligan untuk berikatan dengan protein target.

Kelima, pola interaksi adalah bentuk interaksi/ikatan antara ligan dengan asam-asam amino pada binding site dari target/reseptor, baik berupa interaksi hidrofobik, hidrogen dan van der Waals.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

1.1 Struktur tiga dimensi ligan uji. Kode SMILES ligan uji yang diperoleh dari Knapsack dibuat dalam struktur 3 dimensi menggunakan website Marvin.

1.2 Struktur tiga dimensi makromolekul. Struktur tiga dimensi makromolekul yang diunduh dari *Protein Data Bank* (PDB)

2. Alat

2.1. Perangkat Keras. LAPTOP HP-5JM56RJU dengan spesifikasi processor AMD Ryzen 5 5600H with Radeon 3.30 GHz, RAM 16,0 Giga Byte (15, 3 GB Usable)

2.2. Perangkat Lunak dan Laman Web. *SwissADME* (<http://www.SwissADME.ch/>), *PyRx*, *Biovia Discovery Studio*, *Pubchem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), *Protein Data Bank (PDB)* (<https://www.rcsb.org/>).

D. Metode Percobaan

1. Skrining ligan uji

Skrining *drug-likeness* dilakukan terhadap ligan uji. Pengujian *drug-likeness* struktur senyawa tanaman Brotowali sebagai ligan uji dilakukan menggunakan *SwissADME*. Kode *Canonical SMILES* struktur senyawa tanaman Brotowali diperoleh dari KNAPSACK dan disimpan dalam notepad. Laman *SwissADME* dapat diakses melalui <http://www.SwissADME.ch/>. Kode Canonical SMILES disalin dan ditempelkan pada kotak "Enter a list of SMILES here" di laman *SwissADME*, lalu tombol "Run!" ditekan. Profil *drug-likeness* senyawa

tersebut kemudian digunakan untuk menentukan kelayakannya sebagai kandidat obat oral (Daina *et al.*, 2017).

2. Pembuatan dan preparasi ligan uji

Preparasi ligan dilakukan dengan memuat struktur ligan ke dalam AutoDockTools (ADT) melalui menu *Ligand > Input*. Fleksibilitas ligan diatur menggunakan fitur *Ligand > Torsion Tree > Choose Torsions* untuk menentukan ikatan tunggal yang dapat berotasi, kemudian jumlah ikatan rotatable dibatasi melalui *Ligand > Torsion Tree > Set Number of Torsions*. Preparasi ligan dilakukan untuk memastikan bahwa struktur ligan berada dalam format dan kondisi yang sesuai untuk proses *docking* molekuler, yang mencakup penambahan informasi muatan parsial, penentuan tipe atom, serta pengaturan fleksibilitas ligan agar ligan dapat menyesuaikan konformasinya secara realistis ketika berinteraksi dengan sisi aktif protein target. Ligan kemudian disimpan dalam format .pdbqt melalui *Ligand > Output > Save as PDBQT*, dimuat ke dalam PyRx melalui tombol *Load Molecule*, dan dikonversi menjadi ligan AutoDock dengan klik kanan pada nama ligan dan memilih *Convert to AutoDock Ligand* (Eberhardt *et al.*, 2021).

3. Preparasi makromolekul target

Struktur tiga dimensi dari protein target iNOS, MMP-9, dan LOX diunduh melalui situs web *Protein Data Bank* menggunakan kode PDB masing-masing, iNOS (3HR4), MMP-9 (4XCT), dan LOX (7LAF). Pengunduhan ini dilakukan sebagai bagian dari proses penyiapan makromolekul untuk studi penambatan molekuler (Listyani *et al.*, 2018)

Struktur protein target dimuat ke dalam ADT melalui menu *File > Load Molecule*, molekul air kristalografi dihapus menggunakan *Edit > Delete Water*, dan ligan ko-kristal dihapus menggunakan *Edit > Delete Selected Molecule* untuk membersihkan sisi aktif protein. Protein bersih disimpan kembali dalam format .pdb, dimuat ke dalam PyRx melalui *Load Molecule*, kemudian dikonversi menjadi makromolekul AutoDock dengan klik kanan pada protein dan memilih *Convert to AutoDock Macromolecule*. Preparasi ini dilakukan untuk memastikan bahwa struktur protein berada dalam kondisi kimia yang sesuai untuk simulasi *docking*, dengan penambahan hidrogen polar dan muatan parsial yang diperlukan dalam pembentukan ikatan hidrogen dan perhitungan energi elektrostatik (Trott & Olson, 2010).

4. Pembuatan *Gridbox*

Pengaturan *gridbox* dilakukan langsung di *PyRx* melalui tab *Vina Wizard* dengan mengatur posisi dan dimensi sumbu X, Y, dan Z secara manual sehingga ligan ko-kristal berada tepat di tengah *gridbox* dan seluruh sisi aktif protein tercakup di dalam ruang pencarian. Parameter *gridbox* digunakan sesuai nilai bawaan *PyRx*, yaitu *spacing* sebesar 0,375 Å dan *exhaustiveness* sebesar 8, namun nilai *exhaustiveness* masih dapat ditingkatkan hingga 99 (Seeliger & De Groot, 2010).

5. Validasi metode penambatan molekuler

Proses validasi metode bertujuan untuk memastikan bahwa protein target dapat digunakan dalam penelitian bersama senyawa uji melalui prosedur penambatan molekuler. Menurut Listyani *et al.* (2018) validasi ini dilakukan dengan membandingkan nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) ligan asli sebelum dan sesudah penambatan menggunakan perangkat lunak *PyRx*.

Validasi metode dilakukan dengan melakukan *re-docking* ligan ko-kristal ke dalam protein target menggunakan *PyRx* dengan menekan tombol Run pada tab *Vina Wizard*. Struktur ligan sebelum dan sesudah *docking* divisualisasikan menggunakan *PyMOL* dan dilakukan penyelarasan menggunakan perintah *align ligan_sebelum, ligan_setelah, cycles=0, transform=0*. Nilai RMSD dicatat sebagai indikator keberhasilan metode, dengan nilai RMSD kurang dari 2 Å menunjukkan bahwa metode mampu mereproduksi posisi ligan asli dengan baik (Saputri *et al.*, 2016). Visualisasi hasil penambatan antara protein target dan ligan dilakukan menggunakan perangkat lunak *PyMOL* untuk melihat tumpang tindih struktur, dan *BIOVIA Discovery Studio* untuk mengamati pola interaksi asam amino pada protein target. Nilai RMSD yang baik ditunjukkan oleh nilai kurang dari 2 Å, yang menunjukkan kesesuaian konformasi yang tinggi antara ligan sebelum dan sesudah penambatan (Sari *et al.*, 2020).

6. Proses penambatan molekuler

Setelah preparasi dan validasi protein target selesai, penambatan senyawa uji dilakukan menggunakan perangkat lunak *PyRx*. Tujuan dari tahap ini adalah untuk mengetahui energi ikatan, pola interaksi asam amino antara protein target dan senyawa uji, serta mempelajari model ikatan yang terbentuk (Listyani *et al.*, 2018). Proses dilakukan dengan mengunduh dan membuka perangkat lunak *PyRx* dari laman resminya (<https://pyrx.sourceforge.io>), kemudian memasukkan protein target yang

telah dipreparasi sebagai makromolekul dan senyawa uji yang ditetapkan sebagai ligan masuk dalam daftar kolom ligan. Baik makromolekul maupun ligan selanjutnya dipilih, kemudian ditentukan ukuran dan koordinat *gridbox* (x, y, z) berdasarkan lokasi situs aktif. Penambatan dilakukan dengan menekan tombol “Run” dan energi ikatan akan diperoleh setelah proses selesai.

Proses *docking* dilakukan sebanyak tiga kali (replikasi) untuk setiap ligan guna mengurangi bias algoritma pencarian stokastik dan meningkatkan reliabilitas hasil. Nilai energi ikatan terbaik dan paling konsisten dipilih sebagai hasil akhir. Hasil penambatan selanjutnya dianalisis dengan memvisualisasikan kompleks protein–ligan menggunakan BIOVIA Discovery Studio untuk mengidentifikasi jenis interaksi yang terbentuk, seperti ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan interaksi elektrostatik (Dallakyan & Olson, 2015).

E. Analisis Hasil Penambatan Molekuler

1. *Drug-likeness*

Drug-likeness merupakan suatu kriteria sederhana namun berguna untuk menyaring molekul-molekul yang berpotensi sebagai obat. Salah satu metode yang paling umum digunakan untuk menilai kemiripan suatu senyawa dengan obat adalah aturan Lipinski, yang juga dikenal sebagai aturan lima. Aturan ini berfungsi sebagai pedoman praktis untuk mengevaluasi kelayakan senyawa sebagai obat yang dikonsumsi secara oral. Kriteria dalam aturan ini meliputi: jumlah akseptor ikatan hidrogen tidak lebih dari lima, jumlah donor ikatan hidrogen tidak lebih dari lima, berat molekul kurang dari 500, dan nilai logaritma koefisien partisi antara oktanol dan air (CLogP) kurang dari lima. Senyawa yang memenuhi seluruh kriteria tersebut dianggap memiliki kemiripan dengan obat (Mochizuki *et al.*, 2019).

2. Validasi metode

Tahapan validasi menghasilkan data berupa nilai RMSD, pola interaksi asam amino, serta situs aktif dari senyawa uji. Validasi dilakukan hanya pada proses pemilihan protein target dengan cara melakukan penambatan ulang antara protein target dan senyawa asli. Tujuan dari langkah ini adalah untuk mengevaluasi tingkat kesejajaran (*overlay*) dari protein target yang akan digunakan (Listyani *et al.*, 2018). Nilai kesejajaran yang baik berada pada kisaran 2–3 Å (Sari *et al.*, 2020).

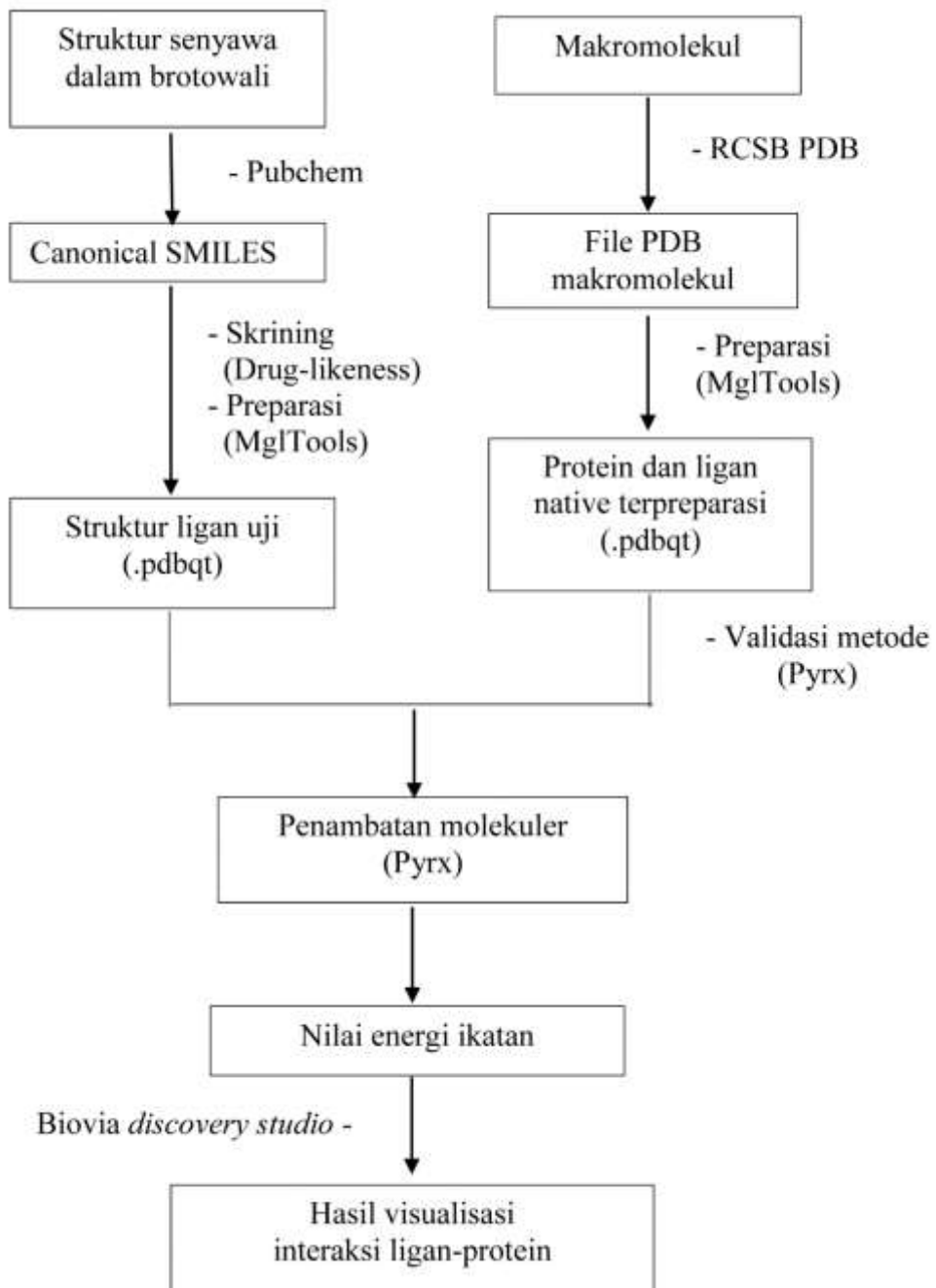
3. Energi bebas ikatan

Penambatan molekul menggunakan perangkat lunak *PyRx* menghasilkan nilai energi bebas ikatan antara protein target dan senyawa uji. Energi bebas ikatan dikatakan baik apabila nilainya menjauhi angka nol, artinya semakin negatif nilai energi tersebut, maka semakin baik kualitas ikatan yang terbentuk (Listyani *et al.*, 2018). Vijayakumar *et al.*, (2022) menyatakan nilai energi ikatan sebesar -6 kcal/mol secara umum digunakan sebagai ambang batas untuk menilai afinitas interaksi antara ligan dan reseptor. Penelitian ini menerapkan kriteria yang lebih ketat dengan menggunakan nilai cut-off di bawah -7 kcal/mol, sehingga memungkinkan seleksi senyawa dengan afinitas ikatan yang lebih kuat dan lebih selektif.

4. Model interaksi

Evaluasi hasil penambatan molekuler juga dilakukan melalui analisis pola interaksi residu asam amino antara ligan uji dan ligan alami pada protein target. Sari *et al.* (2020) menyatakan kemiripan pola residu asam amino dinilai penting karena berperan dalam menentukan kesesuaian mekanisme pengikatan dan potensi aktivitas biologis senyawa uji. Semakin tinggi tingkat kemiripan pola residu tersebut, maka semakin besar kemungkinan senyawa uji memiliki aktivitas biologis yang serupa dengan senyawa asli (Arwansyah *et al.*, 2014).

Visualisasi data interaksi antara reseptor dan ligan dilakukan dengan menggunakan *Biovia Discovery Studio* mengidentifikasi jenis serta posisi ikatan yang terbentuk dalam representasi dua dan tiga dimensi. Tingkat kemiripan interaksi dihitung berdasarkan perbandingan jumlah residu asam amino yang berinteraksi pada ligan uji terhadap ligan alami, kemudian dinyatakan dalam bentuk persentase. Nilai persentase yang lebih tinggi menunjukkan kesamaan pola interaksi yang lebih besar, yang mengindikasikan potensi aktivitas biologis dan mekanisme pengikatan yang serupa dengan ligan alam (Amrulloh *et al.*, 2023). Penelitian ini menetapkan nilai persentase diatas atau sama dengan 60% sebagai seleksi ligan terbaik.



Gambar 8. Skema Jalannya penelitian