

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Sampel Dan Populasi

Populasi dalam penelitian ini meliputi kandungan kimia yang telah diidentifikasi dalam tanaman daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dan protein target PPAR- γ dan SUR1.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah struktur senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) yang memenuhi kriteria *drug-likeness* berdasarkan aturan *Lipinski's Rule of Five* serta dianalisis interaksinya dengan protein target terkait diabetes, yaitu PPAR- γ dan SUR1.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama penelitian ini adalah senyawa aktif metabolit sekunder dari daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.).

Variabel utama kedua adalah penelitian ini adalah protein target terapi DM yang digunakan yaitu PPAR- γ dan Sulfonilurea.

Variabel utama ketiga penelitian ini adalah analisis *drug-likeness* yang mencakup parameter aturan *Lipinski's Rule of Five*.

Variabel utama keempat penelitian ini adalah penambatan molekuler untuk memprediksi afinitas energi ikatan (ΔG) dan pola interaksi ligan-protein.

Variabel utama kelima penelitian ini adalah nilai energi ikatan (ΔG) antara ligan dan reseptor yang menunjukkan afinitas interaksi senyawa terhadap protein target.

Variabel utama keenam penelitian ini adalah pola interaksi ligan dengan residu protein target, seperti ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan π - π stacking pada situs aktif.

Variabel utama ketujuh penelitian ini adalah parameter validasi metode *docking* yang dilihat dari nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD).

Variabel utama kedelapan penelitian ini adalah prediksi toksisitas senyawa bioaktif daun kelor berdasarkan parameter *Cramer rules*, karsinogenisitas, mutagenisitas dan *in vitro* mutagenisitas.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Pada penelitian ini terdapat tiga variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

2.1 Variabel Bebas. Variabel bebas adalah faktor yang diselidiki pengaruhnya untuk menilai pengaruhnya terhadap variabel terikat. Variabel bebas yang digunakan yaitu kandungan daun kelor yang diperoleh dari *web server* fitokimia seperti PubChem dan KNApSACk, beserta dikonfirmasi melalui kajian literatur ilmiah terdahulu.

2.2 Variabel Tergantung. Variabel tergantung adalah variabel yang dipengaruhi oleh nilainya terhadap variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah nilai energi ikatan (ΔG) hasil *docking* molekul, pola interaksi antara senyawa dengan protein target, dan hasil prediksi toksisitas *in silico*.

2.3 Variabel Terkontrol. Variabel terkontrol merupakan faktor yang dikendalikan agar tidak mempengaruhi variabel tergantung, serta memastikan bahwa penelitian dapat direplikasi secara konsisten. Variabel terkontrol yang digunakan pada penelitian ini adalah struktur protein target, parameter dan metode *docking* serta metode prediksi toksisitas yang digunakan.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, senyawa daun kelor adalah senyawa yang terkandung dalam tanaman daun kelor yang dapat digunakan sebagai senyawa uji (ligan) yang memenuhi kriteria *drug-likeness* terhadap protein target terapi DM.

Kedua, protein target adalah protein dalam tubuh yang dijadikan target oleh senyawa aktif daun kelor yang terlibat dalam terapi DM yaitu PPAR- γ dan SUR1 pada proses *molecular docking*.

Ketiga, *drug-likeness* adalah parameter yang dilakukan dalam proses penyaringan awal (*screening*) senyawa sebelum dilakukan analisis *molecular docking* untuk menilai kelayakan senyawa sebagai kandidat obat yang mencakup parameter aturan *Lipinski's Rule of Five* meliputi, massa molekul, Log P, jumlah donor dan akseptor H yang dianalisis menggunakan *web server* SwissADME.

Keempat, penambatan molekuler adalah metode komputasi untuk memprediksi afinitas energi ikatan (ΔG) dan pola interaksi ligan-protein antara senyawa daun kelor dan protein target menggunakan *web server* SwissDock, dengan validasi pose melalui RMSD di PyMOL serta visualisasi interaksi menggunakan LigPlot+.

Kelima, afinitas energi ikatan (AG) adalah nilai energi ikatan yang diperoleh dari kompleks protein dengan ligan, yang diprediksikan dapat merepresentasikan afinitas senyawa terhadap protein target. Semakin negatif nilai energi ikatan, maka semakin kuat dan stabil kompleks yang terbentuk yang mengindikasikan prediksi afinitas yang semakin baik.

Keenam, pola interaksi yang baik adalah kesesuaian interaksi antara senyawa aktif dengan residu asam amino pada situs aktif protein target, yang ditunjukkan melalui kemiripan pola interaksi ikatan hidrogen dan hidrofobik dengan residu asam amino yang berinteraksi dengan ligan asli. Tingkat kesesuaian tersebut dinilai melalui persentase kemiripan residu yang berinteraksi, sehingga semakin tinggi persentasenya, semakin kuat indikasi bahwa senyawa memiliki pola pengikatan serupa ligan asli.

Ketujuh, RMSD (*Root Mean Square Deviation*) adalah parameter yang digunakan dalam validasi metode *docking* untuk menilai kemiripan posisi ligan *docking* dengan posisi ligan asli pada struktur kristal, nilai $\leq 2 \text{ \AA}$ dianggap valid.

Kedelapan, prediksi toksisitas adalah penilaian potensi bahaya senyawa bioaktif daun kelor yang dipilih berdasarkan potensi aktivitasnya dan dianalisis secara *in silico* menggunakan perangkat lunak Toxtree melalui parameter *Cramer rules*, karsinogenisitas (genotoksik dan non-genotoksik), mutagenisitas (*rulebase by ISS*), serta *in vitro* mutagenisitas (*Ames test alerts by ISS*).

C. Alat dan Bahan

1. Alat

1.1 Perangkat keras. Perangkat keras yang digunakan pada penelitian ini adalah laptop Lenovo Ideapad Slim 1i dengan spesifikasi Prosesor Intel® Celeron® N4020, 1.1 up to 2.8 GHz, RAM 4 GB, Penyimpanan 256 GB SSD, Dimensi 288 × 200 × 17.9 mm, Abu-abu, SanDisk 8 GB.

1.2 Perangkat lunak. Perangkat lunak yang digunakan adalah *web server* KNApSackFamily (<https://www.knapsackfamily.com/KNApSackFamily/>), PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>), SwissDock, PyMol.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah struktur tiga dimensi protein target PPAR- γ , SUR1, dan data kandungan senyawa metabolit sekunder tanaman daun kelor yang diperoleh dari *web server* dan jurnal penelitian terdahulu dengan struktur yang diunduh dari *web server* Pubchem. Makromolekul protein yang dipilih adalah PPAR- γ pada manusia yang didapatkan dari metode kristalografi X-ray diffraction resolusi 1.70 Å yang tertambat dengan pioglitazone dengan PDB ID : 5Y2T. Sementara makromolekul SUR1 yang dipilih dari eksperimen dengan XRD yang berikatan dengan glibenklamid dengan PDB ID: 6BAA resolusi 3,36 Å.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengumpulan Data Senyawa Bioaktif

Tahap awal dilakukan dengan pencarian senyawa bioaktif dari daun kelor yang diperoleh dari database fitokimia KNApSack dan literatur pada jurnal-jurnal ilmiah. *Web server* PubChem diakses, kemudian nama senyawa dimasukkan di kolom pencarian dan perintah pencarian dijalankan. Selanjutnya, tautan nama senyawa dipilih, lalu simpan kode SMILES dari masing-masing senyawa atau bagian struktur 2D atau 3D dari senyawa tersebut diunduh dalam format SDF dan dikonversi ke format yang sesuai untuk keperluan penambatan molekuler (*molecular docking*).

2. *Screening Drug-Likeness*

Seluruh senyawa bioaktif daun kelor yang telah dikumpulkan dievaluasi menggunakan *web server* SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) untuk menilai kriteria *drug-likeness*. Kode SMILES dari masing-masing senyawa disalin dari database PubChem, kemudian situs SwissADME diakses. Kode SMILES tersebut ditempelkan pada kolom “*Enter a list of SMILES here*”, lalu klik tombol “*Run*” untuk menjalankan analisis. Penilaian ini meliputi parameter dari Lipinski’s Rule of Five yang mencakup berat molekul, jumlah donor dan akseptor hidrogen, serta nilai logP.

3. Pengumpulan Struktur Makromolekul (Protein Target)

Pengunduhan struktur 3D makromolekul protein target diperoleh dari Protein Data Bank (<http://www.rscb.org/pdb/>) dalam format .pdb.

3.1 Struktur Protein PPAR- γ . *Web server* RCSB PDB diakses, kemudian PDB ID 5Y2T dimasukan ke dalam kolom pencarian dan

perintah pencarian dijalankan. Setelah halaman struktur protein terbuka, tautan PDB ID 5Y2T diklik untuk menuju halaman detail protein. Struktur protein kemudian dipilih dengan memilih opsi “Download Files” dan memilih format “Legacy PDB Format”.

3.2 Struktur Protein SUR1. *Web server* RCSB PDB diakses, kemudian PDB ID 6BAA dimasukkan ke dalam kolom pencarian dan perintah pencarian dijalankan. Setelah halaman struktur protein terbuka, tautan PDB ID 5Y2T diklik untuk menuju halaman detail protein. Struktur protein kemudian dipilih dengan memilih opsi “Download Files” dan memilih format “Legacy PDB Format”.

Struktur protein target yang telah diperoleh, tidak dilakukan proses preparasi makromolekul secara manual, seperti penambahan hidrogen polar atau penghapusan molekul air. Hal ini disebabkan karena *web server* SwissDock telah mengintegrasikan seluruh proses preparasi tersebut secara otomatis, termasuk optimasi struktur protein dan identifikasi situs aktif. Dengan demikian, file struktur protein yang diperoleh dari PDB dapat langsung digunakan dalam tahap penambahan molekul.

4. Validasi Metode *Docking*

Validasi metode *docking* dilakukan dengan metode *re-docking*, yaitu mengikat kembali ligan asli yang telah diketahui menempel pada struktur PPAR- γ dan SUR1. Penentuan *grid box* pada proses *molecular docking* dilakukan dengan merujuk pada posisi ligan asli yang berikatan pada lokasi residu asam amino yang berperan aktif dalam situs pengikatan protein target, sebagaimana diidentifikasi dalam jurnal pendukung makromolekul.

Proses ini dilakukan menggunakan aplikasi AutoDock Tools (Venkataraman *et al.*, 2022). Aplikasi Autodock tools dibuka, kemudian protein dimuat (load protein). Asam amino yang berikatan pada situs aktif dipilih, lalu opsi “Grid” diakses dan menu “*Grid Box*” diklik. Penentuan grid dilakukan berdasarkan lokasi asam amino pada situs aktif. Ligan diposisikan berada di tengah kotak dan dipastikan seluruh bagiannya tertutup oleh grid. Setelah konfigurasi grid disesuaikan, pengaturan tersebut disimpan.

Tabel 1. Parameter pengaturan *grid box*

Kode makromolekul	<i>Grid box</i>					
	Center (Å)			Dimensi (Å)		
	X	Y	Z	X	Y	Z
5Y2T	8,33	-0,181	47,909	26,000	26,000	30,000
6BAA	191,194	144,099	128,084	26,000	26,000	26,000

Validasi dilakukan menggunakan *web server* SwissDock dengan algoritma AutoDock Vina. Proses diawali dengan memasukan Kanonikal SMILES ligan, kemudian tombol “*Prepare ligand*” diklik hingga muncul tanda centang berwarna hijau sebagai indikasi bahwa ligan telah berhasil dipreparasi. Target protein dimasukkan dengan cara mengetikkan kode PDB atau mengunggah file PDB dalam format.pdb. Setelah itu, dua kotak pemilihan baru akan ditampilkan; rantai yang ingin digunakan dipilih, sedangkan pada bagian heteroatom, opsi “*None*” dipilih. Tombol “*Prepare target*” kembali diklik hingga muncul tanda centang berwarna hijau sebagai indikasi preparasi berhasil. Nilai *grid box* dimasukkan sesuai dengan yang tercantum pada Tabel 1 dan parameter “*sampling exhaustivity*” disetel pada nilai 8. Tombol “*Check parameters*” diklik dan setelah muncul tanda centang, proses penambatan molekuler dapat dilakukan. Alamat email dan nama proyek penambatan (opsional) diisi terlebih dahulu, kemudian tombol *Start docking* diklik. Hasil penambatan akan dikirim ke email yang telah diisikan (Bugnon *et al.*, 2024).

Hasil penambatan ulang dianalisis dengan menghitung nilai RMSD menggunakan PyMOL dan divisualisasikan dalam bentuk 2D menggunakan LigPlot+ untuk mengamati pola interaksi asam amino dan jenis ikatan yang terbentuk dalam model visualisasi 2D, lalu dibandingkan dengan kompleks protein-ligan asli sebelum uji.

Dua struktur molekul dimuat ke dalam PyMOL menggunakan perintah *load*, dengan satu sebagai referensi dan satu lagi sebagai hasil *docking*. Setelah kedua struktur dimuat, proses penyelarasan (superimposisi) dilakukan menggunakan perintah *align*, yang secara otomatis menghitung nilai RMSD berdasarkan perbedaan posisi atom dari kedua struktur. Nilai RMSD dihasilkan ditampilkan di jendela log PyMOL setelah perintah dijalankan (Lill & Danielson, 2011).

5. Penambatan Molekuler (*Molecular Docking*)

Validasi *docking* selesai, senyawa yang terpilih dan lolos dalam skrining drug-likeness akan dilakukan *molecular docking*. Proses

penambatan molekul dilakukan dengan menggunakan *web server* SwissDock dengan algoritma *AutoDock Vina*.

Proses diawali dengan memasukkan Kanonikal SMILES ligan (senyawa daun kelor), kemudian tombol “*Prepare ligand*” diklik hingga muncul tanda centang berwarna hijau sebagai indikasi bahwa ligan telah berhasil dipreparasi. Target protein dimasukkan dengan mengetikkan kode PDB (5Y2T atau 6BAA) atau dengan mengunggah file PDB dalam format *.pdb*. Setelah itu, dua kotak pemilihan baru akan ditampilkan; rantai yang ingin digunakan dipilih dengan menekan huruf A, sedangkan pada bagian heteroatom, opsi “*None*” dipilih. Tombol “*Prepare target*” kembali diklik hingga muncul tanda centang berwarna hijau sebagai indikasi preparasi berhasil.

Nilai koordinat *grid box* (x, y, z) dimasukkan sesuai dengan parameter yang telah ditentukan dan parameter “*sampling exhaustivity*” disetel pada nilai 8. Tombol “*Check parameters*” diklik dan setelah muncul tanda centang, proses penambatan molekuler dapat dilakukan. Alamat email dan nama proyek penambatan (opsional) diisi terlebih dahulu, kemudian tombol *Start docking* diklik. Hasil penambatan akan dikirim ke email yang telah diisikan. Hasil dari proses penambatan yang dilakukan melalui SwissDock berupa nilai energi ikatan serta prediksi konformasi pengikatan antara protein dan ligan. Data tersebut digunakan untuk menentukan kompleks dengan nilai energi ikatan paling rendah, yang secara otomatis ditempatkan pada peringkat teratas hasil penambatan, sebagai representasi dari interaksi yang paling stabil antara ligan dan protein target (Bugnon *et al.*, 2024).

6. Visualisasi dan Analisis Interaksi

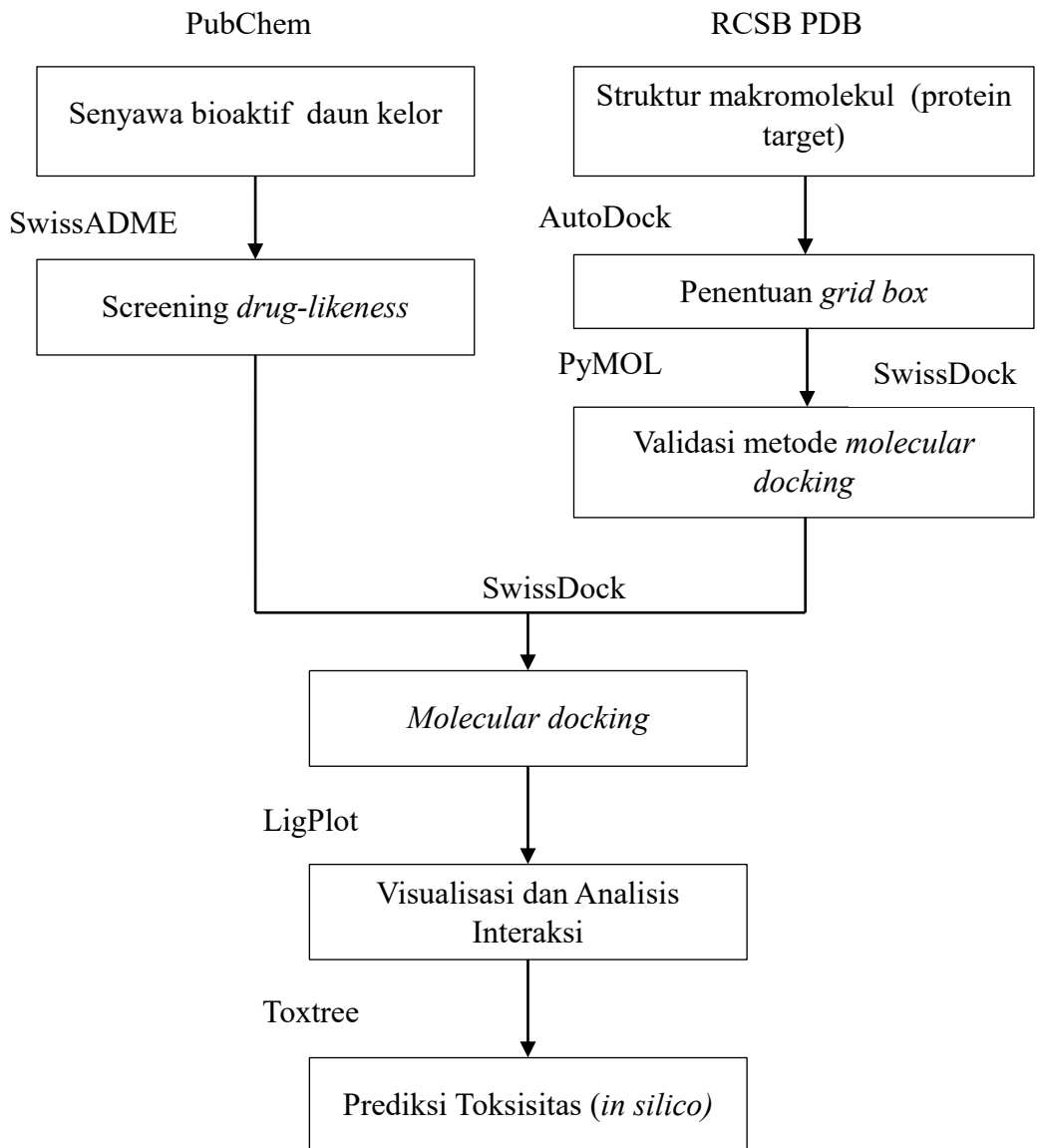
Hasil *docking* yang telah diperoleh dianalisis lebih lanjut melalui tahap visualisasi dan analisis interaksi ligan dengan protein. Kompleks protein–ligan terlebih dahulu dibentuk melalui penggabungan file hasil penambatan molekuler berformat *.pdb* dengan file protein target berformat *.pdb* menggunakan perangkat lunak PyMOL. File *.pdb* kompleks protein–ligan dianalisis menggunakan LigPlot+ untuk mengevaluasi jenis interaksi yang terbentuk serta mengidentifikasi residu asam amino yang berperan pada situs aktif protein. Analisis ini bertujuan untuk mengetahui residu-residu kunci yang berkontribusi terhadap stabilitas kompleks protein dengan ligan. Proses diawali dengan membuka perangkat lunak LigPlot+, kemudian file hasil penambatan molekuler dengan format *.pdb* dibuka melalui menu *File* dan opsi *Open*.

Setelah file berhasil dimuat, analisis interaksi dilakukan secara otomatis oleh sistem, dan hasil visualisasi ditampilkan dalam bentuk representasi dua dimensi yang menunjukkan interaksi hidrogen serta interaksi hidrofobik antara ligan dan residu asam amino pada situs aktif protein.

7. Prediksi Toksisitas (*In Silico*)

Senyawa potensial yang diperoleh dari hasil penambatan molekuler disiapkan dalam bentuk kode SMILES. Uji toksisitas dilakukan secara *in silico* menggunakan perangkat lunak Toxtree untuk memprediksi nilai toksisitas senyawa. Perangkat lunak Toxtree dibuka, kemudian kode SMILES dimasukkan pada kolom "*Chemical identifier*". Tombol "*Go!*" pada sisi kanan di klik sehingga struktur senyawa ditampilkan pada panel *Structure* diagram. Parameter perhitungan dipilih opsi "*Method*" diakses dan menu "*Select a decision tree*" di klik, kemudian ditentukan parameter yang digunakan, yaitu *Cramer rules*, *Carcinogenicity* (genotoksik dan non-genotoksik) dan *Mutagenicity rulebase by ISS*, serta *In vitro mutagenicity (Ames test) alerts by ISS*. Tombol "*Estimate*" pada bagian kanan atas (panel *Toxic Hazard*) diklik untuk menampilkan hasil klasifikasi toksisitas. Hasil prediksi dibaca pada bagian "*Verbose explanation*" dan disimpan untuk analisis lebih lanjut.

E. Skema Penelitian



Gambar 12. Skema penelitian

F. Analisis Data

Data senyawa bioaktif daun kelor yang telah melewati proses screening *drug-likeness* menggunakan SwissADME dikumpulkan dan dilakukan analisis berdasarkan parameter *Lipinski's Rule of Five*. Syarat nilai dari parameter yang digunakan dapat dilihat pada tabel 2. Nilai dari masing-masing parameter dikompilasi dalam tabel memanjang ke kanan

untuk tiap parameter dan menurun untuk tiap senyawa. Menurut aturan *Lipinski's Rule of Five* suatu senyawa dikategorikan memenuhi kelayakan *drug-likeness* jika melanggar satu dari empat parameter utama yang ditetapkan (Lipinski *et al.*, 2012). Hasil analisis digunakan untuk menyimpulkan apakah suatu senyawa memiliki potensi sebagai kandidat obat oral.

Tabel 2. Parameter *drug-likeness* SwissADME

Parameter	Nilai
Lipinski Rule	Massa molekul ≤ 500 Dalton
	Log p $\leq 4,15$
	Donor ikatan hidrogen ≤ 5
	Akseptor ikatan hidrogen ≤ 10

Senyawa yang lolos screening *drug-likeness* dilakukan *docking* terhadap protein target PPAR- γ (5Y2T) dan SUR1 (6BAA) menggunakan *web server* SwissDock dengan algoritma Autodock Vina. Setiap pose diberi skor berdasarkan Vina score, yaitu nilai energi ikatan ligan-protein, semakin rendah (lebih negatif) nilai energi, semakin besar kemungkinan ikatan terjadi secara stabil di lingkungan biologis. Hasil *docking* berupa daftar pose dengan skor dan visualisasi interaksi disediakan dalam format .pdb atau .mol2, serta dapat diunduh untuk dianalisis lebih lanjut.

Data yang didapatkan di susun rapi dalam tabel memanjang ke kanan untuk tiap protein target dan menurun untuk tiap senyawa. Berdasarkan nilai energi tersebut, dilakukan penilaian terhadap afinitas ligan terhadap target, dengan kriteria bahwa semakin negatif nilai energi, maka semakin tinggi afinitas ligan.

Analisis interaksi ligan-protein dilakukan untuk mengevaluasi kemiripan pola interaksi antara ligan uji dan *native* ligan pada situs aktif protein. Visualisasi hasil *docking* menggunakan LigPlot+ membantu mengidentifikasi jenis interaksi yang terbentuk, seperti ikatan hidrogen, hidrofobik, serta interaksi lain. Persentase kemiripan dihitung dengan rumus :

$$\frac{\text{Jumlah asam amino senyawa uji}}{\text{Jumlah asam amino native ligan}} \times 100\%$$

Semakin tinggi nilai persentase kemiripan, maka semakin mirip pola interaksinya dengan ligan alami. Kondisi ini mengindikasikan potensi aktivitas biologis yang sebanding serta kemungkinan ligan uji menempati situs aktif dengan mekanisme pengikatan yang serupa (Amrulloh *et al.*, 2023).

Data visualisasi disusun rapi dalam tabel memanjang ke kanan untuk tiap protein target dan menurun untuk tiap senyawa, kemudian dilakukan interpretasi terhadap residu yang terlibat dalam ikatan serta jenis ikatannya, sebagai dasar untuk mengevaluasi potensi aktivitas antidiabetes dari masing-masing senyawa.

Senyawa kandidat terpilih berdasarkan hasil penambatan molekuler selanjutnya dianalisis profil prediksi toksisitasnya secara *in silico* menggunakan perangkat lunak Toxtree. Parameter yang digunakan meliputi *Cramer rules*, *Carcinogenicity* (genotoksik dan non-genotoksik), *Mutagenicity rulebase by ISS*, serta *In vitro mutagenicity (Ames test) alerts by ISS*.

Kriteria penilaian tiap parameter disajikan pada Tabel 3. Hasil prediksi disusun dalam tabel dengan format memanjang ke kanan untuk setiap parameter dan menurun untuk setiap senyawa. Kategori atau status yang diperoleh dari masing-masing parameter digunakan untuk menilai tingkat keamanan senyawa. Senyawa yang menunjukkan kategori risiko tinggi atau memiliki alerts mutagenisitas/karsinogenisitas dikelompokkan sebagai kandidat yang memerlukan perhatian khusus atau tidak direkomendasikan untuk dikembangkan lebih lanjut.

Tabel 3. Parameter penilaian prediksi toksisitas (Toxtree)

Parameter	Kategori	Kriteria
<i>Cramer Rules</i>	Kelas I (Rendah)	Senyawa dengan struktur kimia sederhana dan metabolisme efisien, menunjukkan toksisitas oral rendah
	Kelas II (Menengah)	Senyawa yang memiliki struktur kurang aman dibanding kelas I, namun tidak memiliki ciri struktural toksisitas seperti kelas III
	Kelas III (Tinggi)	Senyawa dengan struktur kimia yang tidak dapat diasumsikan aman sejak awal atau memiliki gugus fungsi reaktif, potensi toksisitas signifikan
<i>Carcinogenicity & Mutagenicity Rulebase by ISS</i>	Positif genotoksik karsinogenik	Genotoksik: Positif, Non-genotoksik: Negatif. Terdapat <i>structural alert</i> karsinogenisitas genotoksik
	Negatif genotoksik karsinogenik	Genotoksik: Negatif, Non-genotoksik: Negatif. Tidak terdapat <i>structural alert</i> baik genotoksik maupun non-genotoksik
<i>In Vitro Mutagenicity (Ames Test) Alerts by ISS</i>	Ada peringatan mutagenisitas <i>S. typhimurium</i>	Terdapat <i>structural alert</i> terhadap mutagenisitas pada <i>S. typhimurium</i>
	Tidak ada peringatan mutagenisitas <i>S. typhimurium</i>	Tidak terdapat <i>structural alert</i> terhadap mutagenisitas pada <i>S. typhimurium</i>