

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian adalah seluruh senyawa kimia yang terkandung dalam tanaman *chromolaena odorata* dan protein target berupa enzim α -glukosidase dan DPP-4 yang berperan dalam terapi diabetes melitus.

Sampel dalam penelitian ini adalah sebagian dari populasi, yaitu senyawa dalam tanaman *chromolaena odorata* yang berpotensi sebagai inhibitor enzim α -glukosidase dan DPP-4 yang diperoleh dari KNApSACk, PubChem, dan literatur jurnal lain sebagai pendukung.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama:

Variabel utama dalam penelitian ini adalah senyawa potensial dari tanaman *Chromolaena odorata* yang memiliki potensi aktivitas antidiabetes.

Variabel kedua adalah protein target, yaitu enzim α -glukosidase (PDB ID: 2QMJ) dan DPP-4 (PDB ID: 1X70) yang berperan sebagai sasaran interaksi senyawa uji.

Variabel ketiga adalah interaksi senyawa terhadap protein target, yang dievaluasi berdasarkan skor *docking* dan pola interaksi residu asam amino pada situs aktif protein melalui simulasi molecular docking menggunakan perangkat lunak PLANTS.

Variabel keempat adalah prediksi profil farmakokinetik senyawa potensial yang meliputi aspek absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi (ADME), yang dianalisis menggunakan webserver ADMETlab 3.0.

2. Klasifikasi Variabel:

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah sebagai variabel yang ingin dicari dalam pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Maka variabel bebas dalam penelitian ini adalah senyawa dalam tanaman *chromolaena odorata* yang memiliki potensi sebagai antidiabetes

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah variabel yang di pengaruhi nilainya akibat pengaruh variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah nilai energi ikatan (ΔG) dan interaksi asam amino terhadap enzim α -glukosidase dan DPP-4 serta hasil prediksi profil farmakokinetik senyawa.

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah variabel yang berpengaruh terhadap kedua variabel sebelumnya. Sehingga variabel terkendali dalam penelitian ini adalah webserver, software dan komputer yang digunakan.

3. Definisi Operasional Variabel:

Pertama, senyawa potensial adalah molekul-molekul kecil yang berasal dari tanaman *Chromolaena odorata* yang diperoleh dari basis data PubChem dan KNApSACk, dan digunakan sebagai ligan uji untuk dianalisis interaksinya dengan enzim α -glukosidase dan DPP-4.

Kedua, protein target adalah struktur tiga dimensi (3D) enzim α -glukosidase (PDB ID: 2QMJ) dan enzim DPP-4 (PDB ID: 1X70) yang diunduh dari basis data RCSB Protein Data Bank (PDB).

Ketiga, aktivitas penghambatan didefinisikan sebagai kecenderungan interaksi senyawa potensial dari *Chromolaena odorata* terhadap enzim target (α -glukosidase dan DPP-4), yang dievaluasi berdasarkan skor *docking* dan pola interaksi residu asam amino pada situs aktif protein target melalui simulasi molecular docking menggunakan perangkat lunak PLANTS. Visualisasi interaksi ligan–protein dilakukan untuk mengidentifikasi jenis dan residu asam amino yang terlibat dalam pembentukan kompleks ligan–protein.

Keempat, profil farmakokinetik (ADME) senyawa potensial dianalisis menggunakan webserver ADMETlab 3.0 dengan mempertimbangkan parameter absorpsi (permeabilitas Caco-2, P-gp substrate, HIA, F20%, F30%, dan F50%), distribusi (PPB/Plasma Protein Binding, BBB/Blood–Brain Barrier, dan VDss), metabolisme (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4, CYP2B6 sebagai substrat, serta stabilitas HLM), dan ekskresi (CL_{plasma} dan waktu paruh eliminasi/ $T_{1/2}$).

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Perangkat keras yang akan digunakan adalah laptop merk lenovo dengan spesifikasi Intel inside, RAM 4 Giga *Byte* dan penyimpanan 128 Giga *Byte*. Perangkat lunak yaitu : PubChem, KNApSACk, RCSB PDB , SWISSADME, PyRx, PLANTS1.2 Discovery Studio Visualizer, Open Babel.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Struktur 3D senyawa potensial dari tanaman *chromolaena odorata* yang diunduh dari database PubChem dan struktur enzim α -glukosidase (PDB ID: 2QMJ) dan DPP-4 (PDB ID :1X70) dari RCSB PDB .

D. Prosedur Penelitian

1. Pengumpulan data kandungan tanaman

Senyawa kimia yang terkandung dalam tanaman *chromolaena odorata* dikumpulkan dari Webserver KNApSACk dan literatur berupa jurnal penelitian sebelumnya. Senyawa-senyawa metabolit sekunder tanaman *chromolaena odorata* yang sudah di temukan di download strukturnya dari Pubchem dalam bentuk file SDF dan copy paste kode SMILES untuk digunakan pada ADMETlab.

2. Preparasi Ligan tanaman *chromolaena odorata*

Senyawa-senyawa metabolit sekunder tanaman *chromolaena odorata* yang sudah dipilih di upload ke Yasara untuk penambahan atom hidrogen. Setelah penambahan atom hidrogen, dilakukan energy minimization menggunakan pyrx. Masuk software pyrx dan dipilih openbabel kemudian input file ke dalam software klik senyawa da pilih “minimiae selected”. Setelah itu klik senyawa da pilih convert selected to autodock ligan (pdbqt). Opsi save ini akan secara otomatis memberikan muatan gasteger pada ligan. Save file ligand yang sudah dilakukan energi minimize . upload file ke yasara untuk mengubah file menjadi mol2 agar bisa *didocking* dengan PLANTS1.2.

3. Pengumpulan data Protein Target

Pengumpulan data protein target dilakukan dengan masuk pada situs resmi Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>). Pada kolom pencarian, ketik kata kunci yaitu *α -glucosidase* dan DPP4. Protein target yang dipilih dengan melihat nilai resolusi yang bagus yaitu <2Å dan nilai ligan structure quality assessment yang bagus yaitu mendekati 1 (better) . Protein yang dipilih untuk α -glukosidase adalah dengan (PDB ID: 2QMJ) dan DPP-4 (PDB ID: 1X70). Setelah didapatkan protein target yang akan digunakan selanjutnya diunduh dengan format PDB.

4. Validasi Molecular Docking

Validasi dilakukan melalui proses *re-docking* terhadap ligan asli (co-crystallized ligand) yang berasal dari struktur protein target. Hasil dari *re-docking* kemudian dibandingkan dengan posisi ligan asli dengan

menghitung nilai Root Mean Square Deviation (RMSD) menggunakan YASARA. Untuk melakukan validasi metode pertama persiapkan protein target dan ligan asli untuk di *redocking*.

4.1. Preparasi protein. Protein dipersiapkan dengan menghapus molekul air, ion, dan ligan asli, serta menambahkan atom hidrogen menggunakan perangkat lunak BIOVIA Discovery Studio Visualizer. Proses penambahan hidrogen dan penyesuaian muatan dilakukan menggunakan AutodockTool. Setelah langkah-langkah tersebut selesai, file diunggah ke YASARA, disimpan, dan diubah ke format mol2 untuk digunakan dalam proses *docking* menggunakan PLANTS 1.2.

4.2. Preparasi native ligand. Mengunggah protein ke BIOVIA Discovery Studio (DS), kemudian menghilangkan molekul air. Setelah itu, hilangkan protein dan ligan lain yang tidak relevan dengan ligan utama yang akan di-*docking*, dan tambahkan atom hidrogen. Simpan file yang telah diedit dalam format PDB. Selanjutnya, unggah file ke PyRx untuk minimisasi energi, kemudian simpan sebagai PDBQT untuk penambahan muatan Gasteiger. Setelah proses ini selesai, simpan file ke folder yang akan secara otomatis mengonversinya ke file PDB. Terakhir, unggah file ke YASARA, simpan, dan konversikan ke format mol2.

4.3. Proseses *docking*. Membuat suatu folder dan isi folder dengan filr mol 2 ligand dan protein yang akan di*docking*, PLANTS1.2, scripts, parallelPLANTS.sh. kemudian buka commande prompt dengan win+r ketik ubuntu enter. Setelah itu, masukkan perintah ./PLANTS1.2 --mode bind file_ligan.mol2 10 file_protein.mol2 Perintah ini akan menghasilkan file bindingsite.def yang berisi koordinat gridball center dan radius, yang secara otomatis dihitung berdasarkan jarak antara ligan dan protein oleh PLANTS1.2. Selanjutnya, masukkan perintah untuk menjalankan parallelPLANTS.sh menggunakan PLANTS1.2: bash scripts/parallelPLANTS.sh file_protein.mol2 file_ligan.mol2 1 bindingsite.def Perintah ini menjalankan *docking* berdasarkan koordinat dari file bindingsite.def. Jika cara ini tidak berhasil dan menghasilkan nilai RMSD yang buruk, maka gunakan template plantconfig yang terbentuk dari proses *docking* sebelumnya. Edit file plantconfig menggunakan Notepad, atur parameter seperti centre, radius, clustre_structure, cluster_rmsd, write_multi_mol2, dan lain-lain sesuai kebutuhan hingga mencapai hasil yang diinginkan berdasarkan literatur acuan. Setelah editing selesai, jalankan plantconfig dengan perintah berikut: ./PLANTS1.2 --mode screen plantconfig Perintah ini digunakan

pada command prompt untuk menjalankan konfigurasi *docking* yang telah disesuaikan.

4.4. Perhitungan RMSD. Unggah ligan hasil *redocking* dan ligan sebelum *redocking* ke YASARA. Hapus atom hidrogen pada kedua ligan asli (native ligan). Lakukan analisis RMSD antara kedua molekul tersebut. Nilai RMSD dianggap valid jika kurang dari 2Å. Jika nilai RMSD lebih besar dari 2Å, maka lakukan kalibrasi ulang dengan pengaturan yang berbeda hingga diperoleh nilai RMSD yang kurang dari 2Å.

5. Proses molecular *docking*

Senyawa-senyawa metabolit sekunder dari tanaman *Chromolaena odorata* yang telah dikumpulkan dipreparasi dengan penambahan atom hidrogen serta proses energy minimization menggunakan perangkat lunak PyRx. Selanjutnya, ligan yang telah dipreparasi disimpan dalam format .mol2 dan dimasukkan ke dalam folder khusus yang berisi berkas-berkas pendukung untuk proses molecular docking menggunakan perangkat lunak PLANTS versi 1.2, yang sebelumnya telah dipersiapkan pada tahap validasi metode. Konfigurasi docking dilakukan dengan mengubah file plantconfig menggunakan aplikasi Notepad, dengan mengganti nama ligan native pada file .mol2 menjadi nama ligan senyawa uji dari *Chromolaena odorata*. Proses docking dijalankan melalui Command Prompt dengan membuka sistem Ubuntu pada Windows (Win + R → ketik ubuntu → Enter). Selanjutnya, pengguna diarahkan ke direktori kerja dengan perintah `cd ~/nama_folder`. Agar perangkat lunak PLANTS 1.2 dapat dijalankan, dilakukan pemberian izin eksekusi menggunakan perintah `chmod +x PLANTS1.2`. Proses molecular docking dimulai dengan menjalankan perintah `./PLANTS1.2 --mode screen plantconfig`, yang akan melakukan simulasi pengikatan ligan terhadap protein target berdasarkan parameter yang telah ditetapkan. Data yang diperoleh dari hasil molecular *docking* berupa skor *docking* yang dihasilkan oleh fungsi scoring ChemPLP, serta beberapa konformasi ligan dalam bentuk file .mol2. Skor docking bersifat relatif dan digunakan untuk menggambarkan kecenderungan kestabilan interaksi ligan–protein, di mana nilai skor yang lebih rendah menunjukkan interaksi yang diprediksi lebih stabil.

Seluruh hasil docking secara otomatis disimpan dalam folder result dalam format file .csv yang berisi nilai skor docking, yang

kemudian diurutkan dari nilai terbaik hingga terburuk. Apabila terjadi kesalahan pada jalur penyimpanan folder result, perbaikan dapat dilakukan dengan menghapus folder tersebut menggunakan perintah `rm -r /folderpath/file/result`, sehingga proses docking selanjutnya dapat dijalankan kembali dengan normal.

6. Analisis interaksi molekuler

Analisis visualisasi hasil *molecular docking* pada penelitian ini dilakukan menggunakan BIOVIA Discovery Studio (DS) untuk menyatukan ligan hasil *docking* dan protein target. Setelah itu, langsung dilakukan analisis ikatan residu asam amino dan jenis interaksi antara protein target dengan ligan dari *Chromolaena odorata* hasil *docking*. File mol2 dari protein yang telah dipersiapkan dan disimpan sebelumnya, serta file mol2 dari ligan hasil *docking*, dimasukkan ke dalam BIOVIA Discovery Studio (DS) untuk proses visualisasi dan analisis interaksi.

7. Prediksi profil farmakokinetik (ADME)

Senyawa-senyawa dari tanaman *chromolaena odorata* yang sudah diketahui memiliki afinitas dan pola interaksi yang baik pada protein target α -glukosidase dan DPP-4 yang menyerupai ligan native, diinput dalam format SDF atau kode SMILES ke dalam kolom yang tersedia pada webserver. Setelah diinput, klik submit, dan hasil analisis prediksi ADME akan keluar, yang kemudian dapat dikumpulkan dan dianalisis lebih lanjut.

E. Interpretasi Data

Data senyawa metabolit sekunder yang diperoleh kemudian dilakukan proses *molecular docking* terhadap protein target α -glukosidase dan DPP-4 menggunakan perangkat lunak PLANTS versi 1.2. Hasil docking selanjutnya dikumpulkan dan disajikan dalam bentuk tabel, dengan data tersusun secara horizontal untuk masing-masing protein target dan secara vertikal untuk setiap senyawa uji. Penentuan potensi afinitas senyawa sebagai kandidat antidiabetes dilakukan berdasarkan skor *docking* yang dihasilkan oleh fungsi penilaian ChemPLP pada PLANTS, di mana nilai skor yang lebih rendah menunjukkan kecenderungan interaksi pengikatan yang lebih stabil. Selain itu, evaluasi afinitas juga didukung oleh analisis kesamaan residu asam amino yang berinteraksi dengan ligan, yang diperoleh melalui visualisasi kompleks ligan-protein menggunakan perangkat lunak BIOVIA Discovery Studio (DS). Pendekatan ini digunakan untuk

memberikan gambaran awal mengenai potensi interaksi senyawa terhadap masing-masing protein target secara *in silico*.

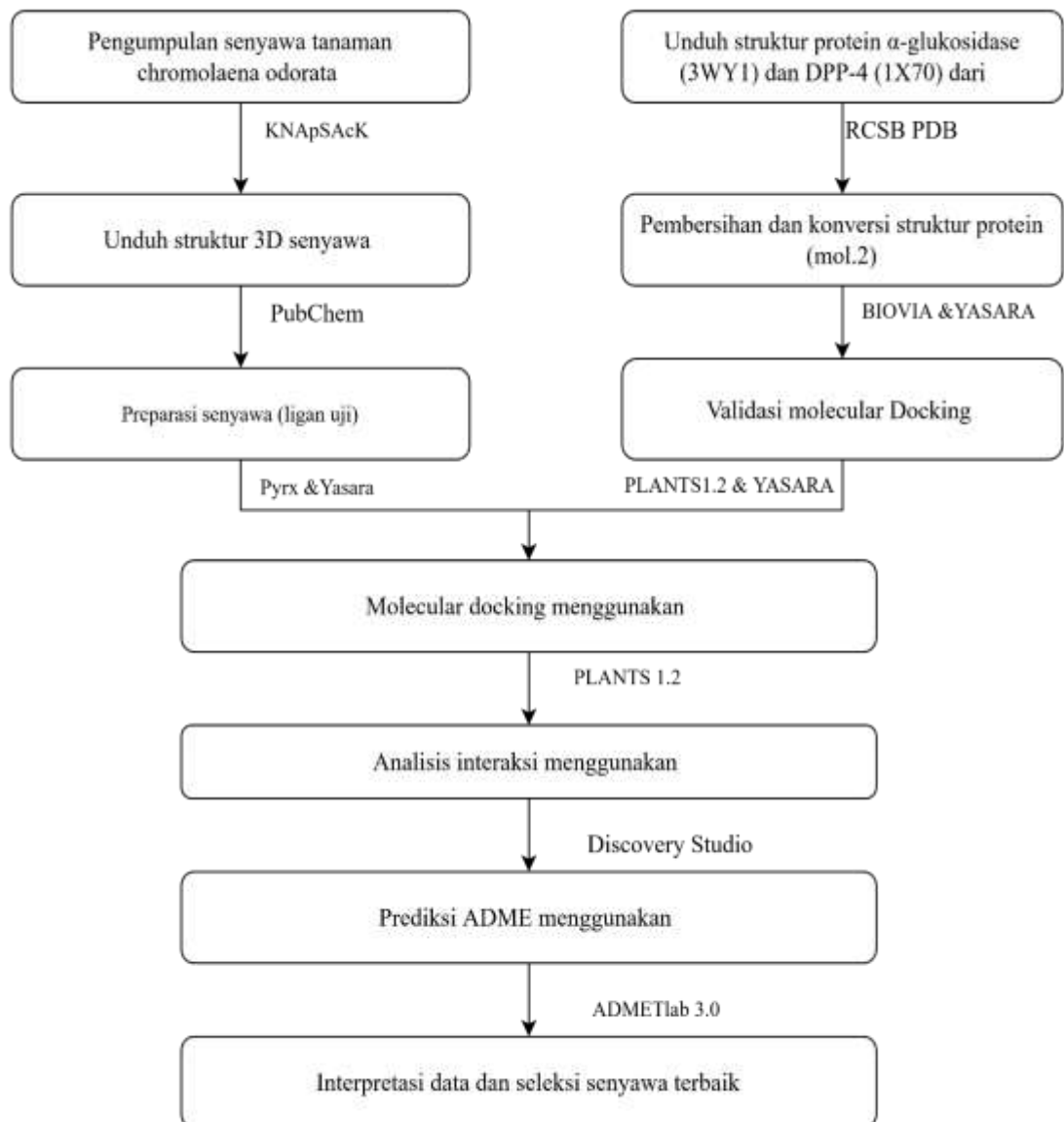
Data senyawa metabolit sekunder yang telah didapat melalui molekular *docking* dimasukkan ke dalam ADMETlab3.0 untuk mendapat data profil ADME. Data yang didapatkan di susun rapi dalam tabel memanjang untuk tiap parameter dan menurun untuk tiap senyawa. Setelah itu, disimpulkan apakah senyawa tersebut layak dari segi absorpsi, distribusi, metabolisme dan ekskresi untuk digunakan sebagai obat pada manusia melalui rute oral dengan membandingkan hasil prediksi dengan nilai pada tabel 1 berikut.

Tabel 1. Keputusan empiris parameter ADME

ADME	Parameter	Baik	Sedang	Buruk
Absorpsi	F20%,F30%,F50%	0-0,3	0,3-0,7	0,7-1,0
	HIA,Pgp substrate			
	Caco-2 permeability	-5,15	-	<5,15
Distribusi	VDss	0,04-20		Bukan 0,04-20
	PBB	≤90%	-	>90%
	Fu	≥5%	-	<5%
Metabolisme	CYP1A2,CYP3A4,CYP2C9, CYP2C19,CYP2D6,CYP2B6, CYP2C8substrat,HLM stability	0-0,3	0,3-0,7	0,7-1,0
Ekskresi	T_2^1	>8	1-8	<1
	CL plasma	0-5	5-15	>15

Untuk titik akhir klasifikasi, nilai probabilitas prediksi diubah menjadi enam simbol: 0-0,1 (---), 0,1-0,3 (--), 0,3-0,5 (-), 0,5-0,7 (+), 0,7-0,9 (++), dan 0,9-1,0 (+++).

F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 14. Skema Jalannya Penelitian