

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah senyawa-senyawa yang terkandung dalam jahe (*Zingiber officinale*)

Sampel dalam penelitian ini adalah senyawa-senyawa yang terkandung dalam jahe (*Zingiber officinale*) dan telah melalui skrining *druglikeness*.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama pada penelitian ini adalah energi ikatan (*binding energy*) yang dihasilkan dari interaksi molekuler antara senyawa aktif dalam jahe (*Zingiber officinale*) dengan protein. Variabel utama kedua pada penelitian ini adalah besar persentase kemiripan ikatan ligan uji dan ligan asli terhadap target protein. Variabel utama ketiga pada penelitian ini adalah perangkat lunak dan metode yang digunakan untuk proses skrining senyawa penambatan molekuler, meliputi *software* SwissADME, AutoDock, Pymol, dan basis data senyawa aktif (seperti PubChem).

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel bebas pada penelitian ini adalah senyawa-senyawa aktif dari jahe (*Zingiber officinale*) yang memiliki potensi antikanker.

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah nilai energi ikatan (*binding energy*) yang dihasilkan dari proses penambatan molekuler.

Variabel terkendali parameter teknis dalam proses penambatan molekuler seperti jenis protein target (makromolekul), metode penambatan, nilai resolusi protein, dan struktur molekul ligan asli.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, senyawa aktif jahe (*Zingiber officinale*) adalah seluruh senyawa aktif jahe yang strukturnya diperoleh dari basis data PubChem dalam format SMILES dan dianalisis sebagai ligan dalam proses penambatan molekuler.

Kedua, penambatan molekuler adalah Teknik komputasi yang digunakan untuk memprediksi interaksi antara ligan dan target protein

Ketiga, nilai energi ikatan (*binding energy*) adalah skor yang dihasilkan dari proses penambatan molekuler menggunakan perangkat

lunak AutoDock Vina, skor dianggap baik apabila memiliki nilai yang lebih rendah (lebih negatif)

Keempat, residu asam amino dan jenis interaksi adalah interaksi antara ligan dan protein target yang dianalisis menggunakan perangkat lunak Pymol. Jenis interaksi yang diamati meliputi ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan elektrostatis.

Kelima, protein target adalah protein yang berasal dari organisme *homo sapiens* yang terlibat pada kanker hati. Protein ini diperoleh dari basis data *Protein Data Bank* (PDB) dalam format tiga dimensi yaitu BCL-XL dan ERK1/2

Keenam, antikanker hati adalah zat atau senyawa yang memiliki kemampuan untuk mencegah, menghambat, atau menghancurkan sel kanker

C. Alat dan Bahan

1. Alat

1.1 Perangkat Keras. Perangkat keras yang digunakan adalah laptop Asus P1411CMA dengan spesifikasi *Intel® UHD Graphics 600*, RAM 4GB DDR4 SO-DIMM *Storage 256GB M.2 NVMe™ PCIe® 3.0 SSD, Operating System Windows 10*.

1.2 Perangkat Lunak. Perangkat lunak yang digunakan adalah MarvinSketch, SwissADME, PyRx, VegaZZ, PyMOL

2. Bahan

2.1 Senyawa Bioaktif. Senyawa-senyawa jahe dapat diunduh dari PubChem atau jika diperlukan, senyawa dapat dirancang di MarvinSketch

2.2 Protein Target. ERK1/2 (PDB ID: 2OJJ) dan BCL-XL (PDB ID : 4QVX) dapat diunduh dari PDB <https://www.rcsb.org> dengan format file PDB

2.3 Ligan Asli. (S)-phenylglycinol untuk ERK1/2 dan A-1155463 untuk BCL-XL. Dapat diakses dari PDB (file kompleks dengan protein) atau basis data kimia seperti PubChem.

D. Cara Kerja

1. Skrining Senyawa

Skrining senyawa dari jahe dapat dilakukan pada swissADME <http://www.swissadme.ch> dengan melihat parameter *druglikeness*. Masukan SMILES dari senyawa-senyawa jahe, smiles dapat dilihat pada pubchem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Jika diperlukan, smiles

dapat dibuat dengan bantuan Marvin Sketch. Setelah melakukan skrining pada seluruh senyawa jahe, selanjutnya dapat dilakukan proses penambatan molekuler.

2. Cara kerja Penambatan Molekuler

2.1 Pengunduhan Makromolekul. Protein target akan diunduh dari PDB (*Protein Data Base*) melalui <https://www.rcsb.org>

2.2 Persiapan Struktur Senyawa Jahe. Seluruh senyawa jahe yang telah melalui proses skrining dan terpilih sebagai kandidat senyawa yang akan dilakukan penambatan terhadap protein target dibuat struktur dua dimensinya dengan bantuan Marvin Sketch dalam format .mol. Struktur dua dimensi dibuat struktur tiga dimensinya menggunakan VegaZZ kemudian disimpan dalam dengan format pdb.

2.3 Preparasi Protein. Protein BCL-XL (kode PDB: 4QVX) dan ERK1/2 (kode PDB: 20JJ) mengandung interaksi ikatan hidrogen yang melibatkan jembatan air, sehingga molekul air yang berperan dalam interaksi tersebut dipertahankan. Molekul-molekul air yang tidak berperan dalam interaksi dihapus menggunakan perangkat lunak VegaZZ. Selanjutnya, optimasi dilakukan menggunakan AutoDockVina untuk menyesuaikan makromolekul dengan lingkungan komputasi yang diperlukan untuk proses docking. Tahapan optimasi meliputi penghilangan rantai yang tidak diperlukan, penambahan atom hidrogen, serta penambahan muatan Kollman.

2.4 Preparasi Ligan. Struktur tiga dimensi senyawa dibuka menggunakan program VegaZZ, kemudian atom hidrogen ditambahkan. Muatan senyawa diperbaiki dengan menetapkan muatan parsial menggunakan metode *Gasteiger charges* dan diaplikasikan *forcefield Autodock*. Proses minimasi dilakukan sebanyak 10.000 langkah untuk mendapatkan konformasi yang paling stabil. Optimasi dilakukan dengan VegaZZ untuk menghasilkan energi molekul paling rendah. Setiap senyawa yang telah dioptimasi disimpan dalam format file .pdb.

2.5 Validasi Metode. Proses validasi metode dilakukan untuk memverifikasi kesesuaian antara konformasi ligan hasil penambatan molekuler dan ligan asli. Konformasi ligan hasil penambatan molekuler disejajarkan dengan konformasi ligan asli berdasarkan struktur hasil kristalografi, yang kemudian dianalisis menggunakan nilai RMSD.

Pada proses penambatan, pengaturan *gridbox* digunakan untuk menentukan ruang lingkup di sekitar situs aktif protein tempat ligan akan berinteraksi. Koordinat pusat *gridbox* (*center X, Y, Z*) serta dimensinya

(size X, Y, Z) ditentukan berdasarkan lokasi situs aktif protein target yang relevan. Nilai-nilai tersebut memastikan area yang disimulasikan mencakup seluruh wilayah interaksi ligan dengan protein target.

Tabel berikut menunjukkan pengaturan *gridbox* yang digunakan untuk protein target BCL-XL dan ERK 1/2 berdasarkan data analisis:

Tabel 10. Pengaturan gridbox makromolekul

Makromolekul	Center (X, Y, Z)	Dimensi (X, Y, Z)
ERK 1/2	140480, 13.9289, 39.8272	25.0000, 25.0000, 25.0000
BCL-XL	20,3629, 5.8988, 5.4305	25.0000, 25.0000, 25.0000

Tabel 11. Parameter minimasi energi untuk protein BCL-XL dan ERK 1/2

Parameter minimasi energi	Nilai
<i>Number of steps for update</i>	1
<i>Total number of steps</i>	5000
<i>Stop if energy difference is less than</i>	0,1

Gridbox ini memastikan bahwa area yang dianalisis meliputi semua kemungkinan posisi ligan yang dapat berinteraksi dengan residu aktif protein target.

2.6 Proses Penambatan Molekuler (*Docking molekuler*).

Proses Penambatan molekuler menggunakan PyRx dengan sistem Autodock Vina dilakukan dengan memanfaatkan struktur makromolekul dan ligan yang telah dioptimasi secara terpisah. Proses penambatan molekuler diawali dengan pembukaan aplikasi PyRx. Lokasi penyimpanan dan parameter optimasi energi kemudian diatur. Molekul dimuat dengan melakukan klik kanan pada *area Molecules* dan memilih opsi *Load Molecule*. Selanjutnya, ligan dibuat dengan klik kanan pada ligan dan memilih AutoDock kemudian *Make Ligand*. Semua molekul yang tidak digunakan dihapus dengan klik kanan pada area kosong *Molecules* dan memilih *Remove All Molecules*. Langkah berikutnya, aplikasi ditutup, dan folder penyimpanan ligan dibuka. Protein yang telah dipreparasi disalin dan ditempelkan ke folder yang sesuai. Setelah itu, aplikasi PyRx dibuka kembali. Pada tahap ini, semua molekul dipilih melalui *Select Molecules* pada Vina Wizard, termasuk semua ligan dan makromolekul. Selanjutnya, *gridbox* diatur sesuai kebutuhan, dan tombol *Forward* diklik. Proses dilanjutkan hingga *running* selesai, menandai akhir dari prosedur penambatan molekuler.

E. Analisis Hasil

1. Energi Ikatan

Nilai energi ikatan (*binding affinity*) yang diperoleh dari hasil penambatan ditabulasi dan dibandingkan untuk setiap senyawa terhadap target protein. Hasil ini digunakan untuk menentukan senyawa dengan afinitas terbaik, yang ditunjukkan oleh nilai energi pengikatan paling rendah (lebih negatif).

2. Presentasi Kemiripan Interaksi

Presentasi kemiripan interaksi dihitung dengan membandingkan residu asam amino target protein yang berinteraksi dengan ligan uji dan ligan asli. Persentasi ini menunjukkan kemampuan ligan uji dalam meniru pola interaksi ligan asli terhadap target protein. Proses ini bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas senyawa jahe sebagai kandidat antikanker hati berdasarkan pola interaksinya yang menyerupai ligan asli.