

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini meliputi kandungan senyawa kimia yang ada pada tanaman matoa (*Pometia pinnata* J.R. Forst. & G. Forst) dan protein target antihipertensi.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah struktur kandungan senyawa kimia metabolit sekunder dalam matoa yang memiliki potensi untuk antihipertensi terutama pada protein target ACE dan AT1.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama dari penelitian ini adalah kandungan senyawa kimia dari tanaman matoa.

Variabel utama ketiga dari penelitian ini adalah protein target antihipertensi Renin-Angiotensin yang digunakan yaitu ACE dan AT1.

Variabel utama ke-empat dari penelitian adalah nilai energi ikatan (ΔG) dan pola interaksi antara ligan dan protein target.

Variabel utama kelima dari penelitian mencakup parameter farmakokinetika seperti Absorpsi, metabolisme, dan ekskresi.

Variabel keenam adalah webserver & software yang digunakan untuk melakukan *docking* molekul dan prediksi profil farmakokinetika.

2. Klasifikasi Variabel Utama

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

2.1 Variabel Bebas. Variabel bebas adalah faktor yang diselidiki pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Dalam penelitian ini, variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandungan kimia dari tanaman. matoa yang diambil dari webserver dan literatur berupa jurnal dari penelitian sebelumnya.

2.2 Variabel Tergantung. Variabel tergantung adalah variabel yang dipengaruhi nilainya akibat pengaruh variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah nilai energi ikatan (ΔG) dan pola interaksi dari *docking* molekul dan nilai Parameter Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, dan Ekskresi dari hasil perhitungan aplikasi webserver.

2.3 Variabel Terkontrol. Variabel terkontrol adalah variabel yang dikendalikan agar tidak mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu ditetapkan kualitasnya sehingga hasil yang diperoleh dapat direplikasi dalam penelitian lain secara tepat. Variabel terkontrol yang digunakan pada penelitian ini adalah web server, software, dan komputer yang digunakan.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Validitas metode *docking* dilihat dari parameter RMSD (*Root Mean Square Deviation*) yang menilai kemiripan posisi ligan asli pada struktur dengan posisi ligan hasil *docking*. Perhitungan nilai RMSD dilakukan menggunakan aplikasi Yasara.

Affinitas senyawa tanaman matoa antara ligan dan reseptor yang dilihat dari nilai energi ikatan (ΔG) yang didapat dari proses *docking molekular*.

Pola interaksi adalah jenis dan posisi asam amino yang terikat pada ligan serta jenis ikatan yang terbentuk antara ligan dalam tanaman matoa dan reseptor antihipertensi yang dilihat dengan visualisasi hasil *docking molecular*.

Profil farmakokinetika yang dilihat dari parameter absorpsi, Distribusi, Metabolisme, dan Eksresi. Untuk parameter ADME dari ADMETlab 3.0 adalah absorpsi (Permeabilitas Caco-2, Pgp substrate, HIA, F20%, F30%, & F50%), Distribusi (PPB (*Plasma Protein Binding*), BBB (*Blood Brain Barrier*), & VDss), Metabolisme (CYP 1A2 / 2C19 / 2C9 / 2D6 / 3A4 / 2B6 substrat & Stabilitas HLM), & Eksresi (CLplasma & T1/2).

Webserver adalah perangkat lunak dalam server yang berfungsi untuk menerima permintaan (request) berupa halaman web melalui protokol HTTP dan atau HTTPS, kemudian mengirimkan kembali hasil.

Software atau perangkat lunak komputer adalah seperangkat instruksi, data, atau program yang digunakan untuk mengoperasikan komputer dan menjalankan tugas-tugas tertentu.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah data kandungan senyawa metabolit sekunder dalam tanaman matoa yang diambil dari webserver dan jurnal penelitian yang sebelumnya sudah meneliti kandungan senyawa dalam tanaman matoa. Struktur senyawa

metabolit sekunder tanaman matoa diambil dari webserver Pubchem dan protein target diambil dari webserver *Protein Data Bank*.

2. Alat

2.1 Perangkat Keras. Perangkat keras yang digunakan pada penelitian ini adalah Notebook computer lenovo dengan spesifikasi Prosesor Intel Celeron, Windows 10, 1.1 GHz, Desain 249 x 186 x 8.5 mm, Aluminium, 1.5 kg, Abu-abu, Penyimpanan SSD tersedia, 128 GB, eMMC, 4 GB RAM, DDR4L, 1 Hard drive, 1 slot.

2.2 Webserver & Software. PubChem , Pymol, RCSB PDB, RCSB PDB, Yasara, PyRx-Virtual Screening Tool, PLANTS1.2, ADMETlab3.0 BIOVIA Discovery Studio Visualizer, Ligplot+.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengumpulan senyawa metabolit sekunder

Melakukan pencarian metabolit sekunder berupa senyawa metabolit sekunder tanaman matoa yang didapat dari webserver dan literatur berupa jurnal dari penelitian sebelumnya. Senyawa-senyawa metabolit sekunder tanaman matoa yang sudah ditemukan di download struktur-nya dari Pubchem dalam bentuk file SDF dan copy paste kode SMILES untuk digunakan pada ADMETlab.

2. Preparasi ligan Tanaman Matoa

Senyawa-senyawa metabolit sekunder tanaman matoa yang sudah dipilih di upload ke Yasara untuk penambahan atom hidrogen. Setelah itu dilakukan energy minimization menggunakan software PyRx. Masuk software PyRx pilih openbale dan input file ke dalam software klik senyawa dan pilih '*minimize selected*'. Setelah itu klik senyawa dan pilih '*convert selected to autodock ligand (pdbqt)*' opsil save ini akan secara otomatis memberikan muatan gasteger pada ligan. Save file ligan yang sudah dilakukan energi minimization yang akan terbentuk dalam file pdb. Upload file pdb ligan ke yasara untuk mengubah file menjadi mol2 agar bisa *didocking* dengan PLANTS1.2.

3. Pencarian protein target

Dipilih reseptor protein yang bekerja sebagai Angiotensin Converting Enzym dalam penyakit hipertensi berdasarkan literatur dari jurnal yang telah di melakukan *docking* molekul terhadap tanaman sebagai hipertensi. Protein target dipilih dengan melihat nilai resolusi yang bagus yaitu $<2\text{\AA}$ dan nilai *ligand Structure Quality Assessment* yang bagus yaitu mendekati 1 (*Better*). Beberapa di antaranya adalah protein ACE dengan kodem PDB 1O86 dan Angiotensin II Type 1

(AT1) dengan kode PDB 4ZUD. Setelah didapatkan protein yang akan digunakan sebagai protein target *docking* molekular. Cari protein pada webserver RCSB PDB dan download dalam bentuk file PDB.

4. Validasi Metode *Docking*

Validitas metode *docking* dilihat dari parameter RMSD (Root Mean Square Deviation) yang menilai kemiripan posisi dan struktur native ligan sebelum di *docking* dengan posisi ligan hasil *docking* menggunakan software YASARA. Untuk melakukan validasi metode pertama persiapkan protein target dan ligan asli untuk di *redocking*.

4.1 Preparasi protein

Preparasi protein dilakukan dengan menghapus air, ion, ligan asli, dan penambahan atom hidrogen dengan menggunakan software BIOVIA Discovery Studio Visualizer dan penambahan hidrogen serta muatan dengan menggunakan AutodockTool. Setelah semua itu dilakukan upload ke yasara, save dan ubah file menjadi mol2, sehingga bisa digunakan untuk *docking* menggunakan PLANTS1.2.

4.1.1 ACE (1O86). Input file PDB 1O86 yang sudah di download dari RCSB PDB ke Biovia DS dan hapus molekul air, hapus native ligan ([N2-[(S)-1-CARBOXY-3-PHENYLPROPYL]-L-LYSYL-L-PROLINE) dan GLYCINE. Setelah itu disimpan dalam bentuk file PDB. Ion metal zink dan ion halogen klorida tetap di simpan di protein dan tambahkan atom hidrogen polar di Biovia DS. Kemudian simpan file protein yang sudah di preparasi dalam bentuk mol2.

4.1.2 AT1(4ZUD). Upload file 4ZUD dalam bentuk PDF yang sudah di download dari RCSB PDB dan hapus molekul air, hapus protein ligan Olmesartan menggunakan BIOVIA Discovery Studio Visualizer dan tambahkan hidrogen polar disimpan dalam bentuk file mol2.

4.2 Preparasi native ligan

Upload ke biovia DS kemudian hapus air, setelah hapus protein dan ligan lain yang bukan ligan utama yang ingin di *docking*, serta lakukan penambahan atom hidrogen. Setelah itu save file yang sudah di edit dalam format pdb. Kemudian upload file ke pyrx dan lakukan energi minimization, setelah itu save as pdbqt untuk penambahan muatan gasteiger. Kemudian simpan file ke folder yang secara otomatis akan menjadi file pdb. Setelah semua itu dilakukan upload ke yasara, save dan ubah file menjadi mol2.

4.2.1. 1O86. Untuk lisinopril dari file 1086 yang di upload ke biovia DS hapus air terlebih dahulu kemudian protein dan ligan lain yaitu GLYCINE, ion klorida, dan ion zink. Serta tambahkan hidrogen polar pada file ligan. Kemudian di save dalam format mol2. setelah itu upload file ligan ke pyrx dan lakukan energi minimization. Kemudian save ligan dalam bentuk pdbqt. Setelah itu gunakan Biovia DS untuk mengubah file pdbqt ke mol2 agar bisa digunakan untuk *docking* menggunakan PLANTS1.2.

4.2.2. 4ZUD. Untuk Olmesartan dari upload file 4ZUD ke biovia DS kemudian hapus air, protein, dan tambahkan atom hidrogen. Kemudian save dalam format pdb, setelah itu upload file ke pyrx dan lakukan *energy minimization*. Setelah itu gunakan Biovia DS untuk mengubah file pdbqt ke mol2 agar bisa digunakan untuk *docking* menggunakan PLANTS1.2.

4.3 Proses *docking*

Buat suatu folder dan isi folder dengan file mol2 ligan dan protein yang akan *didocking*, PLANTS1.2, scripts, parallelPLANTS.sh. Kemudian buka *commande* prompt dengan win+r ketik ubuntu enter. Masukkan *pathway* menuju folder yang berisi file-file yang sudah disiapkan *cd ~/folder*. Kemudian masukkan kode *./PLANTS1.2 --mode bind file_ligan.mol2 10 file_protein.mol2* untuk membuat *binding site*. Akan terbentuk file *bindingsite.def* yang berisi *gridball koordinate centre* dan radius yang secara otomatis dihitung berdasar jarak antara ligan dan protein oleh PLANTS1.2. kemudian, masukkan kode bash *scripts/parallelPLANTS.sh file_protein.mol2 file_ligan.mol2 1 bindingsite.def*. Kode ini menggunakan *parallelPLANTS.sh* melewati PLANTS1.2. *Docking* dilakukan berdasarkan koordinat dari file *bindingsite.def*. Jika cara ini tidak berhasil dan memberikat nilai RMSD yang buruk, maka gunakan template *plantconfig* yang terbentuk dari proses *docking* sebelumnya, edit dengan notepad atur *centre*, *radius*, *clustre_structure*, *cluster_rmsd*, *write_multi_mol2*, dll sesuai keperluan sampai mencapai hasil yang di inginkan sesuai dengan literatur acuan. Kemudian untuk menjalankan *plantconfig* gunakan kode *./PLANTS1.2 -mode screen plantconfig* pada *commande* prompt.

4.3.1. ACE (1O86). File protein dan ligan dalam bentuk mol2 dimasukkan ke dalam folder untuk proses *docking*, folder yang juga berisi PLANTS1.2, Scripts, ParallelPLANTS.sh, setelah semua lengkap buka *commande* prompts dengan win+r +“ubuntu” enter.

Masukkan pathway menuju folder dengan kode `d ~/folder1/folder2/folder_dst`. Kemudian masukkan kode `./PLANTS1.2 --mode bind file_ligan.mol2 10 file_protein.mol2` untuk membuat *binding site*. Akan terbentuk file `bindingsite.def` yang berisi gridball koordinat centre dan radius yang secara otomatis dihitung berdasar jarak antara ligan dan protein oleh PLANTS1.2 dari `bindingsite.def` milik 1O86 ditemukan koordinat centre: 41.0136 (x), 34.3252(y), & 46.4412(z) dengan radius 17.6938. kemudian, masukkan kode bash `scripts/parallelPLANTS.sh file_protein.mol2 file_ligan.mol2 1 bindingsite.def`. Setelah didapatkan hasil *docking* maka dihitung RMSD dari ligan hasil *redocking* dengan ligan sebelum *diredocking*. Dan dari perhitungan RMSD yang dilakukan di dapatkan hasil *docking* >2Å oleh karena itu dilakukan pada settingan `plantconfig` menggunakan notepad. Pymol digunakan untuk memvisualisasi gridball dari koordinat *binding site*. Radius dari gridball diperkecil untuk membatasi pergerakan ligan sehingga tidak melenceng dari *binding pocket*, zink, klorida, dan asam amino yang penting untuk diikat. Gridball juga tidak boleh terlalu kecil karena akan bisa membuat ligan tidak bisa bergerak atau berkonformasi maksimal untuk mengikat dengan asam amino dan metal zink dengan baik. Dari beberapa kali percobaan dipilih gridball dengan radius 11.00000 seperti pada gambar 8 bagian bawah. sehingga pengaturan `plantconfig` dari 1O86 dirubah radius menjadi 11.00000.

4.3.2. AT1 (4ZUD). File protein dan ligan dalam bentuk `mol2` dimasukkan ke dalam folder untuk proses *docking*, folder yang juga berisi PLANTS1.2, Scripts, ParallelPLANTS.sh, setelah semua lengkap buka commande prompts dengan `win+r` +“ubuntu” enter. Masukkan pathway menuju folder dengan kode `d ~/folder1/folder2/folder_dst`. Kemudian masukkan kode `./PLANTS1.2 --mode bind file_ligan.mol2 10 file_protein.mol2` untuk membuat file `bindingsite`. dari `bindingsite.def` milik 1O86 ditemukan koordinat centre;-40.8457(x), 63.3244(y), & 28.2205(z) radius 16.6285. Kemudian, masukkan kode bash `scripts/parallelPLANTS.sh file_protein.mol2 file_ligan.mol2 1 bindingsite.def`. Setelah didapatkan hasil *docking* maka dihitung RMSD dari ligan hasil *redocking* dengan ligan sebelum di *redocking*. Dan dari perhitungan RMSD yang dilakukan didapatkan hasil *docking* >2Å oleh karena itu dilakukan pada settingan `plantconfig` menggunakan notepad. Pymol digunakan untuk memvisualisasi gridball dari koordinat *binding site*. Gridball yang

terdapat pada pymol divisualisasikan memiliki radius 16.6285 dan dari gambar yang terlihat bisa dilihat bahwa gridball lumayan besar mengelilingi ligan. Radius dari gridball diperkecil tapi tidak terlalu kecil untuk membatasi pergerakan ligan sehingga tidak melenceng dari *binding pocket* dan asam amino yang penting untuk diikat dan tetap memberikan cukup ruang untuk ligan bergerak serta membentuuk ikatan dengan asam amino di sekitarnya. Dari beberapa kali percobaan dipilih gridball dengan radius 8.00000. Sehingga pengaturan plantconfig dari 4ZUD disesuaikan dengan radius yang didapat dari pymol.

4.4 Perhitungan RMSD

Upload ligan hasil *redocking* dan sebelum di *redocking* ke Yasara. Hapus atom hidrogen pada kedua *native* ligan. Lakukan analisis RMSD molekul-molekul terhadap keduanya. Nilai dikatakan valid apabila memiliki nilai RMSD kurang dari 2Å. Jika tidak valid maka akan dilakukan kalibrasi ulang dengan setting yang berbeda sampai mendapat nilai kurang dari 2Å.

5. Proses Docking

Senyawa-senyawa metabolit sekunder tanaman matoa (ligan) yang sudah dikumpulkan dan sudah dipreparasi dengan penambahan atom hidrogen dan energy minimization pada pyrx dimasukkan ke dalam folder khusus yang berisi file-file untuk *docking* menggunakan PLANTS1.2 yang sudah dipersiapkan saat validasi metode. Ubah plantconfig dengan notepad ligan_file dari nama mol2 native ligan menjadi mol2 ligan senyawa matoa. Lakukan *docking* dengan membuka commande prompt win+r ketik ubuntu enter. Masukkan pathway `cd ~/folder`. Ketik `chmod +x PLANTS1.2` agar PLANTS1.2 bisa dijalankan. Kemudian ketik `./PLANTS1.2 --mode screen plantconfig` untuk menjalankan proses *docking*. Data yang diambil dari hasil molekular *docking* adalah energi ikatan (ΔG) dan konstanta inhibisi. File csv berupa data *binding energy* dari hasil *docking* dari yang terbaik ke terburuk dan beberapa konformasi berbentuk file mol2 dari hasil *docking* akan secara otomatis tersimpan ke file result. Bila pathway file result error gunakan kode `rm -r /folderpathway/file1/result` agar file result bisa di akses untuk proses *docking*.

6. Analisis visualisasi

Analisis Visualisasi hasil molekular *docking* pada penelitian ini dilakukan menggunakan pymol untuk menyatukan ligan hasil *docking* dan protein target, setelah itu digunakan ligplot+ untuk melihat ikatan

residu asam amino dan jenis interaksi antara protein target dengan ligan tanaman matoa hasil *docking*. Input file mol2 dari protein yang di preparasi yang sudah di save sebelumnya dan Input file mol2 dari ligan hasil *docking* ke pymol, kemudian save kedua file dalam bentuk PDB. Setelah itu, Input file PDB tersebut menggunakan Ligplot+. Dilakukan analisis visualisasi pada semua ligan yang didapatkan dari hasil *docking* terhadap protein target ACE dan AT1.

7. Parameter Profil ADME

Senyawa-senyawa tanaman matoa yang sudah diketahui memiliki affinitas dan pola interaksi yang baik pada protein target ACE dan AT1 menyerupai ligan *native* di-input file SDF atau kode SMILES ke dalam kolom yang tersedia pada webserver, setelah di input klik submit dan akan keluar hasil analisa prediksi ADME yang akan dikumpulkan dan dianalisis.

E. Analisis Data

Data senyawa-senyawa metabolit sekunder dikumpulkan dan *didocking* kepada protein target Angiotensin Converting Enzyme (ACE) & Angiotensin II Type 1 (AT1) menggunakan software PLANTS1.2. Hasil *docking* dikumpulkan, data yang didapatkan di susun rapi dalam tabel memanjang ke kanan untuk tiap protein target dan menurun untuk tiap senyawa, setelah itu disimpulkan apakah senyawa memiliki afinitas yang baik sebagai antihipertensi dari nilai energi *binding affinity* (ΔG) yang didapatkan dari *docking* dan persentase (%) kesamaan asam amino yang terikat kepada ligan yang didapat dari hasil analisa visualisasi menggunakan software Pymol & Ligplot+.

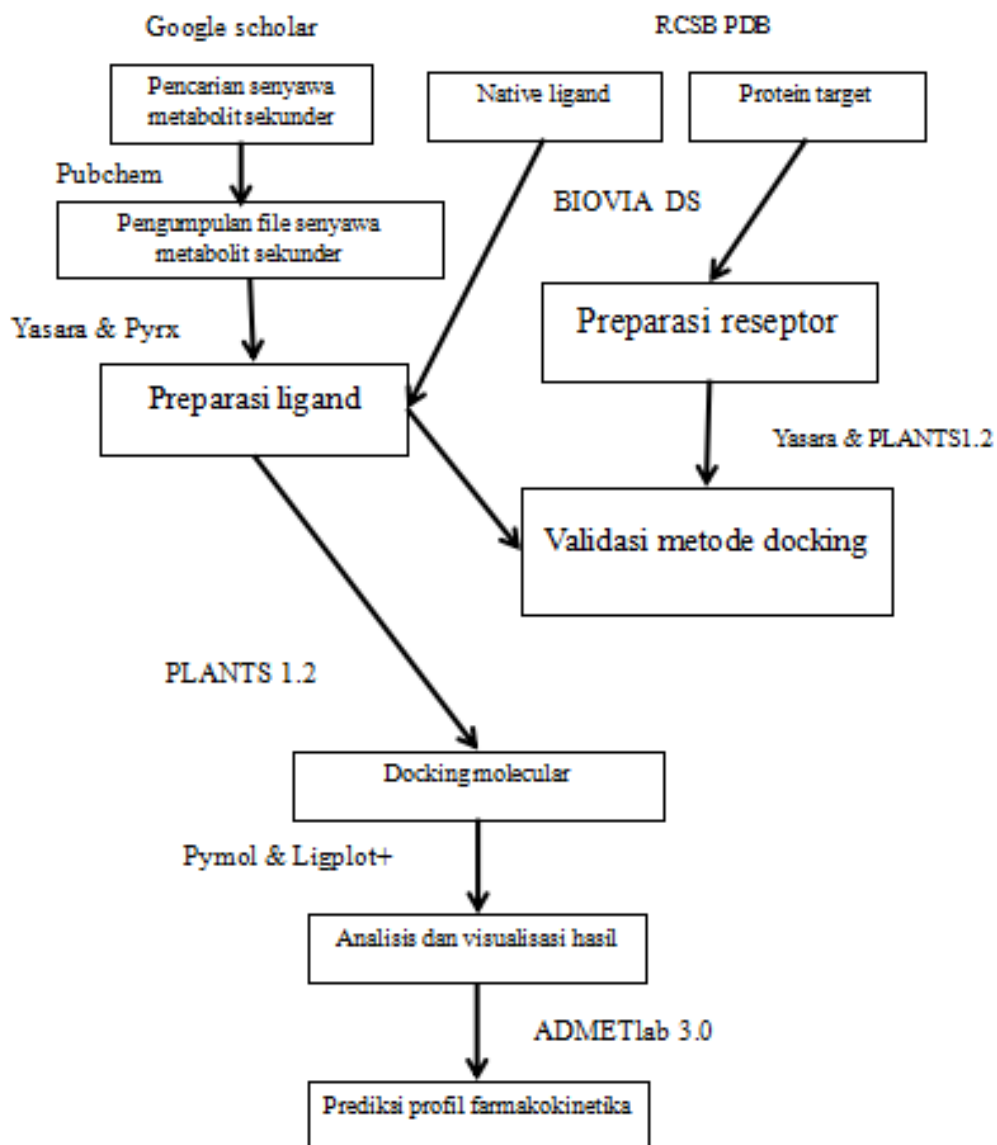
Data senyawa metabolit sekunder yang telah didapat melalui *molekular docking* dimasukkan ke dalam ADMETlab3.0 untuk mendapat data profil ADME. Data yang didapatkan di susun rapi dalam tabel memanjang untuk tiap parameter dan menurun untuk tiap senyawa. Setelah itu, disimpulkan apakah senyawa tersebut layak dari segi absorpsi, Distribusi, Metabolisme, Eksresi untuk di gunakan sebagai obat pada manusia melalui rute oral dengan membandingkan hasil prediksi dengan nilai pada tabel 2 berikut.

Tabel 2. Parameter ADMETlab 3.0

ADME	Parameter	Nilai		
Absorpsi	Caco-2 <i>Permeability</i>	> -5.15		≤ -5.15
	Pgp inhibitor	0-0.3	0.3-0.7	0.7-1.0
	Pgp substrate	0-0.3	0.3-0.7	0.7-1.0
	HIA	0-0.3	0.3-0.7	0.7-1.0
	F20%	0-0.3	0.3-0.7	0.7-1.0
	F30%	0-0.3	0.3-0.7	0.7-1.0
	F50%	0-0.3	0.3-0.7	0.7-1.0
Distribusi	BBB	0-0,3	0,3-0,7	0,7-1,0
	VD _{ss}	0,04-20		<0,04-20
	PBB	≤ 90%		> 90%
Metabolisme	CYP 1A2 / 2C19 / 2C9 / 2D6 / 3A4 / 2B6 substrat	Category 0 (Non-substrate / Non-inhibitor)		Category1 Substrate / Inhibitor
	Stabilitas HLM	0-0.3	0.3-0.7	0.7-1.0
Ekskresi	CL _{plasma}	0-5	5-15	>15
	T _{1/2}	>8	1-8	<1

Indikator berwarna dindikasikan dengan hijau ● sangat baik, kuning ● sedang, dan merah ● buruk. 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 Penelitian



Gambar 8. Skema Penelitian