

BAB 3

PROSEDUR PENELITIAN

3.1 Metode Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian kualitatif yang dirancang dengan menggunakan studi kasus berbasis komputer dengan menggunakan *in silico* atau *molecular docking*. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui interaksi antara ligan dan protein reseptor untuk menemukan kandidat senyawa yang berpotensi sebagai jerawat penghambat protein *EXO-alpha-sialidase* penyebab jerawat yang memiliki kinerja yang sama seperti inhibitor Neu5Ac2en.

Bahan yang digunakan yaitu struktur 3D protein *EXO-alpha-sialidase* yang diperoleh dari webserver <http://www.rcsb.org>, struktur 3D senyawa flavonoid (flavonol) yang diperoleh dari website <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> yang nantinya dipreparasi dengan software *Discovery studio*.

3.2 Ruang Lingkup Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan cara *in silico* dengan menggunakan *molecular docking* terkait senyawa yang terkandung dalam daun binahong (*Anradera cordifolia*) dengan senyawa uji yaitu flavonoid sebagai acuan sebelum dilakukan uji GC-MS, yang selanjutnya senyawa uji disesuaikan dengan hasil GC-MS dan selanjutnya dilakukan *docking*. Adapun yang menjadi protein dalam penghambat protein *EXO-alpha-sialidase*.

3.3 Sumber Data Penelitian

Sumber data pada penelitian ini didapat dengan cara studi literatur dalam menentukan uji senyawa yang terkandung dalam daun binahong diperkuat dengan adanya uji lab yang dilaksanakan di Universitas Gadjra Mada, selanjutnya menentukan protein target yang akan diujikan menggunakan *molecular docking*. Untuk menentukan data struktur protein target diambil melalui RCBS Protein Data Bank (PDB) dengan alamat website <https://www.rcsb.org/>. Sedangkan untuk menentukan bentuk dari senyawa uji yang digunkkan yaitu melalui website PubChen NCBI (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Selanjutnya untuk mengetahui kelayakan dari senyawa yang diuji untuk memenuhi kriteria senyawa

yang dapat digunakan pada *docking* di cek melalui *Lipinski's rule of five* dengan alamat web <http://www.scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp>

3.4 Langkah-langkah Penelitian

3.4.1 Tahap Persiapan

Pada tahap persiapan, peneliti mempersiapkan alat dan bahan yang akan digunakan untuk penelitian pengujian. Sebelum melakukan *docking* atau uji komputasi, peneliti melakukan uji terlebih dahulu terhadap daun binahong untuk mengetahui kandungan yang terdapat di daun binahong tersebut. Selanjutnya Untuk mendapatkan bahan senyawa ligan dengan bentuk dan kode untuk *docking* yaitu dapat diakses pada situs website PubChem NCBI (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sedangkan untuk menentukan data struktur protein target diambil melalui RCBS Protein Data Bank (PDB) dengan alamat website <https://www.rcsb.org/>.

Adapun pada tahap persiapan ini digunakan alat dan bahan sebagai berikut:

a) Alat

Penelitian ini menggunakan perangkat keras yaitu :

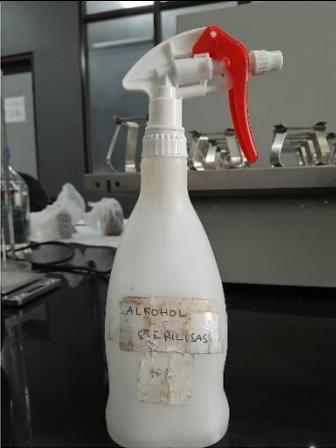
Type : ACER Aspire 3
 Processor : AMD Athlon Silver 3050U with Radeon Graphics 2.30 GHz
 RAM : 4,00 GB
 Device ID : 023190F0-3217-4EB7-898D-60C7C4566ACE
 Product ID : 00356-24531-01137-AAOEM
 System type : 64-bit operating system, x64-based processor

Adapun peralatan yang digunakan dapat dilihat secara lengkap pada tabel (Tabel 3.1) berikut:

Tabel 3. 1
Peralatan penelitian

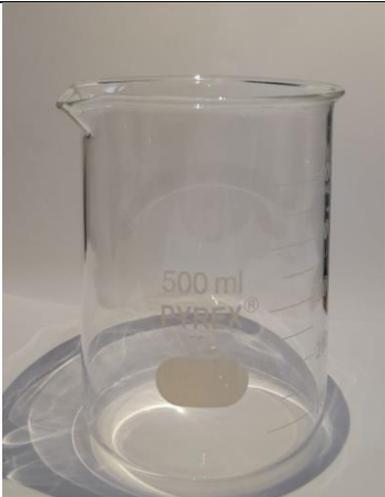
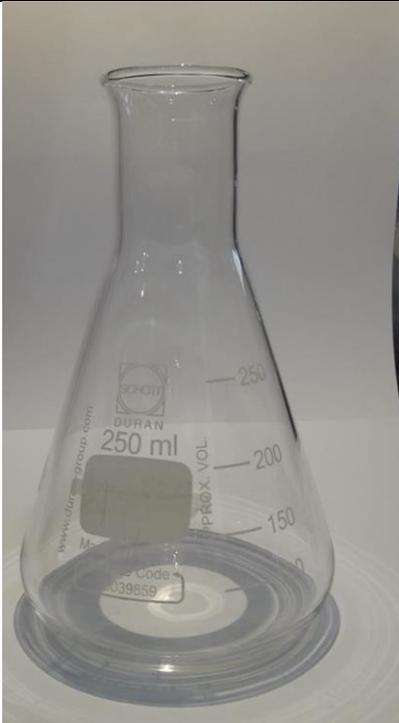
No.	Alat	Gambar	Kegunaan	Jumlah
1	Dryer oven		Untuk pengeringan daun binahong	1
2	Oven memmert		Untuk pengeringan daun binahong	1
3	Nampah		Untuk tempat menyimpan daun binahong	2

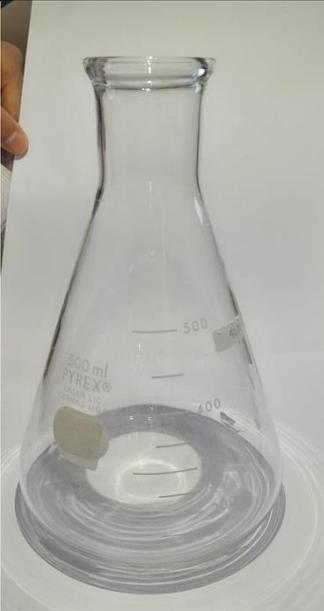
4	Lumpang alu		Untuk menumbuk daun binahong yang telah dikeringkan	1
5	Saringan dan wadah		Untuk menyaring hasil tumbukan daun binahong	1
6	Shakeer orbital		Untuk menghomogenkan larutan daun binahong	1
7	Shakeer vertikal		Untuk menghomogenkan larutan daun binahong	1

8	Etanol 96%		Sebagai pelarut	2500 ml
9	Alkohol		Mensterilkan alat	-
10	Spatula		Sebagai pengaduk	1

11	Botol gelap		Untuk penyimpanan maserasi	4
12	Karet dan plastik		Untuk membungkus	-
13	Aluminium foil		Untuk membungkus tutup botol	1 roll
14	Wrapping		Untuk membungkus tutup botol	4 roll

15	Kertas saring		Untuk menyaring ekstrak daun binahong	-
16	Neraca analitik		Untuk menimbang simplisia kering daun binahong	1
17	Sarung tangan latex		Menjaga tangan tetap steril	-

18	Beaker glass 500ml		Menyimpan dan memindahkan ekstrak daun binahong	1
19	Labu erlenmeyer 250		Tempat menghomoge nkan ekstrak	4
20	Beaker glass 100ml		Untuk wadah pembanding ekstrak	2

8	Labu erlenmeyer 500ml		Tempat menghomogenkan ekstrak	3
21	Corong		Membantu dalam penyaringan ekstrak	1

b) Bahan

Tabel 3. 2 Bahan Penelitian

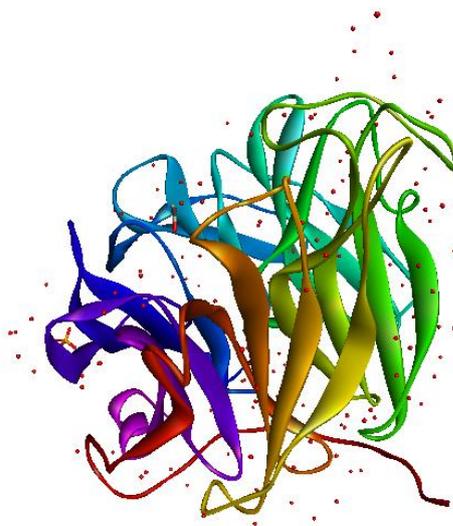
No	Nama	Kegunaan	Jumlah
1.	Simplisia Daun Binahong	Ekstraksi untuk uji kandungan	8 kg
2.	etanol 96%	Sebagai pelarut pada proses ekstraksi	2500 ml
3.	Senyawa uji (ligan)	Sebagai ligan yang akan ditambatkan pada reseptor	8 senyawa
4.	Protein bakteri (reseptor)	Menjadi target pada penambatan senyawa uji	1 reseptor

berikut merupakan tabel senyawa uji kandungan pada daun binahong yang akan digunakan pada proses *molecular docking*.

Tabel 3. 3 Senyawa Uji Kandungan Tanaman Binahong Hasil Uji GCMS

Nama senyawa	Molecular formula
[1-1'- Bicyclopropyl]-2-octanoic-acid-2'-hexyl--methyl-ester	C ₂₁ H ₃₈ O ₂
Desulphosinigrin	C ₁₀ H ₁₇ NO ₆ S
5- methyl-2-(1H-pyrrol-1-yl)phenol	C ₁₁ H ₁₁ NO
Methyl 14-methylpentadecanoate	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
1-Monolinolenoyl-rac-glycerol	C ₂₁ H ₃₆ O ₄
Phytol	C ₂₀ H ₄₀ O
Methyl Stearate	C ₁₉ H ₃₈ O ₂

Adapun protein *EXO-alpha-sialidase* (Gambar 3.1) sebagai reseptor dengan kode 7LBV.

**Gambar 3. 1** Visualisasi Reseptor *EXO-alpha-sialidase*

Sumber : <https://www.rcsb.org/>.

Selain alat dan bahan, peneliti juga mempersiapkan aplikasi yang akan digunakan pada *docking* diantaranya AutodockTools, Autodock Vina, discovery studio, UCSF Chimera, LigPlus+, PyMOL, *Chem Bio Draw Ultra* Versi 12 (Cambridge Soft), dan *Chem Bio 3D Ultra* Versi 12 (Cambridge Soft)

3.4.2 Tahap Pelaksanaan

Pada tahap pelaksanaan dilakukan beberapa tahapan proses yaitu:

- 1) Mendapatkan Surat Keputusan Dekan Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Siliwangi mengenai penetapan bimbingan skripsi pada tanggal 8 Oktober 2022;
- 2) Menentukan fokus penelitian bersama dosen pembimbing pada 1 November 2022;
- 3) Pengajuan judul ke Dewan Bimbingan Skripsi (DBS) pada tanggal 1 Desember 2022;
- 4) Penyusunan proposal penelitian bersama pembimbing I dan pembimbing II dari tanggal 21 Januari- 4 Maret 2023;
- 5) Melaksanakan sidang proposal pada 14 Maret 2023;
- 6) Mulai proses penelitian diawali dengan pengumpulan, pengeringan hingga ekstraksi daun binahong pada 4 April- 30 Mei 2023;
- 7) Mengirimkan sampel yang akan dilakukan uji lab GC-MS di Universitas Gadjah Mada pada 31 Mei 2023;
- 8) Melakukan *docking* pada 12 -17 Juli 2023;
- 9) Proses olah data pada 19-24 Juli 2023.

3.4.3 Tahap Pengolahan Data

Pada tahap pengolahan data dilakukan setelah mendapatkan hasil dari hasil uji *screening* daun binahong terkait kandungan apa saja yang ada, selanjutnya senyawa yang diketahui telah melalui proses *docking* dengan berbagai senyawa yang ditautkan dengan reseptor protein yang akan menunjukkan hasil *scoring* interaksi senyawa ligan dengan reseptor.

3.5 Teknik Pengumpulan Data

Adapun tahap pengumpulan data penelitian sebagai berikut :

3.5.1 Uji skrining fitokimia dengan GC-MS

Pada tahap uji skrining dengan menggunakan GC-MS ini dilakukan dengan mengirimkan sample ekstrak daun binahong kepada pihak laboratorium di Universitas Gadjah Mada dikarenakan keterbatasan alat yang tersedia di kampus. GC-MS ini sendiri merupakan metode pemisahan senyawa organik yang

menggunakan dua metode analisis senyawa yaitu kromatografi gas (GC) untuk menganalisis jumlah senyawa secara kuantitatif dan spektrometri massa (MS) untuk menganalisis struktur molekul senyawa analit.

3.5.2 Molecular docking

3.5.2.1 Preparasi Reseptor

Reseptor yang digunakan diunduh dari Protein Data Bank. Reseptor yang berupa makromolekul protein dipisahkan dari molekul lain yang tidak diperlukan beserta ligan. Pemisahan dilakukan menggunakan Discovery Studio. Pengoptimasian untuk penambahan atom hidrogen dan *Compute Gasteiger* menggunakan Avogadro.

3.5.2.2 Validasi Metode Docking

Validasi metode docking dilakukan dengan metode redocking menggunakan ligan alami yang terdapat pada reseptor dengan kode yang telah tertera pada RCBS PDB.

3.5.2.3 Preparasi Ligan

Ligan atau senyawa uji senyawa dicari dan ditentukan menggunakan perangkat lunak Discovery Studio. Kemudian dilakukan Optimasi geometri menggunakan metode semiempirik (PM3) yang tersedia pada program perangkat lunak. Hasil optimasi tersebut kemudian dikonversi menggunakan disimpan file PDB. Kemudian dilakukan penyiapan senyawa uji dengan AutodockTools.

3.5.2.4 Docking Ligan Uji terhadap Reseptor

Pengaturan grid box parameter dilakukan menggunakan AutodockTools, Koordinat grid box ditentukan berdasarkan koordinat ligan ko-kristal dari file reseptor yang digunakan pada saat validasi, kemudian dilakukan proses penambatan menggunakan Autodock Vina.

3.5.2.5 Analisa dan Visualisasi Hasil Docking

Penentuan konformasi ligan hasil *docking* (pose terbaik) dilakukan dengan memilih konformasi ligan yang memiliki energi ikatan paling rendah. Hasil docking dengan pose terbaik kemudian dianalisa menggunakan Discovery Studio. Parameter yang dianalisa meliputi residu asam amino, ikatan hidrogen, konstanta inhibisi prediksi, dan energi bebas ikatan. (Sari, Junaidin, & Pratiwi, 2020)

3.5.2.6 Binding site

Daerah pada protein/reseptor yang menjadi target penambatan *Docking*. Metode yang digunakan untuk memprediksi penambatan antara ligan dan reseptor *In silico* menggunakan aplikasi komputer sebagai analog *In vitro* dan *In vivo*. Reseptor penerima molekul, sebagian besar merupakan protein atau biopolimer lain, pose kandidat bentuk pengikatan ligan molekul partner komplementer yang akan berikatan dengan reseptor. *Scoring* proses evaluasi pose dengan menghitung interaksi molekular, seperti ikatan hidrogen dan kontak hidropobik sekuens deretan asam amino dalam suatu protein.

3.5.2.7 MMV

Molegro Molecular Viewer, program yang digunakan dalam melihat interaksi hasil data docking PDB Protein Data Bank, data protein yang akan di docking dengan senyawa/ligan PLANTS Protein-Ligand ANT System, program docking dengan menggunakan algoritma ACO (*Ant Colony Optimization*) RMSD Root Mean Square Deviation, nilai yang menunjukkan validitas metode docking yang digunakan dengan nilai standar. Visualisasi dari hasil docking juga dapat menggunakan aplikasi PyMOL dan PyRx.

3.6 Teknik Analisis Data

Analisis data dilihat dari hasil skrining fitokimia dan beberapa parameter dapat dilihat dari hasil *docking* masing-masing senyawa uji terhadap *EXO-alphasialidase* menggunakan Autodock Vina, konstanta inhibisi (ki), kompleks protein ligan yang divisualisasikan dengan pymol dan interaksi residu-ligan yang divisualisasikan dengan Discovery Studio.

3.7 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium botani Universitas Siliwangi Tasikmalaya dan laboratorium Universitas Gadjah Mada yang dilaksanakan pada bulan November sampai bulan Juli 2023.

