

BAB 3

PROSEDUR PENELITIAN

3.1 Metode Penelitian

Jenis penelitian yang dijalankan berupa deskriptif kualitatif secara *in silico* dengan teknik yang digunakan meliputi *molecular docking* dan prediksi toksisitas yang bertujuan menemukan interaksi ikatan dan energi afinitas antara ligan dan reseptor serta mengidentifikasi absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi dan profil toksisitas dengan cepat dan akurat. Creswell & Creswell (2018) menuturkan bahwa penelitian deskriptif kualitatif merupakan bagian paradigma post-positivistik dimana pengetahuan dikonstruksi dan digambarkan oleh data, bukti dan pertimbangan logis melalui observasi mendalam yang memiliki sifat konjektural dan tidak pernah mendapatkan kebenaran absolut. Sehingga penelitian harus sanggup mengembangkan pernyataan yang relevan dengan sesuai situasi yang sebenarnya. *In silico* sebagai metode yang memakai kemampuan komputer dalam perancangan obat sebagai penunjang dari *in vitro* dan *in vivo* (Muchtaridi *et al.*, 2018).

3.2 Ruang Lingkup Penelitian (Fokus Penelitian)

Berikut ini adalah ruang lingkup penelitian yang akan dikaji berdasarkan rumusan masalah yang telah dipaparkan mencakup sebagai berikut:

- 1) Telaah kajian pustaka yang relevan yang memaparkan potensi kandungan kopi robusta yaitu asam klorogenat sebagai antihipertensi yang bertentangan dengan kepercayaan masyarakat dan masih menjadi bahan diskusi yang tak kunjung usai.
- 2) Analisis bioinformatika dengan menggabungkan teknik *molecular docking* dan prediksi toksisitas bertujuan memaparkan interaksi dan efek yang timbul pada tubuh manusia kala pengikatan asam klorogenat sebagai kandungan kopi robusta

dengan reseptor beta adrenergik dan *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) sebagai pemicu hipertensi.

- 3) Penyusunan modul penuntun *molecular docking* dan prediksi toksisitas yang ditujukan sebagai suplemen bahan ajar, sebagai upaya memandu pembelajaran bioinformatika di tingkat sekolah menengah dan perguruan tinggi yang menjadi kemampuan krusial yang harus dimiliki di perkembangan abad ini dan membentuk sumber daya manusia yang berkualitas dan sanggup menghadapi persaingan dunia ditengah derasnya perkembangan digital, serta diharapkan dapat bermanfaat bagi pendidik biologi guna meningkatkan kompetensi komputasi.

3.3 Sumber Data Penelitian

Data dalam penelitian ini dikumpulkan dari sumber data primer dan sumber data sekunder. Data yang berasal langsung dari sumbernya disebut sebagai sumber data primer. Di sisi lain, data yang tidak secara langsung diperoleh dengan tujuan untuk mendukung studi penelitian disebut sebagai sumber data sekunder. Data primer untuk penelitian ini diperoleh melalui hasil *in silico* terkait *molecular docking* dan prediksi toksisitas serta hasil wawancara mengenai kopi dan hipertensi. Sedangkan data sekunder dalam penelitian ini diperoleh dari hasil telaah literatur dari jurnal hasil penelitian, buku, seminar di Youtube dan dokumentasi.

3.4 Langkah-langkah Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan dalam tiga tahapan pokok yaitu persiapan, pelaksanaan, dan pengolahan data.

3.4.1 Persiapan

- 1) Pada tanggal 20 Oktober 2022 memperoleh Surat Keputusan Dekan Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Siliwangi terkait pembimbing skripsi.
- 2) Pada tanggal 30 November 2022 mengajukan judul ke Dewan Bimbingan Skripsi (DBS);

- 3) Pada bulan Januari sampai bulan Februari 2023 menyusun proposal penelitian dengan dosen pembimbing I dan dan dosen pembimbing II;
- 4) Pada bulan Februari 2023 mengajukan permohonan seminar skripsi penelitian dan melaksanakan seminar proposal.

3.4.2 Pelaksanaan

Tahap pelaksanaan dan analisis data dilakukan di bulan Februari 2023, meliputi:

1) Persiapan alat dan bahan

Alat yang digunakan berupa perangkat keras, perangkat lunak, *database*, dan *web server*. Perangkat keras yang digunakan yaitu seperangkat laptop merek ACER yang memiliki spesifikasi AMD Ryzen 3 2200U with Radeon Vega Mobile Gfx 2.50 GHz RAM 4 GB, sistem operasi windows 10 64bit dan mouse merek *Logitech M170*. *Software* yang dilibatkan dalam penelitian ini yaitu, *BIOVIA Discovery Studio*, *Autodock Tools 1.5.7*, *Autodock Vina*, dan *Notepad*. *Database* yang digunakan ialah *Protein Data Bank* (PDB) dan PubChem. *Web server* yang dipakai yaitu *PASS Online* (*Prediction of Activity Spectra for Substances*), ProTox-II, dan PkCSM.

Bahan yang dipakai dalam *molecular docking* dan prediksi toksisitas secara *in silico* yaitu struktur 3D kandungan kopi robusta yakni asam klorogenat sebagai ligan yang diunduh dari situs PubChem dengan kode 1794427 dalam format **sdf* serta struktur 3D reseptor beta adrenergik dengan kode 7BVQ dan *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) dengan kode 3BKK yang di download dari *Protein Data Bank* dalam format **pdb* beserta ligan kontrol untuk reseptor beta adrenergik yaitu senyawa kolesterol (CLR) dan ligan kontrol pada *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) yakni senyawa N-Asetilglukosamin (NAG).

2) Uji *Prediction of Activity Spectra for Substances* (PASS)

Melalui program PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*) berbasis web *online* yang dapat diakses pada laman

<http://www.way2drug.com/passonline/predict.php> untuk menganalisis aktivitas biologis spektrum senyawa bioaktif berdasarkan strukturnya dengan mengambil *canonical smiles* ligan asam klorogenat. Sesudah itu login lalu klik *predict new compound* dilanjutkan klik SMILES. Lalu masukkan *canonical smiles* ligan dan klik *get prediction*.

3) Prediksi toksisitas

Dalam bentuk format SMILES senyawa diproses menggunakan pkCSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction>) untuk memprediksi sifat fisikokimia senyawa dan mendapatkan parameter untuk dikategorikan menurut *lipinski rule of five*. Untuk memprediksi toksisitas LD50 per oral pada hewan pengerat, klasifikasi toksisitas senyawa berbasis *Globally Harmonized System (GHS)* digunakan Protox II (http://tox.charite.de/protox_II/) dan toksisitas senyawa berpatokan sensitasi kulit, toksisitas ames, hepatoksisitas didapatkan melalui pkCSM.

Menjalankan pkCSM dengan akses *small-molecule pharmacokinetic predicting*, memasukkan *canonical smiles* ligan asam klorogenat, dan memilih mode prediksi "ADMET". Tahap selanjutnya pengoperasian ProTox, setelah terbuka halaman *ProTox web server*, pada tambilan menu bar, klik menu "TOX PREDICTION" dan akan diarahkan pada halaman baru untuk uji toksisitas. Masukkan nama atau *Cannonical SMILES* ligan yang akan kita uji pada kolom "search", setelah muncul maka akan ditampilkan pada lembar kerja struktur dari senyawa tersebut dalam tampilan 2D. Pilih semua model prediksi toksisitas pada tampilan "additional models", tekan tombol "start tox-prediction" pada sebelah kanan bawah, lalu tunggu beberapa detik hingga halaman hasil prediksi toksisitas muncul. Setelah muncul halaman hasil prediksi toksisitas, disana akan ditampilkan prediksi LD50, *average similarity*, dan akurasi prediksi.

4) Preparasi ligan

Berkas ligan yang telah diunduh dikonversi dari format **sdf* ke format **pdb* menggunakan aplikasi *Biovia Discovery Studio 2021*. Kemudian di preparasi menggunakan perangkat lunak *Autodock Tools*. File ligan dibuka dalam bentuk **pdb*, kemudian dipreparasi menambahkan muatan Gasteiger dengan klik *edit* → *charges* → *compute gasteiger* dan hidrogen ditambahkan dengan klik *edit* → *hydrogens* → *add* → *all hydrogens* → *edit* → *hydrogens* → *merge non-polar* → *continue*. Tahap berikutnya klik *Ligand* → *Torsion tree* → *Detect root* → *Torsion tree* → *Choose torsion*. Penyesuaian torsi dilakukan dengan *detecting root* dan diatur sesuai yang diinginkan. Kemudian file ligan disimpan ke dalam format file **pdbqt*.

5) Preparasi reseptor

Optimasi reseptor dengan memasukkan reseptor dalam format **pdb* ke dalam *software Biovia Discovery Studio 2021*. Pada umumnya struktur protein pada PDB mengandung molekul pelarut berupa air dan residu lainnya, sehingga diperlukan penghilangan molekul air agar tidak mengganggu pada saat simulasi docking dilakukan dan untuk memastikan bahwa yang benar-benar berinteraksi adalah ligan dan reseptor. Molekul air dihilangkan dengan klik *scripts* → *selection* → *select water molecules* → *delete*. Kemudian rantai protein dipisahkan dari native ligand dengan menghapus bagian tersebut dengan klik *scripts* → *selection* → *select ligands* → *delete*. Kemudian disimpan dengan format **pdb* sebagai reseptor dan berlanjut preparasi menggunakan perangkat lunak *Autodock Tools*. File reseptor dibuka dalam bentuk **pdb* lalu dikonversi menjadi format **pdbqt*. Penambahan muatan Kollman dengan klik *edit* → *charges* → *add kollman charge* dan menambahkan hidrogen dengan klik *edit* → *hydrogens* → *add* → *polar only*. Perlu ditambahkan hidrogen pada protein, karena protein tersebut dipreparasi secara eksperimental melalui X-ray diffraction. Pada kristalografi sinar-X, atom hidrogen tidak terlihat dalam percobaan. Oleh karena itu, pada sebagian besar file PDB hasil kristalografi sinar-X dengan resolusi

yang kurang baik, atom hidrogen tidak akan ada pada struktur. Sehingga pada simulasi docking perlu dilakukan penambahan hidrogen untuk mengoptimalkan posisi hidrogen dari struktur yang dihasilkan dan mampu menentukan posisi yang diinginkan secara energetik dari atom-atom. Hasil preparasi kemudian disimpan sebagai berkas dengan format **pdbqt*. Preparasi dilakukan pada reseptor beta adrenergik dan ACE.

6) Simulasi *Molekular docking*

Ligan yang sebelumnya diarsipkan ditambahkan dengan klik *Ligand* → *Input* → *Choose* → *Ligan* → *Select Molecule for Autodock4* dan diatur daerah penambahan atau *grid box* dengan klik *grid* → *grid box* → *center* → *center on ligand*. Parameter config berupa *grid center x, y, dan z, spacing, dan volume* diubah sesuai keinginan. Tahap berikutnya membuat konfigurasi vina yang diketik pada notepad dan disimpan dengan nama “config” dalam folder *download*. Konfigurasi vina terdiri dari penulisan nama reseptor dan ligan, output, dan *gribox*. Penulisan nama reseptor dan ligan pada notepad harus sama dengan nama file pada folder *download*. *Output “out”* merupakan hasil dari proses docking tersebut dibuat dengan nama “*ligan_out.pdbqt*” sedangkan *center_x, center_y, center_z, size_x, size_y, dan size_z* adalah parameter *grid box* yang telah diatur sebelumnya pada protein reseptor. Setelah pengaturan file konfigurasi notepad selesai, maka proses docking dengan vina dapat dijalankan. Vina dijalankan melalui perintah *Command prompt*. *Command prompt* dijalankan dengan perintah “*cd (nama folder tempat menyimpan config)*” untuk masuk ke dalam folder. Kemudian proses docking dapat dijalankan perintah sebagai berikut: “*vina.exe --config config.txt --log log.txt --out ligan_out.pdbqt*”. Untuk input dan output-nya, vina menggunakan format file struktur molekul yang sama dengan Autodock yaitu **pdbqt*. File dengan format **pdbqt*. Setelah proses docking selesai, maka muncul 2 file baru dalam folder vina, yaitu ‘*log.txt*’ dan ‘*out.pdbqt*’. ‘*log.txt*’ berisikan nilai afinitas ikatan dan *Root*

Mean Square Deviation (RMSD) dari hasil *docking*. Sedangkan ‘out.pdbqt’ merupakan konformasi dari ligan-ligan yang didockingkan.

7) Visualisasi hasil

Visualisasi hasil docking dilakukan menggunakan *software BIOVIA Discovery Studio* untuk dilihat bentuk interaksi antara senyawa uji dengan residu asam amino pada reseptor dalam bentuk 3D maupun 2D.

Penambatan molekul antara ligan kontrol dan reseptor dilakukan dengan alur yang sama dari preparasi ligan dan reseptor sampai dengan visualisasi hasil yang dilakukan sebelum pengujian penambatan molekul ligan uji dengan reseptor.

3.4.3 Pengolahan Data

Tahap ini akan dilaksanakan setelah mendapatkan hasil *molecular docking* dan prediksi toksisitas secara *in silico* asam klorogenat sebagai kandungan kopi robusta dengan reseptor hipertensi yaitu beta adrenergik dan *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE). Sebagai bentuk pertanggungjawaban peneliti maka dirancang naskah skripsi sebagai laporan akhir dengan mengacu pedoman penulisan yang berlaku dan penelitian ini perlu dipublikasikan untuk menambah wawasan khalayak umum terkait kopi dan hipertensi.

3.5 Teknik Pengumpulan Data

3.5.1 Jenis Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data yang diterapkan pada penelitian ini ialah teknik dokumentasi dan teknik *in silico*.

3.5.1.1 Teknik Dokumentasi

Dokumentasi diungkapkan Moleong (2018) ialah sumber data yang bersifat alamiah dan melimpah. Data-data yang dikumpulkan dengan teknik dokumentasi cenderung merupakan data sekunder. Teknik dokumentasi digunakan untuk menelusuri

informasi terkait pendapat, teori, dalil-dalil dan lain-lain yang bisa diperoleh melalui fakta yang tersemat pada surat, catatan harian, arsip foto, hasil rapat, cenderamata, jurnal penelitian dan sebagainya (Iryana & Kawasati, 2019). Pada penelitian ini dokumentasi dilakukan dengan cara membaca jurnal, berita atau catatan yang didokumentasikan mengenai kopi robusta dan hipertensi.

3.5.1.2 Teknik *in silico*

Teknik *in silico* mengacu pada penelitian melalui simulasi komputer. Teknik *in silico* melibatkan ketersediaan *database*, *software* dan *web server* yang terbuka untuk diakses secara gratis (Nursanti, 2022). Sumber *database* yang digunakan ialah *Protein Data Bank* (PDB) dan PubChem. *Software* yang dilibatkan dalam penelitian ini yaitu, *BIOVIA Discovery Studio*, *Autodock Tools*, *Autodock Vina*, dan *Notepad*. *Web server* yang dipakai yaitu *PASS Online (Prediction of Activity Spectra for Substances)*, *ProTox-II*, dan *PkCSM*. Dalam penelitian ini kandungan kopi robusta yaitu asam klorogenat akan dikonformasi dengan reseptor beta adrenergik dan ACE sebagai agen hipertensi serta melihat mutu keamanan dan nilai toksisitas dari asam klorogenat.

3.5.2 Uji Keabsahan Data

Penelitian kualitatif menempatkan peneliti sebagai instrumen utama sehingga peneliti harus mempunyai teori dan pemahaman yang komprehensif atas konteks yang dikaji terutama teknik keabsahan data. Data merupakan komponen yang krusial dalam penelitian, data inilah yang digunakan sebagai sumber analisis data. Penelitian membutuhkan akurasi, presisi, dan akuntabilitas. Pada penelitian kualitatif, salah satu bentuk pertanggungjawaban atas penelitian yang dilakukan yaitu harus melalui tahapan dalam pengujian keabsahan data yang dapat dilakukan dengan uji kredibilitas, transferabilitas, dependabilitas, maupun konfirmabilitas (Mekarisce, 2020; Moleong, 2018).

3.5.2.1 Uji Kredibilitas (Kepercayaan)

Uji kredibilitas disebut dengan validitas internal. Kredibilitas adalah kapasitas menanamkan keyakinan dari perspektif peneliti dan pembaca bahwa kajian penelitian akurat. Menurut Creswell & Creswell (2018) uji kredibilitas dapat dilakukan dengan delapan strategi yang meliputi triangulasi sumber data yang berbeda, pengecekan anggota, penggunaan deskripsi yang beragam, reflektivitas, penyajian informasi negatif, penyajian informasi positif, pemanjangan waktu pengamatan, tanya jawab dengan rekan sejawat, penggunaan auditor eksternal. Dalam penelitian ini digunakan strategi triangulasi, penggunaan deskripsi beragam, dan penyajian informasi negatif.

3.5.2.1.1 Triangulasi

Triangulasi ialah memverifikasi dari berbagai sudut guna membangun pembenaran yang selaras pada permasalahan. Pengecekan data melalui sudut beragam yaitu berdasarkan sumber, teknik, dan waktu (Mekarisce, 2020; Moleong, 2018). Triangulasi sumber berarti data dicek melalui berbagai sumber seperti pada penelitian ini membandingkan hasil *molecular docking* dengan dokumen yang telah ditelaah. Triangulasi teknik berarti pengecekan data dengan sumber sama dengan teknik yang berbeda, seperti melakukan prediksi aktivitas biologis dan prediksi toksisitas pada senyawa asam klorogenat di penelitian ini. Triangulasi waktu dilakukan dengan mengecek kembali data dari sumber dan teknik yang sama namun waktu atau situasi berbeda seperti melakukan *molecular docking* pada reseptor beta adrenergik dan ACE.

3.5.2.1.2 Deskripsi Beragam

Bahan referensi yang bervariasi akan mendukung pengembangan penelitian yang reliabel (Mekarisce, 2020). Contohnya pada penelitian ini dilakukan telaah

pustaka dari berita organisasi dunia dilengkapi dengan seminar dan jurnal yang relevan dengan kopi robusta dan hipertensi sebagai penunjang penelitian ini.

3.5.2.1.3 Penyajian Informasi Negatif

Penyajian informasi negatif mengindikasikan terdapat data yang bertentangan dengan hasil penelitian (Creswell & Creswell, 2018; Mekarisce, 2020). Pada penelitian ini dilatarakan oleh persepsi dan perdebatan publik mengenai kopi robusta dapat meningkatkan hipertensi, namun peneliti mengkaji kasus potensi kopi robusta sebagai antihipertensi.

3.5.2.2 Uji Transferabilitas (Generalisasi)

Uji transferabilitas disebut validitas eksternal yang terkait dengan konsep generalisasi data. Nilai transferabilitas pada penelitian kualitatif tergantung pada pembaca. Kala hasil penelitian dapat dipahami pada konteks dan situasi sosial secara jelas maka dapat dianggap penelitian bertransferabilitas (Mekarisce, 2020). Pada penelitian ini pembaca disajikan gambaran umum terkait kasus hipertensi di Indonesia dan perkembangan kopi di Indonesia serta diperlihatkan hasil penelitian yang cermat yang menggambarkan konteks penelitian.

3.5.2.3 Uji Dependabilitas (Reliabilitas)

Uji dependabilitas dikenal juga dengan istilah reliabilitas atau menilai mutu proses penelitian. Dependabilitas tercapai bila peneliti berikutnya dapat mereplikasi rangkaian prosedur penelitian tersebut. Peneliti perlu menyertakan prosedur dan perlu menemukan orang lain untuk memeriksa prosedur penelitian (Creswell & Creswell, 2018; Mekarisce, 2020). Mekanisme uji dependabilitas dilakukan pada penelitian ini saat jejak alur penelitian diperiksa oleh dosen pembimbing.

3.5.2.4 Uji Konfirmabilitas (Objektivitas)

Uji konfirmabilitas mengukur objektivitas yang berarti apabila hasil penelitian telah disepakati banyak orang terkait makna, relevansi, dan akurasi penelitian. Konfirmabilitas dalam penelitian kualitatif merujuk transparansi sebagai bentuk ketersediaan peneliti dalam mengungkapkan kepada publik mengenai bagaimana proses dan komponen yang ada dalam penelitiannya, yang selanjutnya memberikan kesempatan kepada pihak lain untuk melakukan kritik dan saran dari hasil temuannya sekaligus memperoleh persetujuan diantara pihak tersebut (Mekarisce, 2020). Dengan mempertanggungjawabkan penelitian ini pada ujian sidang, penelitian ini memenuhi persyaratan konfirmabilitas.

3.6 Teknik Analisis Data

Teknik analisis data yang digunakan peneliti dalam penelitian ini merupakan teknik deskriptif kualitatif sehingga peneliti akan mendeskripsikan temuan yang diolah dari dokumentasi dan *in silico* selama proses penelitian sehingga bentuk analisis yang dilakukan merupakan penjelasan, bukan merupakan data statistik. Dalam analisis data kualitatif, aktivitas analisis data dilakukan secara interaktif dan berkelanjutan sampai tuntas, sehingga datanya sudah konsisten.. Teknik analisis menurut Miles dan Huberman (1992 dalam Hardani *et al.*, 2020) tersusun atas tiga alur yakni reduksi data, penyajian data, dan penarikan kesimpulan.

3.6.1 Reduksi Data

Reduksi data meliputi pemilihan elemen pokok yang sesuai dengan fokus penelitian. Reduksi data dapat diartikan menajamkan, menggolongkan, mengarahkan, membuang yang tidak perlu, dan mengorganisasi data hingga kesimpulan akhir dapat ditarik dan diverifikasi. Reduksi data bersifat analisis yang berlaku secara terus menerus selama pengumpulan data berlangsung sampai dapat ditarik dan diverifikasi

pada kesimpulan (Hardani *et al.*, 2020). Reduksi data dalam penelitian ini yaitu data *in silico* perlu direduksi agar tak melebar.

3.6.2 Penyajian Data

Penyajian data merupakan pijakan selanjutnya jika data telah direduksi. Kemampuan untuk menarik kesimpulan dan mengambil tindakan disediakan oleh penyajian data. Data dapat disajikan dalam bentuk teks, gambar, grafik, tabel, atau kata-kata tertulis. Data disajikan dengan tujuan menggabungkan informasi untuk menggambarkan situasi (Hardani *et al.*, 2020). Pada penelitian ini disajikan data mengenai kopi robusta, hipertensi dan hasil *molecular docking* dan prediksi toksisitas.

3.6.3 Penarikan Simpulan dan Verifikasi

Fase terakhir dalam analisis data adalah menarik kesimpulan dan memverifikasinya. Ketika temuan baru yang sebelumnya belum pernah ada disajikan dengan data yang valid dan konsisten, maka kesimpulan dianggap kredibel. Temuan dapat berupa deskripsi atau gambaran suatu obyek yang sebelumnya masih remang atau tidak jelas sehingga setelah diteliti menjadi jelas. Simpulan yang dibuat harus relevan dengan fokus penelitian, tujuan penelitian dan temuan penelitian (Hardani *et al.*, 2020).

3.7 Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian dimulai pada bulan Oktober 2022 sampai Juli 2023 di Laboratorium Botani Jurusan Pendidikan Biologi Universitas Siliwangi.

