

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Metode yang digunakan adalah eksperimental eksploratif dengan *computational experiment* senyawa marker dan senyawa pilihan dari genus *alphitonia* dengan metode *in silico* terhadap protein target *RNA Polimerase* dan *Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase* (InhA) menggunakan aplikasi *docking* PLANTs.

3.2. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Universitas Borneo Lestari dengan waktu pelaksanaan penelitian dari periode Januari – Mei 2024.

3.3. Variabel Penelitian

3.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu 30 senyawa pilihan dari genus *Alphitonia* dan senyawa pembanding.

3.3.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu aktivitas bakteri *Mycobacterium tuberculosis* terhadap senyawa pilihan genus *alphitonia* yang ditunjukkan dengan skor *docking*.

3.4. Alat dan Bahan

3.4.1. Alat

a. Perangkat Keras

Perangkat keras yang digunakan yaitu Laptop HP 14 ultimate 64 bit, sistem operasi menggunakan Microsoft® Windows®11 Version 22H2, Processor AMD Ryzen 3 3250U with Radeon Graphics 2.60 GHz, spesifikasi RAM 8GB + 512 SSD.

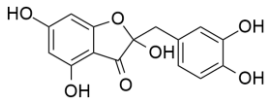
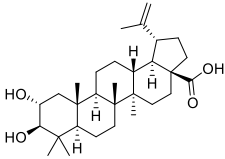
b. Perangkat lunak

Perangkat lunak yang digunakan yaitu PLANTs v1.1 (2016) untuk menjalankan docking, Marvin sketch v5.2.5 (2009), Discovery studio v21.1.0.20298 (2020), serta YASARA v.10.18 untuk preparasi ligand.

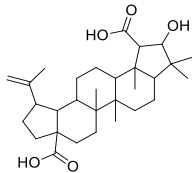
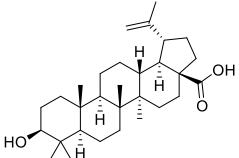
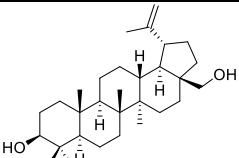
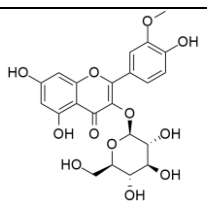
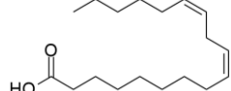
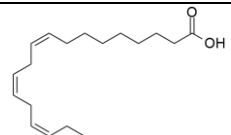
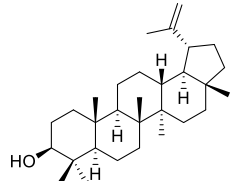
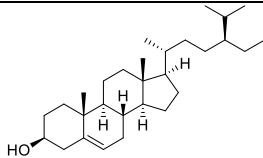
3.4.2. Bahan

Bahan yang digunakan yaitu struktur 2D dari senyawa – senyawa yang terkandung dalam genus *Alphitonia* antara lain:

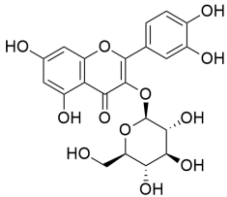
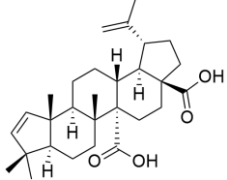
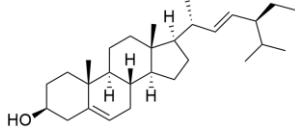
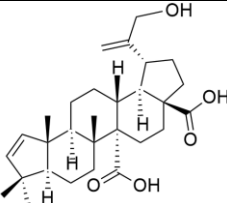
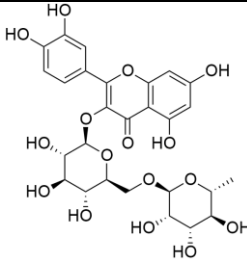
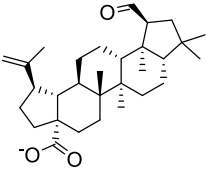
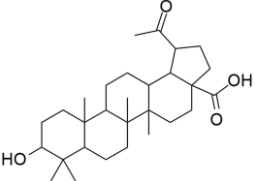
Tabel 1. Struktur Senyawa dalam Genus *Alphitonia*

No	Senyawa	Golongan	Struktur Kimia 2D
1.	<i>Alphitonin</i>	<i>Hydroxybenzyl coumarone</i>	
2.	<i>Alphitolic acid</i>	<i>Lupane triterpenoid</i>	

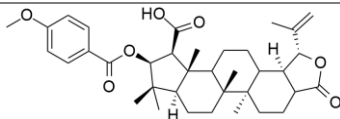
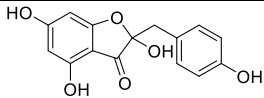
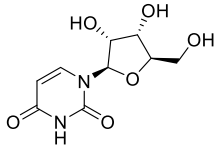
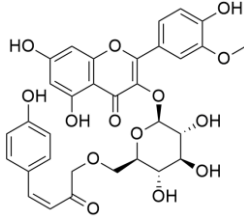
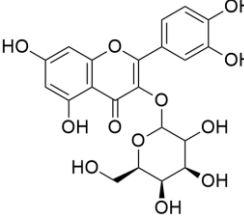
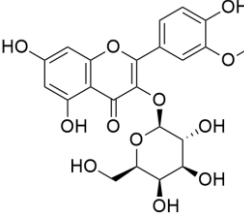
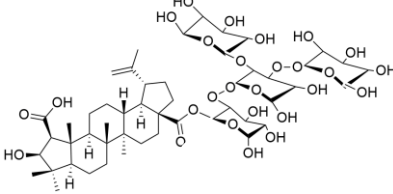
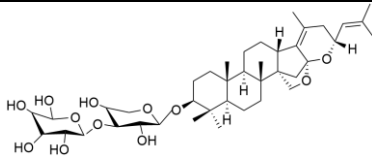
Lanjutan Tabel 4. Struktur Senyawa dalam Genus *Alphitonia*

No	Nama Senyawa	Golongan	Struktur Kimia 2D
3.	<i>Ceanothic acid</i>	<i>Triterpenoid</i>	
4.	<i>Betulinic acid</i>	<i>Triterpenoid</i>	
5.	<i>Betulin</i>	<i>Triterpenoid</i>	
6.	<i>Isorhamnetin 3-O-β-D-glucopyranoside</i>	<i>Flavonol glycosides</i>	
7.	<i>Linoleic acid</i>	<i>Fatty acid</i>	
8.	<i>α-Linolenic acid</i>	<i>Fatty acid</i>	
9.	<i>Lupeol</i>	<i>Triterpenoid</i>	
10.	<i>β-Sitosterol</i>	<i>Phytosterol</i>	

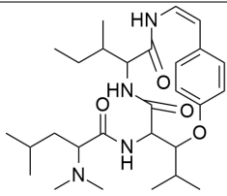
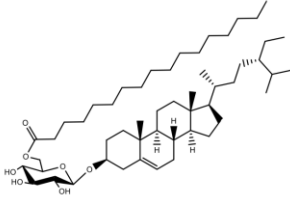
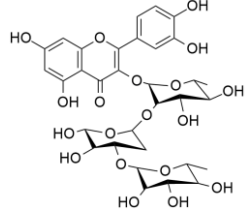
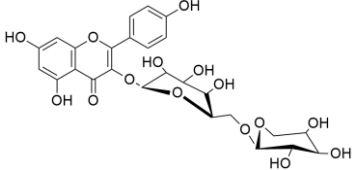
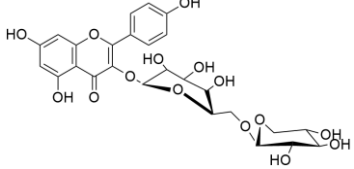
Lanjutan Tabel 4. Struktur Senyawa dalam Genus *Alphitonia*

No	Nama Senyawa	Golongan	Struktur Kimia 2D
11.	<i>Quercetin 3-O-β-D-glucopyranoside</i>	<i>Flavonol glycoside</i>	
12.	<i>Ceanothenic acid</i>	<i>Triterpenoid</i>	
13.	<i>Stigmasterol</i>	<i>Phytosterol</i>	
14.	<i>29-Hydroxyceanothenic acid</i>	<i>Norlupane triterpenoid</i>	
15.	<i>Rutin</i>	<i>Flavonoid</i>	
16.	<i>2α-formyl-A(1)norlup-20(29)en-28-oic acid.</i>	<i>Triterpenoid</i>	
17.	<i>Platanic acid</i>	<i>Triterpenoid</i>	

Lanjutan Tabel 4. Struktur Senyawa dalam Genus *Alphitonia*

No	Nama Senyawa	Golongan	Struktur Kimia 2D
18.	<i>Alphitexolide</i>	<i>Triterpenoid</i>	
19.	<i>Maesopsin</i>	<i>Flavonoid</i>	
20.	<i>Uridin</i>	<i>Pyrimidine</i>	
21.	<i>Isorhamnetin 3-O-(6''-O-(Z)-p-coumaroyl)-β-D-glucopyranoside</i>	<i>Flavonol glycoside</i>	
22.	<i>3-O-β-D-Galactopyranosyl-queracetin</i>	<i>Flavonoid</i>	
23.	<i>3-O-β-D-Galactopyranosyl-isorhamnetin</i>	<i>Flavonoid</i>	
24.	<i>28-O-β-D-Glucopyranosyl-(1→3)-[β-Dglucopyranosyl-(1→2)]-β-D-lucopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosylceanothic acid</i>	<i>Triterpenoid, Saponin</i>	
25.	<i>3-O-β-D-Glucopyranosyl-(1→3)-α-arabinopyranosyl-17,20-didehydro-20-deoxyjubogenin</i>	<i>Triterpenoid, Saponin</i>	

Lanjutan Tabel 4. Struktur Senyawa dalam Genus *Alphitonia*

No	Nama Senyawa	Golongan	Struktur Kimia 2D
26.	<i>Adouetine X</i>	<i>Cyclopeptide</i> <i>alkaloid</i>	
27.	<i>6'-Heptadecanoyl-3-O-β-D-glucopyranosylsitosterol</i>	<i>Phytosterol</i>	
28.	<i>Quercetin 3-O-α-L-rhamnopyranosyl (1→2)-α-L-arabinopyranosyl (1→2)-α-L-rhamnopyranoside</i>	<i>Flavonol glycosides</i>	
29.	<i>3-O-α-L-Arabinopyranosyl-(1→2)-α-L-rhamnopyranosylkaempferol</i>	<i>Flavonoid</i>	
30.	<i>3-O-β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-α-L-rhamnopyranosylkaempferol</i>	<i>Flavonoid</i>	

Struktur obat isoniazid dan rifampisin sebagai senyawa pembanding. Protein target yang diunduh dari <https://www.rcsb.org/> dengan kode.pdb 1ENY, 2NV6 dan 2X23 (*Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase/InhA*) beserta *native ligand* nya dan 3H87, 1I6V dan 1YNN (*RNA Polymerase Sub Unit β*) dengan *native ligand* nya.

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Preparasi Protein

Struktur kompleks protein yang diunduh dari situs *Protein Data Bank* (PDB) <https://rcsb.org/> dalam format (.pdb) di preparasi dengan melakukan proses “load” protein pada program YASARA. Struktur protein dilakukan pemisahan dari protokol *docking* (ion, air, *ligand*) sehingga akan didapat file “protein.mol2” dan “ref_ligand.mol2” (Purnomo, 2013).

3.5.2. Preparasi *Native Ligand*, Senyawa Pembanding dan Senyawa Uji

Preparasi *native ligand*, senyawa pembanding, dan senyawa uji dilakukan menggunakan program MarvinSketch 5.2.5. Ligan-ligan tersebut dibuat 2D dan mengatur pH 7,4 lalu disimpan dalam format “.mrv” serta masing-masing di konformasi sebanyak 10 kali lalu disimpan sebagai “.mol2” (Purnomo, 2013).

3.5.3. Validasi Protein dan Penetapan Nilai *Root Mean Square Distances* (RMSD)

Struktur protein target dilakukan *docking* dengan protokol *docking* (“ref_ligand.mol2” dan “protein.mol2”) yang sudah dipreparasi menggunakan aplikasi PLANTS untuk dilihat skor *docking* dari protein target dari inhA dengan kode pdb 1ENY dan protein target dari RNA polimerase dengan kode pdb 3H87. Kemudian dihitung RMSD (*Root Mean Square Distance*) dari hasil *docking* dengan program YASARA. Protokol validasi protein *docking* diterima jika RMSD kurang dari 2.0 Å (Purnomo, 2013).

3.5.4. Penambatan Molekul (*Molecular Docking*)

Aplikasi PLANTS dijalankan, “load” *file native ligand*, senyawa uji dan senyawa pembanding dari protokol *docking* yang sudah di preparasi sebelumnya, Kemudian dilakukan *docking* dengan menuliskan “*input script*” pada *commandprompt* PLANTS hingga diperoleh *output* skor *docking*. Hasil *docking* dilihat dari *output* dapat dilihat dalam format excel dengan nama *file bestranking.csv* di folder result protokol *docking* (Purnomo, 2013).

3.5.5. Visualisasi Penambatan Molekul

Hasil penambatan molekul dilihat melalui bantuan aplikasi *Discovery Studio Visualizer*. Prosesnya melalui pemilihan protein preparasi dengan format .pdb dan konformasi terbaik hasil *docking* untuk dilihat visualisasi interaksi antara protein dan senyawa hasil *docking* secara 2D dan 3D (Martati *et al.* 2018).

3.5.6. Drug Scan

Proses *drug scan* melibatkan aplikasi *Discovery Studio* untuk memunculkan interaksi ikatan antara reseptor dan ligan serta memunculkan senyawa dalam bentuk 2 dimensi. Proses ini memudahkan untuk mengetahui ikatan, ikatan *ligand*, ikatan *hydrogen*, serta residu ikatan dalam suatu molekul dalam senyawa maupun obat pembanding (Purnomo, 2013).

3.5.7. Analisis Data

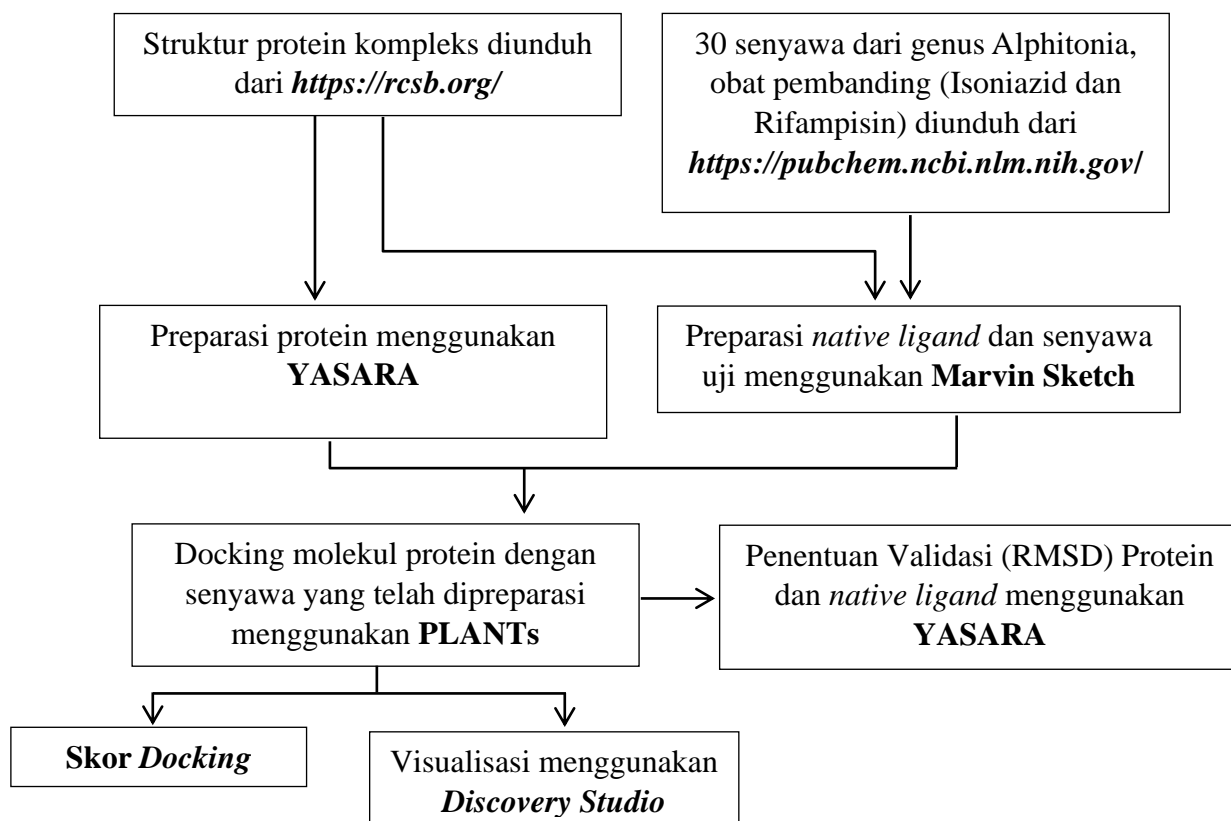
Analisis dan visualisasi penambatan molekul hasil *docking* dilihat melalui *output* dalam format *notepad*. Penentuan hasil *docking* dilakukan dengan cara memilih konformasi yang memiliki skor ChemPLP atau energi bebas paling rendah. Kemudian hasil *docking* divisualisasi menggunakan YASARA untuk melihat jarak ikatan hidrogen $< 2 \text{ \AA}$ (Rachmania *et al.*, 2018).

Pada analisa skor *docking*, penambatan molekul energi terendah yang dibebaskan oleh ligan dianggap ΔG_{bind} . Skor *docking* dihitung antara lain dengan nilai skor *docking* berdasarkan energi bebas *Gibbs* dimana semakin kecil (semakin negatif) nilai skor *docking* senyawa uji ataupun senyawa pembanding terhadap reseptor (protein) target maka dapat dikatakan senyawa tersebut memiliki afinitas ikatan yang baik terhadap reseptor (Martati *et al.*, 2019).

3.5.8. Penentuan *Lipinski's Rule of Five*

Penentuan prediksi sifat fisikokimia *Lipinski's Rule of Five* dilakukan terhadap *native ligand* dari reseptor dan 30 senyawa dari genus *Alphitonia* dengan format *pdb*. Lalu dilakukan prediksi sifat fisikokimia dari senyawa yang diuji secara online pada laman SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>) dan ditentukan senyawa uji yang sesuai Aturan *Lipinski's Rule of Five* (Riyaldi *et al.*, 2022).

3.6. Bagan Penelitian



Gambar 1. Bagan Skema Alur Penelitian