

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini metode yang digunakan yaitu metode eksperimental eksploratif dengan uji *in silico* senyawa *marker* dari genus *Alphitonia* terhadap protein target antikanker kolorektal menggunakan aplikasi *molecular docking* berupa aplikasi *PLANTS*.

3.2. Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Universitas Borneo Lestari, dan waktu pelaksanaan penelitian dari periode Januari 2024 – Maret 2024.

3.3. Variabel Penelitian

3.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam Penelitian ini yaitu struktur senyawa-senyawa yang terkandung dalam genus *Alphitonia*.

3.3.2. Variabel Terikat

Variabel terikat.dalam penelitian ini yaitu skor docking dari hasil uji aktivitas *in silico* antikanker kolorektal pada senyawa genus *Alphitonia*.

3.4. Alat dan Bahan

3.4.1. Alat

a. Perangkat keras

Alat yang digunakan pada penelitian ini berupa perangkat keras laptop LENOVO 14ADA7 dengan spesifikasi : *Windows 11 Home 64-bit; 2.3GHz (8 CPUs); Ram 8GB; SSD235,9; AMD Radeon (TM) Vega 3 Graphics.*

b. Perangkat Lunak

Untuk preparasi *ref_ligan*, *ligan*, dan *protein* menggunakan : MarvinSketch v.5.2.5.1; YASARA v.10.1.8. Dan untuk menjalankan *docking* menggunakan PLANTs® v1.1

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan yaitu struktur 2D dari senyawa- senyawa yang terkandung dalam genus *alphitonia* antara lain: *Alphitolic acid*, *Ceanothic acid*, *Betulinic acid*, *Betulin*, *Corosolic acid*, *Alphitonin*, *Lupeol*, β -*Sitosterol*, *trans-Coumaroyl alphitolic acid*, *cis-Coumaroyl alphitolic acid*, *Zizyberenic acid*, *Kaempferol- 3-rutinoside*, *Platanic acid*, *Quercetin 3-O-alpha-L- rhamnopyranoside*, *Isorhamnetin 3-o-rutinoside*, *2 α -Formyl- A(1)norlup-20(29)-en-28-oic acid*, *2-Ketobetulinic acid*, *29-Hydroxyceanothenic acid*, *Adouetine X*, *Alphitexolide*, *Betulonic acid*, *Ceanothenic acid*, *Isorhamnetin 3-O-(6''-O-(Z)-p-coumaroyl)- β -D-glucopyranoside*, *Maesopsin*, *Quercetin 3-O-alpha-L-arabinopyranosyl(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranoside*, *Quercetin 3-*

O-alpha-L- rhamnopyranosyl(1→2)-alpha-L-arabinopyranosyl(1→2)-alpha-L-rhamnopyranoside, Quercetin 3-O-beta-D-glucopyranoside, Rutin, Stigmasterol, dan Uridine. Struktur obat cetuximab dan bevacizumab sebagai senyawa pembanding. Protein target EGFR dan VEGFR yang diunduh dari <https://www.rcsb.org/> dengan kode pdb 4HJO (EGFR) dan 2P2I (VEGFR).

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Preparasi Protein

Protein yang akan digunakan sebagai reseptor uji diunduh dari situs resmi protein data bank (www.rcsb.org) dalam format “pdb”. Selanjutnya dipreparasi pada program YASARA dengan menggunakan proses “load” protein. Kemudian struktur protein dipisahkan 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

Pada penelitian ini, aplikasi yang digunakan untuk preparasi *native ligand*, senyawa pembanding, dan senyawa uji yaitu MarvinSketch. *Ligand* dibuat dalam bentuk model 2D pada pH 7,4 disimpan dengan nama *file* “ligand2D.mrv” lalu dibuat “*conformations*” kemudian disimpan sebagai “ligand.mol2”. Prosedur yang dilakukan dalam protokol *docking* untuk *native ligand*, senyawa pembanding dan senyawa uji (Purnomo, 2013).

3.5.3. Validasi Protein dan penetapan nilai RMSD

Validasi metode docking terhadap ligan asli dilakukan untuk mencari konformasi ligan asli. Struktur protein target dilakukan *docking* dengan protokol *docking* (“ref_ligand.mol2” dan “protein.mol2”) yang sebelumnya telah dilakukan preparasi menggunakan aplikasi PLANTS untuk melihat skor *docking* dari protein target 4HJO dan 2P2I. Setelah itu, lalu hitung nilai RMSD (*Root Mean Square Distance*) dari hasil *docking* menggunakan program YASARA. Protokol validasi protein *docking* diterima jika RMSD kurang dari 2.0 angstrom (Purnomo, 2013).

3.5.4. Penambatan Molekul (*Moleculer Docking*)

Operasikan aplikasi PLANTS, Kemudian lakukan *docking pada* “load” *file native ligand*, senyawa uji dan senyawa pembanding dari protokol *docking* yang telah di preparasi sebelumnya, dengan menuliskan “input script” pada *commandprompt* PLANTS hingga didapatkan *output* skor *docking*. Hasil *docking* 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

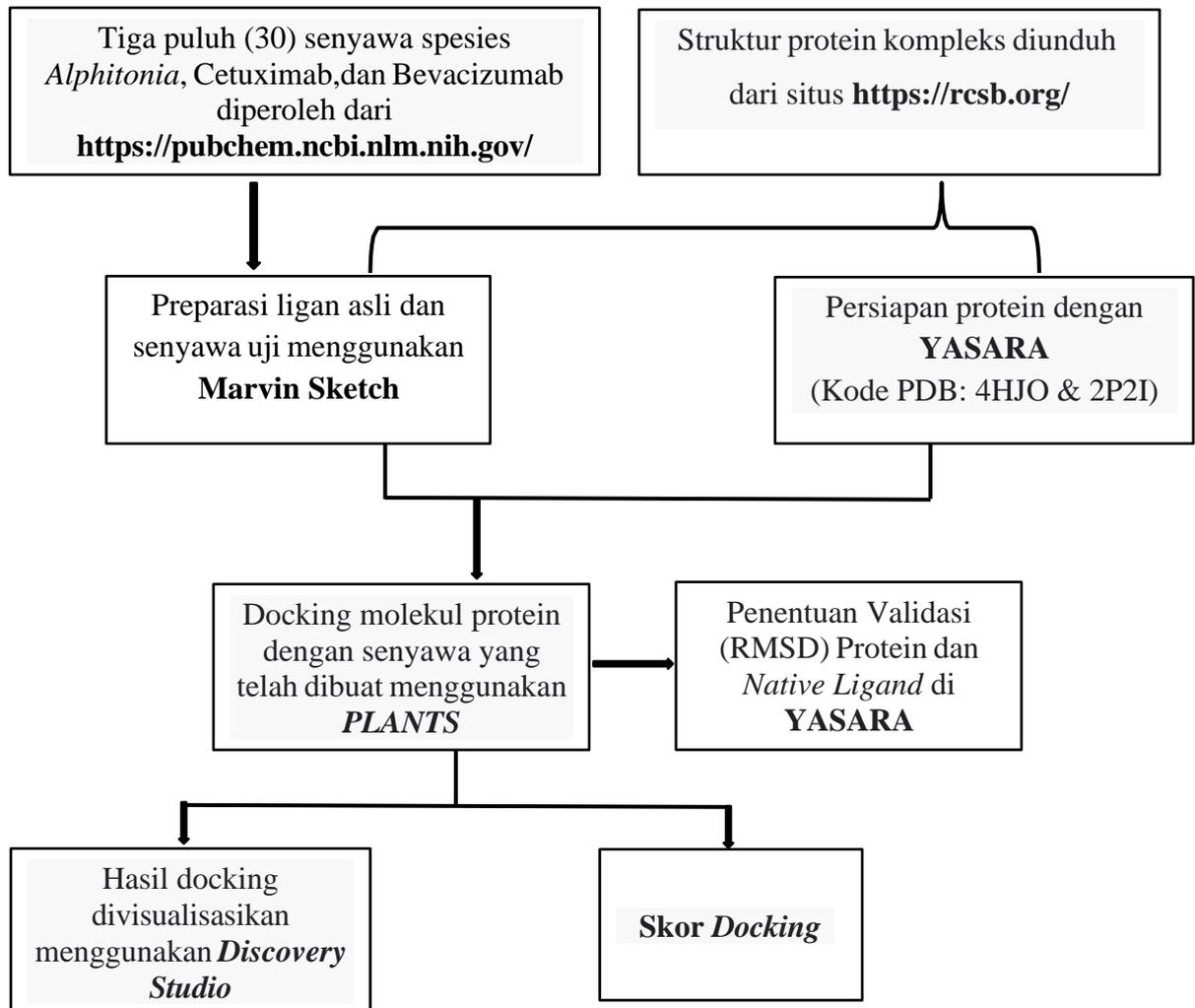
Tujuan dari visualisasi penambatan molekul adalah untuk melihat interaksi antara ligan dengan residu asam amino pada reseptor. Prosesnya melalui pemilihan protein preparasi dengan format .pdb dan konformasi terbaik hasil *docking* ditampilkan secara 2D dan 3D dengan

menggunakan program berbasis visualisasi yaitu *Discovery Studio Visualizer* (Martati *et al.*, 2019).

3.5.6. Analisis Data

Langkah kerja dalam analisis hasil penambatan dilakukan dengan menggunakan PyMOL dan *Discovery studio*, dengan menggunakan hasil *docking score* yang telah didapatkan. *Docking score* dapat diinterpretasikan dengan semakin kecil (semakin negatif) nilai energi ikatan yang dihasilkan, maka dikatakan senyawa tersebut memiliki afinitas ikatan yang semakin baik pada reseptor. Sebaliknya, semakin besar nilai energi ikatan yang dihasilkan maka senyawa tersebut memiliki afinitas ikatan yang semakin rendah (Purnomo, 2013).

3.6. Bagan Penelitian



Gambar 19. Bagan Skema Alur Penelitian