BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah kandungan senyawa kimia pada tanaman kelor (*Moringa oleifera*), protein target AR. Sampel pada penelitian ini adalah 20 senyawa kimia dari tanaman kelor (*Moringa oleifera*) serta protein JAK3, TACE, dan mPGES1.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah kandungan senyawa dari tanaman kelor (*Moringa oleifera*) yang diyakini memiliki aktivitas terapi artritis reumatoid.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah nilai energi bebas ikatan, dan model interaksi.

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah perangkat lunak yang digunakan dalam proses *docking molekuler* dan webserver untuk memprediksi profil farmakokinetik senyawa yang akan diteliti.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel bebas adalah variabel yang ingin diketahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung, maka variabel bebas dalam penelitian ini adalah 20 kandungan senyawa kimia dari tanaman kelor (*Moringa oleifera*) yang diyakini memiliki aktivitas terapi artritis reumatoid.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah nilai energi bebas ikatan, model interaksi, serta profil farmakokinetika.

Variabel terkendali adalah variabel yang memiliki pengaruh terhadap variabel tergantung dan variabel bebas. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah spesifikasi protein dan native ligand, serta validitas metode.

3. Definisi Operasional Variabel utama

Pertama, kandungan senyawa tanaman kelor (*Moringa oleifera*) adalah dua puluh struktur kimia yang tercantum pada Tabel 1 merupakan metabolit sekunder. Senyawa dari kelor disebut sebagai ligan uji.

Kedua, energi bebas ikatan yaitu kandungan senyawa tanaman kelor (*Moringa oleifera*) terhadap JAK3, TACE, dan mPGES1 yang berperan dalam aktivitas terapi artritis reumatoid.

Ketiga, model interaksi yaitu kandungan senyawa tanaman kelor (*Moringa oleifera*) terhadap JAK3, TACE, dan mPGES1 yang berperan dalam aktivitas terapi artritis reumatoid.

Keempat, profil farmakokinetika adalah prediksi mengenai absorbsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi menggunakan ADMETlab 2.0. Prediksi profil absorbsi adalah LogPapp (Caco-2permebility), Pgp-substrate, HIA (*Human Intestinal Absorption*), dan nilai F (*bioavailabilitas* 20%).

Kelima, Prediksi distribusi adalah PPB (Plasma Protein Binding), dan VD (Volum Distribution). Prediksi metabolisme adalah substrat CYP50,1A2, 3A4, 2C9, 2C19 dan 2D6. Prediksi ekskresi adalah waktu paruh (T1/2) dan klirens (CL).

Keenam, *docking molekuler* PLANTS adalah *docking* yang memperlakukan ligand dan protein secara fleksibel berdasarkan ACO (*Ant Colony Optimatization*).

Kejutuh, validitas metode *docking* adalah nilai RMSD yang digunakan untuk mengevaluasi konformasi ligan asli dan ligan uji. Protein dapat dilakukan *docking* senyawa dan dinyatakan valid untuk dilakukan metode *docking molekuler* jika nilai RMSD sebesar ≤ 2 Å.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

1.1 Perangkat keras. Spesifikasi perangkat keras yang digunakan adalah laptop ASUS dengan Processor Intel® CoreTM i3, NVIDIA® MX330, RAM 8GB, HDD 1 TB, dan Operating sistem Windows 10 HOME.

1.2 Perangkat lunak. Perangkat lunak yang digunakan dalam penelitian ini adalah MarvinSketch, PLANTS (Protein-Ligands Ant System), YASARA, BIOVIA DS, PyMOL, LigPlot+, serta beberapa weserver yaitu webserver PDB, webserver Pubchem, webserver ADMETlab 2.0, webserver KNApSAcK, Venny 2.1 dan webserver USDA Phytochem.

2. Bahan

Struktur dua dimensi dari ligan uji yang digambar menggunakan software MarvinSketch dan diperoleh dengan string SMILES dari webserver PubChem. Struktur ligan uji tertera pada tabel 1 dan 2. Protein terget artritis reumatoid (kode PDB : 3LXK, 3KME, dan 4WAB) yang diunduh dari webserver protein data bank (PDB) dalam bentuk stuktur 3D.

D. Cara Kerja

1. Skrining Ligan Uji

Skrining ligan uji dimulai dengan dicari ligan uji yang dapat digunakan sebagai ligan uji terapi AR. Dr. Dukes Phytochemical merupakan webserver yang dapat digunakan untuk menentukan senyawa yang berpotensi sebagai target penyakit (Duke, 1985). Selain menggunakan Phytochem digunakan juga jurnal pendukung. Pengumpulan kandungan senyawa kimia tanaman menggunakan webserver KNApSAcK Senyawa yang berpotensi terhadap protein target kemudian diuji dengan *Lipinski's rules of five* dengan tujuan mengidentifikasi senyawa dapat digunakan secara oral menggunakan *webserver* ADMETlab 2.0.

2. Penyiapan ligan uji

2.1 Pembuatan struktur ligan uji. Struktur kimia 2D digambar dengan *software* MarvinSketch dalam format.mol dengan memasukan string canonical SMILES dari *webserver* PubChem. Struktur 3D digambar dengan sofware BIOVIA DS.

2.2 Optimasi ligan uji. Optimasi dilakukan dengan menggunakan *software* MarvinSketch untuk pembuatan struktur 3D dari ligan uji. Hasil format 2D (.mol) dibuka dengan fitur open with menggunakan *software* MarvinSketch. Protonasi disesuaikan dengan pH darah yaitu 7,4 kemudian dioptimasi untuk mendapatkan konformasi yang stabil, struktur disimpan dengan format .mol2 (Dwi Agistia *et al.*, 2013). Senyawa uji disimpan dengan format .mol2 menggunakan fitur save as.

2.3 Preparasi ligan uji. Senyawa yang sudah dioptimasi menggunakan MarvinSketch dengan format .mol2 kemudian dibuka menggunakan YASARA untuk menghilangkan molekul H2O dan ditambahkan atom H. Setelah preparasi selesai ligan uji yang disimpan menjadi format .mol2 (Dwi Agistia *et al.*, 2015).

3. Penyiapan struktur molekul

3.1 Pengunduhan protein target. Target makromolekul diunduh dari *webserver* RCSB PDB (<u>https://www.rcsb.org/</u>) dengan kode PDB ID 3lxk (JAK3), 3kme (TACE), dan 4wab (mPGES-1).

Pengunduhan makromolekul menggunakan *webserver* dengan format .pdb (Tiara *et al.*, 2020).

3.2 Preparasi protein target. Makromolekul dengan ligan asli dipisah menggunakan *software* YASARA. Protein target yang tersusun dari beberapa makromolekul dipisahkan menjadi sekuen tunggal dengan membuka file .pdb dan menghapus bagian yang tidak diperlukan dalam protokol *docking* yang menyisakan satu protein dan satu *native ligand*. Optimasi makromolekul menggunakan *software* YASARA dengan penambahan atom hidrogen. Makromolekul yang sudah dipreparasi selanjutnya disimpan dengan format .yob menggunakan YASARA, lalu dipisahkan antara ligan asli dan makromolekul sehingga tersisa protein target saja. Protein target yang telah terpisah dengan ligan asli kemudian disimpan menggunakan YASARA dalam format .mol2 sebagai *protein.mol2* (Dwi Agistia *et al.*, 2015).

3.3 Preparasi native ligand. Ligan asli yang sudah terpisah makromolekul disimpan dalam format.yob, dengan dilakukan pengoptimasi ligan asli menggunakan software YASARA dengan penambahan atom hidrogen kemudian disimpan dalam format .mol2 sebagai ref ligand.mol2 (Dwi Agistia et al., 2015). Preparsi ligan dilakukan dengan mengikuti protokol docking dengan menggunakan menggunakan dari konformasi kombinasi beberapa software MarvinSketch. File *ref_ligand.mol2* dibuka menggunakan MarvinSketch kemudian dilakukan pengecekan protonasi pada pH 7,4 dengan memilih menu Tools kemudian protonasi dan disimpan sebagai *ligand 2D* dengan tipe file .mrv. Konformasi dilakukan dengan memilih menu Tools dan pilih conformation kemudian comformers. Setelah selesai ligan disimpan dengan tipe file .mol2 (Purnomo, 2013)

4. Validasi metode

4.1 Proses *docking* reseptor dengan native ligand. Validasi metode menggunakan *software* PLANTS bertujuan untuk mencari konformasi 3D dari *native ligand* terhadap reseptor menggunakan titik koordinat dan besaran *gridbox* yang sudah ditentukan sebelumnya. Menurut Tiara *et al* (2020) konformasi 3D berfungsi untuk mengetahui *Root Mean Square Deviation* (RMSD) dari *native ligand* sebelum dilakukan proses analisis *docking molekuler* dan RMSD native ligand sesudah dilakukan proses analisis *docking molekuler* menggunakan PLANTS. Nilai RMSD digunakan untuk mengetahui nilai kesejajaran

konformasi dari struktur native ligand sebelum dan sesudah dilakukan *docking molekuler* (Sari *et al.*, 2020).

4.2 Visualisasi hasil *docking* reseptor dengan native ligand. Hasil *docking* dibuka menggunakan *software* PLANTS untuk mengetahui nilai RMSD dan divisualisasikan menggunakan *software* YASARA. Nilai RMSD kurang dari 2Å maka diartikan bahwa nilai kesejajaran sudah valid (Sari *et al.*, 2020). Nilai RMSD semakin mendekati 0 maka nilai kesejajaran semakin baik (Sari *et al.*, 2020).

5. Proses Docking

5.1 Proses docking reseptor dan ligan uji. Setelah dilakukan validasi kemudian dilakukan proses *docking molekuler* antara reseptor dan ligan uji. Aplikasi yang digunakan adalah PLANTS. File berupa CMD, PLANTS, ligand.mol2 (sesuai dengan senvawa vang akan diuji). protein.mol2 yang sebelumnya telah dipreparasi dimasukkan ke dalam satu folder. PLANTS membutuhkan pengaturan file berupa teks file yang diedit dengan menggunakan notepad lalu disimpan dengan format .txt. Proses analisis docking molekuler dimulai dengan membuka file CMD vang sudah ada di folder, CMD digunakan untuk menuliskan perintah agar PLANTS dapat melakukan running. Pertama, misalkan kita akan mendockingkan quersetin maka pilih file quersetin.mol2 dan protein.mol2 yang terdapat di folder lalu dilakukan penyatuan proteinligan dengan menuliskan perintah -plants --mode bind ref_ligand.mol2 5 protein.mol2 kemudian klik enter, maka akan muncul kode gridbox pengikatan antara ligand dan protein. Kedua, copy kode gridbox lalu paste ke dalam pengaturan file yang berisikan kode gridbox pada notepad.

Keunggulan dari PLANTS adalah kode *gridbox* akan otomatis muncul tanpa dilakukan pengaturan nilai x, y, dan z nya. Ketiga, proses penentuan energi ikatan yang paling poten terhadap protein target dengan perintah *-plants --mode screen pc_3kme.txt* kemudian klik enter dan tunggu hingga proses *docking* selesai, *pc_3kme.txt* merupakan pengaturan file yang diedit menggunakan wordpad atau notepad sebelumnya. Penamaan file berperan penting dalam proses analisis *docking molekuler* karena jika nama file dan perintah tidak sesuai makan proses *docking* tidak dapat *running*. Setelah selesai untuk melihat nilai terbaik dari beberapa konformasi dan replikasi maka dijalankan perintah *-cd results* kemudian *-more bestranking.csv* maka akan muncul beberapa nilai energi ikatan terbaik dari senyawa uji, kemudian tutup aplikasi CMD dan data otomatis tersimpan dalam format excel atau csv (Purnomo H., 2013).

5.2 Analisis model interaksi. Hasil analisis docking molekuler dilakukan visualisasi menggunakan software PvMOL dan LigPlot+ untuk melihat pola interaksi asam amino yang terlibat dan menganalisis ikatan yang terbentuk antara protein target dan senyawa uji. Potensi penghambatan dilihat dari ikatan asam amino yang terbentuk (Suhadi et al., 2019). PyMoL membutuhkan pengaturan berupa file dalam format .pdb. Proses visualisasi dimulai dengan membuka aplikasi PyMOL kemudian memasukkan file yang akan divisualisasi dalam bentuk .pdb dan juga dapat menggunakan kode perintah yang sesuai dengan bahasa PyMOL. Pertama, misalnya akan memvisualisasikan quercetin dengan reseptor dapat membuat folder yang berisikan quercetin.mol2 dan protein.mol2 kemudian mengcopy alamat folder. Kedua, memasukan perintah pada gridbox yang tersedia dengan mengetik -pwd klik enter kemudian -cd paste alamat folder dan klik enter. Pymol akan mendeteksi folder yang diinginkan kemudian masukkan perintah selanjutnya -load receptor.mol2 klik enter jika file sudah muncul pada layar kemudian masukkan perintah -hide all klik enter -show surface klik enter. Ketiga masukkan ligan ujinya dengan perintah -load *quercetin.mol2* klik enter maka secara otomatis sistem akan memunculkan file yang diinginkan. Terakhir untuk mengunduh file visualisasi ketik perintah -save quercetin.pdb kemudian klik enter maka otomatis hasil unduhan akan berada pada folder yang sudah ada.

Untuk melihat pola interaksi asam amino yang terlibat dan menganalisis ikatan yang terbentuk antara protein target dan senyawa uji menggunakan Ligplot+. Untuk menjalankan aplikasi pertama membuka aplikasi Ligplot+ yang sudah diunduh, kemudian membuka *manual book* yang tersedia di dalam aplikasi. *Manual book* ini berfungsi untuk memudahkan peneliti dalam menggunakan aplikasi. LigPlot+ hanya dapat mengenali file dengan format .pdb maka sebelum digunakan akan ada panduan untuk mengedit *path* yang berada di dalam aplikasi. Setelah itu LigPlot+ dapat digunakan dengan mengklik file dan memilih file yang akan divisualisasi. Program ini dapat digunakan untuk menumpangkan LIGPLOT atau DIMPLOT terkait untuk menyorot persamaan dan perbedaan antara protein yang mengikat protein yang berbeda (Ying Chu, 2018).

5.3 Korelasi energi bebas dan persentase kesamaan residu asam amino. Nilai energi bebas ikatan terendah dari ligan uji dan persentase kesamaan asam amino tertinggi dari hasil interaksi ligan uji dengan reseptor menunjukkan bahwa ligan uji memiliki potensi besar sebagai senyawa yang dapat berperan terhadap reseptor protein yang diinginkan. Presentase kesamaan residu asam amino dihitung pada webserver Venny 2.1 dengan memasukan asam amino native ligand dengan reseptor pada list yang tersedia dan dibandingkan dengan asam amino ligan uji dengan reseptor. Hasil didapatkan dalam bentuk presentase. Korelasi energi bebas dilakukan menggunakan aplikasi Excel kemudian memasukkan data pada sumbu x dan y dan data disuguhkan dalam bentuk gambar *chart*. Garis pada titik 0 sumbu X mengindikasikan posisi ligan dari setiap reseptor. Apabila hasil yang didapatkan semakin ke kiri dari area garis pada titik 0 dan semakin tinggi posisi ligan terhadap diagram maka dapat diartikan bahwa ligan uji diprediksi memiliki potensi yang tinggi terhadap reseptor protein target.

6. Prediksi profil ADME

Profil ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, dan Excrection) berguna untuk memprediksi senyawa yang kita uji telah memenuhi persyaratan sifat farmakokinetik atau tidak. Prediksi dilakukan menggunakan webserver ADMETlab 2.0. Pertama menuju ke webserver PubChem untuk mengunduh canonical SMILES dengan memasukan nama senyawa pada kolom pencarian, kemudian mencari canonical SMILES pada bagian Names and Identifier. Kedua, menuju ke halaman indeks pada web server, kemudian memilih profil ADMET evaluation. Ketiga, memasukkan struktur molekul yang akan diprediksi, memasukkan struktur molekul dapat menggunakan Cannonical SMILES pada kolom yang sudah tersedia atau bisa menggunakan file molekul dengan format (*.sdf). Keempat, pilih parameter dari setia profil yang akan diprediksi. Pemilihan parameter disesuaikan dengan ketentuan yang sudah ditetapkan, dalam penelitian ini parameter yang digunakan memenuhi Lipinski of five rules. Kelima, proses prediksi dilakukan dengan mengklik here pada menu explain, lalu hasil prediksi akan diperoleh (Dong et al., 2018).

E. Analisis Hasil Docking Molekuler

1. Validasi

Validasi berguna untuk mencari konformasi 3D dari *native ligand* terhadap reseptor. Menurut Tiara *et al* (2020) konformasi berfungsi untuk mengetahui nilai kesejajaran antara konformasi struktur *native ligand* sebelum dan sesudah dilakukan proses *docking*. Nilai kesejajaran dikatakan valid jika nilai RMSD kurang dari 2Å (Sari *et al.*, 2020)

2. Energi ikatan

Energi ikatan dilakukan analisis agar mengetahui nilai energi ikatan antara protein target dengan senyawa uji. Nilai energi ikatan dikatakan baik apabila nilainya semakin minus akan tetapi juga dipastikan dengan terjadinya ikatan antara protein target dan senyawa uji (Tiara *et al.*, 2020).

3. Model Interaksi

Hasil analisis *docking molekuler* juga dilihat pada nilai kemiripan residu asam amino pada ligan uji dan residu asam amino pada ligan asli (Sari *et al.*, 2020). Hasil residu dari asam amino penting dalam keterlibatan interaksi ligan dan reseptor (Arwansyah *et al.*, 2014).

4. Korelasi Energi Bebas dan Persentase Kesamaan Residu Asam Amino

Energi binding ditunjukkan pada sumbu X sedangkan persentase asam amino ditunjukkan pada sumbu Y. Korelasi berupa garis pada titik 0 dari sumbu X yang mengindikasikan posisi ligan dari setiap reseptor. Senyawa uji yang memiliki nilai energi bebas ikatan terendah serta persentase kesamaan asam amino yang terbentuk memberikan pengaruh bahwa senyawa uji tersebut berpotensi sebagai senyawa yang mampu berperan dengan protein target yang dituju. Senyawa uji diprediksi memiliki potensi baik terhadap protein apabila posisinya semakin ke kiri area garis pada titik 0 serta semakin tinggi posisi ligan terhadap sumbu y (Pratama *et al.*, 2020).

5. Prediksi Profil ADME

Prediksi Profil ADME digunakan untuk memastikan apakah zat uji memenuhi persyaratan sifat farmakokinetik. Menurut peneliti Daina *et al* (2017), dapat digunakan sebagai parameter ADME dalam penemuan obat baru dan untuk memastikan ciri fisikokimia, dan farmakokinetik suatu zat.



F. Skema Penelitian

Gambar 7. Skema Penelitian