

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah kandungan senyawa kimia yang terdapat pada jeruk purut

Sampel pada penelitian ini adalah kandungan senyawa kimia dari Jeruk Purut seperti Terpenoid yang telah diidentifikasi melalui KNApSAcK, *PubChem*, dan literatur jurnal lain sebagai bahan pendukung.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah kandungan senyawa kimia yang terdapat pada jeruk purut, variabel kedua adalah parameter profil farmakokinetika absorbs, metabolisme, ekskresi dan toksisitas, variabel ketiga *web server* yang digunakan untuk prediksi.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Pada penelitian ini terdapat tiga variabel yaitu variabel bebas, variabel terikat, dan variabel terkontrol.

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas adalah variabel yang diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandungan kimia Jeruk purut yang diperoleh dari KNApSAcK, Pubchem, dan jurnal literatur.

2.2 Variabel tergantung. Variabel tergantung adalah variabel yang dipengaruhi nilainya akibat pengaruh variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah parameter absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, dan toksisitas, yang digunakan untuk mengetahui Profil Farmakokinetika dan toksisitas pada senyawa Jeruk purut.

2.3 Variabel terkontrol. Variabel terkontrol adalah variabel yang dikendalikan agar tidak mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu ditetapkan kualitasnya agar hasil yang diperoleh dapat diulang dalam penelitian lain secara tepat. Variabel terkontrol yang digunakan pada penelitian ini adalah *web server*.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Parameter absorpsi adalah parameter yang mengukur bagaimana suatu obat berpindah dari tempat pemberian ke tempat kerja, Parameter

Absorpsi meliputi *Caco-2 Permeability*, *MDCK Permeability*, *PAMPA*, *Pgp inhibitor*, *Pgp substrate*, *HIA*, *F50%* yang diambil dari webserver ADMETlab.

Parameter Distribusi adalah parameter yang mengacu bagaimana obat berpindah ke berbagai jaringan tubuh dan memuat jumlah obat dalam jaringan, Parameter distribusi meliputi *PPB*, *VDss*, *BBB*, *Fu*, yang diambil dari webserver ADMETlab.

Parameter metabolisme adalah parameter yang mengukur bagaimana sistem enzimatik khusus memecah obat, menentukan durasi, dan intensitas kerja suatu obat, Parameter metabolisme meliputi, *CYP1A2 substrate*, *CYP2C19 substrate*, *CYP2C9 substrate*, *CYP2D6 substrate*, *CYP3A4 substrate*, dan *HLM Stability*, yang diambil dari webserver ADMETlab.

Parameter ekskresi adalah parameter yang menjelaskan pengeluaran obat dari tubuh melalui berbagai jalur ekskresi yang berbeda, parameter ekskresi meliputi *CL_{plasma}* dan $T^{1/2}$, yang diambil dari webserver ADMETlab.

Parameter toksisitas adalah parameter yang menjelaskan parameter yang menjelaskan pada ukuran atau karakteristik yang digunakan untuk menilai tingkat toksisitas suatu zat. parameter ekskresi meliputi *Drug-induced neurotoxicity*, *Hematotoxicity*, *Drug-induced Nephrotoxicity*, *Genotoxicity*, *RPMI-8226 Immunotoxicity*, *A549 Cytotoxicity*, *Hek293 Cytotoxicity*, *hERG Blockers (10 μ M)*, *hERG Blockers*, *Human Hepatotoxicity*, *AMES Mutagenicity*, *FDAMDD*, *Carcinogenicity*, *NR-ARNR-AR-LBD*, *NR-AhR*, *NR-Aromatase*, *NR-ER*, *NR-ER-LBD*, *NR-PPAR-gamma*, *SR-ARE*, *SR-ATAD5*, *SR-HSE*, *SR-MMP*, *SR-p53*, *Acute Toxicity Rule*, *Genotoxic Carcinogenicity Rule*, *NonGenotoxic Carcinogenicity Rule*, yang diambil dari webserver ADMETlab.

Senyawa adalah substansi kimia yang terdiri dari dua atau lebih unsur yang terikat bersama dalam rasio tetap melalui ikatan kimia, kandungan senyawa mengacu pada unsur-unsur yang membentuk senyawa tersebut, setiap senyawa memiliki susunan kandungan senyawa yang spesifik, yang menunjukkan jenis unsur yang terlibat dan rasio relatif mereka dalam senyawa tersebut, aktivitas kandungan senyawa jeruk nipis yang diprediksi sebagai obat melalui skrining *drug-likeness*, *drug-likeness* adalah suatu senyawa kimia memiliki karakteristik yang dianggap cocok atau ideal untuk digunakan sebagai obat yang mencakup berbagai aspek, termasuk sifat fisika dan kimia

senyawa tersebut, kemampuannya untuk berinteraksi dengan target biologis secara spesifik, serta potensinya untuk menunjukkan aktivitas farmakologis yang diinginkan dengan efek samping yang minimal yang terdiri dari parameter Lipinski, Ghose, dan Veber.

Web server adalah perangkat lunak dalam server yang berfungsi untuk menerima permintaan (request) berupa halaman web melalui protokol HTTP dan atau HTTPS, kemudian mengirimkan kembali hasil.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah data kandungan senyawa kimia jeruk nipis.

2. Alat

2.1 Perangkat Keras. Perangkat keras yang digunakan pada penelitian ini adalah laptop Asus dengan spesifikasi Intel(R) Celeron(R) N4020 CPU @1.10GHz 1.10 GHz, RAM 4.00GB, Window 11 dengan 64-bit Operating system, x64-based processor

2.2 Webservice. PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), KNApSAcK(<http://www.knapsackfamily.com/KNApSAcK/>), ADMETlab (<https://admetlab3.scbdd.com/>), SwissADME (<https://www.swissadme.ch/>).

D. Jalannya Penelitian

1. Pengumpulan senyawa aktif

Pengumpulan senyawa pada tanaman jeruk purut dilakukan dengan membuka web server KNApSAcK. Pada menu “*select by*” pilih *ALL Types*, kemudian memasukkan nama ilmiah tanaman pada kolom pencarian, lalu klik enter, maka kandungan senyawa aktif akan muncul beserta rumus molekulnya. Pengumpulan senyawa pada tanaman jeruk purut juga dilakukan dengan mengumpulkan dari jurnal ilmiah.

2. Pengumpulan kode *smiles*

Kode smile adalah representasi linear yang digunakan untuk menyatakan struktur kimia secara singkat dan mudah dimengerti oleh komputer. Setiap senyawa kimia memiliki kode SMILES uniknya sendiri. Kode smiles dapat dikumpulkan dari 2 webservice yang berbeda yaitu PubChem dan KNApSAcK, untuk pengumpulan menggunakan

Pubchem yaitu dengan Mengakses Situs Web PubChem melalui alamat “<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>”, gunakan kotak pencarian di bagian atas halaman PubChem. Masukkan nama senyawa tersebut ke dalam kotak pencarian dan tekan tombol "Search". Telusuri hasil pencarian untuk menemukan entri senyawa yang sesuai. Klik pada entri untuk membuka halaman detail senyawa. Pada halaman detail senyawa, cari bagian kode SMILES. Biasanya, itu akan ada di bagian informasi struktur atau identifikasi senyawa. Kedua dapat menggunakan KNApSaCK dengan mengakses situs web Knapsack melalui alamat “https://knapsackfamily.com/knapsack_core/top.php”. gunakan kotak pencarian di situs web Knapsack. Masukkan nama senyawa tersebut ke dalam kotak pencarian dan tekan tombol "Search". Telusuri hasil pencarian untuk menemukan entri senyawa yang sesuai. Klik pada entri untuk membuka halaman detail senyawa. Pada halaman detail senyawa, cari bagian kode SMILES. Biasanya, itu akan ada di bagian informasi struktur atau identifikasi senyawa.

3. Seleksi senyawa *drug likeness*

Penyeleksian senyawa *drug likeness* pada tanaman Jeruk purut dilakukan dengan metode Lipinski's rule of five Dilakukan dengan mengakses web server SwissADME di alamat <https://www.swissadme.ch/>. Di halaman utama SwissADME, terdapat kotak teks yang memungkinkan untuk memasukkan struktur senyawa. dengan beberapa cara: dengan menggambar, menyalin dan menempelkan, atau memasukkan SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry System*) atau InChI (*International Chemical Identifier*). Di bawah kotak teks, terdapat beberapa pilihan untuk metode penghitungan, seperti "*Molecular Weight*", "*LogP*", "*Number of H-bond Donors*", dan "*Number of H-bond Acceptors*". Pastikan untuk memeriksa atau memilih yang sesuai dengan skrining Lipinski Rule. Setelah memasukkan struktur senyawa dan memilih metode penghitungan yang sesuai, klik tombol "*Submit*" atau "*Predict*" untuk mulai proses prediksi. Setelah prediksi selesai, hasil yang tersaji berupa nilai-nilai yang dihitung berdasarkan struktur senyawa yang di masukkan .

4. Pengumpulan parameter profil farmakokinetika dan toksisitas

Skrining parameter dapat dilakukan dengan mengakses Web ADMETlab melalui Alamat “<https://admetlab3.scbdd.com/>”, kemudian masuk Service pada menu atas web, dan pilih ADMET Evaluation, Jika

ingin menggunakan kode smiles pilih Bagian “Paste a single smiles”, Kemudian Masukkan kode smiles yang telah dikumpulkan pada kotak pencarian dan klik submit, Maka akan muncul hasil parameter senyawa yang dicari . Namun jika ingin menggambar struktur molekul nya secara manual dapat menggunakan bagian “*Draw a molecule using JMSE editor*” kemudian gambar struktur molekul yang ingin dicari, Jika dirasa sudah selesai klik bagian submit . Data yang dicari menggunakan kode smiles maupun penggambaran molekul dapat diunduh dengan format CSV maupun PDF, jika ingin mengunduh dengan format CSV klik kotak hijau “Download as CSV” pada bagian atas kanan menu, dan jika ingin mengunduh dengan format PDF klik kotak hijau “Download as PDF” pada bagian atas kanan menu.

5. Analisis data

Data yang telah dikumpulkan dari proses skrining dilakukan penganalisan pada setiap parameternya, yaitu dengan membandingkan data profil farmakokinetika dan toksisitas dari tiap senyawa yang telah didapat dari proses skrining dengan keputusan empiris tiap parameter pada tabel 1, data yang didapatkan di susun rapi dalam tabel memanjang untuk tiap parameter dan menurun untuk tiap senyawa, dan disimpulkan apakah senyawa tersebut layak secara farmakokinetika dan toksisitas untuk di gunakan sebagai obat .

Tabel 1. Keputusan empiris parameter *druglikeness*

Druglikeness	Parameter	Baik	Sedang	Buruk
Lipinski rule	Berat molekul	<500	-	>500
	Akseptor ikatan N & O	<10	-	>10
	MLogP	<4,15	-	>4,15
	akseptor ikatan NH & OH	<5	-	>5
Ghose	Berat molekul	160-480	-	<160->480
	Log P	-0,4-5,6	-	<-0,4&>5,6
	Mr	40-130	-	<40&>130
	Atoms	20-70	-	<20&>70
Veber	Berat molekul	<500	-	>500
	Rotatable bound	<10	-	>10
	TPSA	<140	-	>140

Tabel 2. Keputusan empiris parameter ADMET

ADMET	Parameter	Baik	Sedang	Buruk
Absorpsi	PAMPA, MDCK, F50%, HIA, Pgp <i>substrate</i>	0-0,3	0,3-0,7	0,7-1,0
	Caco-2 <i>Permeability</i>	-5,15	-	<5,15
Distribusi	VD _{ss}	0,04-20		<0,04-20
	PBB	≤ 90%	-	>90%
	Fu	≥ 5%	-	< 5%
Metabolisme	CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2B6, CYP2C8 <i>substrat</i> , HLM <i>stability</i>	0-0,3	0,3-0,7	0,7-1,0
Ekskresi	$T_{\frac{1}{2}}$	>8	1-8	<1
	CL _{plasma}	0-5	5-15	>15
Toksistas	<i>Drug-induced neurotoxicity</i> , <i>Hematotoksistas</i> , <i>Genotoxicity</i> , <i>Drug-induced</i> <i>Nephrotoxicity</i> , RPMI-8226 <i>Immunotoxicity</i> , A549 <i>Cytotoxicity</i> , FDAMDD, Hek293 <i>Cytotoxicity</i> , NR- AhR, Herg blocker/(10μM), NR-ER, <i>Human</i> <i>Hepatotoxicity</i> , SR-ARE, AMES <i>Mutagenicity</i> , SR- ATAD5, <i>Carcinogenicity</i> , NR- <i>Aromatase</i> , NR-PPAR- gamma, SR-HSE, SR-MMP, SR-p53.	0-0,3	0,3-0,7	0,7-1,0

Ket : Indikator berwarna hijau dapat disimpulkan sangat baik, kuning sedang, dan merah buruk.