

## **BAB 3**

### **PROSEDUR PENELITIAN**

#### **3.1 Metode Penelitian**

Penelitian yang digunakan oleh penulis adalah penelitian kualitatif deskriptif dengan jenis penelitian *pre- experimental* yang berbasis komputasi secara *in silico* dengan menggunakan teknik *moleccucar docking* dari senyawa *delphinidin 3-(6''-malonyglucoside)* dan *genistein* dengan reseptor hipertensi *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) dengan kode (PDB ID: 1O86) dengan menggunakan *software* MGLTools 1.5.7 yang dilengkapi dengan Autodock Tools dan aplikasi Biovia Discovery Studio Visualizer 2021.

#### **3.2 Ruang Lingkup Penelitian (Fokus Penelitian)**

Hal yang menjadi fokus penelitian pada penelitian yang akan dilakukan ini adalah melakukan analisis secara *in silico* dengan metode *molecular docking* pada dua senyawa *Clitoria ternatea* L. dengan reseptor hipertensi *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) (PDB ID:1O86). Hasil yang akan dianalisis pada penelitian ini adalah fisikokimia, farmakokinetik, afinitas energi, dan tingkat toksisitas pada kedua senyawa aktif dari bunga telang. Sehingga akan mendapatkan kesimpulan apakah bunga telang memiliki potensi untuk dijadikan sebagai salah satu kandidat obat anti hipertensi atau tidak.

#### **3.3 Sumber Data Penelitian**

Sumber data yang digunakan pada penelitian ini adalah jurnal-jurnal ilmiah yang sudah dipublikasikan mengenai penelitian *in silico* menggunakan bunga telang dan *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE). Serta jurnal-jurnal sebagai pendukung lainnya dan buku-buku yang digunakan sebagai sumber data penelitian. Sumber data yang digunakan pada penelitian ini didapatkan dari mencari senyawa yang terkandung pada bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) melalui web server KNApSack ([http://www.knapsackfamily.com/knapsack\\_core/top.php](http://www.knapsackfamily.com/knapsack_core/top.php)). Pengunduhan ligan yang digunakan pada penelitian ini bersumber dari laman PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Untuk pengunduhan reseptor dilakukan pada website RSCB PDB (<https://www.rcsb.org/>). Oleh karena itu, jenis data pada penelitian ini adalah data sekunder.

### 3.4 Langkah-Langkah Penelitian

#### 3.4.1 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu berupa perangkat keras (*hardware*) dan perangkat lunak (*software*). Adapun perangkat keras yang digunakan ialah laptop Lenovo ideapad 330 dengan spesifikasi *model name* CO7ML3N, CPU AMD A9-9425 RADEON R5, RAM 8GB, storage 1 TB HDD dan 167 SSD, ODD DVD RW, Display 14,0" HD, dan Battery 2 cell dan mouse merek Banda B100. Sedangkan untuk perangkat lunak yang digunakan berupa sistem operasi *Windows 10 Home* SL, MGLTools 1.5.7 yang dilengkapi dengan *Autodock Tools* 1.5.7, aplikasi *Biovia Discovery Studio Visualizer* 2021, *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>), *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), *KNAPSAck* ([http://www.knapsackfamily.com/knapsack\\_core/top.php](http://www.knapsackfamily.com/knapsack_core/top.php)), *pkCSM* (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/>), *ProTox online tools* ([https://tox-new.charite.de/protox\\_II/](https://tox-new.charite.de/protox_II/)), dan *ERRAT* (<https://saves.mbi.ucla.edu/>).

Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah struktur 3D dua jenis senyawa aktif bunga telang yaitu *genistein* dan *delphinidin 3-(6"-malonyglucoside)* yang datanya didapatkan dari *KNAPSAck* serta hasil dari studi literatur dan untuk pengunduhan strukturnya didapatkan dari *PubChem*, struktur 3D dari reseptor *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) dengan kode 1O86 yang didapatkan dari *Protein Data Bank*, dan struktur 3D dari *lisinopril* sebagai ligan kontrol pada *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE).

#### 3.4.2 Tahap Pencarian dan Pengunduhan Ligan

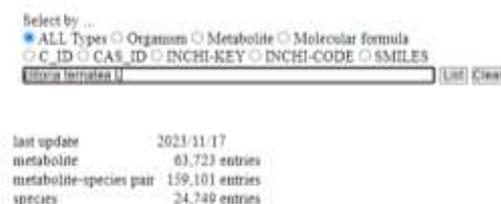
Pencarian ligan pada suatu senyawa dilakukan dengan menggunakan salah satu senyawa yang terkandung dalam bunga telang. Untuk pencarian senyawa aktif tersebut dapat dilakukan menggunakan bantuan *KNAPSAck* ([http://www.knapsackfamily.com/knapsack\\_core/top.php](http://www.knapsackfamily.com/knapsack_core/top.php)) dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Buka atau akses alamat web server *KNAPSAck* pada [http://www.knapsackfamily.com/knapsack\\_core/top.php](http://www.knapsackfamily.com/knapsack_core/top.php) maka akan muncul dari tampilan awal web tersebut seperti pada Gambar 3.1 di bawah ini.



Gambar 3.1 Tampilan awal KNApSack

2. Kemudian masukkan nama ilmiah dari jenis tanaman yang akan dicari senyawa pada kolom pencarian Gambar 3.2, contohnya *Clitoria ternatea* L.



Gambar 3.2 Kolom pencarian senyawa di KNApSack

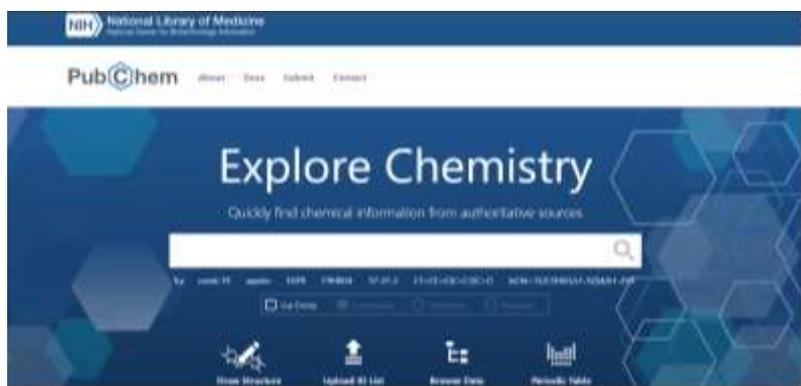
3. Setelah menuliskan nama ilmiah tanaman, lalu klik *List* kemudian akan muncul daftar senyawa aktif yang ada pada *Clitoria ternatea* L. seperti pada Gambar 3.3 di bawah ini.

Gambar 3.3 Tampilan hasil senyawa aktif *Clitoria ternatea* L. di KNApSack

4. Pilihlah salah satu senyawa yang akan digunakan sebagai ligan, kemudian catat senyawa tersebut untuk dilakukan pengunduhan berkas ligan melalui PubChem.

Setelah ligan dari senyawa tersebut diketahui, maka langkah selanjutnya untuk mengunduh berkas ligan melalui laman PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dengan langkah-langkah sebagai berikut:

- 1) Pertama akses alamat website dari PubChem pada <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> seperti Gambar 3.4 di bawah ini.



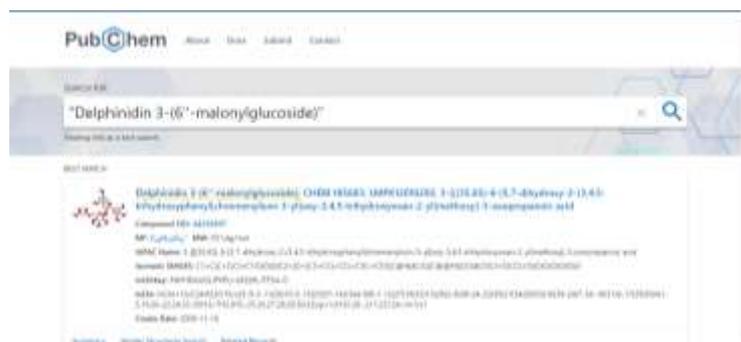
Gambar 3.4 Tampilan awal PubChem

- 2) Langkah selanjutnya yakni dengan memasukkan nama senyawa kimia yang dibutuhkan kemudian ditulis pada menu pencarian lalu tekan enter untuk memulai pencarian seperti Gambar 3.5 di bawah ini.



Gambar 3.5 Kolom pencarian ligan di PubChem

- 3) Hasil dari pencarian akan otomatis terbuka pada halamann web tersebut. Kemudian klik dari hasil yang paling memenuhi kebutuhan atau *best match* untuk dapat membuka informasi secara lebih. Untuk tampilan dapat dilihat pada Gambar 3.6.



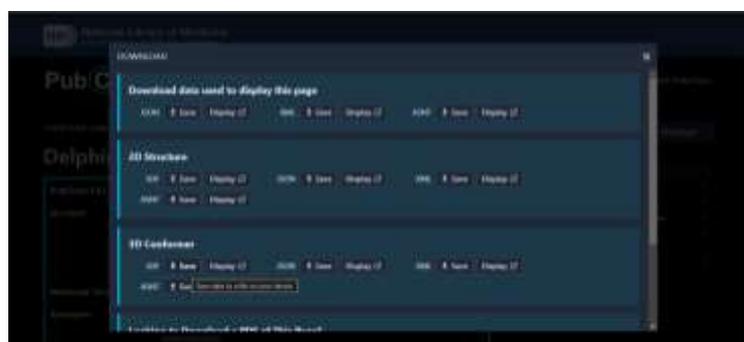
Gambar 3.6 Tampilan hasil pencarian ligan di PubChem

- 4) Langkah selanjutnya, halaman yang berisi data serta informasi lengkap mengenai senyawa tersebut akan terbuka. Berikut tampilan dari data informasi tersebut dapat dilihat pada Gambar 3.7.



Gambar 3.7 Tampilan hasil pencarian *Delphinidin 3-(6''-malonylglucoside)* di PubChem

- 5) Selanjutnya lakukan pengunduhan struktur 3D dengan klik *Dwonload* serta pilih dalam bentuk format *SDF Save* pada kolom *3D conformer* seperti Gambar 3.8 di bawah ini.



Gambar 3.8 Tampilan pengunduhan *Delphinidin 3-(6''-malonylglucoside)* di PubChem

### 3.4.3 Tahap Pencarian dan Pengunduhan Reseptor

Pencarian untuk reseptor ini sudah dilakukan dengan cara studi literatur terhadap jurnal-jurnal yang telah melakukan uji secara *in silico* dengan menggunakan reseptor *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) sebagai anti hipertensi. Dari beberapa jurnal yang sudah dibaca, dapat ditemukan bahwa reseptor *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) tersebut adalah dengan kode PDB ID 1O86. Kemudian reseptor tersebut diunduh dalam bentuk format pdb pada laman RSC PDB dengan langkah-langkah dibawah ini:

- 1) Pertama akses laman <https://www.rcsb.org/> akan terlihat tampilan awal seperti Gambar 3.9 di bawah ini.



Gambar 3.9. Tampilan awal RSCB PDB

- 2) Langkah selanjutnya tuliskan nama protein reseptor pada kolom pencarian, misalnya reseptor yang digunakan pada penelitian ini yaitu **1O86** akan muncul seperti pada Gambar 3.10 di bawah ini.



Gambar 3.10 Pencarian reseptor 1O86 di RSCB PDB

- 3) Kemudian klik *Download Files* lalu pilih file dalam bentuk *PDB Format*. Tampilan Download File seperti pada Gambar 3.11 di bawah ini.



Gambar 3.11 Tampilan download file reseptor 1O86 di RSCB

### 3.4.4 Tahap Preparasi Ligan

Langkah awal yang dilakukan dalam melakukan suatu preparasi ligan adalah dengan membuka file ligan dengan menggunakan bantuan aplikasi *Biovia Discovery Studio Visualizer 2021*. Kemudian klik save as dan kemudian file tersebut disimpan dengan nama file “Ligan” dalam format .pdb. Langkah selanjutnya yang harus dilakukan yaitu melakukan preparasi ligan dengan menggunakan aplikasi Autodock Tools kemudian lakukan langkah-langkah berikut ini:

- a. Klik *ligand* kemudian klik *Input* dan klik *open* untuk membuka file dengan nama *Ligan.pdb*
- b. Klik *edit*, lalu *hydrogen*, lalu klik *add* dan *polar only*
- c. Klik *ligand* kemudian klik *Torsion Tree* dan *Detect Root*
- d. Klik *ligand*, lalu klik *Torsion Tree* dan *Choose Torsion* (klik menu “Make peptide backbone bonds non-rotatable”, lalu klik “Make amide bonds rotatable”, dan klik “Make all active bonds non-rotatable”)
- e. Klik *Ligand*, lalu *Output* dan klik *Save As.pdbqt* kemudian klik tanda O (tanda lingkaran merah).

### 3.4.5 Tahap Preparasi Reseptor

Langkah selanjutnya yaitu preparasi reseptor diawali dengan membuka file reseptor (1O86) pada aplikasi *Biovia Discovery Visualizer 2021*. Kemudian klik *scripts*, lalu *selection*, lalu klik *select water molecules* dan klik *delete*. Setelah itu klik *scripts* kembali, lalu *selection*, lalu *select ligand*, dan klik *delete*. Apabila sudah

selesai maka lakukan save as dengan nama *file* “Reseptor” dalam bentuk format \*.pdb.

Langkah yang harus dilakukan untuk selanjutnya yaitu melakukan preparasi reseptor dengan membuka aplikasi Autodock Tools kemudian lakukan langkah-langkah sebagai berikut ini:

- a. Klik *Grid*, lalu klik *Macromolecule*, lalu klik *Open* untuk membuka file dengan nama *Reseptor.pdb* dan simpan dengan klik *Save As.pdbqt*.
- b. Klik *Edit*, lalu pilih *Hydrogen*, lalu pilih *Add*, dan *Polar Only*.
- c. Klik *Edit*, lalu pilih *Hydrogen* dan *Merge Non Polar*.
- d. Klik *Ligand*, lalu pilih *Input*, kemudian klik *Choose* lalu klik *Ligand* dan *Select Molecule for AutoDock*.

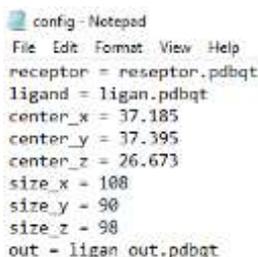
#### 3.4.6 Tahap Penentuan Grid Box

Pada penentuan grid box ini dilakukan untuk proses *docking*. Adapun langkah dalam menentukan grid box dengan cara klik *Grid* kemudian *Grid Box*. Selanjutnya, atur posisi dari grid box hingga menutupi antara ligan dan reseptor. Cara untuk mengaturnya dengan mengatur X center, Y center, Z center, size X, size Y, dan size Z. Kemudian catat angka tersebut untuk dimasukkan ke dalam notepad.

#### 3.4.7 Tahap Pembuatan Notepad

Sebelum melakukan proses *docking*, maka dibutuhkan file notepad yang disimpan dalam bentuk config.txt. Adapun langkahnya sebagai berikut:

- 1) Buka aplikasi Notepad.
- 2) Tuliskan ke dalam Notepad seperti Gambar 3.12 (ukuran grid box dapat disesuaikan dengan kebutuhan).
- 3) Kemudian Save As dengan menggunakan nama *file* config dalam format .txt.
- 4) Tutup aplikasi Autodock Tools untuk melakukan proses *docking*.



```

config - Notepad
File Edit Format View Help
receptor = reseptor.pdbqt
ligand = ligan.pdbqt
center_x = 37.185
center_y = 37.395
center_z = 26.673
size_x = 108
size_y = 90
size_z = 98
out = ligan_out.pdbqt

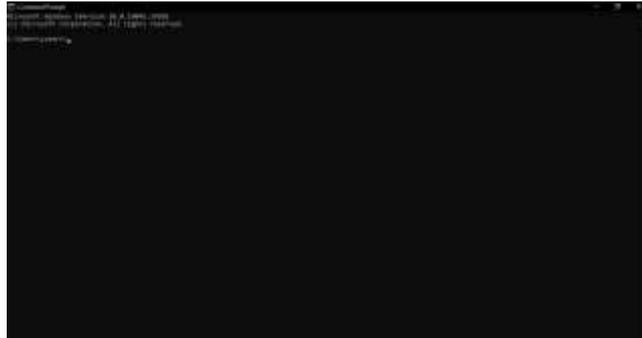
```

Gambar 3.12 Tampilan notepad untuk *docking*

### 3.4.8 Tahap Docking Ligan dan Reseptor

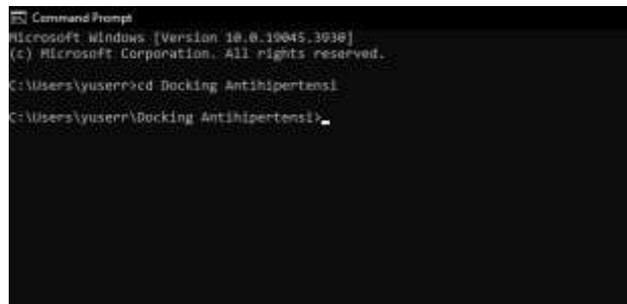
Langkah yang dilakukan untuk melakukan *docking* ligan dan reseptor yaitu dengan menggunakan perintah dari aplikasi Command Prompt sebagai berikut:

- 1) Buka aplikasi Command Prompt. Tampilan awal Command Prompt dapat dilihat pada Gambar 3.13.



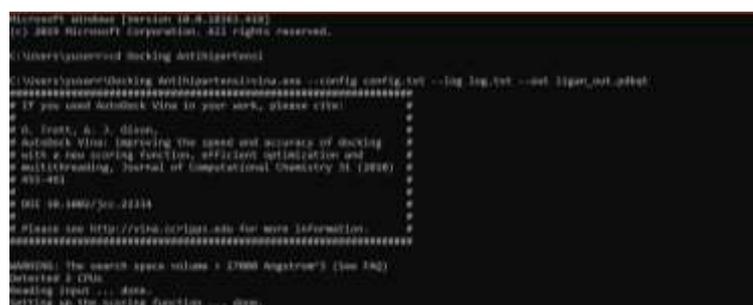
Gambar 3.13 Tampilan command prompt

- 2) Kemudian masukkan perintah **cd** (nama tempat penyimpanan file) lalu tekan Enter. Tampilan akan seperti Gambar 3.14 di bawah ini.



Gambar 3.14 Tampilan setelah enter di Command Prompt

- 3) Masukkan perintah **vina.exe - -config config.txt - -log log.txt - -out ligan\_out.pdbqt** kemudian klik Enter. Pastikan tampilannya seperti Gambar 3.15 di bawah ini.



Gambar 3.15 Proses docking di Command Prompt

- 4) Proses *docking* sudah selesai apabila sudah menunjukkan tampilan seperti pada Gambar 3.16 di bawah ini.



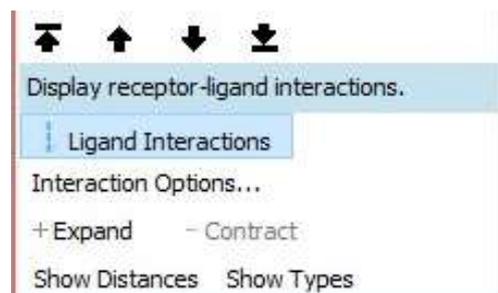
Gambar 3.16 Tampilan setelah selesai docking di Command Prompt

- 5) Buka file *Reseptor.pdb* dan file *ligan\_out.pdbqt* menggunakan *Biovia Discovery Studio Visualizer 2021*. Lalu *copy ligan\_out.pdbqt* ke file *reseptor.pdb*.

### 3.4.9 Tahap Visualisasi Hasil Docking

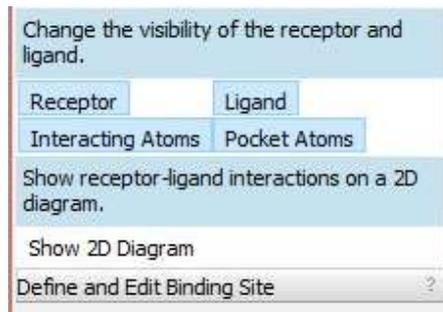
Langkah terakhir yang dilakukan adalah dengan memvisualisasika hasil *docking* dengan menggunakan aplikasi *Biovia Discovery Studio Visualizer 2021* sebagai berikut:

- 1) Pilih *Ligan Interaction* seperti pada Gambar 3.17.



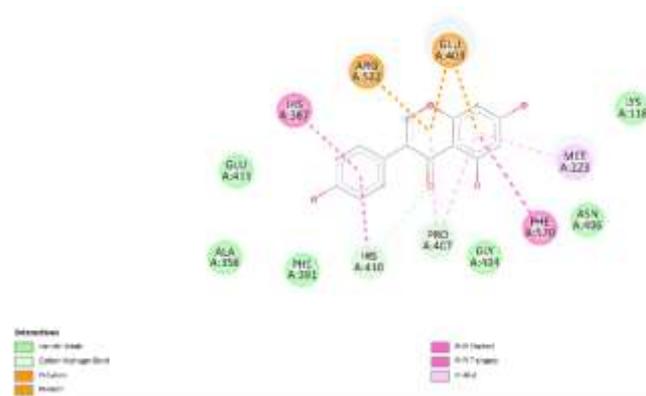
Gambar 3.17 Menu Ligand Interactions di *Biovia Discovery Studio Visualizer 2021*

- 2) Kemudian klik *Show 2D Diagram* seperti pada Gambar 3.18.



Gambar 3.18 Menu Show 2D Diagram di *Biovia Discovery Visualizer 2021*

- 3) Melakukan visualisasi hasil dari *docking* jika sudah selesai. Tampilannya akan seperti pada Gambar 3.19 di bawah ini.



Gambar 3.19 Tampilan hasil visualisasi di *Biovia Discovery Visualizer 2021*

### 3.4.10 Tahap Prediksi Fisikokimia dan Farmakokinetik (ADME)

Prediksi fisikokimia dan farmakokinetik dari salah satu senyawa aktif *Clitoria ternatea* L., dilakukan dengan menggunakan web pkCSM dengan langkah-langkah sebagai berikut:

- 1) Bukalah website pkCSM <https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/prediction> seperti Gambar 3.20 di bawah ini.



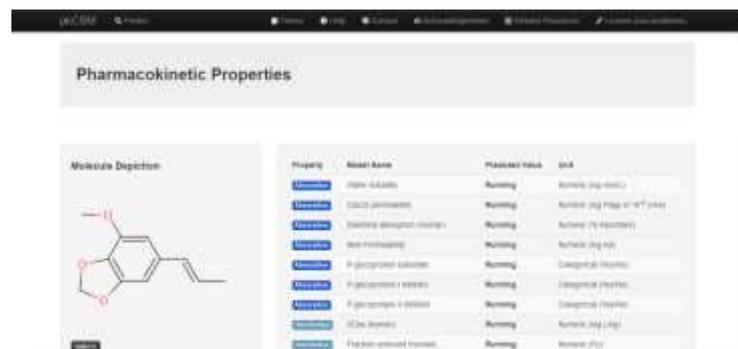
Gambar 3.20 Tampilan pkCSM

- 2) Unggah file SMILE atau salin kode SMILE senyawa yang diinginkan yang sudah didapatkan dari PubChem seperti pada Gambar 3.21 di bawah ini.



Gambar 3.21 Tampilan kolom kode dan file SMILE di pkCSM

- 3) Klik mode prediksi yang di inginkan, misalnya klik **ADMET**, maka akan terlihat tampilan seperti Gambar 3.22 di bawah ini.



Gambar 3.22 Hasil pencarian menggunakan kode SMILE

- 4) Kemudian lakukan scroll ke bawah untuk dapat melihat *Molecule properties* (Gambar 3.23) pada prediksi fisikokimia. Lakukan pencatatan hasil dari molecule properties tersebut sebagai hasil dari prediksi fisikokimia senyawa tersebut. Untuk prediksi farmakokinetik ini dapat dilihat dari parameter yang ada pada sebelah kanan yang sudah ditentukan sebelumnya.



Gambar 3.23 Tampilan hasil dari molecule properties di pkCSM

### 3.4.11 Tahap Prediksi Toksisitas

Prediksi toksisitas ini dilakukan dengan menggunakan web server ProTox dengan langkah sebagai berikut;

- 1) Akses website ProTox pada laman [https://tox-new.charite.de/protox\\_II/](https://tox-new.charite.de/protox_II/) seperti pada Gambar 3.24 di bawah ini.



Gambar 3.24 Tampilan dari Protox

- 2) Pilih *Tox Prediction* untuk melakukan prediksi toksisitas kemudian akan muncul tampilan seperti pada Gambar 3.25.



Gambar 3.25 Tampilan awal dari Tox Prediction

- 3) Masukkan nama senyawa yang didapat di PubChem atau kode SMILES misalkan menggunakan kode SMILES dari senyawa yang digunakan pada kolom pencarian seperti pada Gambar 3.26 lalu tekan search.



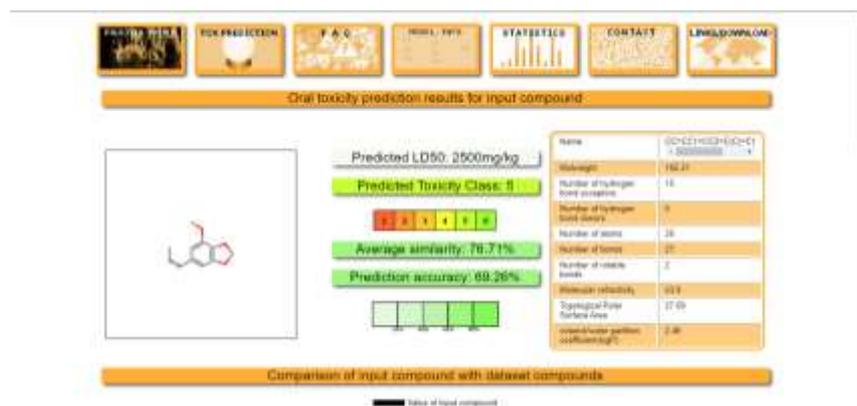
Gambar 3.26 Kolom pencarian Tox Prediction

- 4) Klik *Start Tox-Prediction* (Gambar 3.27) untuk dapat memulai melakukan prediksi toksisitas.



Gambar 3.27 Tampilan untuk melakukan prediksi toksisitas

- 5) Setelah melakukan start tox prediction tidak berselang lama akan menampilkan hasil dari prediksi toksisitasnya. Scroll ke bawah untuk melihat hasil dari prediksi toksisitas seperti pada Gambar 3.28.



Gambar 3.28 Hasil prediksi toksisitas

### 3.5 Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data yang digunakan pada penelitian ini adalah menggunakan studi dokumentasi yang meliputi studi pustaka jurnal-jurnal penelitian, buku-buku, dan *screening* melalui website.

### 3.6 Teknik Analisis Data

Tahap ini akan dilaksanakan setelah mendapatkan hasil *molecular docking* dan prediksi toksisitas secara *in silico* dari senyawa *genistein* dan *delphinidin 3-(6''-malonyglucoside)* sebagai kedua jenis kandungan dari bunga telang dengan reseptor hipertensi *Angiotensin Converting Enzyme (ACE)* dengan kode PDB ID: 1O86. Afinitas dari senyawa *genistein* dan *delphinidin 3-(6''-malonyglucoside)*

dengan reseptor hipertensi *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) dengan kode PDB ID 1O86 akan diukur dari energi afinitas, RMSD (*Root Mean Square Deviation*) dan interaksi ligan dengan protein targetnya (Purwaniati, 2020).

Dalam analisis data untuk prediksi fisikomia menggunakan 5 parameter *Lipinski rule of five* yang terdiri dari berat masa molekul (BM)<500, Logaritma koefisien partisi octanol/air (LogP)<5, hydrogen bond donor (HBD)<5, hydrogen bond acceptor (HBA)<10, dan kesalahan/*violation* < 2 (Wulandari, 2020). Untuk langkah ini menggunakan bantuan software online yaitu pkCSM pada laman (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction>).

Data hasil farmakoninetik ini akan dianalisis secara deskriptif dengan mendeskripsikan nilai senyawa aktif pada web pkCSM yang sesuai dengan indikator ADME (*Absorption, Distribution, Metabolism, dan Excretion*). Sedangkan untuk hasil analisis data guna mengukur tingkat toksisitas menggunakan bantuan web server *Protox online tool* yakni dapat dilihat dari nilai LD50 dan nilai toksisitasnya serta parameter yang digunakan yaitu parameter *ames toxicity* dan *hepatotoxicity* menggunakan *pkCSM online tool* kemudian data yang dihasilkan ini akan dianalisis secara deskriptif (Pires et al., 2015).

Teknik analisis data pada penelitian ini akan dilakukan dengan tiga langkah yang sesuai dengan teknik analisis data pada penelitian kualitatif yaitu:

#### 1) Reduksi Data

Reduksi data merupakan sebuah upaya dalam menyimpulkan data, kemudian memilah-milah data dalam satuan konsep tertentu, kategori tertentu, dan tema tertentu (Rijali, 2019). Pada penelitian ini, penulis memilih data dari jurnal-jurnal penelitian dan screening senyawa dari website resmi yang kemudian dipilah data-data yang sesuai dengan yang dibutuhkan dan digunakan oleh penulis.

#### 2) Penyajian Data

Penyajian data adalah kegiatan untuk menyusun informasi yang akan memberikan adanya penarikan kesimpulan dari hasil penyusunan informasi (Rijali, 2019). Penyajian data yang akan dilakukan oleh penulis yakni berupa penjelasan deskriptif dalam bentuk teks dan tabel.

#### 3) Penarikan Kesimpulan

Penarikan kesimpulan merupakan satu tahap terakhir yang dilakukan oleh penulis dalam upaya melakukan analisis data pada penelitian ini. Pada penarikan kesimpulan ini, penulis akan menyimpulkan hasil dari penyajian data yang sudah,

### **3.7 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Botani, Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Siliwangi. Adapun waktu penelitian ini dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 3. 1. Jadwal Kegiatan Penelitian

No	Kegiatan Penelitian	2023		2024												
		Nov	Des	Jan	Feb	Mar	Apr	Mei	Jun	Jul	Agust	Sept	Okt	Nov	Des	
1	Mendapatkan SK bimbingan skripsi	■														
2	Pengajudan judul penelitian kepada dosen pembimbing dan DBS		■													
3	Menyusun dan melakukan bimbingan proposal			■	■	■										
4	Mengajukan permohonan seminar proposal						■									
5	Seminar proposal							■								
6	Menyempurnakan proposal							■	■							
7	Persiapan penelitian								■							
8	Pelaksanaan penelitian								■	■						
9	Pengolahan data hasil penelitian								■	■	■	■				
10	Seminar hasil penelitian												■			
11	Penyusunan dan bimbingan skripsi												■	■		
12	Sidang skripsi															■
13	Penyempurnaan skripsi													■	■	