

BAB 3

PROSEDUR PENELITIAN

3.1. Metode Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini merupakan kualitatif deskriptif secara *in silico* dengan memanfaatkan data kuantitatif hasil *molecular docking* sebagai dasar penelitiannya. Menurut Sugiyono (2020) penelitian kualitatif merupakan metode penelitian yang berlandaskan pada sifat postpositivisme, biasanya digunakan untuk meneliti pada kondisi objek yang alamiah, dimana peneliti merupakan instrumen kunci dengan teknik pengumpulan data dilakukan secara triangulasi atau gabungan, analisis data pada penelitian ini bersifat induktif/kualitatif dan hasil penelitiannya lebih menekankan pada makna. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini merupakan senyawa metabolit sekunder daun kersen yang diperoleh berdasarkan kajian literatur. Literatur utama yang diacu adalah pengujian UHPLC-MS pada ekstrak metanol daun kersen yang dilakukan oleh (Zakaria et al., 2019). Pengujian secara *in silico* menggunakan aplikasi PyRx, dan *Biovia Discovery Studio Visualizer* 2019. Protein yang digunakan adalah *Angiotensin Converting Enzym* (ACE) (Muchtaridi et al., 2020). Sedangkan senyawa yang akan dikaji adalah golongan flavonoid yaitu yaitu *kaempferol-3-o-galactoside* (Trifolin), *myricetin*, *quercetin-3-o-galactoside* (Hyperoside), *kaempferol-3-O-glucoside* (Astragalin), *quercetin-3-o-glucuronide* (Querciturone), *quercetin*, *quercetin dimer*, *rhamnetin*, *pinobaksin*, *pinocembrin*, *kaempferol*, dan *genistein*, yang diperoleh dari hasil kajian literatur dengan ligan kontrol lisinopril.

3.2. Ruang Lingkup Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, fokus penelitian yang akan dilakukan adalah menganalisis secara *in silico* dengan metode *molecular docking* pada senyawa metabolit sekunder daun kersen dengan reseptor *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) yang menjadi salah satu pemicu hipertensi. Hasil yang kemudian akan dianalisis meliputi afinitas energi, fisikokimia, farmakokinetik, dan tingkat toksisitas senyawa metabolit sekunder daun kersen sebagai antihipertensi. Hal ini bertujuan untuk memaparkan hasil

interaksi yang terjadi sehingga kemudian menghasilkan kesimpulan apakah senyawa metabolit sekunder daun kersen memiliki potensi sebagai antihipertensi atau tidak.

3.3. Sumber Data Penelitian

Data yang dikaji dalam penelitian ini berasal dari dua sumber data, di antaranya:

3.3.1 Sumber Primer

Penelitian ini menggunakan sumber data primer yang berasal dari web Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), analisis sifat fisikokimia dan farmakokinetik pada web SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php#>), prediksi toksisitas pada web Prottox II (<https://tox.charite.de/>), dan simulasi *molecular docking* menggunakan aplikasi PyRx dan *Biovia Discovery Studio Visualizer* 2019 dari senyawa flavonoid terhadap reseptor *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) untuk menjawab pertanyaan penelitian.

3.3.2 Sumber Sekunder

Penelitian ini juga menggunakan sumber data sekunder yang diperoleh dari hasil kajian literatur dari beberapa referensi yang digunakan oleh peneliti terkait kandungan senyawa potensial dalam daun kersen sebagai langkah awal dalam melakukan analisis *in silico*.

3.4. Langkah-langkah Penelitian

Dalam penelitian ini peneliti melewati tiga tahap prosedur penelitian, yaitu:

3.4.1 Tahap Persiapan

Adapun Langkah tahap persiapan dalam penelitian ini di antaranya:

- 1) Memperoleh Surat Keputusan Dekan Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Siliwangi terkait penetapan bimbingan skripsi pada September 2024;
- 2) Mengajukan judul penelitian kepada Dosen Pembimbing I, Dosen Pembimbing II, dan Dewan Bimbingan Skripsi (DBS) pada September 2024;
- 3) Menyusun proposal penelitian dan melaksanakan bimbingan secara berkala dengan Dosen Pembimbing I dan Dosen Pembimbing II pada Bulan September-Oktober 2024;

- 4) Mengajukan permohonan seminar proposal penelitian kepada Dewan Bimbingan Skripsi (DBS) pada Oktober 2024
- 5) Melaksanakan seminar proposal penelitian pada November 2024
- 6) Melakukan perbaikan proposal melalui bimbingan dan konsultasi dengan pembimbing I dan Pembimbing II Pada November 2024
- 7) Mempersiapkan penelitian November s.d. Desember 2024

3.4.2 Tahap Pelaksanaan

3.4.2.1 Alat dan Bahan

Dalam tahap pelaksanaan, peneliti menyiapkan beberapa alat dan bahan yang akan digunakan selama penelitian yang tercantum dalam Tabel 3.1.

Tabel 3. 1 Alat dan Bahan

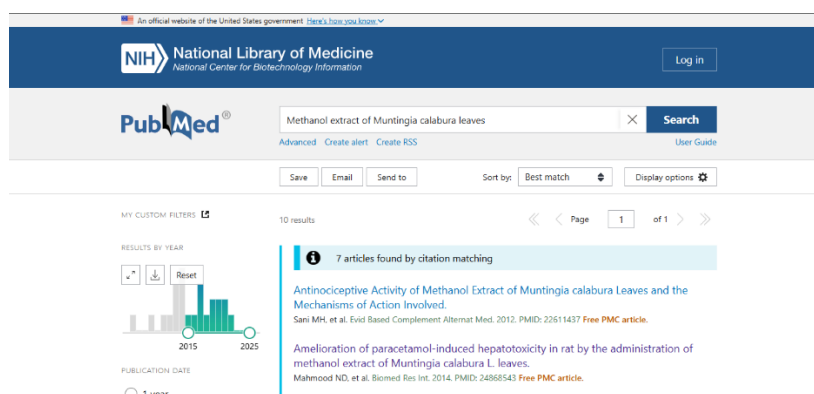
No	Alat dan Bahan	Spesifikasi dan Kegunaan	Jumlah	Gambar
1.	Handphone	Realme C21Y untuk menunjang pengambilan dokumentasi selama penelitian	1 Buah	
2.	Laptop	Asus tipe Sonic Master dengan beberapa <i>hardware</i> dan <i>software</i> pendukung yang digunakan untuk melakukan analisis <i>in silico</i>	1 Unit	
3.	Flavonoid	Salah satu golongan senyawa yang terkandung dalam daun kersen, digunakan sebagai bahan	8 Buah	

		analisis secara <i>in silico</i> sebagai kandidat antihipertensi, dengan rincian quercetin-3-o-glucuronide, kaempferol-3-o-galactoside, myricetin, quercetin-3-o-galactoside, kaempferol-3-O-glucoside, quercetin, quercetin dimer, rhamnetin, pinobaksin, pinocembrin, kaempferol, dan genistein.		
4.	<i>Angiotensin Converting Enzyme (ACE)</i>	Protein target dengan PDB ID: 1O86 sebagai reseptor hipertensi yang menjadi fokus penelitian dan akan diujikan dengan senyawa golongan flavonoid yang ditargetkan.	1 Buah	
5.	PyRx	Versi 0.8, sebagai <i>Software</i> yang digunakan untuk <i>molecular docking</i> .	1 Buah	
7.	<i>Biovia Discovery Studi Visualizer 2019</i>	Versi 2019, sebagai <i>Software</i> yang digunakan untuk melakukan preparasi protein target dan memvisualisasikan	1 Buah	

		hasil <i>molecular docking</i> untuk melihat interaksi antara ligan dan protein dengan tampilan 2D.		
--	--	---	--	--

3.4.2.2 Kajian Literatur terkait Senyawa yang Terkandung dalam Daun Kersen

Proses analisis senyawa yang terkandung dalam daun kersen dilakukan melalui kajian literatur dengan sumber artikel kredibel dari jurnal nasional maupun internasional bereputasi yang melakukan eksperimen dengan berbagai metode seperti pada gambar 3.1.

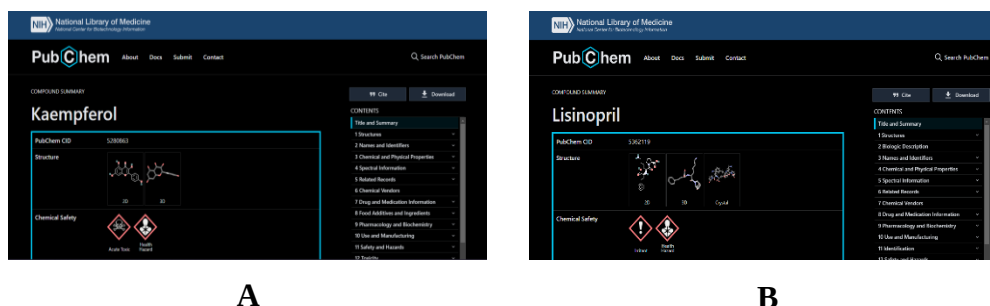


Gambar 3. 1 Pencarian dan Analisis Senyawa Metabolit Sekunder Daun Kersen (Muntingia calabura L.)

Sumber: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

3.4.2.3 Pengunduhan Berkas Ligan Senyawa Metabolit Sekunder dan Lisinopril

Daftar senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun kersen berdasarkan literatur akan dianalisis untuk mengetahui senyawa mana saja yang memiliki potensi sebagai antihipertensi. Proses analisis dimulai dari pencarian senyawa melalui kajian literatur dari berbagai artikel jurnal yang membahas mengenai senyawa yang terkandung dalam daun kersen. Kemudian dilakukan pengunduhan berkas dari senyawa-senyawa tersebut melalui *web server database biologi* <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> seperti pada gambar 3.2 untuk mendapatkan benturuk struktur 3D dalam format SDF.



A

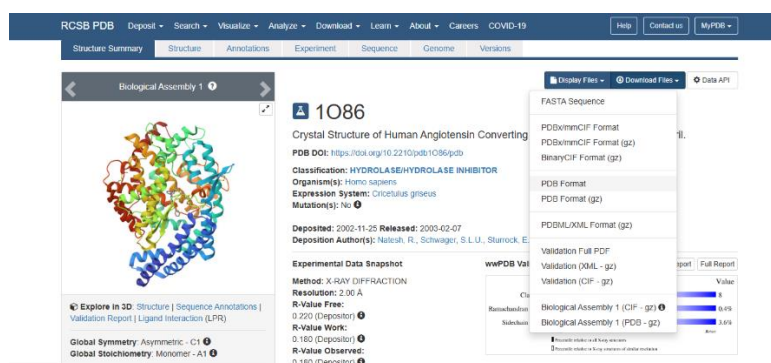
B

Gambar 3. 2 A) Pengunduhan berkas senyawa uji; B) Pengunduhan ligan Kontrol (Lisinopril)

Sumber : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

3.4.2.4 Pengunduhan Berkas Reseptor ACE

Reseptor ACE dicari dengan mengkaji berbagai artikel jurnal yang membahas mengenai mekanisme terjadinya hipertensi atau artikel yang meneliti terkait obat antihipertensi. Kemudian pengunduhan berkas reseptor ACE seperti yang tertera pada gambar 3.3 dilakukan melalui *web server database* biologi <https://www.rcsb.org/> dengan PDB ID : 1O86 untuk mendapatkan bentuk struktur 3D dalam format PDB.



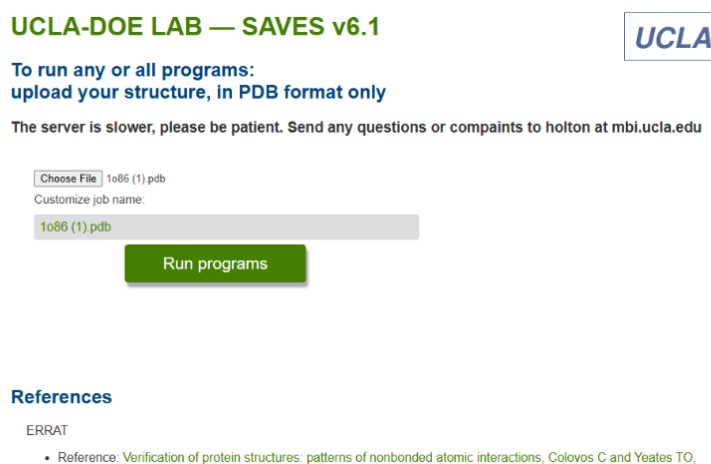
Gambar 3. 3 Pengunduhan Berkas Reseptor ACE

Sumber: <https://www.rcsb.org/>

3.4.2.5 Validasi Protein ACE menggunakan Uji Errat

Berkas reseptor ACE yang telah diunduh kemudian divalidasi protein menggunakan uji Errat pada *webserver* Saves seperti pada gambar 3.4 untuk memverifikasi struktur protein ACE yang akan digunakan dalam penelitian. Uji ini bertujuan untuk memastikan bahwa struktur protein yang diteliti akurat dan

valid untuk menentukan apakah struktur protein yang digunakan telah memenuhi standar kualitas yang ditentukan ataukah belum.

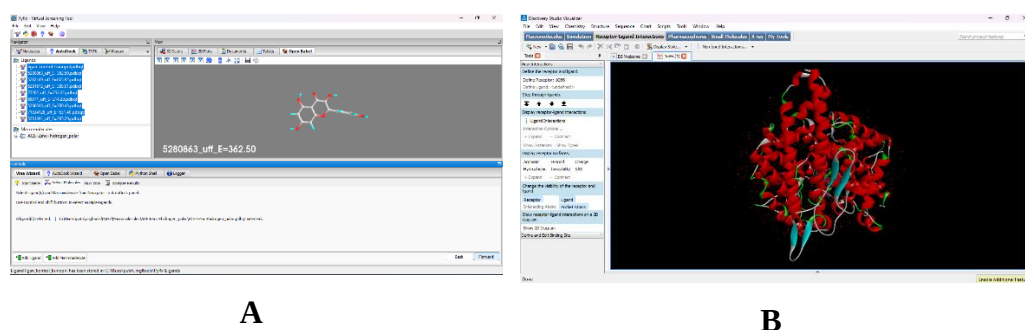


Gambar 3. 4 Uji Validasi Protein ACE

Sumber: <https://saves.mbi.ucla.edu/>

3.4.2.6 Preparasi Ligan dan Reseptor

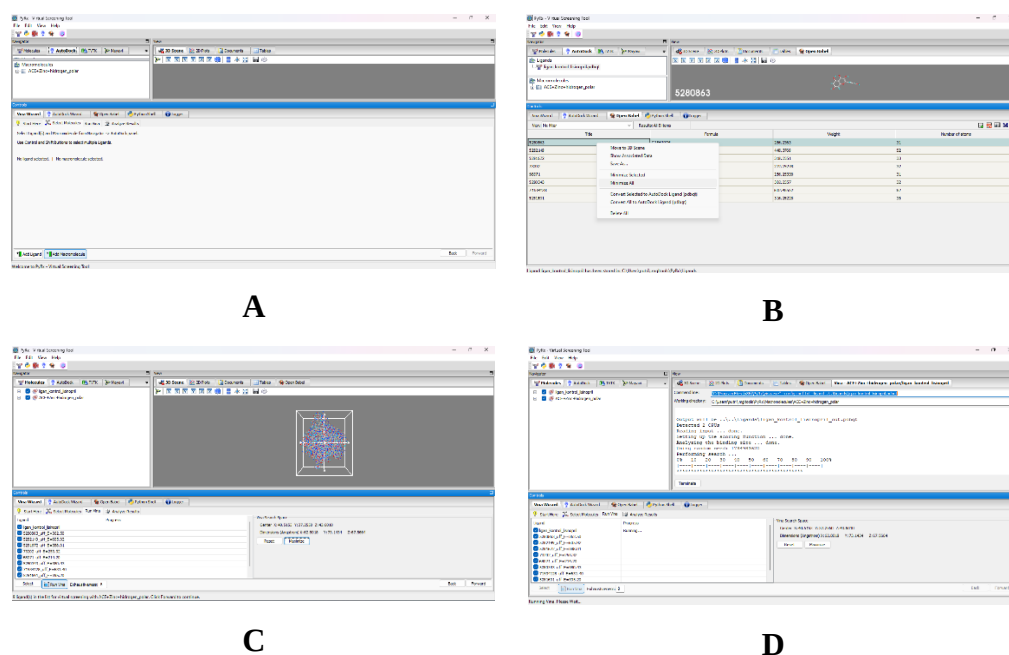
Proses preparasi ligan atau senyawa metabolit sekunder dari daun kersen dilakukan dalam aplikasi PyrRx seperti pada gambar 3.5 dengan cara mengunggah berkas ligan yang sebelumnya telah didapatkan dari Pubchem melalui menu open babel, setelah terunggah klik 1 kali pada nama berkas, klik kanan kemudian pilih *Minimize all*. Sedangkan untuk reseptor ACE dipreparasi melalui aplikasi *Biovia Discovery Studio Visualizer* 2019 dengan cara mengunggah berkas struktur ACE yang sebelumnya didapatkan dari RSCB PDB pada menu file lalu *open*, kemudian gunakan *shortcut* Ctrl+H untuk melihat tampilan bagian-bagian protein, setelah itu klik kanan pada “*water*” dan klik “*cut*” untuk menghilangkan molekul air, hal yang sama dilakukan pada bagian “*ligand groups*” untuk *menghilangkan native ligand* dan “*Hetatm*” untuk menghilangkan molekul yang tidak diinginkan, selain itu hidrogen polar juga ditambahkan melalui menu *Chemistry + Hydrogens + add polar*, hal ini dilakukan untuk meminimalisasi adanya gangguan dalam proses *molecular docking* (tabel 3.5).



Gambar 3. 5 A) Preparasi ligan; B) Preparasi Reseptor (ACE)
Sumber: dokumentasi pribadi

3.4.2.7 Simulasi *Molecular docking* Senyawa Metabolit Sekunder, Lisinopril, dan reseptor ACE

Simulasi *molecular docking* dilakukan dalam aplikasi PyRx (gambar 3.6) dengan langkah pertama yaitu mengunggah berkas ACE yang sebelumnya telah dipreparasi melalui aplikasi *Biovia Discovery Studio Visualizer* 2019 pada menu Vina Wizard, lalu klik start, kemudian unggah berkas reseptor ACE pada menu pilihan *Add Macromolecule*, beralih pada menu open babel dan unggah berkas ligan pada menu *Add* setelah itu klik satu kali pada berkas ligan, klik kanan dan pilih menu *Convert All to Autodock Ligand*. Setelah terunggah kemudian lakukan forward dan pilih menu *maximize* agar ligan, ligan kontrol, dan reseptor ACE berada pada wilayah *grid box*, setelah semuanya masuk dalam wilayah tersebut maka kita hanya perlu memilih menu *forward* kemudian run vina sehingga proses *molecular docking* berlangsung. Setelah proses *molecular docking* selesai maka hasil akan muncul dengan menampilkan skor *binding affinity*, skor tersebut yang kemudian akan dianalisis untuk menarik kesimpulan hasil *molecular docking* nya. Setelah itu hasil *molecular docking* di simpan dalam format PDB untuk dapat divisualisasikan dalam aplikasi *Biovia Discovery Studio Visualizer* 2019.



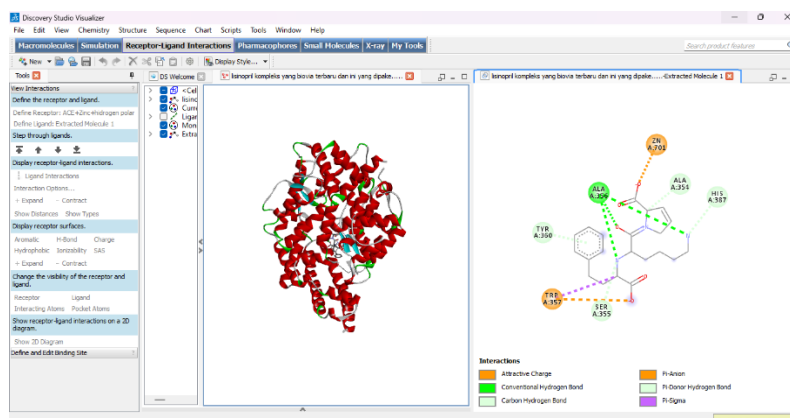
Gambar 3. 6 A) Memasukkan Makromolekul (protein ACE) dan Ligan Kontrol (Lisinopril); B) Memasukkan ligan Uji; C) Mengatur Grid Box ke Maximize; D)

Proses *docking* Senyawa Uji dan Ligan Kontrol dengan protein ACE

Sumber: Dokumentasi pribadi

3.4.2.8 Visualisasi Hasil *docking*

Setelah proses simulasi *molecular docking* selesai, dilakukan visualisasi hasil *docking* seperti pada gambar 3.7 dilakukan dalam aplikasi *Biovia Discovery Studio Visualizer 2019*, pada *Biovia Discovery Studio Visualizer 2019* dilakukan dengan cara mengunggah berkas hasil *docking* yang telah didapatkan dalam format PDB dari menu file lalu klik pilihan open untuk dapat melihat bagaimana ligan dari senyawa metabolit sekunder daun kersen berikatan dengan reseptor ACE pada bagian *binding site* nya. Selain itu dilakukan juga visualisasi dalam bentuk diagram 2D untuk dapat mengetahui ikatan apa saja yang terjadi antara ligan dan reseptor.



Gambar 3. 7 Visualisasi 3D dan 2D Hasil *docking*

Sumber: Dokumentasi pribadi

3.4.2.9 Analisis Fisikokimia dan Farmakokinetik

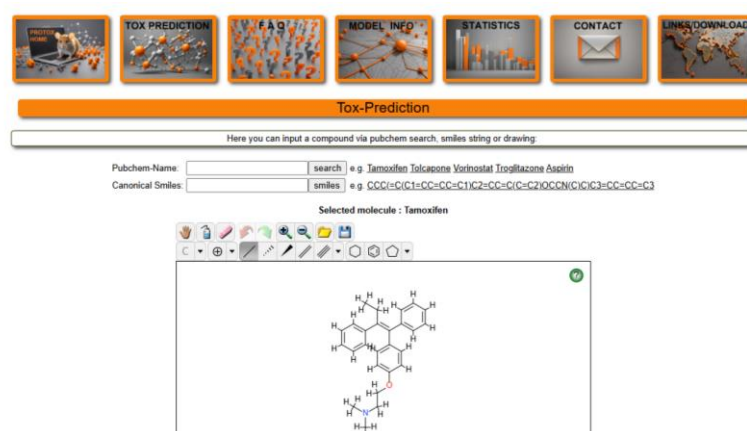
Pada tahapan ini, analisis fisikokimia dan farmakokinetik dilakukan dalam *website* Swiss ADME dengan cara menyalin SMILE senyawa metabolit sekunder dari pubchem kemudian di tempel pada laman Swiss ADME dalam halaman klik menu ‘Run’ (gambar 3.8) kemudian hasil fisikokimia dan farmakokinetik akan muncul dan dapat dianalisis. Selain sifat fisikokimia dan farmakokinetiknya, terdapat juga tampilan *Lipophilicity*, *Druglikeness*, dan *Water Solubility* yang dapat dianalisis untuk memperkuat prediksi keamanan senyawa sebelum dijadikan kandidat obat.

Gambar 3. 8 Analisis Prediksi Sifat Fisikokimia dan Farmakokinetik

Sumber: <http://www.swissadme.ch/>

3.4.2.10 Prediksi Toksisitas

Tahap prediksi toksisitas dapat dilakukan dalam web protox II dengan cara memasukkan SMILE senyawa metabolit sekunder seperti web Swiss ADME pada tahap sebelumnya (gambar 3.9). Terdapat beberapa pilihan menu yang dapat dipilih untuk mengetahui prediksi toksisitas senyawa, dalam penelitian ini, memilih opsi Organ Toxicity dan *Toxicity end point*. Dalam web ini utamanya menampilkan tingkatan toksisitas dan nilai *predicted* LD50.



Gambar 3.9 Prediksi Toksisitas Senyawa Uji

Sumber: <https://tox.charite.de/>

3.4.3 Tahap Akhir

- 1) Mengolah data yang diperoleh dari hasil analisis *in silico* pada Januari s.d 2025;
- 2) Menyusun hasil, pembahasan, simpulan dan saran pada skripsi dari hasil penelitian dan melaksanakan bimbingan dengan Dosen Pembimbing I dan Dosen Pembimbing II pada Februari s.d Maret 2025;
- 3) Mengajukan permohonan seminar hasil kepada DBS Pada Maret 2025;
- 4) Melaksanakan seminar hasil penelitian Pada Maret 2025;
- 5) Memperbaiki dan mengonsultasikan skripsi berdasarkan seminar hasil melalui bimbingan dengan Dosen Pembimbing I dan Dosen Pembimbing II Pada Maret s.d April 2025;
- 6) Mengajukan permohonan ujian skripsi kepada Sekretaris Jurusan pada April 2025;

- 7) Melaksanakan ujian skripsi dan pengumuman kelulusan pada April 2025;
- 8) Menyempurnakan skripsi berdasarkan hasil ujian skripsi dan mengonsultasikannya dengan Dosen Pembimbing I dan Dosen Pembimbing II pada April 2025;
- 9) Mencetak skripsi pada Mei 2025.

3.5. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data yang diterapkan dalam penelitian ini adalah teknik dokumentasi yang didapatkan dari studi literatur, *screening database* biologi melalui *website*, dan teknik *in silico*. Menurut sugiyono (2020) dokumen dalam teknik pengumpulan data dalam penelitian kualitatif merupakan catatan peristiwa yang telah dilakukan, dapat berupa tulisan, gambar, ataupun karya monumental yang ditulis oleh seseorang.

3.6. Teknik Analisis Data

Teknik analisis data yang digunakan dalam penelitian ini merupakan analisis secara deskriptif hasil dari simulasi *molecular docking* menggunakan aplikasi *Biovia Discovery Studio Visualizer* 2019 dan PyRx, analisis sifat fisikokimia dan farmakokinetik dengan menggunakan parameter *Lipinski's rule of five* dan ADME, dan juga uji prediksi toksisitas menggunakan *Webserver* *protox II online tools* dari senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun kersen (*Muntingia calabura* L.) terhadap salah satu reseptor penyakit hipertensi yaitu *Angiotensin Converting Enzym* (ACE). Analisis dilakukan dengan menggunakan ligan kontrol berupa Lisinopril.

Dalam analisis *in silico*, hasil *molecular docking* dapat dilihat dalam energi ikatan dan jenis ikatan antara senyawa dengan protein target, dalam penelitian ini, protein target berupa *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE). Energi ikatan yang terbentuk digunakan untuk melakukan analisis afinitas antara ligan dengan ACE, Semakin negatif energi ikatan yang dihasilkan maka ikatannya semakin kuat dan stabil (Utari et al., 2021). Kemudian hasil energi ikatan antara ligan (senyawa metabolit sekunder) dengan ACE akan dibandingkan dengan energi ikatan lisinopril sebagai *native ligand* untuk dapat mengetahui apakah ligan yang digunakan memiliki potensi sebagai ACE *Inhibitor*. Selain itu dilakukan

juga analisi terhadap nilai RMSD (*Root Mean Square Distance*) yang merupakan parameter validasi metode *molecular docking* , menurut susanti dalam (Utari et al., 2021) hasil *molecular docking* akan dinyatakan valid saat nilai RMSD $\leq 3,0$.

Analisis data dalam penelitian kualitatif menurut (Sugiyono, 2020) merupakan proses pencarian dan penyusunan data secara sistematis yang sebelumnya diperoleh dari hasil wawancara, catatan lapangan, dan dokumentasi. Analisis data dilakukan dengan cara mengorganisasikan data ke dalam beberapa kategori, menjelaskan kedalam beberapa unit, melakukan sintesa, menyusun ke dalam pola, memilih data mana yang penting dan akan dipelajari, dan menarik kesimpulan yang memungkinkan data tersebut mudah dipahami oleh diri sendiri maupun orang lain.

Teknik analisis data yang akan dilakukan dalam penelitian ini meliputi tiga langkah utama yang mengacu pada teknik analisis data dalam penelitian kualitatif model Miles and Huberman dalam (sugiyono, 2020) di antaranya reduksi data, penyajian data, dan penarikan kesimpulan.

3.6.1 Reduksi data

Reduksi data adalah aktivitas memilih hal pokok, merangkum, dan fokus mencari hal yang penting untuk mencari tema dan pola nya. Dalam penelitian ini data yang diperoleh berasal dari artikel hasil studi literatur kemudian ditentukan data yang akan dipilih untuk dikaji dalam penelitian.

3.6.2 Penyajian data

Penyajian data adalah aktivitas penyusunan data dari hasil reduksi yang sebelumnya telah dilakukan. Dalam penelitian kualitatif penyajian data dapat dilakukan dengan menyantumkan teks naratif, matrik, grafik, jejaring kerja, dan diagram. Dalam penelitian ini penulis akan menyajikan data dalam bentuk teks naratif dan dilengkapi dengan tabel maupun dokumentasi.

3.6.3 Penarikan Kesimpulan

Penarikan kesimpulan dalam penelitian merupakan tahap akhir yang dilakukan. Data yang telah diperoleh dari tahap sebelumnya selama penelitian akan disimpulkan oleh penulis. Kesimpulan dalam penelitian kualitatif merupakan

temuan baru yang belum pernah ada sebelumnya. Temuan tersebut dapat disampaikan dalam bentuk deskripsi atau gambaran suatu objek yang pada awalnya belum jelas menjadi jelas, dapat dituangkan berupa hubungan interaktif, hipotesis, ataupun teori (Sugiyono, 2020).

3.7. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Botani, Jurusan Pendidikan Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan pada bulan Desember 2024. Adapun rincian waktu penelitian terlampir pada tabel 3.2.

Tabel 3. 2 Jadwal Kegiatan Penelitian

No	Uraian Kegiatan	September				Oktober				November				Desember				Januari				Februari				Maret				April			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1.	Mendapatkan SK Dosen Pembimbing																																
2.	Mengonsultasikan Topik Penelitian																																
3.	Mengajukan Judul Penelitian Kepada Dosen Pembimbing dan DBS																																
4.	Menyusun dan Melakukan Bimbingan Proposal																																
5.	Seminar Proposal																																
6.	Menyempurnakan Proposal Penelitian																																
7.	Melakukan Pengujian <i>In silico</i>																																
8.	Mengolah dan Menyusun Hasil Pengujiamn <i>In silico</i>																																

