

BAB 3

PROSEDUR PENELITIAN

3.1 Metode Penelitian

Penelitian ini menerapkan pendekatan deskriptif kuantitatif untuk mendeskripsikan hasil analisis *in silico* yang menunjukkan interaksi antara senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam tanaman Putri Malu (*Mimosa pudica* L.) sebagai kandidat antikanker paru-paru. Analisis dilakukan melalui komputasi *in silico* menggunakan metode penambatan molekul dan dinamika molekul, berdasarkan senyawa yang didapatkan dari kajian literatur beberapa artikel dengan *Epidermal Growth Factor Receptor/EGFR* (PDB ID: 3W33) (Kawakita et al., 2013).

3.2 Variabel Penelitian

3.2.1 Variabel Bebas

Pada penelitian ini menggunakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman *Mimosa pudica* L.

3.2.2 Variabel Terikat

Aktivitas antikanker yang dinilai berdasarkan afinitas energi ikatan senyawa terhadap *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR), serta parameter farmakokinetik dan toksisitas senyawa.

3.2.3 Variabel Kontrol

Obat gefitinib digunakan sebagai pembanding, dengan analisis energi pengikatan dan jenis interaksinya terhadap reseptor EGFR (PDB ID: 3W33). Gefitinib dipilih karena merupakan inhibitor tirosin kinase yang telah terbukti efektif secara klinis dalam menghambat aktivitas EGFR pada kanker paru-paru (Oktavia et al., 2022).

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi mencakup stigmasterol, sitosterol, quercetin, betulinic acid, myricetin, β -sitosterol- β -D-glucoside, ergosteryl acetate, dan mimosine yang telah teridentifikasi pada tanaman *Mimosa pudica* L. berdasarkan literatur ilmiah yang sudah dianalisis berpotensi sebagai antikanker dalam tanaman tersebut.

3.3.2 Sampel

Sampel diambil dari senyawa-senyawa metabolit sekunder yang dipilih dari populasi berdasarkan hasil analisis *in silico* terhadap EGFR (PDB: 3W33). Pemilihan sampel dilakukan dengan memilih senyawa yang menunjukkan nilai energi pengikatan (*binding affinity*) terbaik, interaksi molekuler yang kuat, dan potensi aktivitas antikanker terhadap EGFR.

3.4 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah dengan menggunakan pendekatan *in silico*. Penelitian ini bertujuan untuk mendeskripsikan potensi senyawa bioaktif dari *Mimosa pudica* L. dalam menghambat aktivitas reseptor EGFR yang terkait dengan kanker paru-paru. Langkah-langkah penelitian melibatkan pemilihan dan pengumpulan data senyawa bioaktif dari *database* kimia dan literatur, pemrosesan data reseptor EGFR dari Protein Data Bank (PDB), simulasi *docking* molekular untuk menentukan afinitas pengikatan senyawa terhadap reseptor, dinamika molekul untuk mengetahui interaksi senyawa dengan protein target dalam kondisi dinamis seperti di dalam tubuh, serta analisis farmakokinetik dan toksisitas menggunakan pkCSM untuk memprediksi keamanan dan efektivitas senyawa. Desain ini dipilih karena efisien dalam mengidentifikasi senyawa kandidat obat dengan biaya dan waktu yang lebih rendah dibandingkan metode eksperimental laboratorium.

3.5 Langkah-Langkah Penelitian

3.5.1 Alat dan Bahan

3.5.1.1 Alat untuk Pengujian *In Silico*

Alat yang digunakan untuk penelitian ini terdiri dari perangkat keras dan perangkat lunak. Perangkat keras yang digunakan yaitu Laptop Lenovo dengan Prosesor AMD A9-9425 RADEON R5, 5 COMPUTE CORES 2C+3G, 3.10 GHz, RAM 4 GB, Sistem operasi Windows 10 64-Bit. Adapun untuk perangkat lunak yang digunakan adalah AutodockTools versi 1.5.7, Desmond dengan lisensi akademik (D.E. Show Research, New York), Discovery Studio Visualizer 2021 Client dari Biovia versi 21.1.0.20298, Molegro Molecular Viewer (MMV) versi 2019.7.7 dan Avogadro v1.99.0. Selain itu, menggunakan perangkat lunak dengan basis *server web* diantaranya Protein Data Bank (PDB) dari *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics* (RSCB) <https://www.rcsb.org/>, *Protein Structure Analysis and Verification SAVES* dari *Institute for Genomics and Proteomics US Department of Energy Office of Science* versi 6.0 <https://saves.mbi.ucla.edu/>, PubChem dari *National Institutes of Health* (NIH) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, *Small-molecule pharmacokinetics prediction pkCSM* dari *Bio21 Institute University of Melbourne* <https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsml/prediction>, dan *Lipinski's Rule of Five* dari *Supercomputing Facility For Bioinformatics and Computational Biology* (SCFBio) <http://www.scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp>.

3.5.1.2 Bahan untuk Pengujian *In Silico*

Senyawa yang digunakan sebanyak 8 senyawa yang diambil dari beberapa artikel (Tabel 3.1). Adapun daftar nama senyawa yang sudah ditemukan adalah sebagai berikut.

Tabel 3.1.Daftar Nama Senyawa Metabolit Sekunder *Mimosa pudica* L.

No.	Nama Senyawa	Referensi
1.	Stigmasterol	(Dinda et al., 2006), (Tasnuva et al., 2019), (Zhang et al., 2022)
2.	Sitosterol	(Josewin et al., 1999), (Dinda et al., 2006), (Novotny et al., 2017)
3.	Quercetin	(Tasnuva et al., 2019), (Zheng et al., 2012)
4.	Betulinic acid	(Dinda et al., 2006), (Das et al., 2016)
5.	L-Mimosine	(Parmar et al., 2015)
6.	Myricetin	(Lobstein et al., 2002)
7.	Ergosteryl acetate	(Gopinath et al., 2020)
8.	β -sitosterol- β -D-glucoside	(Josewin et al., 1999), (Shehawy et al., 2022)

3.5.2 Analisis *In Silico*

3.5.2.1 Identifikasi Reseptor Target

Pemilihan reseptor dilakukan berdasarkan kriteria parameter pada Plot Ramachandran, yaitu dengan memastikan nilai *disallowed regions* kurang dari 0,8%. Kemudian, dilakukan analisis profil kualitas reseptor menggunakan metode ERRAT dengan memasukkan kode PDB pada situs <https://saves.mbi.ucla.edu/>. Kualitas ERRAT dievaluasi dalam bentuk persentase, di mana reseptor dengan nilai di bawah 95% dianggap kurang layak untuk digunakan.

3.5.2.2 Penyiapan Reseptor

Reseptor kanker paru-paru (EGFR/*Epidermal Growth Factor Reseptor*) dengan kode PDB 3W33 (Kawakita et al., 2013) diambil dari Protein Data Bank melalui situs (<http://www.rcsb.org/>) dan diunduh dalam format .pdb. Tahap berikutnya melibatkan penghapusan molekul air dan konformer, diikuti dengan

pemisahan reseptor dari ligan alaminya menggunakan aplikasi Molegro Molecular View. Setelah itu, reseptor dan ligan disiapkan dengan penambahan atom hidrogen serta muatan menggunakan aplikasi Discovery Studio 2021 Client, kemudian hasilnya disimpan kembali dalam format .pdb.

3.5.2.3 Penyiapan Ligan Senyawa Uji

Ligan yang akan diuji diunduh dari situs *web* PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dalam format 2D .sdf. Proses penyiapan ligan dilakukan melalui dua tahap utama. Tahap pertama, ligan dibersihkan dalam format 2D, diprotonasi pada pH 7,4 (pH darah), dan disimpan dalam format .pdb. Tahap kedua, dilakukan minimalisasi energi ligan dengan penyesuaian konformasi menggunakan medan gaya MMFF94 (Merck Molecular Force Field), lalu hasilnya disimpan kembali dalam format .pdb. Seluruh proses ini dilakukan menggunakan perangkat lunak Avogadro.

3.5.2.4 Validasi Penambatan Molekul

Metode ini divalidasi dengan cara menambatkan kembali ligan alami ke sisi aktif reseptor yang telah dipisahkan sebelumnya. Setiap reseptor diberi *grid box* yang ukurannya dan koordinatnya disesuaikan dengan ligan alami tersebut. Hasil yang diperoleh diukur menggunakan *Root Mean Square Deviation* (RMSD), yang dinyatakan dalam satuan angstrom (Å). Penambatan molekul dianggap valid jika nilai RMSD yang diperoleh kurang dari 2Å. Proses ini dilakukan menggunakan aplikasi AutoDockTools.

3.5.2.5 Penambatan Molekul

Penambatan senyawa uji dilakukan dalam dua tahap. Tahap pertama adalah skrining virtual untuk mengidentifikasi dan memilih molekul potensial yang cenderung berikatan atau berinteraksi dengan reseptor target. Hasil yang diperoleh kemudian diurutkan berdasarkan energi ikatan, dan 3 senyawa dengan energi ikatan terendah dipilih untuk reseptor menggunakan AutoDockTools dengan algoritma Lamarckian GA pada setiap penambatan, dengan setiap penambatan menghasilkan 150 konformasi. Hasil yang dianalisis dalam prosedur ini meliputi nilai energi ikatan bebas atau ΔG (dalam satuan kkal/mol) dan nilai konstanta inhibisi (K_i).

3.5.2.6 Analisis dan Visualisasi Hasil Penambatan Molekul

Interaksi ligan dengan reseptor dalam bentuk 2D dan 3D dapat dinyatakan melalui visualisasi hasil penambatan. Sebagai sebuah hasil, posisi dari konformasi ligan-reseptor dengan energi ikatan bebas terendah didapatkan dan dibuat dalam bentuk .pdb. Visualisasi dilakukan menggunakan perangkat lunak Discovery Studio.

3.5.2.7 Dinamika Molekul

Dinamika molekul dilakukan menggunakan perangkat lunak Desmond. Kriteria utama dalam pemilihan kompleks protein-ligan terbaik adalah energi ikatan terendah. Perhitungan energi ikatan dilakukan dengan menggunakan medan gaya energi bebas semi-empiris yang mencakup desolvasi berbasis muatan dan penambatan berbasis *grid*. Medan gaya yang dipilih didasarkan pada model termodinamika yang komprehensif, yang memungkinkan penggabungan energi antar molekul untuk menghasilkan prediksi energi ikat. Ketiga reseptor menjalani simulasi dinamika molekul dengan senyawa tanaman *Mimosa pudica* L. terbaik yang diperoleh dari penambatan molekul, untuk mempelajari stabilitas senyawa tersebut pada masing-masing reseptor.

Simulasi menggunakan model air TIP3P (*Transferable Intermolecular Potential 3-Point*) karena tidak mempengaruhi fitur termodinamika zat terlarut, seperti struktur konformer yang stabil secara termodinamika, tetapi dapat mengurangi hambatan antara keadaan tersebut, mempercepat kinetika, dan meningkatkan pengambilan sampel dalam simulasi, serta menambahkan NaCl 0,15 M untuk menyerupai konsentrasi ionik fisiologis. Minimalisasi energi dilakukan selama 100 ps. Dinamika molekul dijalankan selama 100 ns pada suhu 300 K dan tekanan standar 1,01325 bar, menggunakan *orthorhombic box* dengan dimensi *buffer* 10Åx10Åx10Å dan ensemble NPT (*Isothermal–isobaric*) untuk menentukan keadaan termodinamika sistem yang disimulasikan.

3.5.2.8 Skrining Kemiripan Obat Berbasis Ligan (*Drug Scan*)

Analisis *drug scan* dilakukan pada senyawa terbaik yang telah melewati tahap penambatan molekul dan dinamika molekul. Tujuan analisis ini adalah untuk mengevaluasi apakah senyawa kimia dengan aktivitas farmakologi atau biologis memiliki sifat kimia dan fisika yang memungkinkan senyawa tersebut menjadi obat

yang efektif dan dapat diterima secara oral oleh manusia, sesuai dengan aturan *Lipinski's Rule of Five*. Proses ini dilakukan melalui situs web <http://www.scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp>. Senyawa-senyawa dari *Mimosa pudica* L. yang memiliki energi bebas lebih rendah dibandingkan ligan alami akan dipindai berdasarkan aturan Lipinski. Aturan ini mencakup lima kriteria, yang mana minimal dua di antaranya harus dipenuhi untuk dapat dianggap sebagai calon obat. *Lipinski's Rule of Five* mencakup: massa molekul <500 dalton, lipofilitas tinggi ($\text{LogP} < 5$), refraksi molar antara 40-130, memiliki <5 donor ikatan hidrogen, dan <10 akseptor ikatan hidrogen.

3.5.2.9 Prediksi Profil Farmakokinetik dan Toksisitas

Sifat farmakokinetik yang diprediksi meliputi absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, serta prediksi toksisitas dari senyawa *Mimosa pudica* L. menggunakan alat yang tersedia di situs web pkCSM <https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/prediction>. Format senyawa yang digunakan untuk prediksi harus diubah terlebih dahulu ke dalam format SMILES.

3.6 Teknik Pengumpulan Data

Penelitian kuantitatif merupakan metode yang berfokus pada pengumpulan dan analisis data dalam bentuk angka dan ukuran numerik. Pendekatan ini bertujuan untuk mendeskripsikan, menjelaskan, serta menguji hubungan antar variabel dengan memanfaatkan analisis statistik. Penelitian kuantitatif memiliki ciri-ciri berupa pendekatan yang sistematis, penggunaan alat ukur yang telah distandarkan, pengumpulan data dalam bentuk angka, serta analisis statistik untuk memvalidasi dan menjawab pertanyaan penelitian. Metode ini juga biasanya melibatkan sampel yang mewakili populasi dan menerapkan desain penelitian yang terkontrol. Dalam penelitian kuantitatif, teknik pengumpulan data berupa eksperimen analisis interaksi senyawa terhadap protein target. Metode-metode ini dirancang untuk mengumpulkan data dalam bentuk numerik atau statistik yang memungkinkan analisis secara kuantitatif. Dengan pendekatan ini, dapat mengevaluasi hubungan antarvariabel, menguji hipotesis, dan menghasilkan kesimpulan berdasarkan data yang objektif dan terukur (Ardiansyah et al., 2023).

3.7 Instrumen Penelitian

Penelitian ini menggunakan instrumen berupa perangkat keras (Laptop), perangkat lunak (PDB, PubChem, SAVES, MMV, Avogadro, Biovia Discovery Learning, AutoDock Tools, Desmond, *Lipinski's rule of five*, dan pkCSM), serta basis data yang mendukung analisis *in silico* berupa artikel sumber referensi.

3.8 Teknik Pengolahan dan Analisis Data

3.8.1 Pengolahan Data

Data hasil simulasi *docking* molekular diproses menggunakan perangkat lunak Discovery Studio untuk mengidentifikasi pose pengikatan, lokasi pengikatan, serta nilai afinitas (*binding affinity*). Selanjutnya, fisikokimia senyawa dianalisis menggunakan lima parameter dari *Lipinski's Rule of Five*, seperti massa molekul (<500 dalton), $\log P < 5$, dan jumlah donor serta akseptor ikatan hidrogen. Kemudian, prediksi farmakokinetik dilakukan menggunakan pkCSM, dengan mengukur ADMET (*Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity*).

3.8.2 Analisis Data

Penelitian ini melibatkan pengumpulan data yang diikuti dengan analisis data secara berkelanjutan hingga mencapai titik jenuh, sebagaimana dijelaskan oleh model analisis data Miles dan Huberman (Sugiyono, 2013). Lalu dilakukan analisis data dengan langkah-langkah sebagai berikut:

3.8.2.1 Reduksi Data

Tahap ini mencakup proses merangkum data dengan cara memilih dan memfokuskan informasi utama yang relevan serta penting. Langkah ini bertujuan untuk menemukan tema atau pola yang signifikan. Dalam penelitian kuantitatif deskriptif ini, data utama yang diperlukan meliputi pemanfaatan tanaman *Mimosa pudica* L. serta hasil analisis biologi komputasi. Data komputasi diperoleh menggunakan perangkat lunak Discovery Studio untuk mengidentifikasi pose pengikatan, lokasi pengikatan, serta afinitas pengikatan. Data tersebut perlu dirangkum atau dibatasi agar analisis lebih terfokus dan tidak meluas.

3.8.2.2 Penyajian Data

Setelah melalui tahap reduksi, data disajikan dalam berbagai format seperti diagram, tabel, grafik, atau penjelasan naratif. Penyajian ini membantu dalam memberikan gambaran yang jelas tentang hasil penelitian, sehingga memudahkan proses analisis dan interpretasi.

3.8.2.3 Penarikan Kesimpulan

Langkah terakhir adalah menyimpulkan data yang telah dianalisis. Kesimpulan dibuat setelah seluruh tahap analisis selesai, dengan tujuan mengungkapkan temuan yang baru dan orisinal. Temuan ini harus didukung oleh data valid dan konsisten, sehingga menghasilkan kesimpulan yang dapat dipercaya serta relevan dengan tujuan penelitian.

3.9 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Botani Universitas Siliwangi dalam pengujian secara *in silico*. Adapun untuk waktu yang digunakan pada keseluruhan kegiatan penelitian dijelaskan dalam Tabel 3.2 berikut ini

Tabel 3.2.Jadwal Kegiatan Penelitian

No.	Nama Kegiatan	2024				2025						
		Sep	Okt	Nov	Des	Jan	Feb	Mar	Apr	Mei	Juni	Juli
1.	Menerima SK dari Dekan FKIP											
2.	Pengajuan dan Persetujuan Judul											
3.	Penyusunan dan Bimbingan Proposal											
4.	Seminar Proposal Penelitian											
5.	Revisi Proposal Penelitian											
6.	Melakukan Pengujian <i>In Silico</i>											
7.	Mengolah dan Menyusun Hasil Pengujian <i>In Silico</i>											
8.	Pengolahan Data											
9.	Submit Artikel											
10.	Seminar Hasil Penelitian											
11.	Revisi Hasil Penelitian											
12.	Sidang Skripsi											
13.	Revisi Skripsi											