

BAB 3

PROSEDUR PENELITIAN

3.1 Metode Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *in silico screening* dengan analisis deskriptif kuantitatif menggunakan metode *molecular docking*. Sampel pada penelitian ini yaitu senyawa metabolit sekunder daun harendong (*M. malabathricum*) yang diperoleh dari kajian literatur hasil pengujian ekstrak daun harendong baik secara GCMS (*Gas Chromatography – Mass Spectrometry*), HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) maupun LCMS (*Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*) dengan 8 referensi utama (tabel 2.2). Dari delapan referensi tersebut, diperoleh 93 jenis senyawa metabolit sekunder berbeda yang terkandung dalam daun *M. malabathricum* dengan 13 senyawa potensial sebagai anti tuberkulosis dan kerap muncul dua sampai lima kali dari delapan referensi tersebut diantaranya yaitu *gallocatechin*, *epigallocatechin*, *catechin*, *caffeic acid*, *quercetin*, *p-coumaric acid*, *betulinic acid*, *kaempferol*, *gallic acid*, *ursolic acid*, *ellagic acid*, *digiprolactone* dan *myricetin*. Protein target yang digunakan adalah InhA (*Enoyl-ACP reductase*) (PDB: 5W07) dengan senyawa kontrol isoniazid (Capela *et al.*, 2023; Putra *et al.*, 2024). Proses *in silico* dilakukan dengan aplikasi Pyrx dan *Discovery Studio* 2024.

3.2 Ruang Lingkup Penelitian

Fokus penelitian ini adalah melakukan analisis *in silico* dengan metode *molecular docking* pada senyawa metabolit sekunder daun harendong (*M. malabathricum*) dengan protein target InhA (*Enoyl-ACP reductase*) yang berperan penting dalam biosintesis asam mikolat pada dinding sel bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Adapun aspek yang akan dianalisis meliputi afinitas energi, fisikokimia, farmakokinetik, dan tingkat toksisitas senyawa metabolit sekunder daun harendong sebagai inhibitor tuberkulosis untuk menghasilkan kesimpulan apakah senyawa metabolit sekunder daun harendong memiliki potensi sebagai inhibitor tuberkulosis dan dapat dijadikan kandidat obat oral tuberkulosis atau tidak.

3.3 Sumber Data Penelitian

3.3.1 Sumber Data Primer

Sumber data primer untuk senyawa yang digunakan diunduh dari web Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), protein target diunduh dari RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/analysis>), prediksi fisikokimia dan farmakokinetik dianalisis dari *website* SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>), prediksi toksisitas pada *website* Protox 3.0 (<https://tox.charite.de/>), dan simulasi *molecular docking* menggunakan aplikasi Pyrx dan *Biovia Discovery Studio Visualizer* 2024 dari senyawa metabolit sekunder *M. malabathricum* terhadap reseptor InhA untuk menjawab pertanyaan penelitian.

3.3.2 Sumber Data Sekunder

Data sekunder penelitian berupa kandungan senyawa potensial daun harendong diperoleh dari berbagai artikel ilmiah bereputasi melalui kajian literatur mendalam sebagai langkah awal dalam melakukan analisis *in silico*.

3.4 Langkah-langkah Penelitian

3.4.1 Tahap Persiapan

Tahap persiapan untuk penelitian ini yaitu:

- 1) Memperoleh Surat Keputusan Dekan Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Siliwangi terkait penetapan bimbingan skripsi pada 1 Agustus 2025;
- 2) Mengajukan judul penelitian kepada Dosen Pembimbing I, Dosen Pembimbing II, dan Dewan Bimbingan Skripsi (DBS) pada 4 Agustus 2025;
- 3) Menyusun proposal penelitian dan melaksanakan bimbingan dengan Dosen Pembimbing I dan Dosen Pembimbing II pada Bulan Agustus-September 2025;
- 4) Melaksanakan seminar proposal penelitian pada 7 Oktober 2025;
- 5) Melakukan perbaikan proposal melalui bimbingan dan konsultasi dengan pembimbing I dan pembimbing II pada Oktober 2025;
- 6) Mempersiapkan penelitian pada November s.d. Desember 2025

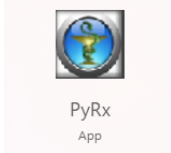
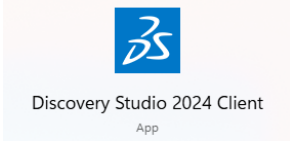
3.4.2 Tahap Pelaksanaan

3.4.2.1 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini secara rinci terdapat pada tabel 3.1 berikut.

Tabel 3. 1. Alat dan Bahan Penelitian

No	Alat dan Bahan	Spesifikasi dan Kegunaan	Jumlah	Gambar
1.	<i>Handphone</i>	Samsung Galaxy A34 untuk pengambilan dokumentasi selama penelitian	1 Buah	
2.	Laptop	Asus A516M (Ram 4 GB, Windows 11) dengan beberapa aplikasi dan <i>website</i> pendukung yang digunakan untuk melakukan analisis <i>in silico</i> .	1 Unit	
3.	Senyawa Ligan dan Kontrol	Senyawa ligan (senyawa metabolit sekunder daun harendong yang potensial sebagai inhibitor tuberkulosis) dan Senyawa kontrol (Isoniazid) di unduh dari <i>website</i> Pubchem	14 Buah	-

4.	Protein target InhA	Protein target dengan PDB ID: 5W07 sebagai reseptor tuberkulosis.	1 Buah	
5.	PyRx	Versi 0.8 sebagai aplikasi yang digunakan untuk <i>molecular docking</i>	1 Buah	
6.	Biova Discovery Studio 2024	Versi 2024 sebagai aplikasi untuk melakukan preparasi protein target dan membuat visualisasi 2D hasil <i>molecular docking</i> untuk melihat interaksi antara ligan dan protein target.	1 Buah	

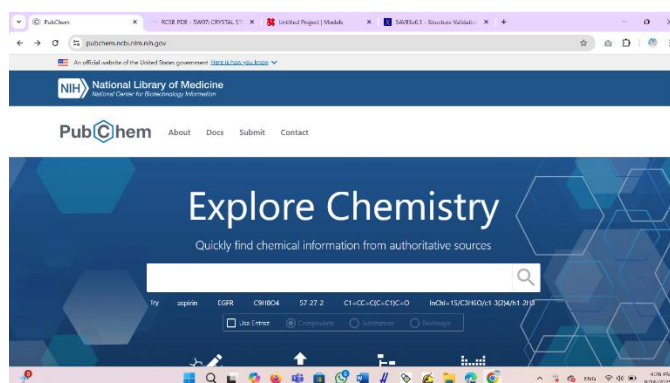
3.4.2.2 Kajian Literatur terkait Senyawa yang terkandung dalam Daun Harendong

Proses pencarian dan seleksi kandungan senyawa metabolit sekunder daun harendong yang potensial sebagai inhibitor tuberkulosis menggunakan sumber artikel yang kredibel dari jurnal nasional maupun internasional bereputasi yang melakukan eksperimen ekstraksi daun harendong melalui GCMS (*Gas Chromatography – Mass Spectrometry*), HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) maupun LCMS (*Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*).

3.4.2.3 Pengunduhan Senyawa Ligan dan Senyawa Kontrol

Daftar senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun *M. malabathricum* berdasarkan kajian literatur dianalisis untuk mengetahui senyawa mana saja yang memiliki potensi sebagai inhibitor tuberkulosis. Proses analisis dimulai dari pencarian senyawa melalui kajian literatur dari berbagai artikel jurnal yang membahas mengenai senyawa yang terkandung dalam daun *M.*

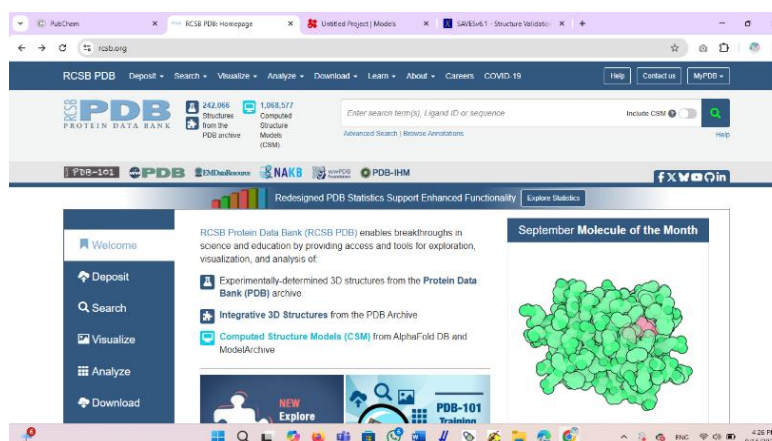
malabathricum. Kemudian dilakukan pengunduhan berkas dari senyawa-senyawa tersebut melalui *website database* biologi <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> seperti pada gambar 3.1 untuk mendapatkan struktur 3D dalam format SDF senyawa ligan serta senyawa kontrol isoniazid.



Gambar 3. 1. *website* Pubchem.
Sumber: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

3.4.2.4 Pengunduhan Protein Target InhA

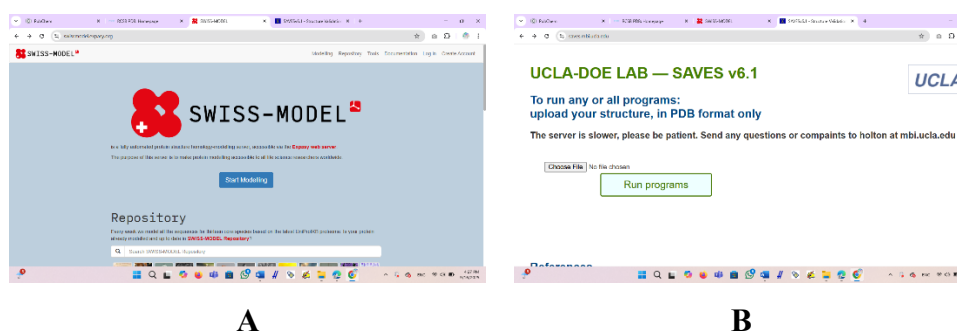
Protein target diunduh dari protein data bank melalui *website database* biologi <https://www.rcsb.org/> dengan PDB ID: 5W07 untuk mendapatkan struktur 3D dalam format PDB. Adapun proses pengunduhan dapat dilihat pada Gambar 3.2 berikut.



Gambar 3. 2. *website* RCSB PDB
Sumber: <https://www.rcsb.org/structure/5W07>

3.4.2.5 Pemodelan dan Validasi Protein Target InhA menggunakan SwissMODEL dan Uji Errat

Protein target yang diunduh kemudian dilakukan pemodelan menggunakan website <https://swissmodel.expasy.org/> (Gambar 3.3a). Nilai yang tertera pada hasil pemodelan menunjukkan persentase kemiripan dari protein tersebut dengan kondisi aslinya di dalam bakteri. Setelah dilakukan pemodelan langkah selanjutnya adalah dengan melakukan validasi protein dengan melihat nilai errat secara keseluruhan melalui website <https://saves.mbi.ucla.edu/> (Gambar 3.3b). 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. 3. (A) Website SwissMODEL; (B) Website Uji Errat
Sumber: <https://swissmodel.expasy.org/> dan <https://saves.mbi.ucla.edu/>

3.4.2.6 Preparasi Ligan dan Senyawa Kontrol

Preparasi ligan dan senyawa kontrol dilakukan menggunakan aplikasi Pyrx, Adapun proses preparasi dimulai dengan cara membuka aplikasi lalu mengunggah berkas ligan yang sebelumnya telah didapatkan dari Pubchem melalui menu open babel kemudian *insert new* di bagian pojok kanan bertanda plus (+). Lalu masukan file ligan uji yang telah diunduh. Klik kanan pada bagian senyawa tersebut dan klik *minimize all*. Setelah dilakukan *minimize all*, klik kanan pada file ligan kemudian simpan dalam bentuk pdb.

3.4.2.7 Preparasi Protein Target

Preparasi protein target/reseptor dilakukan dengan menggunakan aplikasi *Biovia Discovery Studio 2024*. Proses preparasi dilakukan dengan membuka aplikasi, lalu klik *file* dan pilih opsi *open*, kemudian klik *file PDB* dari protein yang

sudah di *modelling* sebelumnya. Selanjutnya hilangkan molekul air pada protein yang sudah di *modelling* dengan cara mengklik menu *script* kemudian pilih *select* dan pilih opsi *select water molecule* kemudian *delete*. Setelah itu hilangkan molekul ligan pada protein yang sudah di *modelling* dengan cara mengklik menu *script* kemudian pilih *select* dan pilih opsi *select ligand* kemudian *delete*. File preparasi lalu disimpan dalam bentuk *pdb*.

3.4.2.8 Simulasi Molecular Docking Senyawa Ligan dan Senyawa Kontrol terhadap protein target InhA

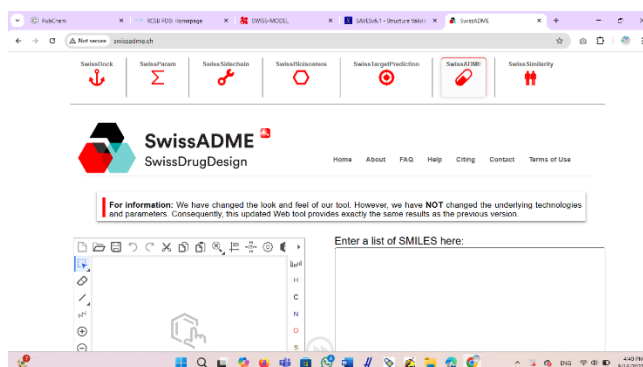
Proses *molecular docking* dilakukan menggunakan aplikasi Pyrx dengan membuka *file* reseptor hasil preparasi serta senyawa ligan dan senyawa kontrol isoniazid yang telah dipreparasi sebelumnya. Setiap senyawa ligan daun harendong atau senyawa kontrol isoniazid diuji satu persatu terhadap protein target dengan cara diklik kanan dan diatur sebagai ligan, sementara InhA dijadikan makromolekul. Setelah itu, proses dilanjutkan dengan mengatur *grid box* hingga mencakup seluruh senyawa ligan atau senyawa kontrol dan reseptor dalam area kotak. Kemudian, proses dilanjutkan hingga terjadi *running* dan muncul nilai skor *binding affinity*.

3.4.2.9 Visualisasi Hasil Docking

Visualisasi hasil *docking* dilakukan menggunakan aplikasi *Biovia Discovery Studio 2024* dengan membuka *file* protein target InhA hasil preparasi serta *file* hasil *docking* senyawa metabolit sekunder dan reseptor. Setelah itu, *file* hasil *docking* disalin dan ditempelkan pada *file* preparasi InhA. Kemudian, pilih opsi interaksi ligan dan tampilkan diagram 2D untuk melihat ikatan yang terbentuk.

3.4.2.10 Analisis Fisikokimia dan Farmakokinetik

Analisis fisikokimia dan farmakokinetik dilakukan menggunakan *website* SwissADME seperti pada Gambar 3.4. Dalam proses ini, SMILES senyawa ligan disalin lalu ditempelkan pada kolom yang tersedia di situs tersebut. Kemudian, dengan mengklik "*run*," hasil fisikokimia dan farmakokinetik dari senyawa metabolit sekunder akan ditampilkan. Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan *Lipinski's rule of five* dan ADME untuk menentukan apakah senyawa ligan dapat dijadikan kandidat obat oral atau tidak.

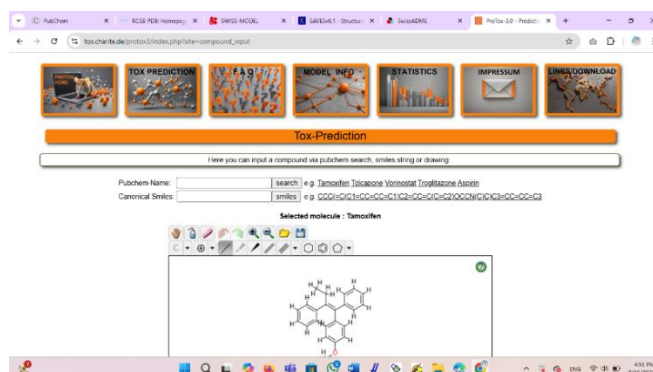


Gambar 3. 4. Website SwissADME

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

3.4.2.11 Prediksi Toksisitas

Prediksi toksisitas dilakukan menggunakan *website* Protox 3.0. Prosesnya dimulai dengan membuka website <https://tox.charite.de/protox3/index.php> (Gambar 3.5), kemudian klik *tox prediction*. Lalu unggah SMILES dari senyawa ligan pada kolom yang tersedia. Selanjutnya, klik *Start tox-prediction*. Prediksi toksisitas dari senyawa ligan akan muncul. Hasil preediksi lalu dianalisis berdasarkan nilai LD₅₀ dan kelas toksisitas sebagai dasar seleksi senyawa terbaik untuk kandidat obat tuberkulosis.



Gambar 3. 5. Website Protox 3.0

Sumber: <https://tox.charite.de/protox3/index.php>

3.5 Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data dalam penelitian ini adalah teknik pengumpulan data dokumentasi yang diperoleh dari studi literatur, *screening database* secara *in silico* sebagai bagian dari analisis bioinformatika komputasional. Adapun data pendukung diperoleh melalui wawancara dan penyebaran kuesioner kepada sivitas

akademika dan masyarakat umum di berbagai daerah di Indonesia sebagai studi pendahuluan penelitian. Menurut Sugiyono (2020) dokumen dalam teknik pengumpulan data dapat berupa tulisan, gambar, ataupun karya monumental yang ditulis oleh seseorang.

3.6 Teknik Analisis Data

Teknik analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah teknik analisis statistik deskriptif hasil dari simulasi *molecular docking* menggunakan aplikasi Biovia Discovery Studio 2024 dan Pyrx, analisis sifat fisikokimia dan farmakokinetik dengan menggunakan parameter *Lipinski's rule of five*, dan prediksi toksisitas menggunakan *website* protox 3.0 *online tools* dari senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun harendong (*M. malabathricum*) terhadap protein target tuberkulosis yaitu InhA (*Enoyl-ACP reductase*), dimana analisis dilakukan dengan menggunakan senyawa kontrol isoniazid sebagai pembanding potensi. Menurut Sugiyono (2020) analisis statistik deskriptif adalah statistik yang digunakan untuk menganalisis data dengan cara mendeskripsikan atau menggambarkan data yang telah terkumpul sebagaimana adanya, tidak ada uji signifikansi dan tidak ada taraf kesalahan karena penelitian tidak bermaksud membuat generalisasi, sehingga tidak ada kesalahan generalisasi.

3.7 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus 2025 sampai Januari 2026 di Laboratorium Botani, Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Siliwangi, dengan rincian rencana jadwal penelitian pada tabel 3.2 berikut.

Tabel 3. 2. Jadwal Penelitian

No	Kegiatan Pendidikan	Agustus				September				Oktober				November	Desember	Januari	Februari	Maret	April		Mei			Juni	
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1-4	1-4	1-4	1-4	1-4	1	2	1	2	3	2	3
1.	Mendapatkan SK Dosen Pembimbing Skripsi																								
2.	Mengonsultasikan Topik Penelitian																								
3.	Mengajukan Judul Penelitian kepada Dosen Pembimbing dan DBS																								
4.	Menyusun dan Bimbingan Proposal																								
5.	Seminar Proposal																								
6.	Menyempurnakan Proposal																								
7.	Melakukan Pengujian <i>In silico</i>																								
8.	Mengolah dan Menyusun Hasil Pengujiamn <i>In silico</i>																								
9.	Melakukan Bimbingan Skripsi																								
10.	Seminar Hasil Penelitian																								
11.	Melakukan Revisi Seminar Hasil																								
12.	Sidang Skripsi																								
13.	Penyempurnaan Skripsi																								