

BAB 3

PROSEDUR PENELITIAN

3.1 Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian menggunakan metode *in silico screening* dengan analisis deskriptif kuantitatif. Sifat deskriptif pada penelitian ini merujuk pada tujuan utama untuk memberikan gambaran yang sistematis dan rinci mengenai potensi antioksidan dari senyawa-senyawa yang diuji. Sementara itu, pendekatan kuantitatif digunakan karena deskripsi tersebut didasarkan sepenuhnya pada analisis data-data numerik yang objektif dan terukur. Data kuantitatif ini mencakup skor energi afinitas (kkal/mol) dari hasil *molecular docking*, nilai-nilai parameter fisikokimia yang dianalisis berdasarkan kaidah Lipinski, serta prediksi kelas toksisitas (LD₅₀) dari setiap senyawa. Dengan demikian, metode ini memungkinkan peneliti untuk tidak hanya mengidentifikasi interaksi secara deskriptif, tetapi juga mengukur dan membandingkan potensi setiap senyawa secara angka untuk menarik kesimpulan yang objektif.

Objek dalam penelitian ini bukanlah sampel fisik, melainkan data senyawa metabolit sekunder yang diperoleh dari hasil analisis *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS) ekstrak kulit pisang ranggap (*Musa troglodytarum* L.). Berdasarkan analisis tersebut dan studi literatur, ditetapkan 14 senyawa ligan uji yang paling berpotensi sebagai antioksidan dari golongan Flavonoid, yang mencakup *Quercetin*, *Kaempferol*, *Luteolin*, *Rutin*, dan derivatnya. Sebagai ligan kontrol (pembanding), digunakan Ligan Alami (*Native Ligand*) yang terko-kristalisasi pada struktur protein target sebagai standar validasi internal. Adapun protein target (reseptor) yang digunakan adalah *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1) yang diperoleh dari bank data *Protein Data Bank* (PDB) dengan kode akses (PDB ID: 4L7B).

Seluruh tahapan analisis *in silico* akan memanfaatkan beberapa perangkat lunak dan *web server*. Proses simulasi *molecular docking* akan dijalankan

menggunakan perangkat lunak PyRx (berbasis AutoDock Vina). Selanjutnya, visualisasi dan analisis interaksi 3D antara ligan dan reseptor, termasuk identifikasi ikatan hidrogen dan residu asam amino, akan dilakukan menggunakan BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2025. Untuk analisis profil fisikokimia, prediksi sifat farmakokinetik (ADME), dan kelayakan obat (*drug-likeness*) dari senyawa uji, akan digunakan web server SwissADME dan pkCSM. Terakhir, analisis prediksi toksisitas akan dilakukan menggunakan web server ProTox 3.0.

3.2 Ruang Lingkup Penelitian

Penulis membatasi permasalahan dalam penelitian ini sesuai dengan judul yang diajukan. Untuk memperjelas batasan penelitian dan mencegah pembahasan yang terlalu luas atau menyimpang, maka ditetapkan ruang lingkup penelitian sebagai berikut:

- 1) penelitian ini menggunakan data sekunder hasil analisis *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS) yang telah dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada untuk mengidentifikasi senyawa-senyawa bioaktif yang terdapat pada kulit pisang ranggap (*Musa troglodytarum* L.). Fokus identifikasi dibatasi pada 14 senyawa flavonoid yang ditetapkan sebagai ligan uji.
- 2) dilakukan analisis *in silico* yang meliputi prediksi sifat fisikokimia, farmakokinetik (ADME), dan toksisitas, serta simulasi *molecular docking* antara ke-14 senyawa flavonoid tersebut terhadap protein target Keap1 (kode PDB: 4L7B). Evaluasi potensi dilakukan dengan membandingkan afinitas ikatan dan interaksi residu amino ligan uji terhadap Ligan Alami (*Native Ligand*) yang digunakan sebagai kontrol positif.
- 3) hasil analisis *in silico* akan diolah dan disajikan dalam bentuk sumber belajar biologi berupa *booklet* digital yang memuat informasi mengenai potensi senyawa metabolit sekunder kulit pisang ranggap sebagai kandidat antioksidan. Produk ini disusun agar relevan dengan Capaian Pembelajaran (CP) Fase F jenjang SMA, khususnya pada materi Bioteknologi Modern dan mata kuliah Bioinformatika.

3.3 Sumber Data Penelitian

Sumber data dalam penelitian ini terdiri atas data primer dan data sekunder. Data primer merupakan data yang didapatkan langsung dari sumber aslinya atau sumber pertama. Sedangkan data sekunder merupakan data yang sudah tersedia, sehingga peneliti tinggal mencari dan mengumpulkan data dari sumber yang telah ada (Sugiyono, 2015). Data primer dalam penelitian ini berupa berkas digital tiga dimensi (3D) yang diunduh dan dipersiapkan secara langsung oleh peneliti untuk keperluan simulasi *in silico*. Data ini mencakup struktur molekul 3D dari 14 senyawa ligan uji golongan flavonoid (termasuk *Kaempferol*, *Quercetin*, *Luteolin*, *Rutin*, dan derivat glikosidanya) yang diperoleh berdasarkan hasil seleksi senyawa dari data analisis LC-MS ekstrak kulit pisang ranggap, serta struktur ligan kontrol positif (Ligan Alami/*Native Ligand*) dan struktur makromolekul protein target Keap1 (PDB ID: 4L7B) yang ditentukan berdasarkan studi literatur. Seluruh struktur ligan uji diunduh dari basis data PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), sedangkan struktur protein target dan ligan kontrol diunduh dari basis data RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>).

Selain itu, data hasil analisis LC-MS terhadap ekstrak kulit pisang ranggap yang digunakan untuk menentukan kandidat senyawa uji diperlakukan sebagai data primer, karena merupakan data empiris orisinil hasil identifikasi yang secara langsung dijadikan dasar penelitian ini. Sementara itu, data sekunder dalam penelitian ini merupakan data rujukan pendukung yang digunakan sebagai dasar justifikasi ilmiah. Data sekunder mencakup berbagai kajian literatur, seperti jurnal ilmiah dan sumber terpercaya lainnya, yang digunakan untuk memperkuat pemilihan 14 ligan uji, serta memvalidasi relevansi Ligan Alami dan protein target dengan mekanisme kerja antioksidan jalur Nrf2.

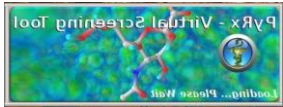
3.4 Langkah-langkah Penelitian

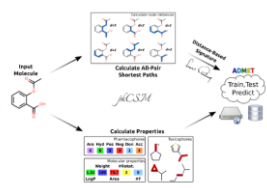
3.4.1 Alat dan Bahan Penelitian

Sehubungan dengan desain penelitian yang berfokus pada studi komputasional (*in silico*), alat dan bahan yang digunakan disesuaikan untuk mendukung proses analisis data. Alat penelitian dikelompokkan menjadi perangkat keras (*hardware*) dan perangkat lunak (*software*), sementara bahan penelitian yang

digunakan seluruhnya berupa data digital. Rincian lengkap dari alat dan bahan disajikan pada Tabel 3.1 dan Tabel 3.2.

Tabel 3.1 Alat Penelitian

No.	Alat	Spesifikasi dan Kegunaan	Gambar
A. Perangkat Keras (<i>Hardware</i>)			
1.	Laptop	Lenovo Thinkpad x395 (Sistem Operasi Windows 11). Digunakan sebagai perangkat keras utama untuk mengolah data dan menjalankan seluruh simulasi.	
2.	Handphone	Digunakan untuk dokumentasi visual (foto/video) selama proses penelitian.	
B. Perangkat Lunak (<i>Software</i>) dan Web server			
1.	PyRx (AutoDock Vina)	Perangkat lunak utama untuk melakukan simulasi <i>molecular docking</i> (penambatan molekuler).	
2.	BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2025	Perangkat lunak untuk memvisualisasikan hasil <i>docking</i> dan menganalisis interaksi 3D dan 2D antara ligan dan reseptor.	
3.	PASS Online	Web server untuk memvalidasi potensi antioksidan (aktivitas biologis) dari senyawa ligan uji.	
4.	SWISS-MODEL	Web server untuk melakukan pemodelan homologi dan visualisasi struktur 3D protein target (reseptor).	
5.	SAVES (UCLA)	Web server untuk memvalidasi kualitas stereokimia dari struktur	

No.	Alat	Spesifikasi dan Kegunaan	Gambar
		3D reseptor hasil pemodelan.	
6.	SwissADME	Web server untuk memprediksi karakteristik fisikokimia dan kelayakan (<i>drug-likeness</i>) senyawa (mengacu <i>Lipinski's Rule of Five</i>).	
7.	pkCSM	Web server untuk memprediksi profil farmakokinetik (ADME) dan bagaimana senyawa diproses dalam sistem biologis.	
8.	ProTox 3.0	Web server untuk memprediksi potensi risiko dan efek toksisitas (misal: LD50, hepatotoksitas) dari senyawa kandidat.	

Sumber: Dokumentasi Peneliti, 2025

Tabel 3.2 Bahan Penelitian

No.	Bahan	Sumber/Basis Data
1.	Data Profil Senyawa Metabolit Sekunder (Kromatogram, Spektrum Massa, dan <i>Curve Area</i> Ekstrak Kulit Pisang Rangkap)	Hasil Uji LC-MS (Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu / LPPT UGM)
2.	Struktur 3D Ligan Uji (14 Senyawa Flavonoid)	PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)
3.	Struktur 3D Ligan Kontrol (Positif) (<i>Native Ligand</i> /Ligan Alami yang terko-kristalisasi pada PDB 4L7B)	RCSB Protein Data Bank (PDB) (Diekstraksi dari struktur kristal 4L7B)
4.	Struktur 3D Protein Target (Reseptor) (<i>Kelch-like ECH-associated protein 1/Keap1</i> dengan Kode PDB: 4L7B)	RCSB Protein Data Bank (PDB) (https://www.rcsb.org/)

Sumber: Dokumentasi Peneliti, 2025

3.4.2 Analisis Data LC-MS dan Penentuan Senyawa Kandidat Antioksidan

Tahap ini merupakan proses analisis data sekunder untuk menyaring dan menetapkan 14 (empat belas) senyawa ligan uji yang paling berpotensi sebagai

antioksidan dari total 80 senyawa metabolit sekunder yang teridentifikasi dari data hasil LC-MS ekstrak kulit pisang ranggap. Daftar lengkap 80 senyawa yang menjadi dasar populasi skrining disajikan pada Tabel 3.3 berikut.

Tabel 3.3 Data Hasil Analisis LC-MS Kulit Pisang Ranggap

No.	Nama Senyawa	Rumus Kimia	Curve Area	Golongan	No.	Nama Senyawa	Rumus Kimia	Curve Area	Golongan
1	<i>Isobutanol</i>	C ₄ H ₁₀ O	471,36	Alkohol	27	<i>Octyl acetate</i>	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	554,53	Ester
2	<i>Acetoin</i>	C ₄ H ₈ A ₂	371,22	Ketone/Alcohol	28	<i>Shikimic acid</i>	C ₇ H ₁₀ O ₅	1888,27	Asam organik
3	<i>3-methylbutanal</i>	C ₅ H ₁₀ O	544,24	Aldehid	29	<i>Ascorbic acid</i>	C ₆ H ₈ O ₆	830,23	Vitamin C
4	<i>Isoamyl alcohol</i>	C ₅ H ₁₂ O ₂	480,54	Alkohol	30	<i>Methyl eugenol</i>	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	212,62	Fenilpropanoid
5	<i>2-hexenal</i>	C ₆ H ₁₀ O	522,89	Aldehid tak jenuh	31	<i>Salsolinol</i>	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	341,27	Alkaloid
6	<i>Hexanal</i>	C ₆ H ₁₂ O	514,17	Aldehid	32	<i>Caffeic Acid</i>	C ₉ H ₈ O ₄	2372,66	Asam fenolik
7	<i>Isobutyl acetate</i>	C ₆ H ₁₂ O ₂	756,75	Ester	33	<i>Fructose</i>	C ₆ H ₁₂ O ₆	1571,56	Gula
8	<i>Fumaric acid</i>	C ₄ H ₄ O ₄	1230,23	Asam organik	34	<i>Glucose</i>	C ₆ H ₁₂ O ₆	1919,78	Gula
9	<i>Succinic acid</i>	C ₄ H ₆ O ₄	795,45	Asam organik	35	<i>Galactose</i>	C ₆ H ₁₂ O ₆	617,57	Gula
10	<i>Benzoic acid</i>	C ₇ H ₆ O ₂	1723,22	Asam aromatik	36	<i>Galacturonic acid</i>	C ₆ H ₁₀ O ₇	1723,21	Asam gula
11	<i>Ethyl butyrate</i>	C ₆ H ₁₂ O ₂	609,26	Ester	37	<i>Pectin</i>	C ₆ H ₁₀ O ₇	1282,21	Polisakarida
12	<i>Niacin</i>	C ₆ H ₅ NO ₂	555,65	Vitamin B3	38	<i>Elimicin</i>	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	264,62	Fenilpropanoid
13	<i>Malic acid</i>	C ₄ H ₆ O ₅	2113,22	Asam organik	39	<i>Pantothenic acid</i>	C ₉ H ₁₇ NO ₅	259,87	Vitamin B5
14	<i>Isoamyl acetate</i>	C ₇ H ₁₄ O ₂	609,12	Ester	40	<i>Thiamine</i>	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ O ₅ ⁺	214,35	Vitamin B1
15	<i>Butyl butyrate</i>	C ₈ H ₁₆ O ₂	652,78	Ester	41	<i>Naringenin</i>	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	1334,22	Flavonoid
16	<i>(2R)-2-pentanol acetate</i>	C ₇ H ₁₄ O ₂	466,11	Ester	42	<i>Luteolin</i>	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	2113,21	Flavonoid
17	<i>Solerol</i>	C ₆ H ₁₀ O ₄	371,17	Lainnya	43	<i>Kaempferol</i>	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	3421,08	Flavonoid
18	<i>Cinnamic acid</i>	C ₉ H ₈ O ₂	2582,52	Asam fenolat	44	<i>Trifoliol</i>	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	1124,91	Flavonoid
19	<i>Arabinose</i>	C ₅ H ₁₀ O ₅	1687,56	Gula sederhana	45	<i>Quercetin</i>	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	2422,32	Flavonoid
20	<i>Isoamyl butyrate</i>	C ₉ H ₁₈ O ₂	471,36	Ester	46	<i>Luteolin</i>	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	881,26	Flavonoid
21	<i>P-coumaric acid</i>	C ₉ H ₈ O ₃	2191,21	Asam fenolik	47	<i>Leucocyanidin</i>	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	479,12	Flavonoid
22	<i>Rhamnose</i>	C ₆ H ₁₂ O ₅	3202,96	Gula sederhana	48	<i>Leucodelphinidin</i>	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	567,86	Flavonoid
23	<i>Xylose</i>	C ₅ H ₁₀ O ₅	2619,30	Gula sederhana	49	<i>Sucrose</i>	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	926,21	Disakarida
24	<i>Vanillic acid</i>	C ₈ H ₈ O ₄	1001,21	Asam fenolik	50	<i>Maltose</i>	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	644,77	Disakarida
25	<i>Acetovanillone</i>	C ₉ H ₁₀ O ₃	330,91	Fenolik	51	<i>Chlorogenic acid</i>	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	2335,65	Asam fenolik
26	<i>Pyridoxine</i>	C ₈ H ₁₁ NO ₃	697,47	Vitamin B6	52	<i>Syringin</i>	C ₁₇ H ₂₄ O ₉	1775,18	Glikosida fenolik
					53	<i>Riboflavin</i>	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	209,07	Vitamin B2
					54	<i>Δ-tocopherol</i>	C ₂₇ H ₄₆ O ₂	155,65	Vitamin E
					55	<i>Γ-tocopherol</i>	C ₂₈ H ₄₈ O ₂	548,70	Vitamin E
					56	<i>Campesterol</i>	C ₂₈ H ₄₈ O	632,65	Sterol
					57	<i>Isocuposterol</i>	C ₂₉ H ₄₈ O	1000,50	Sterol

No.	Nama Senyawa	Rumus Kimia	Curve Area	Golongan
58	24-methylenepolinastanol	C ₂₉ H ₄₈ O	423,21	Sterol
59	Stigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	1100,57	Sterol
60	β -sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	1367,88	Sterol
61	β -amyrin	C ₃₀ H ₅₀ O	1433,27	Triterpenoid
62	Cycloeucalenol	C ₃₀ H ₅₀ O	1931,17	Sterol
63	Obtusifoliol	C ₃₀ H ₅₀ O	1243,22	Sterol
64	Cycloartenol	C ₃₀ H ₅₀ O	2125,77	Sterol
65	α -tocopherol	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	512,78	Vitamin E
66	Kaempferol-3-rhamnoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	2465,22	Flavonoid
67	24-methylene cycloartenol	C ₃₁ H ₅₂ O	1202,66	Sterol
68	Kaempferol-3-O-D-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	2022,96	Flavonoid
69	Kaempferol-7-O- β -D-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	2461,23	Flavonoid

No.	Nama Senyawa	Rumus Kimia	Curve Area	Golongan
70	Luteolin-7-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	1673,03	Flavonoid
71	Phylloquinone	C ₃₁ H ₄₆ O ₂	501,30	Vitamin K1
72	α -carotene	C ₄₀ H ₅₆	766,50	Karotenoid
73	β -carotene	C ₄₀ H ₅₆	736,62	Karotenoid
74	Cryptoxanthin	C ₄₀ H ₅₆ O	454,55	Xantofil
75	Lutein	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	602,66	Xantofil
76	Zeaxanthin	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	258,25	Xantofil
77	Kaempferol-7-rhamnoside 4' glucoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	2190,68	Flavonoid
78	Neoxanthin	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	176,51	Xantofil
79	Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	1241,79	Flavonoid
80	6G-di- β -D-fructofuranosylsucrose	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	801,31	Oligosakarida

Sumber: Tim Riset Universitas Siliwangi, 2025

Mengingat banyaknya jumlah senyawa metabolit sekunder yang teridentifikasi (80 senyawa), maka diperlukan strategi penapisan yang sistematis untuk menentukan senyawa mana yang paling relevan untuk diuji secara komputasi. Berdasarkan landasan teori yang telah dipaparkan pada kajian pustaka, golongan Flavonoid diketahui memiliki potensi aktivitas antioksidan dan inhibisi enzim yang paling kuat dibandingkan golongan metabolit lainnya (Pradhan *et al.*, 2025; Mutha *et al.*, 2021). Oleh karena itu, proses seleksi ligan uji dilakukan melalui dua tahapan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

1) pengelompokan berdasarkan golongan kimia (*chemical classification*)

Pada tahap ini, ke-80 senyawa diklasifikasikan berdasarkan gugus fungsi dan struktur kimianya. Kriteria inklusi diterapkan hanya pada senyawa yang termasuk dalam golongan Flavonoid (baik dalam bentuk aglikon maupun glikosida). Sementara itu, senyawa yang tergolong dalam kelompok asam organik sederhana, gula (karbohidrat), asam lemak, steroid/terpenoid, dan vitamin disisihkan (eksklusi) karena fokus penelitian ini adalah spesifik pada mekanisme antioksidan jalur polifenolik flavonoid. Hasil klasifikasi dan eliminasi tahap pertama disajikan pada Tabel 3.4.

Tabel 3.4 Hasil Penapisan dan Justifikasi Pemilihan Golongan Kimia Senyawa Uji

No.	Golongan Kimia	Status Seleksi	Justifikasi
1	Flavonoid (Aglikon & Glikosida)	Dipilih (Inklusi)	Memiliki struktur polifenolik dengan gugus hidroksil yang terbukti paling efektif dalam <i>radical scavenging</i> dan inhibisi protein target.
2	Asam Fenolat	eksklusi	Meski memiliki gugus -OH fenolik, kapasitas <i>radical scavenging</i> -nya lebih lemah karena tidak memiliki cincin kromon (C6-C3-C6) yang pada flavonoid memperluas resonansi stabilisasi radikal fenol.
3	Terpenoid / Steroid	eksklusi	Tidak memiliki gugus -OH fenolik pada sistem aromatik, sehingga tidak dapat mendonorkan H• untuk menetralkan radikal bebas secara langsung (mekanisme HAT). Aktivitas antioksidannya bersifat tidak langsung.
4	Karbohidrat (Gula)	eksklusi	Tidak memiliki cincin aromatik maupun -OH fenolik; gugus -OH alifatiknya tidak terstabilkan resonansi sehingga tidak mampu menangkap radikal bebas maupun berikatan dengan sisi aktif Keap1.
5	Asam Lemak / Organik	eksklusi	Asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) justru bersifat pro-oksidan karena rentan terhadap peroksidasi lipid oleh radikal bebas; tidak memiliki farmakofor aromatik-fenolik untuk berinteraksi dengan Keap1.
6	Vitamin	eksklusi	Antioksidan vitamin (Vit. C/E) bekerja melalui H-transfer di medium berair atau membran sel, bukan melalui inhibisi langsung protein Keap1, sehingga tidak relevan sebagai ligan dalam studi docking ini.

Sumber: Dokumentasi Peneliti, 2025

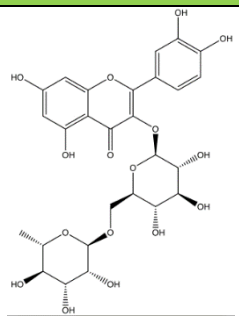
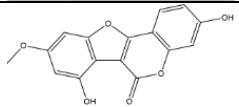
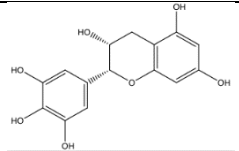
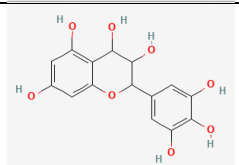
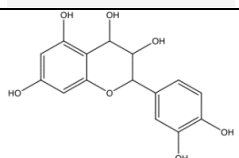
2) penetapan 14 senyawa flavonoid sebagai ligan uji

Berdasarkan hasil penapisan dan justifikasi pemilihan golongan kimia senyawa uji, diperoleh 14 senyawa flavonoid spesifik. Senyawa-senyawa ini mencakup berbagai sub-kelas, seperti Flavonol (*Quercetin*, *Kaempferol*, *Rutin*), Flavon (*Luteolin*), Flavanon (*Naringenin*), serta bentuk derivat glikosidanya. Keputusan untuk tidak membuang bentuk glikosida (seperti *Astragalin* atau *Rutin*) didasarkan pada fakta bahwa dalam sistem biologis tanaman, flavonoid mayoritas disimpan dalam bentuk glikosida, dan senyawa ini juga memiliki potensi bioaktivitas tersendiri sebelum terhidrolisis dalam tubuh. Sesuai dengan strategi *comprehensive screening*, keseluruhan senyawa ini ditetapkan sebagai ligan uji. Selain nama senyawa, data kelimpahan relatif (*curve area*) juga disertakan dalam

daftar final. Data kelimpahan ini penting untuk analisis lanjutan guna memprediksi kontribusi total senyawa tersebut terhadap aktivitas antioksidan ekstrak. Senyawa dengan afinitas pengikatan (*Binding Affinity*) yang kuat dan kelimpahan (*curve area*) yang tinggi diprediksi akan menjadi senyawa bioaktif utama (*major bioactive compound*). Daftar final ke-14 senyawa flavonoid yang akan dianalisis secara *in silico* disajikan pada Tabel 3.5.

Tabel 3.5 Daftar Senyawa Flavonoid Terpilih sebagai Kandidat Ligan Uji

No	Nama Senyawa	Rumus Kimia	Golongan Spesifik	Curve Area	Struktur
1	<i>Kaempferol</i>	$C_{15}H_{10}O_6$	Flavonol (Aglikon)	3421.08	
2	<i>Kaempferol-3-rhamnoside</i>	$C_{21}H_{20}O_{10}$	Flavonol (Glikosida)	2465.22	
3	<i>Kaempferol-7-O-β-D-glucoside</i>	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Flavonol (Glikosida)	2461.23	
4	<i>Quercetin</i>	$C_{15}H_{10}O_7$	Flavonol (Aglikon)	2422.32	
5	<i>Kaempferol-7-rhamnoside 4' glucoside</i>	$C_{27}H_{30}O_{15}$	Flavonol (Glikosida)	2190.68	
6	<i>Luteolin</i>	$C_{15}H_{10}O_6$	Flavon (Aglikon)	2113.21	
7	<i>Kaempferol-3-O-D-glucoside (Astragalin)</i>	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Flavonol (Glikosida)	2022.96	
8	<i>Luteolin-7-glucoside</i>	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Flavon (Glikosida)	1673.03	
9	<i>Naringenin</i>	$C_{15}H_{12}O_5$	Flavanon (Aglikon)	1334.22	

No	Nama Senyawa	Rumus Kimia	Golongan Spesifik	Curve Area	Struktur
10	<i>Rutin</i>	$C_{27}H_{30}O_{16}$	Flavonol (Glikosida)	1241.79	
11	<i>Trifoliol</i>	$C_{16}H_{10}O_6$	Pterocarpin	1124.91	
12	<i>epigallocatechin</i>	$C_{15}H_{14}O_7$	Flavanol (Catechin)	881.26	
13	<i>Leucodelphinidin</i>	$C_{15}H_{14}O_8$	Leucoanthocyanidin	567.86	
14	<i>Leucocyanidin</i>	$C_{15}H_{14}O_7$	Leucoanthocyanidin	479.12	

Sumber: Dokumentasi Peneliti, 2025

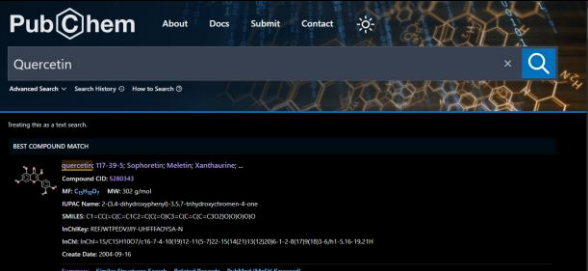
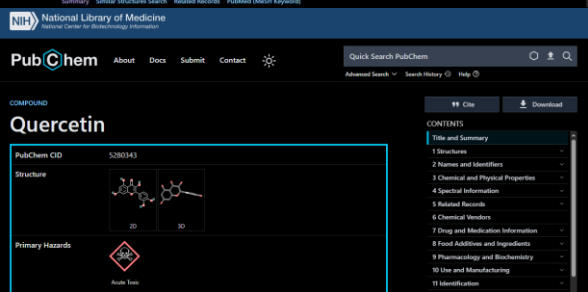
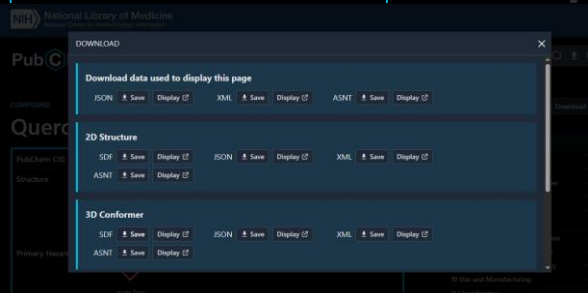
Dengan demikian, seluruh tahapan analisis *in silico* selanjutnya akan dilakukan terhadap ke-14 senyawa tersebut. Analisis akan mengintegrasikan parameter kekuatan ikatan (dari *docking*) dengan ketersediaan senyawa (dari *curve area*) untuk menentukan kandidat obat yang paling potensial secara realistik.

3.4.3 Tahap Pencarian dan Pengunduhan Ligan

Setelah penetapan konseptual kandidat senyawa uji dilakukan, tahap selanjutnya adalah merencanakan proses pengumpulan data digital yang diperlukan untuk simulasi. Proses ini mencakup pencarian dan pengunduhan berkas struktur molekul tiga dimensi (3D) untuk semua senyawa yang akan dianalisis. Struktur 3D dari ke-14 senyawa flavonoid uji (termasuk *Kaempferol*, *Quercetin*, *Luteolin*, *Rutin*, dan derivat lainnya sesuai Tabel 3.5) serta satu senyawa kontrol positif (*Native Ligand*) yang sesuai dengan struktur kristal PDB 4L7B) akan ditelusuri dan diunduh dari basis data PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Berkas setiap

senyawa direncanakan untuk diunduh dalam format SDF (*Structure Data File*) yang kompatibel digunakan pada perangkat lunak *docking*. Dokumentasi visual mengenai tahapan akuisisi data ligan pada basis data PubChem disajikan secara deskriptif pada Tabel 3.6.

Tabel 3.6 Deskripsi Tahapan Pencarian dan Pengunduhan Ligan

No.	Deskripsi Aktivitas	Visualisasi (Gambar)
1	Akses pada laman utama basis data PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/) sebagai sumber data primer struktur ligan.	
2	Proses penelusuran spesifik dengan memasukkan kata kunci nama senyawa uji (misal: “Quercetin”) pada kolom pencarian basis data.	
3	Identifikasi dan pemilihan entri senyawa yang sesuai dengan struktur kimia target dari hasil penelusuran yang ditampilkan sistem.	
4	Pengunduhan berkas struktur 3D dalam format SDF (<i>3D Conformer</i>) melalui menu unduhan yang tersedia untuk digunakan dalam simulasi.	

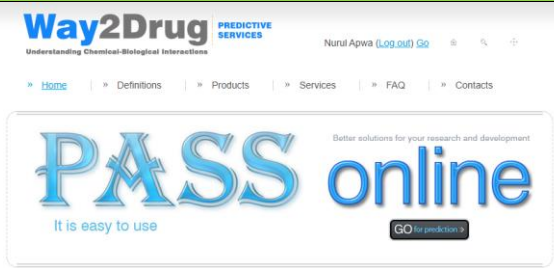
Sumber: Dokumentasi Peneliti, 2025

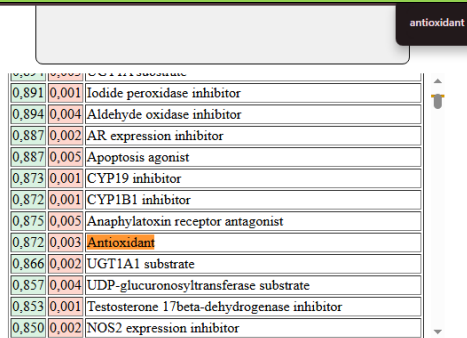
3.4.4 Tahap Validasi Aktivitas Biologis Ligan

Setelah struktur ligan uji diperoleh, dilakukan tahap validasi komputasional awal untuk memprediksi spektrum aktivitas biologis dari senyawa-senyawa

tersebut. Tahap ini bertujuan untuk mengonfirmasi justifikasi pemilihan ligan, khususnya untuk memprediksi potensi antioksidannya secara *in silico* sebelum dilanjutkan ke simulasi *docking*. Proses ini dilakukan menggunakan web server PASS Online (<http://www.way2drug.com>). Kode SMILES dari seluruh 14 ligan uji terpilih dimasukkan ke dalam web server untuk diprediksi. Hasil prediksi (dinyatakan sebagai nilai *Probability to be Active* atau Pa) akan dianalisis untuk memastikan bahwa senyawa-senyawa tersebut memiliki probabilitas yang tinggi sebagai kandidat antioksidan.

Tabel 3.7 Tahap Validasi Aktivitas Biologis Ligan

No.	Deskripsi Aktivitas	Visualisasi (Gambar)
1	Akses pada layanan web server PASS Online (http://www.way2drug.com/passonline) sebagai platform prediksi aktivitas biologis berbasis struktur.	
2	Input kode SMILES ligan pada kolom yang tersedia untuk diterjemahkan menjadi prediksi aktivitas farmakologis. Kemudian eksekusi prediksi (<i>Get Prediction</i>) untuk menghasilkan daftar spektrum aktivitas biologis yang mungkin dimiliki senyawa.	

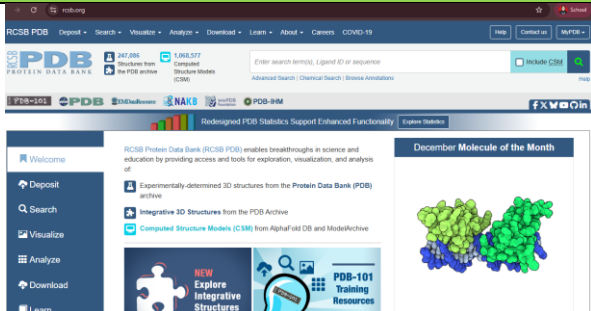
No.	Deskripsi Aktivitas	Visualisasi (Gambar)
3	Interpretasi nilai probabilitas dengan memfokuskan pada aktivitas <i>Antioxidant</i> atau <i>Free Radical Scavenger</i> dengan nilai $P_a > P_i$.	 A screenshot of a web application showing a list of biological activities. The list includes: Iodide peroxidase inhibitor, Aldehyde oxidase inhibitor, AR expression inhibitor, Apoptosis agonist, CYP19 inhibitor, CYP1B1 inhibitor, Anaphylatoxin receptor antagonist, Antioxidant (highlighted in orange), UGT1A1 substrate, UDP-glucuronosyltransferase substrate, Testosterone 17beta-dehydrogenase inhibitor, and NOS2 expression inhibitor. A search bar at the top contains the word 'antioxidant'.

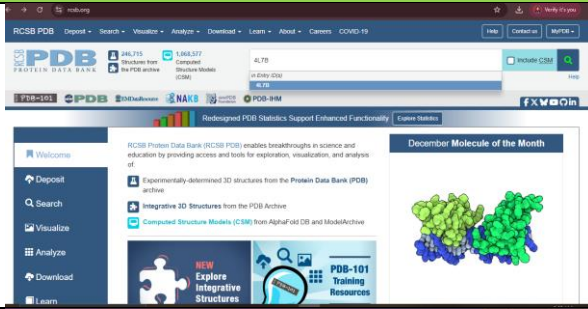
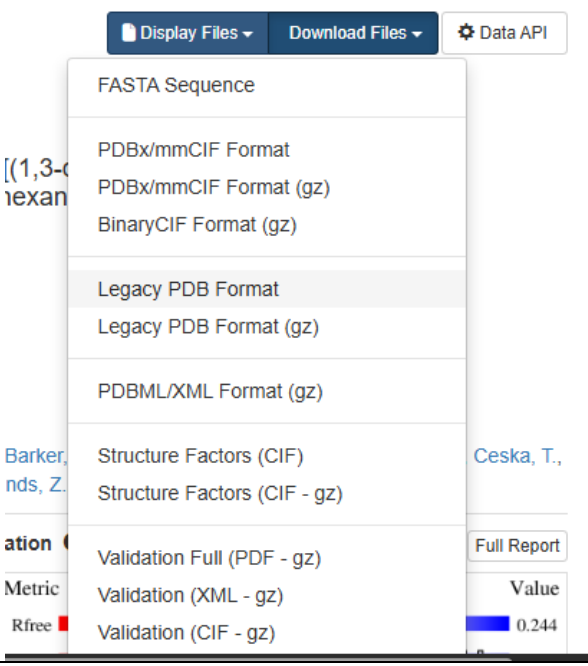
Sumber: Dokumentasi Peneliti, 2025

3.4.5 Tahap Pencarian dan Pengunduhan Reseptor

Penentuan protein target yang relevan dilakukan melalui studi literatur terhadap artikel-artikel ilmiah dengan bantuan *Publish or Perish* terkait peran protein *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1) yang membahas mekanisme stres oksidatif. Berdasarkan kajian tersebut, protein Keap1 dipilih sebagai reseptor target karena perannya yang sentral dalam jalur regulasi antioksidan Nrf2. Selanjutnya, struktur tiga dimensi (3D) dari protein Keap1 dengan kode PDB ID: 4L7B diunduh dari basis data RCSB Protein Data Bank yang dapat diakses melalui laman <https://www.rcsb.org/>. Berkas protein diunduh dalam format PDB (*Protein Data Bank*) untuk digunakan dalam tahap preparasi reseptor sebelum simulasi *docking*. Rincian proses identifikasi dan pengunduhan struktur kristal protein target pada basis data RCSB PDB dirangkum pada Tabel 3.8.

Tabel 3.8 Deskripsi Tahapan Pencarian Reseptor Keap1

No.	Deskripsi Aktivitas	Visualisasi (Gambar)
1	Akses pada laman utama RCSB Protein Data Bank (https://www.rcsb.org/) sebagai penyedia data makromolekul biologi.	 A screenshot of the RCSB Protein Data Bank homepage. The page features a navigation bar with links like Deposit, Search, Visualize, Analyze, Download, and Learn. The main content area includes a search bar, a 'Welcome' message, and a 'December Molecule of the Month' section with a 3D protein structure visualization.

No.	Deskripsi Aktivitas	Visualisasi (Gambar)
2	Penelusuran kode akses (PDB ID) dengan memasukkan kode “4L7B” untuk menemukan struktur kristal protein Keap1 yang spesifik.	
3	Verifikasi detail struktur kristal yang memuat informasi resolusi, metode eksperimen, dan ligan alami yang terikat.	
4	Pengunduhan berkas makromolekul dalam format PDB (PDB Format) untuk tahap preparasi selanjutnya.	

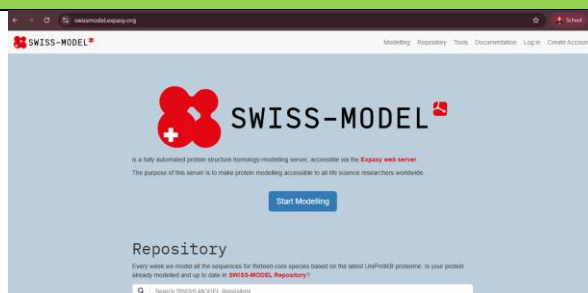
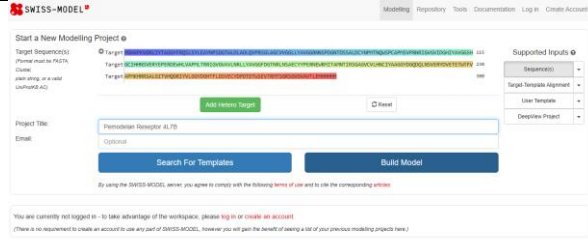
Sumber: Dokumentasi Peneliti, 2025

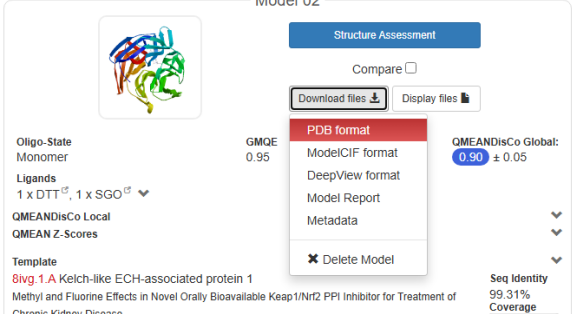
3.4.6 Tahap Pemodelan Reseptor (Protein Target)

Pada penelitian ini, struktur 3D protein Keap1 telah tersedia dalam basis data RCSB Protein Data Bank dengan kode PDB ID: 4L7B, sehingga tidak diperlukan proses *de novo modeling*. Namun, untuk memastikan kualitas struktur yang digunakan, dilakukan pemeriksaan ulang dan perbaikan residu otomatis melalui web server SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>). Proses ini

dilakukan dengan cara mengunggah berkas PDB 4L7B ke SWISS-MODEL dengan format FASTA untuk memperoleh model yang telah dioptimasi dan divalidasi secara otomatis. Model dengan skor kualitas terbaik (nilai GMQE dan QMEAN tertinggi) dipilih, kemudian diunduh kembali dalam format PDB untuk digunakan pada tahap validasi. Apabila struktur 3D tidak tersedia di RCSB PDB, maka pemodelan dapat dilakukan dengan menggunakan sekuens protein dalam format FASTA yang diperoleh dari RCSB PDB, kemudian diproses melalui SWISS-MODEL untuk menghasilkan model prediktif berdasarkan metode *homology modeling*. Tahapan verifikasi dan optimasi kualitas struktur protein menggunakan layanan berbasis web diuraikan pada Tabel 3.9.

Tabel 3.9 Deskripsi Tahapan Pemodelan dan Perbaikan Reseptor

No.	Deskripsi Aktivitas	Visualisasi (Gambar)
1	Akses pada layanan web server SWISS-MODEL (https://swissmodel.expasy.org/) untuk pemodelan homologi otomatis.	
2	Proses pengunggahan berkas target atau input sekuens protein dalam format FASTA untuk memulai pencarian <i>template</i> .	
3	Pemilihan <i>template</i> terbaik berdasarkan parameter kesamaan sekuens (<i>sequence identity</i>) dan cakupan (<i>coverage</i>).	

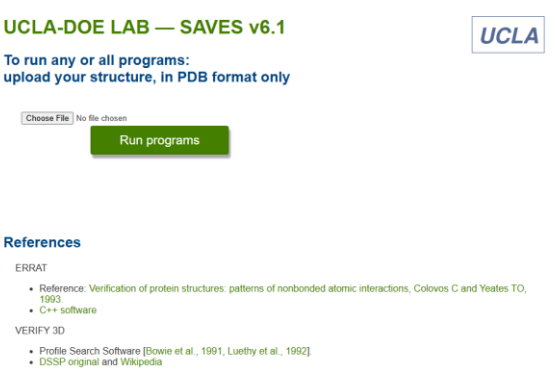
No.	Deskripsi Aktivitas	Visualisasi (Gambar)
4	Penyimpanan model hasil optimasi yang telah divalidasi kualitas residunya dalam format PDB.	

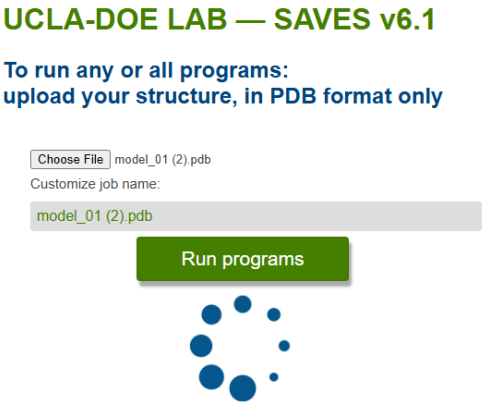
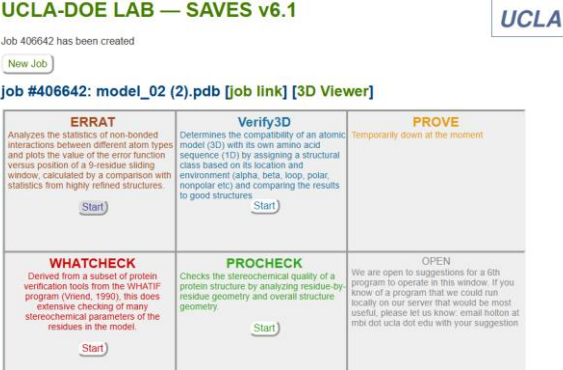
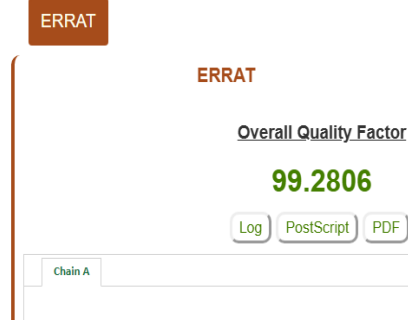
Sumber: Dokumentasi Peneliti, 2025

3.4.7 Tahap Validasi Reseptor (Protein Target)

Setelah model 3D protein Keap1 diperoleh dari tahap pemodelan, tahap selanjutnya adalah melakukan uji validasi untuk memastikan kualitas model tersebut. Proses ini krusial untuk menjamin bahwa reseptor yang digunakan memiliki struktur stereokimia yang akurat sebelum digunakan dalam simulasi *Docking*. Validasi dilakukan dengan mengunggah file PDB hasil pemodelan ke web server SAVES (UCLA) melalui laman <https://saves.mbi.ucla.edu/>, kemudian menjalankan program analisis ERRAT. Model protein dianggap valid dan layak digunakan untuk tahap selanjutnya jika memiliki skor kualitas ERRAT di atas 90%. Uraian deskriptif mengenai tahapan validasi kualitas struktur reseptor ini disajikan pada Tabel 3.10.

Tabel 3.10 Deskripsi Tahapan Validasi Reseptor Menggunakan SAVES

No.	Deskripsi Aktivitas	Visualisasi (Gambar)
1	Akses pada layanan web server SAVES v6.0 (<i>Structural Analysis and Verification Server</i>) yang dikelola oleh UCLA-DOE Institute.	

No.	Deskripsi Aktivitas	Visualisasi (Gambar)						
2	Proses pengunggahan berkas PDB (<i>Upload File</i>) dari struktur protein Keap1 hasil pemodelan yang akan divalidasi.	 UCLA-DOE LAB — SAVES v6.1 To run any or all programs: upload your structure, in PDB format only Choose File model_01 (2).pdb Customize job name: model_01 (2).pdb Run programs						
3	Pemilihan algoritma validasi dengan mencentang opsi ERRAT untuk mengevaluasi statistik interaksi non-ikatan antar atom.	 UCLA-DOE LAB — SAVES v6.1 Job 406642 has been created New Job Job #406642: model_02 (2).pdb [job link] [3D Viewer] <table border="1"> <tr> <td> ERRAT Analyzes the statistics of non-bonded interactions between different atom types and plots the value of the error function versus position of a 9-residue sliding window, calculated by a comparison with statistics from highly refined structures. Start </td> <td> Verify3D Determines the compatibility of an atomic model (3D) with its own amino acid sequence (1D) by assigning a structural class based on its location and environment (alpha, beta, loop, polar, nonpolar etc) and comparing the results to good structures. Start </td> <td> PROVE Temporarily down at the moment </td> </tr> <tr> <td> WHATCHECK Derived from a subset of protein verification tools from the WHATIF program (Viend, 1990), this does extensive checking of many stereochemical parameters of the residues in the model. Start </td> <td> PROCHECK Checks the stereochemical quality of a protein structure by analyzing residue-by-residue geometry and overall structure geometry. Start </td> <td> OPEN We are open to suggestions for a 6th program to operate in this window. If you know of a program that we could run locally on our server that would be most useful, please let us know: email horton at mbi dot ucla dot edu with your suggestion </td> </tr> </table>	ERRAT Analyzes the statistics of non-bonded interactions between different atom types and plots the value of the error function versus position of a 9-residue sliding window, calculated by a comparison with statistics from highly refined structures. Start	Verify3D Determines the compatibility of an atomic model (3D) with its own amino acid sequence (1D) by assigning a structural class based on its location and environment (alpha, beta, loop, polar, nonpolar etc) and comparing the results to good structures. Start	PROVE Temporarily down at the moment	WHATCHECK Derived from a subset of protein verification tools from the WHATIF program (Viend, 1990), this does extensive checking of many stereochemical parameters of the residues in the model. Start	PROCHECK Checks the stereochemical quality of a protein structure by analyzing residue-by-residue geometry and overall structure geometry. Start	OPEN We are open to suggestions for a 6th program to operate in this window. If you know of a program that we could run locally on our server that would be most useful, please let us know: email horton at mbi dot ucla dot edu with your suggestion
ERRAT Analyzes the statistics of non-bonded interactions between different atom types and plots the value of the error function versus position of a 9-residue sliding window, calculated by a comparison with statistics from highly refined structures. Start	Verify3D Determines the compatibility of an atomic model (3D) with its own amino acid sequence (1D) by assigning a structural class based on its location and environment (alpha, beta, loop, polar, nonpolar etc) and comparing the results to good structures. Start	PROVE Temporarily down at the moment						
WHATCHECK Derived from a subset of protein verification tools from the WHATIF program (Viend, 1990), this does extensive checking of many stereochemical parameters of the residues in the model. Start	PROCHECK Checks the stereochemical quality of a protein structure by analyzing residue-by-residue geometry and overall structure geometry. Start	OPEN We are open to suggestions for a 6th program to operate in this window. If you know of a program that we could run locally on our server that would be most useful, please let us know: email horton at mbi dot ucla dot edu with your suggestion						
4	Interpretasi hasil analisis berupa grafik plot ERRAT dan nilai <i>Overall Quality Factor</i> yang mengindikasikan kelayakan struktur.	 ERRAT ERRAT Overall Quality Factor 99.2806 Log PostScript PDF Chain A						

Sumber: Dokumentasi Peneliti, 2025

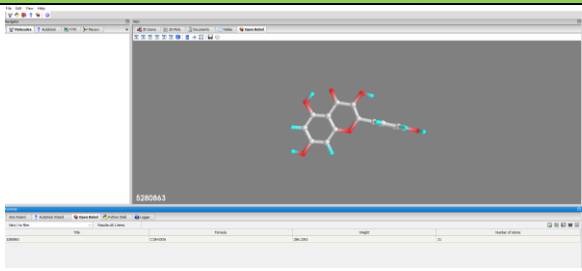
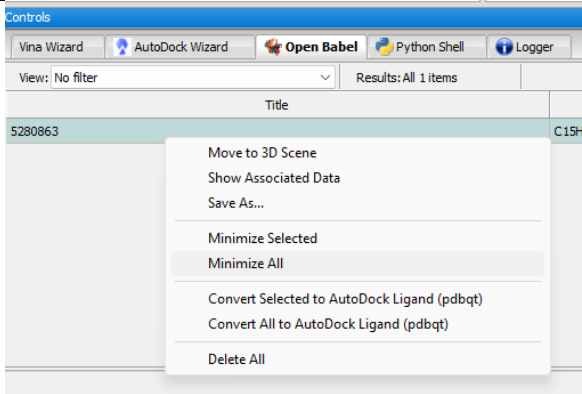
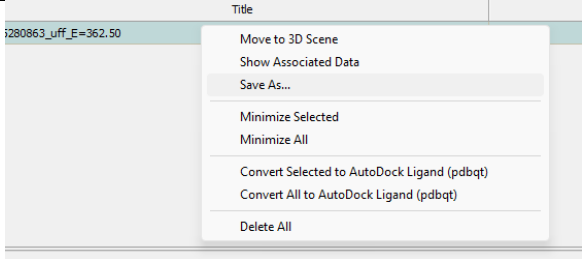
3.4.8 Tahap Preparasi Ligan dan Reseptor

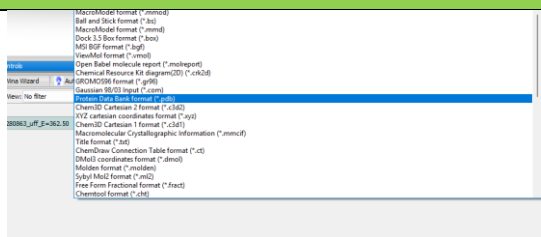
Sebelum simulasi *molecular docking* dijalankan, baik ligan (senyawa uji dan senyawa kontrol) maupun reseptor (protein target) harus melalui tahap preparasi. Tahap ini krusial untuk mengoptimalkan struktur molekul dan membersihkan sisi aktif protein, sehingga hasil simulasi yang diperoleh lebih akurat dan valid.

1) Preparasi Ligan

Tahap preparasi ligan bertujuan untuk menyiapkan struktur tiga dimensi (3D) dari ke-14 ligan uji flavonoid dan Ligan Alami (*Native Ligand*) sebagai kontrol agar berada dalam konformasi energi yang paling stabil. Prosedur preparasi dilakukan menggunakan perangkat lunak PyRx 0.8 (yang terintegrasi dengan *Open Babel*). Selanjutnya, setiap struktur ligan akan melalui proses minimalisasi energi (*energy minimization*) menggunakan medan gaya (*force field*) standar untuk memperoleh konformasi geometri yang paling optimal sebelum dikonversi menjadi format PDBQT. Rincian tahapan preparasi ligan disajikan pada Tabel 3.11.

Tabel 3.11 Deskripsi Tahapan Preparasi Ligan Menggunakan PyRx

No.	Deskripsi Aktivitas	Visualisasi (Gambar)
1	Impor data struktur ligan dengan memuat berkas format SDF yang telah diunduh dari PubChem ke dalam perangkat lunak PyRx melalui open babel.	
2	Proses minimalisasi energi (<i>Energy Minimization</i>) untuk memperbaiki geometri struktur dan mereduksi ketegangan sterik molekul.	
3	Konversi format akhir dengan mengubah seluruh ligan menjadi format PDBQT agar kompatibel dengan	

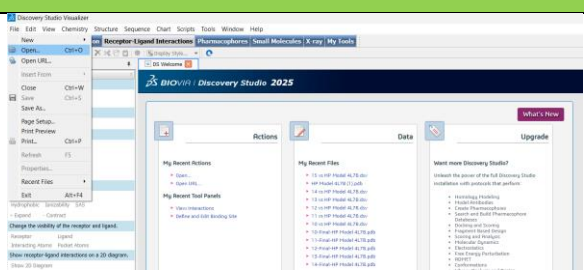
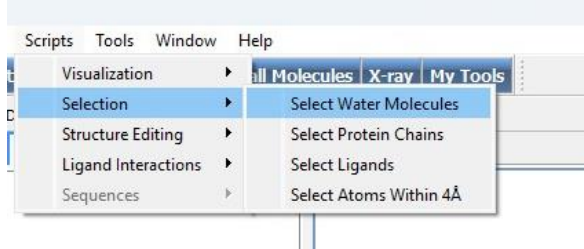
No.	Deskripsi Aktivitas	Visualisasi (Gambar)
	algoritma AutoDock Vina.	

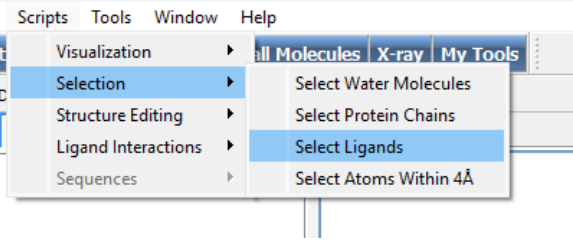
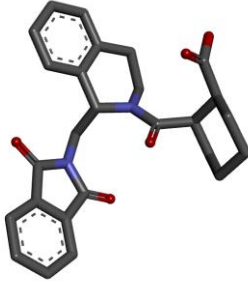
Sumber: Dokumentasi Peneliti, 2025

2) Preparasi Reseptor

Tahap ini bertujuan untuk menyiapkan protein target dengan membersihkan sisi aktifnya dari molekul-molekul non-protein yang dapat mengganggu interaksi. Prosedur preparasi reseptor Keap1 dilakukan menggunakan perangkat lunak BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2025. Selanjutnya, dilakukan seleksi dan penghapusan molekul air (H_2O) serta pemisahan Ligan Alami (*Native Ligand*) dari struktur kristal. Ligan alami yang dipisahkan disimpan sebagai berkas tersendiri untuk keperluan validasi *redocking*. Protein yang telah bersih kemudian disimpan kembali dalam format PDB. Uraian langkah preparasi reseptor dirangkum pada Tabel 3.12.

Tabel 3.12 Deskripsi Tahapan Preparasi Reseptor Menggunakan Discovery Studio

No.	Deskripsi Aktivitas	Visualisasi (Gambar)
1	Visualisasi struktur kristal dengan membuka berkas PDB 4L7B pada perangkat lunak BIOVIA Discovery Studio.	
2	Pembersihan molekul air (<i>Delete Water</i>) untuk menghilangkan interferensi pelarut pada sisi aktif protein.	

No.	Deskripsi Aktivitas	Visualisasi (Gambar)
		
3	Ekstraksi ligan alami dengan memisahkan ligan bawaan dari reseptor dan menyimpannya sebagai file PDB terpisah (untuk kontrol).	
4	Penyimpanan reseptor bersih dalam format PDB yang siap untuk diproses lebih lanjut dalam simulasi <i>docking</i> .	

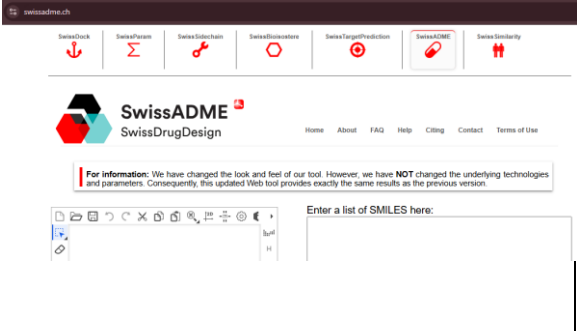
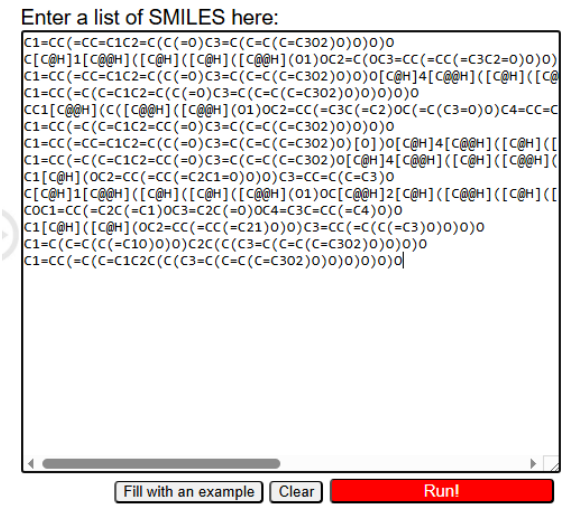
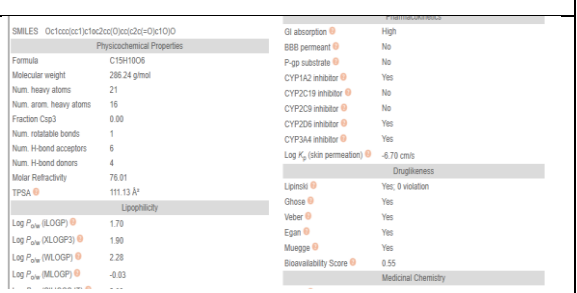
Sumber: Dokumentasi Peneliti, 2025

3.4.9 Tahap Analisis Sifat Fisikokimia

Tahap analisis sifat fisikokimia bertujuan untuk memprediksi karakteristik dasar molekul yang memengaruhi kelayakannya sebagai kandidat obat oral (*Drug-likeness*). Evaluasi ini mengacu secara ketat pada parameter Hukum Lima Lipinski (*Lipinski's Rule of Five*), yang menyatakan bahwa senyawa obat yang baik sebaiknya tidak melanggar lebih dari satu aturan berikut: Berat Molekul ≤ 500 Da, LogP (Lipofilisitas) ≤ 5 , Donor Ikatan Hidrogen ≤ 5 , dan Akseptor Ikatan Hidrogen ≤ 10 . Analisis dilakukan menggunakan *web server* SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>). Input data dilakukan dengan memasukkan format Canonical SMILES dari ke-14 ligan senyawa flavonoid uji dan Ligan Alami (kontrol). Hasil prediksi kemudian dianalisis untuk menentukan profil ketersediaan

hayati (*bioavailability*) senyawa. Uraian langkah analisis fisikokimia disajikan secara deskriptif pada Tabel 3.13.

Tabel 3.13 Deskripsi Tahapan Analisis Fisikokimia via SwissADME

No.	Deskripsi Aktivitas	Visualisasi (Gambar)
1	Akses pada laman utama SwissADME yang dikelola oleh <i>Swiss Institute of Bioinformatics</i> sebagai platform prediksi sifat molekuler.	
2	Input struktur linear dengan menempelkan kode SMILES dari masing-masing senyawa pada kolom <i>List of SMILES</i> yang tersedia. Eksekusi prediksi (<i>Run</i>) untuk mengkalkulasi berbagai parameter fisikokimia secara komputasi.	
3	Interpretasi parameter Lipinski pada bagian <i>Physicochemical Properties</i> dan <i>Drug-likeness</i> untuk menilai kelayakan senyawa sebagai obat oral.	

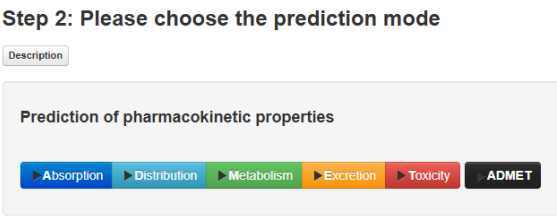
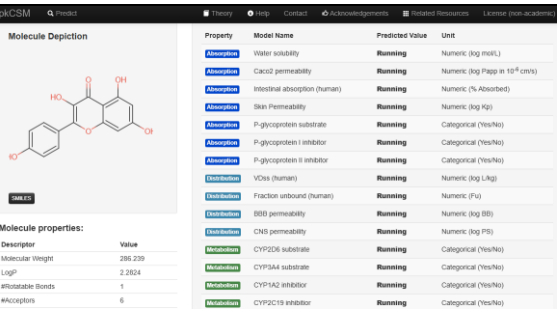
Sumber: Dokumentasi Peneliti, 2025

3.4.10 Tahap Analisis Sifat Farmakokinetik

Tahap analisis farmakokinetik bertujuan untuk memprediksi nasib senyawa di dalam tubuh, meliputi profil Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, dan Ekskresi

Tabel 3.14 Deskripsi Tahapan Analisis Farmakokinetik via pkCSM

No.	Deskripsi Aktivitas	Visualisasi (Gambar)
1	Akses pada laman utama pkCSM yang dikembangkan oleh Universitas Cambridge/Melbourne sebagai platform prediksi farmakokinetik berbasis graf.	The screenshot shows the pkCSM website interface. On the left, there's a navigation menu with links like Home, About, Contact, etc. The main content area has a title "pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic properties using graph-based signatures". Below it, there's an abstract by Douglas E. V. Pires et al. from the University of Medicinal Chemistry. To the right, there's a diagram illustrating the workflow: Input Molecules → Calculate All-Pair Shortest Paths → Graph-Based Signatures → ADMET Train/Test Predictions. There are also sections for "Calculate Properties" and "Available Resources".
2	Input struktur molekuler dengan menempelkan kode SMILES senyawa uji dan memilih mode prediksi ADME pada menu yang tersedia.	This screenshot shows the "Step 1: Please provide a set of molecules (SMILES format)" section. It contains two options for inputting molecular data: Description: A box labeled "Upload your SMILES file:" with a "Choose File" button and the text "No file chosen". Below it, a note states: "Files are expected to have headers identifying the columns File limits". OR: A box labeled "Provide a SMILES string:" containing a text input field with the example SMILES string <chem>[C@H](O)CC(=O)O</chem> and a "Go" button. Below the input field, another example is shown: <chem>CCC(O)CC1=CC=CC=C1C(=O)O</chem>.

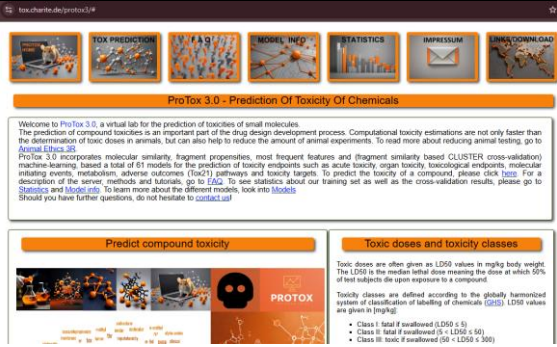
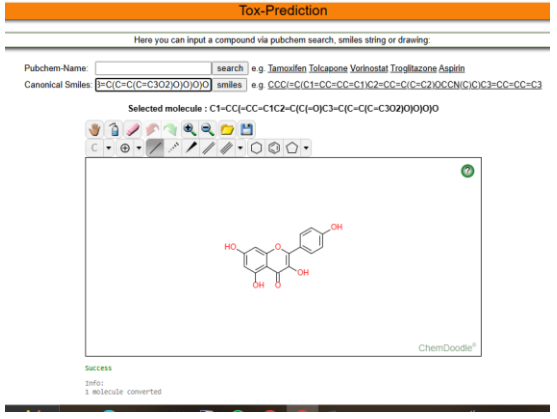
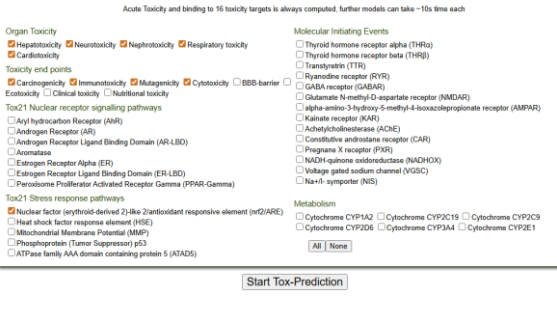
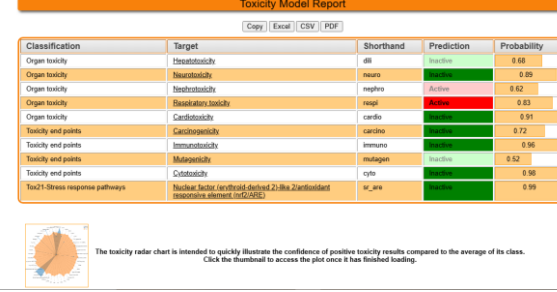
No.	Deskripsi Aktivitas	Visualisasi (Gambar)
3	Eksekusi kalkulasi dengan menekan tombol prediksi untuk memproses algoritma pemetaan struktur-properti.	
4	Interpretasi profil ADME dengan menganalisis nilai numerik pada tab <i>Absorption</i> , <i>Distribution</i> , <i>Metabolism</i> , dan <i>Excretion</i> yang dihasilkan.	

Sumber: Dokumentasi Peneliti, 2025

3.4.11 Tahap Analisis Prediksi Toksisitas

Tahap analisis prediksi toksisitas bertujuan untuk menganalisis profil keamanan senyawa uji guna memperoleh informasi terkait tingkat toksisitas letal, organ target, serta validasi jalur respons stres (*Stress Response Pathway*). Analisis ini penting untuk memenuhi prinsip keamanan bahan alam sebelum melangkah ke uji klinis, serta memastikan bahwa senyawa tersebut aman dikonsumsi. Prediksi dilakukan menggunakan *web server* ProTox 3.0 (<https://tox.charite.de/protox3/>). Input data dilakukan dengan memasukkan kode SMILES dari ke-14 ligan flavonoid uji. Hasil analisis akan mencakup parameter Dosis Letal (LD_{50}), Kelas Toksisitas (Class 1-6 berdasarkan GHS), prediksi Hepatotoksitas, Karsinogenisitas, Mutagenisitas, serta status aktivitas pada jalur Nrf2/ARE sebagai validasi mekanisme antioksidan. Uraian langkah analisis toksisitas disajikan secara deskriptif pada Tabel 3.15.

Tabel 3.15 Deskripsi Tahapan Analisis Toksisitas via ProTox 3.0

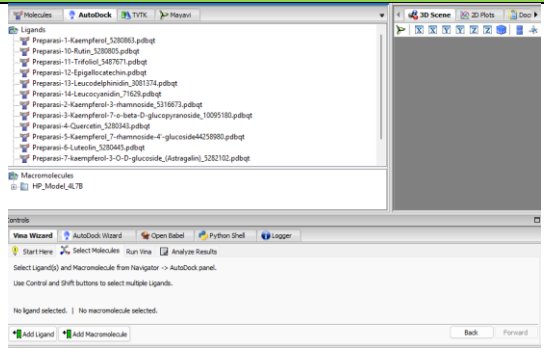
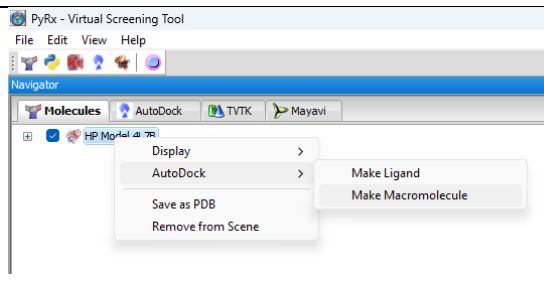
No.	Deskripsi Aktivitas	Visualisasi (Gambar)
1	Akses pada laman utama ProTox 3.0 yang dikembangkan oleh Charité University of Medicine Berlin untuk prediksi toksisitas <i>in silico</i> .	
2	Input kode struktur dengan memasukkan SMILES senyawa uji pada kolom yang tersedia di antarmuka web.	
3	Eksekusi prediksi (<i>Start Tox Prediction</i>) untuk memulai kalkulasi berbasis model <i>machine learning</i> terhadap berbagai <i>endpoint</i> toksisitas.	
4	Interpretasi hasil prediksi yang meliputi nilai LD50, kelas toksisitas, serta diagram radar probabilitas toksisitas organ dan jalur biologis (termasuk Nrf2).	

Sumber: Dokumentasi Peneliti, 2025

3.4.12 Tahap *Molecular Docking* Ligan dan Reseptor

Proses *molecular docking* merupakan tahapan inti dalam penelitian ini yang dijalankan menggunakan perangkat lunak PyRx 0.8 (berbasis algoritma AutoDock Vina). Simulasi dilakukan dengan menginteraksikan reseptor Keap1 yang telah bersih dengan 14 ligan senyawa flavonoid uji serta Ligan Alami (*Native Ligand*) sebagai kontrol validasi. Metode penambatan yang digunakan adalah *Site-Specific Docking*, di mana area pencarian difokuskan pada sisi aktif protein tempat ligan alami terikat, bukan pada seluruh permukaan protein (*Blind Docking*). Pendekatan ini dipilih untuk meningkatkan presisi prediksi afinitas dan akurasi posisi ikatan. Rincian tahapan pelaksanaan simulasi *docking* diuraikan secara deskriptif pada Tabel 3.16.

Tabel 3.16 Deskripsi Tahapan Simulasi *Molecular Docking*

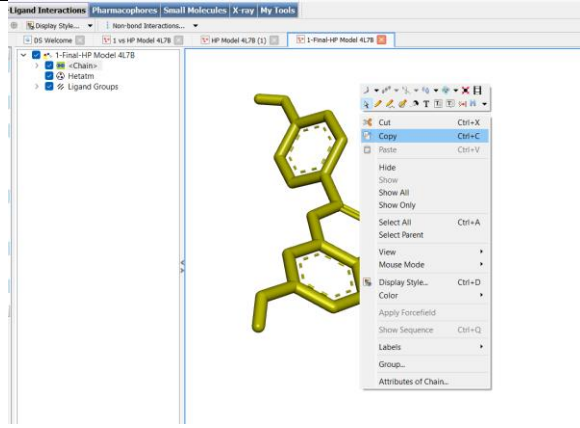
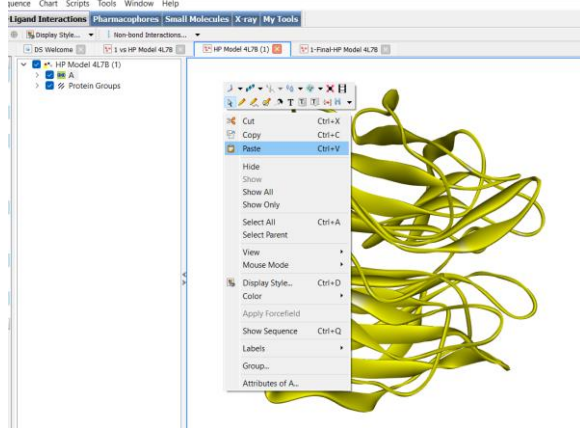
No.	Deskripsi Aktivitas	Visualisasi (Gambar)
1	Inisialisasi data molekul dengan memuat berkas PDBQT dari reseptor Keap1 dan seluruh ligan (uji & kontrol) ke dalam antarmuka Vina Wizard.	
2	Definisi peran molekul dengan menetapkan reseptor sebagai <i>Macromolecule</i> dan senyawa uji sebagai <i>Ligand</i> agar dikenali oleh algoritma.	

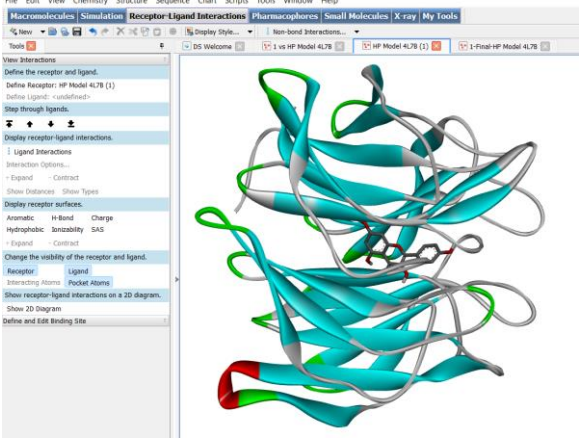
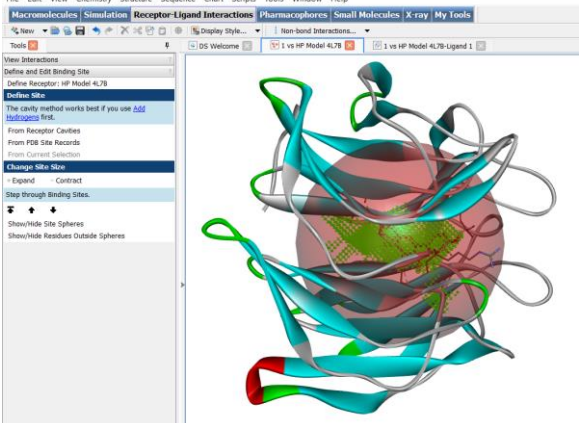
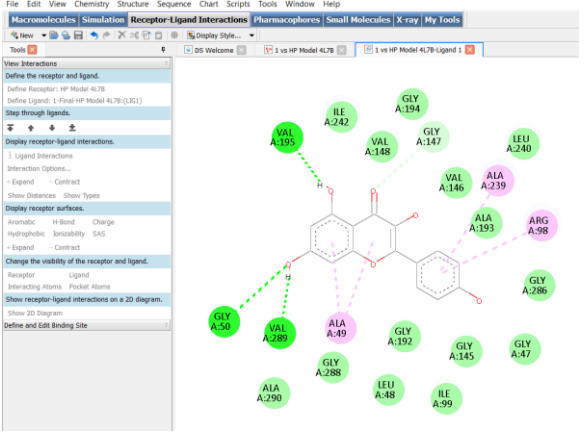
3.4.13 Tahap Visualisasi Hasil *Docking*

Tahap visualisasi bertujuan untuk menganalisis secara kualitatif interaksi molekuler yang terbentuk antara ligan dengan reseptor pada konformasi dengan

energi terendah (*best pose*). Proses ini dilakukan menggunakan perangkat lunak BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2025. Analisis difokuskan untuk mengidentifikasi peta interaksi residu asam amino dan jenis ikatan kimia (seperti ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan gaya Van der Waals) yang menstabilkan kompleks ligan-protein. Selain itu, visualisasi ini digunakan untuk memvalidasi posisi pengikatan ligan uji, apakah menempati kantong sisi aktif (*binding pocket*) yang sama dengan Ligan Alami (*Native Ligand*). Uraian tahapan visualisasi hasil *docking* disajikan pada Tabel 3.17.

Tabel 3.17 Deskripsi Tahapan Visualisasi Interaksi Molekuler

No.	Deskripsi Aktivitas	Visualisasi (Gambar)
1	Integrasi data molekul dengan membuka berkas reseptor Keap1 (PDB) dan berkas hasil <i>docking</i> (PDBQT) untuk menggabungkan struktur protein dengan posisi ligan terpilih.	
2	Seleksi konformasi terbaik dengan memilih pose ligan yang memiliki skor afinitas (<i>Binding Affinity</i>) paling negatif dari daftar hasil <i>docking</i> .	

No.	Deskripsi Aktivitas	Visualisasi (Gambar)
		
3	Visualisasi spasial 3D untuk mengamati orientasi ligan di dalam kantong pengikatan (<i>binding pocket</i>) reseptor secara tiga dimensi.	
4	Analisis diagram interaksi 2D (<i>Show 2D Diagram</i>) untuk memetakan jenis ikatan spesifik dan label residu asam amino yang berinteraksi dengan ligan.	

Sumber: Dokumentasi Peneliti, 2025

3.5 Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah studi dokumentasi dan penelusuran basis data digital. Menurut Sugiyono (2015), studi dokumentasi merupakan suatu teknik pengumpulan data dengan menghimpun dan

menganalisis dokumen-dokumen, baik dokumen tertulis, gambar, maupun elektronik. Teknik ini dipilih karena data penelitian yang dibutuhkan bersifat digital, terdokumentasi, serta dapat diakses melalui hasil identifikasi laboratorium dan repositori bioinformatika daring, bukan berasal dari interaksi langsung dengan subjek. Dalam konteks penelitian *in silico* ini, teknik pengumpulan data dilakukan melalui tiga kegiatan utama untuk mengumpulkan data primer dan data sekunder.

1) Studi Dokumentasi Data *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)* (Pengumpulan Data Primer)

Data hasil analisis LC-MS terhadap ekstrak kulit pisang ranggap diperlakukan sebagai data empiris dasar, karena merupakan data orisinil hasil identifikasi laboratorium yang dilakukan melalui studi kolaborasi. Studi dokumentasi dilakukan terhadap berkas laporan analisis LC-MS yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, yang memuat profil kromatogram, spektrum massa, dan kelimpahan senyawa (*curve area*). Data tersebut menjadi landasan utama untuk menapis dan menetapkan ke-14 senyawa flavonoid spesifik yang digunakan sebagai ligan uji pada tahap simulasi *in silico*.

2) Penelusuran Basis Data Digital (Pengumpulan Data Primer)

Data input simulasi dikumpulkan melalui penelusuran dan pengunduhan berkas pada basis data daring spesifik. Kegiatan ini mencakup pengunduhan berkas struktur molekuler 3D dari 14 ligan uji golongan flavonoid (seperti *Kaempferol*, *Quercetin*, *Luteolin*, *Rutin*, dan derivatnya) dan ligan kontrol positif (Ligan Alami/*Native Ligand*) dari basis data PubChem, serta struktur makromolekul protein target Keap1 (PDB ID: 4L7B) dari basis data RCSB Protein Data Bank (PDB). Seluruh berkas digital tersebut kemudian diolah langsung dalam tahap preparasi dan simulasi *in silico*.

3) Studi Pustaka

Data sekunder dikumpulkan melalui studi pustaka dengan menelaah dan menganalisis dokumen tertulis. Sumber yang digunakan meliputi jurnal ilmiah terakreditasi, buku, dan artikel penelitian yang relevan, yang dimanfaatkan untuk membangun landasan teoritis, memperkuat justifikasi pemilihan 14 senyawa

flavonoid sebagai ligan uji, serta memvalidasi mekanisme interaksi molekuler terhadap protein target Keap1 dalam sistem pertahanan antioksidan.

3.6 Teknik Analisis Data

Teknik analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah teknik analisis statistik deskriptif kuantitatif. Menurut Sugiyono (2015), teknik analisis statistik deskriptif kuantitatif adalah metode yang digunakan untuk menganalisis data dengan cara mendeskripsikan atau menggambarkan data yang telah terkumpul tanpa bermaksud membuat kesimpulan yang berlaku untuk umum atau generalisasi. Pendekatan ini sangat relevan untuk penelitian *in silico* ini, karena tujuannya adalah untuk menyajikan, mengolah, dan menginterpretasikan data-data numerik seperti skor energi afinitas (*Binding Affinity*) dari hasil *molecular docking*, parameter fisikokimia dan farmakokinetik, serta nilai prediksi toksisitas guna memberikan gambaran terperinci mengenai potensi setiap senyawa yang diuji.

Proses analisis data dalam penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan sistematis.

1) Tabulasi dan Organisasi Data

Langkah pertama adalah mengorganisir seluruh data yang diperoleh dari simulasi dan prediksi online. Semua data kuantitatif akan disusun secara sistematis ke dalam tabel-tabel ringkasan untuk mempermudah perbandingan dan analisis. Data yang ditabulasi meliputi:

- a) nilai kelimpahan relatif (*curve area*) dari data LC-MS.
- b) parameter sifat fisikokimia (sesuai Kaidah Aturan Lima Lipinski) dari web server SwissADME.
- c) parameter farmakokinetik (ADME) dari *online tool* pkCSM.
- d) nilai prediksi LD₅₀ (mg/kg) dan kelas toksisitas dari web server ProTox 3.0.
- e) skor energi afinitas (*Binding Affinity*) dan nilai RMSD dari *hasil molecular docking*.

2) Analisis Hasil *Molecular Docking*

Data kuantitatif utama dari hasil *docking* akan dianalisis secara deskriptif untuk mengevaluasi interaksi ligan-reseptor.

- a) Perbandingan skor energi afinitas: skor energi afinitas dari ke-14 senyawa flavonoid uji (seperti *Kaempferol*, *Quercetin*, *Rutin*, dkk.) yang disajikan dalam satuan kkal/mol, akan dibandingkan satu sama lain dan dengan Ligan Alami (*Native Ligand*) sebagai kontrol positif. Nilai yang lebih negatif menunjukkan afinitas ikatan yang diprediksi lebih kuat dan stabil
- b) Analisis Integratif Potensi (Aktivitas x Kelimpahan): data skor afinitas akan disandingkan dengan data kelimpahan (*curve area*). Senyawa yang memiliki kombinasi skor afinitas kuat (negatif tinggi) dan kelimpahan tinggi akan diinterpretasikan sebagai senyawa bioaktif utama (*major bioactive compound*) yang berkontribusi paling besar terhadap khasiat ekstrak.
- c) Analisis validasi pose: dilakukan verifikasi terhadap nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*) dari hasil *redocking*. Sebuah pose *docking* dianggap valid jika nilai RMSD-nya berada di bawah ambang batas yang ditetapkan ($\leq 2 \text{ \AA}$).
- d) Analisis interaksi kualitatif: sebagai data pendukung, hasil visualisasi interaksi akan dianalisis secara kualitatif untuk mendeskripsikan jenis ikatan dan residu asam amino spesifik pada reseptor yang terlibat dalam interaksi serta membandingkan kemiripannya dengan interaksi ligan alami.

3) Analisis Sifat Fisikokimia (*Drug-likeness*)

Data dari web server SwissADME akan dianalisis secara deskriptif untuk mengevaluasi kelayakan obat (*drug-likeness*).

- a) Analisis kaidah lima lipinski: analisis difokuskan pada pemenuhan empat parameter Kaidah Lima Lipinski (*Lipinski's Rule of Five*):
 - (1) berat molekul (MW): ≤ 500 Dalton
 - (2) logP (koefisien partisi oktanol/Air): ≤ 5
 - (3) jumlah donor ikatan hidrogen (HBD): ≤ 5
 - (4) jumlah akseptor ikatan hidrogen (HBA): ≤ 10
 - b) Penetapan kriteria kelayakan: senyawa akan dikategorikan memiliki profil *drug-likeness* yang baik jika memiliki 0 atau 1 pelanggaran ($\text{violations} \leq 1$) terhadap kaidah tersebut.
- ### 4) Analisis Sifat Farmakokinetik (ADME)

Data kuantitatif terkait profil Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, dan Ekskresi (ADME) dari online tool pkCSM akan dianalisis secara deskriptif.

- a) Analisis absorpsi: parameter penyerapan usus (Human Intestinal Absorption/HIA) dianalisis, dengan kriteria nilai $> 30\%$ yang dianggap dapat diserap dengan baik.
 - b) Analisis distribusi: parameter penetrasi sawar darah otak (logBB) dianalisis untuk memprediksi kemampuan senyawa menembus sistem saraf pusat.
 - c) Analisis metabolisme: parameter inhibisi Cytochrome P450 (misal: CYP3A4, CYP2D6) dianalisis, dengan kriteria prediksi *No* (tidak menghambat) yang lebih disukai untuk mengurangi risiko interaksi obat.
 - d) Analisis ekskresi: parameter prediksi sebagai substrat Renal OCT2 transporter (transporter kation organik 2 ginjal) dianalisis. Kriteria prediksi *Yes* (ya) mengindikasikan senyawa tersebut kemungkinan diekskresikan secara aktif melalui ginjal (*urine*).
- 5) Analisis Prediksi Toksisitas

Data kuantitatif dari web server ProTox 3.0 akan dianalisis secara deskriptif untuk mengkategorikan tingkat keamanan prediktif.

- a) Analisis LD₅₀: nilai prediksi LD₅₀ (mg/kg) dianalisis sebagai parameter utama toksisitas akut.
- b) Analisis kelas toksisitas: senyawa dikategorikan berdasarkan standar klasifikasi toksisitas akut GHS (*Globally Harmonized System*). Kategori yang diharapkan adalah yang paling tidak toksik (misal kategori 5: 2000-5000 mg/kg, atau tidak terklasifikasi: > 5000 mg/kg) yang menunjukkan tingkat keamanan prediktif yang tinggi.
- c) Analisis Toksisitas Spesifik (*Toxicity Endpoints*) dan Validasi Aktivitas, prediksi toksisitas diperluas dengan menganalisis status senyawa terhadap berbagai endpoint biologis. Adapun parameter yang dianalisis meliputi:
 - (1) toksisitas organ (*organ toxicity*): *hepatotoxicity* (hati), *neurotoxicity* (saraf), *nephrotoxicity* (ginjal), *respiratory toxicity* (pernapasan), dan *cardiotoxicity* (jantung).

- (2) endpoint toksisitas umum: *carcinogenicity* (karsinogen), *immunotoxicity* (imun), *mutagenicity* (mutagen), dan *cytotoxicity* (sitotoksik).
- (3) jalur respons stres (*stress response pathway*): khususnya Nrf2/ARE (*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2/antioxidant responsive element*).

Prediksi status *Tidak Aktif (Inactive)* diharapkan untuk semua parameter toksisitas (Organ dan Umum). Pengecualian khusus pada jalur Nrf2/ARE, di mana prediksi status *Aktif (Active)* justru sangat diharapkan karena berfungsi sebagai validasi komputasional tambahan bahwa senyawa tersebut mampu mengaktifkan sistem pertahanan antioksidan.

[illegible]

3.7.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Siliwangi, Tasikmalaya (Gambar 3.1), yang menjadi lokasi pelaksanaan seluruh tahapan analisis, meliputi preparasi ligan dan reseptor, simulasi *molecular docking*, serta analisis hasil *in silico* menggunakan perangkat lunak berbasis web dan aplikasi pendukung. Penelitian ini juga didukung oleh data sekunder hasil *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)* yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta (Gambar 3.2), sebagai sumber data senyawa metabolit sekunder kulit pisang ranggap (*Musa troglodytarum* L.).



Gambar 3.1 Laboratorium Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Siliwangi, Tasikmalaya.
Sumber: Dokumentasi Peneliti, 2025



Gambar 3.2 Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
Sumber: Nugroho & Firsto, 2023