

BAB 3

PROSEDUR PENELITIAN

3.1 Metode Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini merupakan penelitian kuantitatif deskriptif secara *in silico* dengan teknik *molecular docking*. Penelitian kuantitatif menurut (Sugiyono, 2020) adalah metode yang berlandaskan pada filsafat positivisme, menggunakan instrumen untuk mengumpulkan data dari populasi atau sampel tertentu, kemudian dianalisis secara statistik guna menguji hipotesis yang telah dirumuskan. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini merupakan senyawa metabolit sekunder daun belimbing wuluh yang diperoleh berdasarkan kajian literatur. Terdapat tiga literatur utama yang diacu dalam penelitian ini, yaitu pengujian GC/MS pada ekstrak daun belimbing wuluh yang dilakukan oleh (Hamzah et al., 2021), pengujian LC-QTOF-MS/MS pada ekstrak daun belimbing wuluh oleh (Ahmed et al., 2018), dan pengujian *Ultrasonic-Assisted Extraction* (UAE) yang diikuti dengan analisis *Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry* (UHPLC-HRMS) yang dilakukan oleh (Alfiraza et al., 2025). Pengujian secara *in silico* menggunakan aplikasi PyRx, dan Biovia Discovery Studio Visualizer 2025. Protein yang digunakan adalah Estrogen- α (ER- α) (Mohtar et al., 2021). Sedangkan senyawa yang akan dikaji adalah Squalene, δ -Tocopherol, Cucumerin A, Afzelechin 3-O-alpha-L-rhamnopyranoside, dan Fluorescein Methyl Ester yang diperoleh dari hasil kajian literatur dengan ligan kontrol 4-hydroxytamoxifen (4-OHT).

3.2 Variabel Penelitian

Variabel penelitian adalah segala sesuatu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dikaji dan dipelajari agar diperoleh informasi mengenai hal tersebut, yang selanjutnya digunakan sebagai dasar dalam penarikan kesimpulan penelitian (Sugiyono, 2020). Variabel dalam penelitian ini terdiri dari variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas adalah variabel yang berperan sebagai faktor penyebab atau yang memengaruhi terjadinya perubahan pada variabel terikat.

Sementara itu, variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi atau menjadi dampak dari adanya variabel bebas tersebut (Sugiyono, 2020).

3.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah lima senyawa uji, yaitu Squalene, δ -Tocopherol, Cucumerin A, Afzelechin 3-O- α -L-rhamnopyranoside, dan Fluorescein Methyl Ester.

3.2.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antikanker payudara yang dinilai berdasarkan nilai *binding affinity*, hasil analisis fisikokimia, farmakokinetik, dan toksisitas yang diperoleh melalui *molecular docking* secara *in silico*.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi merupakan keseluruhan objek atau subjek yang memiliki sifat dan karakteristik tertentu yang telah ditentukan oleh peneliti untuk diteliti dan dijadikan dasar dalam penarikan kesimpulan. Sementara itu, sampel adalah sebagian dari populasi yang memiliki karakteristik serupa dan digunakan sebagai perwakilan dalam penelitian (Sugiyono, 2020). Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun belimbing wuluh yang telah teridentifikasi berdasarkan hasil uji GC-MS dan LC-QTOF-MS/MS dari berbagai literatur ilmiah.

Teknik pengambilan sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *purposive sampling*. *Purposive sampling* adalah teknik penentuan sampel yang dilakukan dengan menggunakan kriteria atau pertimbangan tertentu yang telah ditetapkan oleh peneliti (Sugiyono, 2020). Sampel yang digunakan dalam penelitian ini meliputi lima senyawa, yaitu Squalene, δ -Tocopherol, Cucumerin A, Afzelechin 3-O- α -L-rhamnopyranoside, dan Fluorescein Methyl Ester. Pertimbangan tersebut berdasarkan pada ketersediaan data struktur 3D senyawa metabolit sekunder daun belimbing wuluh serta relevansinya terhadap aktivitas antikanker payudara. Senyawa yang dipilih adalah senyawa yang telah teridentifikasi melalui hasil uji GC-MS dan LC-QTOF-MS/MS dari penelitian

terdahulu, memiliki potensi aktivitas biologis, dan data strukturnya tersedia dalam basis data PubChem sehingga dapat dianalisis menggunakan metode *in silico*.

Adapun fokus penelitian yang akan dilakukan adalah menganalisis secara *in silico* dengan metode *molecular docking* pada senyawa metabolit sekunder daun belimbing wuluh dengan reseptor Estrogen- α (ER- α) yang menjadi salah satu pemicu kanker payudara. Hasil yang kemudian akan dianalisis meliputi afinitas energi, fisikokimia, farmakokinetik, dan tingkat toksisitas senyawa metabolit sekunder daun belimbing wuluh sebagai antikanker payudara. Hal ini bertujuan untuk memaparkan hasil interaksi yang terjadi sehingga kemudian menghasilkan kesimpulan apakah senyawa metabolit sekunder daun belimbing wuluh memiliki potensi sebagai antikanker payudara atau tidak.

3.4 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode kuantitatif deskriptif dengan pendekatan *in silico* untuk menggambarkan dan menganalisis potensi interaksi antara senyawa metabolit sekunder daun belimbing wuluh dengan reseptor Estrogen- α yang berperan dalam perkembangan kanker payudara. Analisis dilakukan melalui tahapan molecular docking, validasi protein, serta evaluasi sifat fisikokimia, farmakokinetik, dan toksisitas senyawa menggunakan perangkat lunak berbasis komputer.

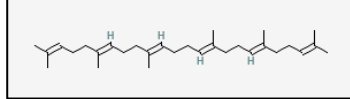
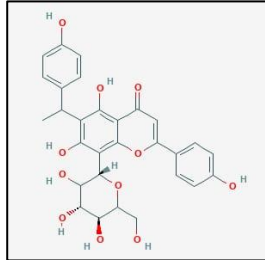
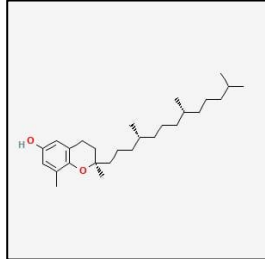
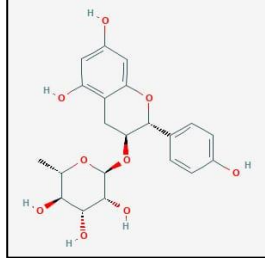
3.5 Langkah-Langkah Penelitian

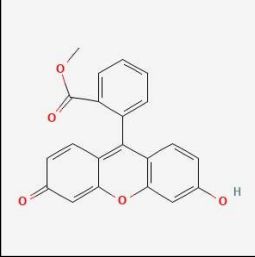
3.5.1 Alat dan Bahan

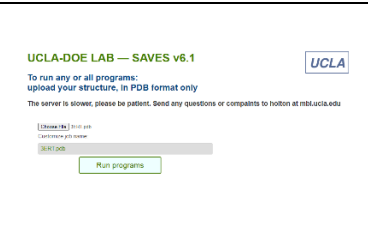
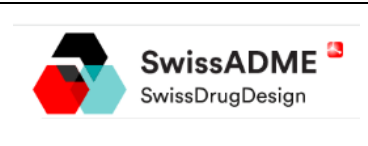
Dalam pelaksanaannya, peneliti menyiapkan beberapa alat dan bahan yang akan digunakan selama penelitian yang tercantum dalam tabel 3.1.

Tabel 3. 1 Alat dan Bahan

No.	Alat dan Bahan	Spesifikasi dan Kegunaan	Jumlah	Gambar	
1.	Handphone	Samsung A13 untuk menunjang pengambilan dokumentasi selama penelitian.	1 Unit		

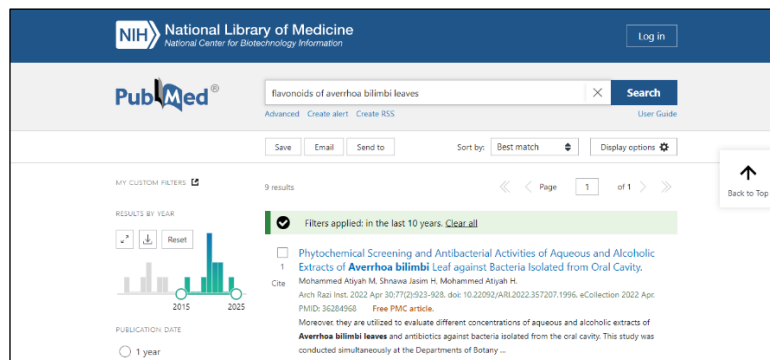
2.	Laptop	HP dengan tipe processor Intel(R) Celeron(R) N3050 @ 1.60GHz ditambah beberapa <i>hardware</i> dan <i>software</i> pendukung yang digunakan untuk melakukan analisis <i>in silico</i> .	1 Unit	
3.	Senyawa Metabolit Sekunder Daun Belimbing Wuluh	Beberapa golongan senyawa yang terkandung dalam daun belimbing wuluh, digunakan sebagai bahan analisis secara <i>in silico</i> sebagai kandidat antikanker payudara dengan rincian sebagai berikut: Squalene, δ -Tocopherol, Cucumerin A, Afzelechin 3-O-alpha-L-rhamnopyranoside, dan Fluorescein Methyl Ester.	5 Jenis	   

				
4.	Estrogen- α (ER- α)	Protein target dengan PDB ID: 3ERT sebagai reseptor kanker payudara yang menjadi fokus penelitian dan akan diujikan dengan senyawa metabolit sekunder dari daun belimbing wuluh yang ditargetkan.	1 Buah	
5.	PyRx	Versi 0.8 sebagai <i>software</i> yang digunakan untuk <i>molecular docking</i> .	1 Buah	 Python Prescription Virtual Screening Tool
6.	Biovia Discovery Studio Visualizer 2025	Versi 2025, sebagai <i>software</i> yang digunakan untuk melakukan preparasi protein target dan visualisasi hasil <i>molecular docking</i> untuk melihat interaksi antara ligan dan protein dengan tampilan 2D.	1 Buah	
7.	Pubchem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)	Pengunduhan berkas senyawa untuk mendapatkan bentuk struktur 3D dalam format SDF.	1 Buah	

8.	Saves (https://saves.mbi.ucla.edu/)	Digunakan untuk memverifikasi struktur protein ER- α yang akan digunakan dalam penelitian.	1 Buah	
9.	Swiss ADME (http://www.swissadme.ch/index.php)	Digunakan untuk analisis fisikokimia dan farmakokinetik.	1 Buah	
10.	ProTox 3.0 (https://tox.charite.de/protox3/)	Digunakan untuk prediksi toksisitas.	1 Buah	

3.5.2 Kajian Literatur terkait Senyawa yang Terkandung dalam Daun Belimbing Wuluh

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

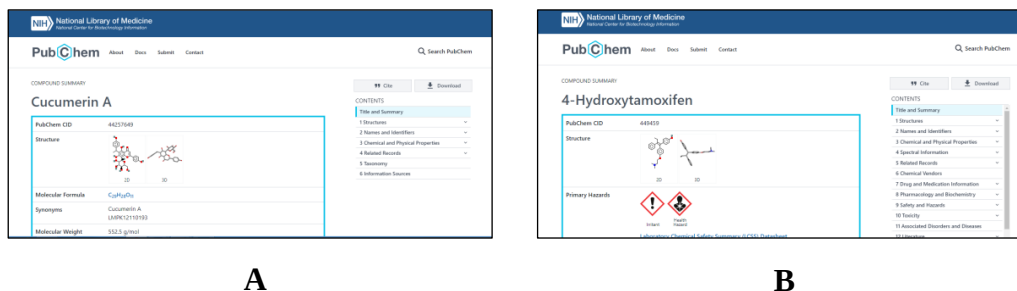


Gambar 3. 1 Pencarian dan analisis senyawa metabolit sekunder daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)
(Sumber: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>)

3.5.3 Pengunduhan Berkas Ligan Senyawa Metabolit Sekunder dan 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT)

Daftar senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun belimbing wuluh berdasarkan literatur akan dianalisis untuk mengetahui senyawa mana saja yang memiliki potensi sebagai antikanker payudara. Proses analisis

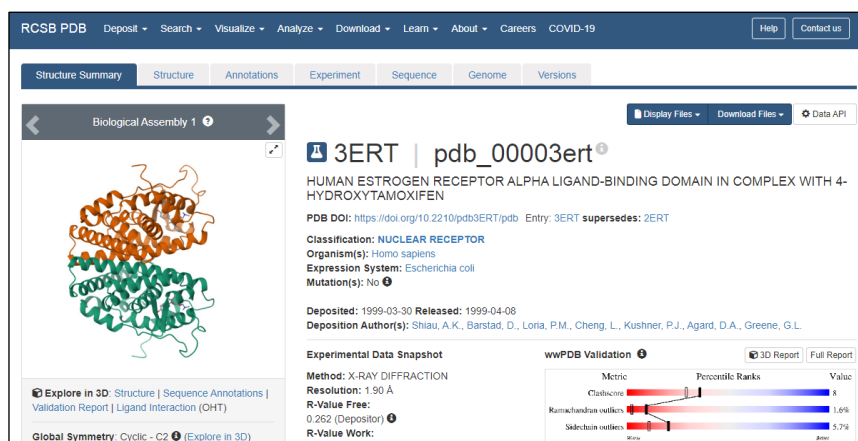
dimulai dari pencarian senyawa melalui kajian literatur dari berbagai artikel jurnal yang membahas mengenai senyawa yang terkandung dalam daun belimbing wuluh. Kemudian dilakukan pengunduhan berkas dari senyawa-senyawa tersebut melalui webserver database biologi <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> seperti pada gambar 3.2 untuk mendapatkan bentuk struktur 3D dalam format SDF.



Gambar 3. 2 A) Pengunduhan Berkas Senyawa Uji; B) Pengunduhan Ligan Kontrol 4-Hydroxytamoxifen
(Sumber: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

3.5.4 Pengunduhan Berkas Reseptor Estrogen- α (ER- α)

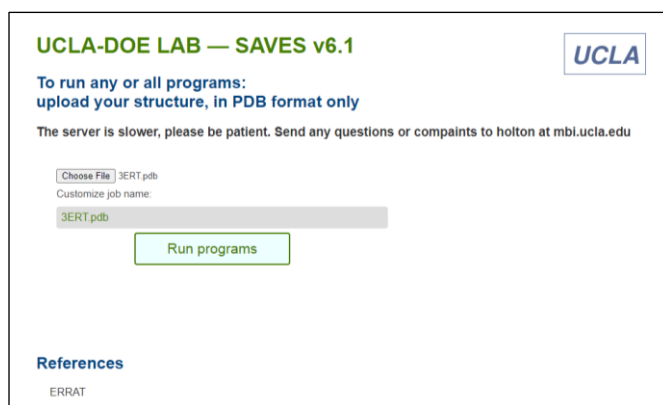
Reseptor Estrogen dicari dengan mengkaji berbagai artikel jurnal yang membahas mengenai mekanisme terjadinya kanker payudara atau artikel yang meneliti terkait obat antikanker payudara. Kemudian pengunduhan berkas reseptor ER- α seperti yang tertera pada gambar 3.3 dilakukan melalui webserver database biologi <https://www.rcsb.org/> dengan PDB ID: 3ERT untuk mendapatkan bentuk struktur 3D dalam format PDB.



Gambar 3. 3 Pengunduhan Berkas Reseptor Estrogen- α
(Sumber: <https://www.rcsb.org/>)

3.5.5 Validasi Protein ER- α menggunakan Uji Errat

Berkas reseptor ER- α yang telah diunduh kemudian divalidasi protein menggunakan uji Errat pada webserver Saves seperti pada gambar 3.4 untuk memverifikasi struktur protein ER- α yang akan digunakan dalam penelitian. Uji ini bertujuan untuk memastikan bahwa struktur protein yang diteliti akurat dan valid untuk menentukan apakah struktur protein yang digunakan telah memenuhi standar kualitas yang ditentukan ataukah belum.

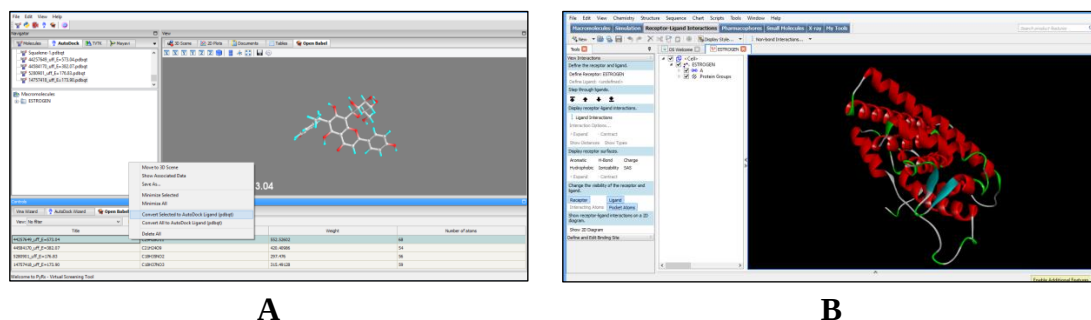


Gambar 3. 4 Uji Validasi Protein ER- α
(Sumber: <https://saves.mbi.ucla.edu/>)

3.5.6 Preparasi Ligan dan Reseptor

Proses preparasi ligan atau senyawa metabolit sekunder dari daun belimbing wuluh dilakukan dalam aplikasi PyRx seperti pada gambar 3.5(A) dengan cara mengunggah berkas ligan yang sebelumnya telah didapatkan dari Pubchem melalui menu “**Open Babel**”, setelah terunggah klik 1 kali pada nama berkas, klik kanan, kemudian pilih “**Minimize all**”. Setelah itu klik kanan kembali pada file ligan, kemudian pilih “**Convert Selected to AutoDock Ligand (pdbqt)**” lalu file disimpan dalam format pdb. Sedangkan untuk reseptor ER- α dipreparasi melalui aplikasi Biovia Discovery Studio Visualizer 2025 dengan cara mengunggah berkas struktur ER- α yang sebelumnya didapatkan dari RSCB PDB pada menu “**File**” lalu “**Open**”, kemudian gunakan *shortcut* Ctrl+H untuk melihat tampilan bagian-bagian protein, setelah itu klik kanan pada “**Water**” dan klik “**Cut**” untuk menghilangkan molekul air, hal yang sama dilakukan pada bagian “**Ligand groups**” untuk menghilangkan *native ligand* dan “**Hetatm**” untuk menghilangkan molekul yang tidak diinginkan, selain itu hidrogen polar juga

ditambahkan melalui menu **Chemistry + Hydrogens + add polar**, hal ini dilakukan untuk meminimalisasi adanya gangguan dalam proses *molecular docking* (gambar 3.5B).

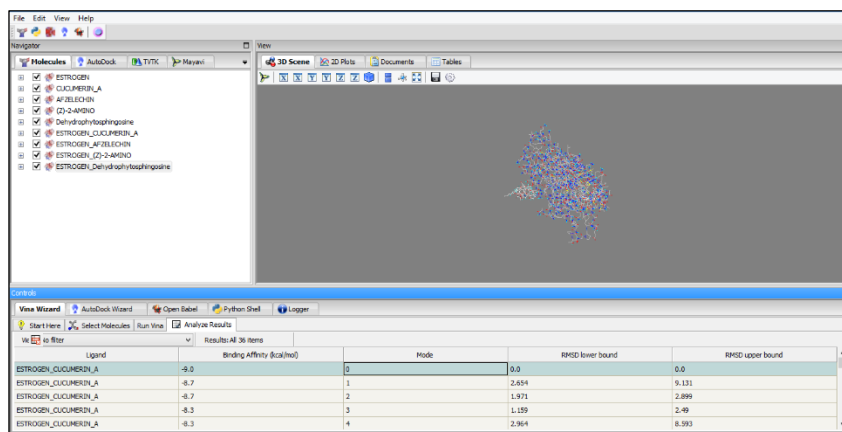


Gambar 3. 5 A) Preparasi Ligan; B) Preparasi Reseptor ER- α
(Sumber: Dokumentasi Pribadi)

3.5.7 Simulasi *Molecular Docking* Senyawa Metabolit Sekunder, 4-OHT, dan Reseptor ER- α

Simulasi *molecular docking* dilakukan dalam aplikasi PyRx dengan langkah pertama yaitu mengunggah berkas ER- α yang sebelumnya telah dipreparasi melalui aplikasi Biovia Discovery Studio Visualizer 2025. Unggah file reseptor dan ligan dengan cara pilih menu “**Load Molecule (MolKit)**”. Lalu klik kanan pada file reseptor kemudian pilih “**AutoDock**” kemudian pilih “**Make Macromolecule**”. Lakukan hal yang sama pada seluruh file ligan, namun perbedaannya adalah setelah klik “**AutoDock**” kemudian pilih “**Make Ligand**”.

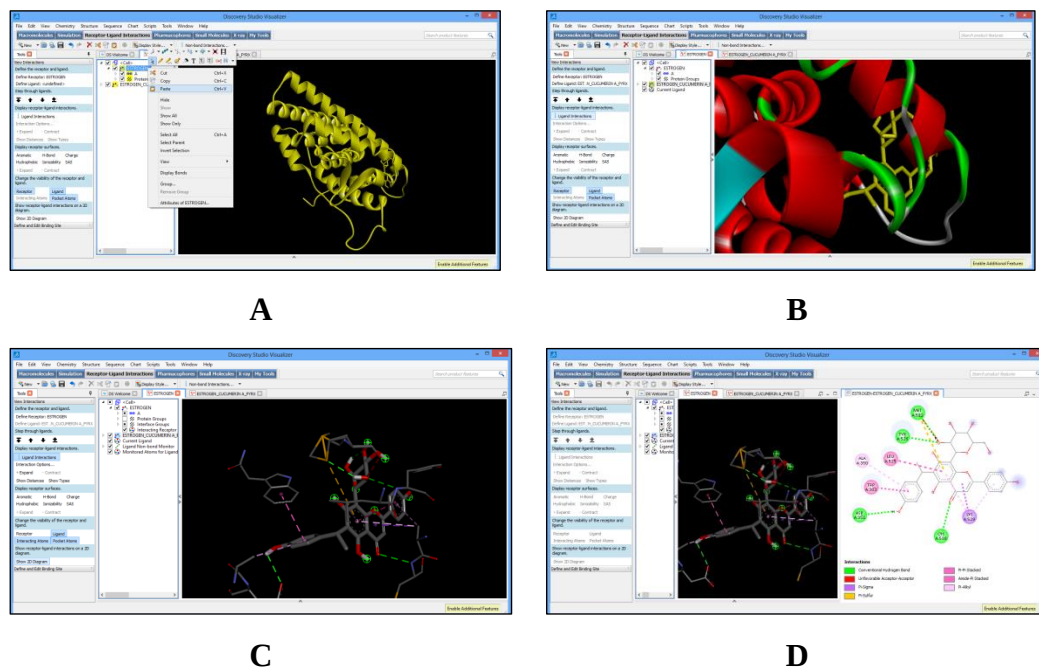
Pada menu Vina Wizard klik “**Select Molecule**”, kemudian pilih semua senyawa yang akan di *docking*. Setelah itu, klik “**Forward**” dan pilih menu “**Maximize**” agar ligan, ligan kontrol, dan reseptor ER- α berada pada wilayah grid box. Setelah semuanya masuk dalam wilayah tersebut, kemudian pilih menu “**Forward**”, lalu tunggu hingga proses *running* selesai. Setelah proses *molecular docking* selesai maka hasil akan muncul dengan menampilkan skor *binding affinity* (gambar 3.6), skor tersebut yang kemudian akan dianalisis untuk menarik kesimpulan hasil *molecular docking* nya. Kemudian klik pada mode 0 atau mode 1. Setelah itu, hasil *molecular docking* disimpan dalam format PDB untuk dapat divisualisasikan dalam aplikasi Biovia Discovery Studio Visualizer 2025.



Gambar 3. 6 Tampilan Skor *Binding Affinity* setelah dilakukan *Docking*
(Sumber: Dokumentasi Pribadi)

3.5.8 Visualisasi Hasil *Docking*

Setelah proses simulasi *molecular docking* selesai, dilakukan visualisasi hasil *docking* seperti pada gambar 3.7 dalam aplikasi Biovia Discovery Studio Visualizer 2025 untuk dapat melihat bagaimana ligan dari senyawa metabolit sekunder daun belimbing wuluh berikatan dengan reseptor ER- α pada bagian *binding site* nya. Selain itu dilakukan juga visualisasi dalam bentuk diagram 2D untuk dapat mengetahui ikatan apa saja yang terjadi antara ligan dan reseptor. Pada Biovia Discovery Studio Visualizer 2025, unggah berkas hasil *docking* yang telah didapatkan dalam format PDB dari menu “**File**” lalu klik pilihan “**Open**”. Kemudian unggah juga reseptor yang telah dipreparasi sebelumnya. Pada halaman file ligan, gunakan *shortcut* Ctrl+H untuk melihat tampilan bagian-bagian ligan, klik kanan dan pilih “**Copy**”. Beralih pada halaman file reseptor, klik kanan kemudian “**Paste**”. Pilih file ligan kemudian klik “**Define Ligand: <undefined>**”. Klik “**Ligand Interaction**” untuk melihat interaksi antara reseptor dengan ligan. Terakhir, pilih “**Show 2D Diagram**” untuk melihat interaksi antara ligan dan reseptor dalam tampilan 2D.



Gambar 3. 7 A) Tahap Paste pada File Reseptor; B) Tampilan setelah Klik *Define Ligand*; C) Tampilan *Ligand Interaction 3D*; D) Tampilan *Ligand Interaction 2D* dan 3D

(Sumber: Dokumentasi Pribadi)

3.5.9 Analisis Fisikokimia dan Farmakokinetik

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

data yang langsung memberikan data kepada pengumpul data, dan sumber sekunder merupakan sumber yang tidak langsung memberikan data kepada pengumpul data, misalnya lewat orang lain atau lewat dokumen. Dokumen dalam teknik pengumpulan data penelitian merupakan catatan peristiwa yang telah terjadi, yang dapat berupa tulisan, gambar, maupun karya monumental dari seseorang, dan berfungsi sebagai sumber data penting untuk memperoleh informasi (Sugiyono, 2020). Teknik pengumpulan data yang diterapkan dalam penelitian ini adalah teknik dokumentasi yang didapatkan dari studi literatur, *screening* database biologi melalui website, dan teknik *in silico*. Data yang dikaji dalam penelitian ini berasal dari dua sumber data, di antaranya:

3.6.1 Sumber Primer

Penelitian ini menggunakan sumber data primer yang berasal dari web Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), analisis sifat fisikokimia dan farmakokinetik pada web SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>), prediksi toksisitas pada web ProTox 3.0 (<https://tox.charite.de/protox3/#>), dan simulasi *molecular docking* menggunakan aplikasi PyRx dan Biovia Discovery Studio Visualizer 2025 dari senyawa metabolit sekunder pada daun belimbing wuluh terhadap reseptor Estrogen- α (ER- α) untuk menjawab pertanyaan penelitian.

3.6.2 Sumber Sekunder

Penelitian ini juga menggunakan sumber data sekunder yang diperoleh dari hasil kajian literatur dari beberapa referensi yang digunakan oleh peneliti terkait kandungan senyawa potensial dalam daun belimbing wuluh sebagai langkah awal dalam melakukan analisis *in silico*. Adapun kriteria sumber sekunder (artikel) yang digunakan antara lain, artikel yang dipublikasikan dalam 10 tahun terakhir (2015–2025), tersedia *full-text* dalam bahasa Inggris atau Indonesia, memuat laporan identifikasi senyawa metabolit sekunder *A. bilimbi* melalui uji fitokimia (GCMS, LC-QTOF-MS/MS, dan lain-lain), serta terindeks di jurnal internasional bereputasi atau jurnal nasional terakreditasi (SINTA).

3.7 Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian adalah perangkat yang berfungsi sebagai alat ukur dalam mengumpulkan data yang berkaitan dengan variabel yang menjadi fokus penelitian, sehingga hasil yang diperoleh dapat dianalisis secara objektif dan sistematis (Sugiyono, 2020). Instrumen dalam penelitian ini berupa perangkat lunak dan webserver bioinformatika yang digunakan untuk memperoleh dan menganalisis data, yaitu:

- a. PubChem, untuk memperoleh struktur 3D senyawa metabolit sekunder.
- b. RCSB Protein Data Bank, untuk memperoleh struktur 3D reseptor Estrogen- α (ER- α).
- c. SAVES Server (Errat), untuk validasi struktur protein.
- d. PyRx, untuk melakukan simulasi *molecular docking* dan mendapatkan nilai afinitas ikatan antara ligan dan reseptor.
- e. Biovia Discovery Studio 2025 untuk visualisasi hasil *docking* dalam bentuk 2D dan 3D.
- f. SwissADME, untuk menganalisis sifat fisikokimia dan farmakokinetik.
- g. ProTox 3.0, untuk menguji toksisitas senyawa uji.

3.8 Teknik Pengolahan dan Analisis Data

Teknik analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis secara deskriptif hasil dari simulasi *molecular docking* menggunakan aplikasi Biovia Discovery Studio Visualizer 2025 dan PyRx, analisis sifat fisikokimia dan farmakokinetik dengan menggunakan parameter *Lipinski's rule of five* dan ADME, serta uji prediksi toksisitas menggunakan webserver ProTox 3.0 dari senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap salah satu reseptor kanker payudara yaitu Estrogen- α (ER- α). Analisis dilakukan dengan menggunakan ligan kontrol berupa 4-hydroxytamoxifen (4-OHT). Dalam analisis *in silico*, hasil *molecular docking* dapat dilihat dalam energi ikatan dan jenis ikatan antara senyawa dengan protein target, dalam penelitian ini, protein target berupa yaitu Estrogen- α . Energi ikatan yang terbentuk digunakan untuk melakukan analisis afinitas antara ligan dengan ER- α . Semakin kecil atau semakin negatif energi ikatan maka semakin stabil

(kuat) pula ikatan yang dihasilkan (T. Z. A. D. Putri et al., 2024). Kemudian hasil energi ikatan antara ligan (senyawa metabolit sekunder) dengan ER- α akan dibandingkan dengan energi ikatan 4-OHT untuk dapat mengetahui apakah ligan yang digunakan memiliki potensi sebagai ER- α inhibitor. Selain itu, nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*) juga dianalisis sebagai parameter validasi metode *molecular docking*. RMSD merupakan parameter yang menggambarkan seberapa besar perubahan interaksi protein dan ligan pada struktur kristal sebelum dan sesudah di *docking* untuk mengetahui nilai penyimpangannya. Hasil *docking* dinyatakan valid saat nilai $\text{RMSD} \leq 2\text{\AA}$ (I. W. Sari et al., 2020).

Dalam penelitian kuantitatif, proses analisis data meliputi kegiatan mengelompokkan data berdasarkan variabel penelitian, mentabulasikan data sesuai variabel penelitian, menyajikan hasil dalam bentuk tabel atau grafik, serta melakukan perhitungan untuk menjawab rumusan masalah penelitian (Sugiyono, 2020). Teknik analisis data pada penelitian ini menggunakan pendekatan kuantitatif deskriptif, yang bertujuan untuk menggambarkan atau mendeskripsikan data sebagaimana adanya tanpa melakukan generalisasi.

3.9 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Botani Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Siliwangi pada bulan Desember 2025. Adapun rincian waktu penelitian terlampir pada tabel 3.2.

Tabel 3. 2 Jadwal Kegiatan Penelitian

[illegible]

