

-BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental secara *in silico*. Penelitian ini menggunakan proses *docking molecular* dari senyawa kurkuminoid dalam kandungan tanaman kunyit dan temulawak terhadap reseptor enzim *main protease 6LU7* dari *SARS-CoV-2* menggunakan aplikasi *PyRx (x64)(v0.8)*, *Biovia Discovery Studio Visualizer (x64)(v21.1.0)*, *AutoDockTools.Ink (v21.1.0)*, dan *Lipinski Rule of Five.Ink* yang dilakukan selama 2 bulan dari bulan Desember 2022 hingga Januari 2023 di Universitas Sahid Surakarta.

3.2 Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian adalah suatu alat yang digunakan mengukur variabel penelitian yang diamati (Sugiyono, 2013). Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *hardware* berupa Laptop *Acer* yang dioperasikan dengan sistem *windows 10* dengan *processor Intel® Celeron® N4100 CPU @ 1.10 GHz*, kecepatan prosesor *GHz*, kapasitas *RAM* memori *4,00 GB* digunakan sebagai alat untuk menjalankan proses penambahan molekuler. Program *software* yang digunakan berupa *Pyrx (x64)(v0.8)*, *Windows 10 (Microsoft Word)*, *Pubchem (National Center for Biotechnology Information)* dan *PDB (Protein Data Bank)* oleh *National Science Foundation (DBI-1832184) US*

Department of Energy (DE-SC0019749), National Cancer Institute, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, dan National Institute of General Medical Sciences of the National Institutes (<https://www.rcsb.org/pages/about-us/index>) digunakan untuk memasukkan molekul protein dan validasi penambatan protein, *Biovia Discovery Studio Visualizer (x64)(v21.1.0) (Dassault systemes)* digunakan untuk visualisasi hasil *docking*, *AutoDockTools.Ink (v21.1.0) (National Institute of Health)* digunakan untuk preparasi ligan dan protein sebelum ditambatkan. Model struktur tiga dimensi protein yang digunakan dalam penelitian ini adalah enzim *protease* dengan kode *Protein Data Bank (PDB)* adalah *6LU7*.

3.3 Variabel Penelitian

Variabel penelitian adalah segala sesuatu yang berbentuk apa saja yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari sehingga diperoleh informasi tentang hal tersebut, lalu ditarik kesimpulannya (Sugiyono, 2015). Penelitian ini menggunakan variabel bebas, variabel terikat dan variabel terkontrol.

a. Variabel Bebas (*Independent*)

Variabel bebas pada penelitian ini adalah senyawa kurkuminoid, protein *6LU7*, *Pyrx*, *Biovia Discovery Studio Visualizer*.

b. Variabel Terikat (*Dependent*)

Variabel terikat pada penelitian ini adalah hasil *docking* atau *docking score*, jenis ikatan (kovalen, ion, hidrogen, *ion-dipol*, *ion dipol-dipol*, *van der waals*, hidrofobik).

c. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah *gridbox*.

3.4 Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini adalah :

- a. *In silico* adalah memprediksi interaksi senyawa obat (dengan protein target baik enzim maupun reseptor dalam suatu penelitian).
- b. *Molecular docking* adalah metode yang bermanfaat untuk mencari kombinasi interaksi protein dan ligan serta menjadi dasar penemuan obat secara simulasi.
- c. Kurkumin *n* [*1,7-bis-(4,-hidroksi-3,-metoksifenil)hepta1, 6-diena-3, 5-dion*]. adalah senyawa aktif yang ditemukan pada kunyit, berupa polifenol dengan rumus kimia $C_{21}H_{20}O_6$. Kurkumin memblokir pembentukan spesies reaktif-oksigen, memiliki sifat anti-inflamasi akibat penghambatan siklooksigenase (*COX*). Kurkumin adalah beta-diketon yang merupakan metana di mana dua hidrogennya digantikan oleh gugus feruloyl.
- d. *Bis-demethoxycurcumin (1E,6E)-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)hepta-1,6-diene-3,5-dione*) adalah beta-diketon yang merupakan metana dimana dua hidrogennya tersubstitusi oleh gugus *4-hidroksisinaoil*. Ini memiliki peran sebagai metabolit dan inhibitor.
- e. *Demethoxycurcumin* adalah beta-diketon yaitu kurkumin yang salah satu gugus metoksinya digantikan oleh hidrogen.

- f. Ikatan hidrogen adalah ikatan yang terjadi antara atom hidrogen (H) pada molekul yang satu dengan salah satu unsur atom (F, O, N) pada molekul lainnya yang merupakan gaya *dipol-dipol* paling kuat.
- g. Ikatan hidrofobik adalah molekul nonpolar tidak mengandung ion yang terhidrasi atau memiliki momen *dipol*.
- h. *Log P* (Koefisien Partisi) adalah perbandingan konsentrasi senyawa dalam dua fase yang tak larut pada kesetimbangan.
- i. *Molar Refractivity* adalah nilai total polarisabilitas suatu molekul obat.
- j. Protein *spike* adalah protein yang bertindak sebagai pengunci yang mengikat reseptor pada sel manusia (*ACE2*) yang diaktifkan oleh enzim yang ada pada sel inang.
- k. Protein *core* adalah penguat dari struktur protein.
- l. *Reseptor* adalah molekul protein yang menerima sinyal kimia dari luar sel yang mengarahkan aktivitas yang dikerjakan sel.
- m. *Ligan* adalah molekul sederhana yang dalam senyawa kompleks bertindak sebagai donor pasangan elektron. *Ligan* adalah molekul, yang menyumbangkan sepasang elektron ke atom atau ion logam pusat untuk membentuk kompleks koordinasi.
- n. *RNA* adalah singkatan *ribonukleat acid* yang merupakan salah satu materi genetik yang terdiri dari nukleotida. Dalam tubuh manusia *RNA* berperan sebagai pembawa informasi genetik dan menerjemahkannya dalam sintesis berbagai macam protein.

- o. *ACE2* adalah singkatan dari *angiotensin-converting enzyme 2* enzim yang menempel pada permukaan luar (membran) sel-sel di beberapa organ, seperti paru-paru, arteri, jantung, ginjal, dan usus. *ACE2* bekerja mengkatalisis perubahan *angiotensin II* menjadi *angiotensin 1-7*. *ACE2* melawan aktivitas enzim *angiotensin converting enzyme (ACE)* dengan mengurangi jumlah *angiotensin-II* dan meningkatkan *Angiotensin 1-7* yang bekerja pada reseptornya.
- p. *6LU7* adalah sebagai protein target potensial untuk pengobatan *Covid-19*. *6LU7* adalah *Protease* utama (*MPro*) dalam *SARS-CoV-2*. *Protease* ini mewakili target potensial untuk menghambat replikasi *Coronavirus*.
- q. *Ikatan kovalen* adalah ikatan yang terbentuk dari pemakaian bersama pasangan elektron antara dua atom.
- r. *Ikatan ion* adalah ikatan yang terjadi akibat adanya serah terima elektron sehingga membentuk ion positif dan ion negatif yang konfigurasi elektronnya sama dengan gas mulia.
- s. *Ikatan ion – dipol* adalah gaya tarik-menarik yang terjadi antar molekul senyawa kovalen polar.
- t. *Ikatan dipol – dipol* adalah ikatan yang terjadi antara sisi positif molekul polar dengan sisi negatif molekul polar lainnya.
- u. *Favipiravir* adalah obat antivirus yang digunakan untuk mengatasi beberapa jenis virus influenza, seperti influenza A, yang menyebabkan flu burung dan flu babi, influenza B, dan influenza C.

- v. *Irevesibel* adalah penambahan substansi, perubahan bentuk sel dan perubahan susunan kimia sehingga terjadi pertumbuhan searah dan tidak dapat kembali ke bentuk asal.
- w. *Score docking* adalah nilai yang menunjukkan energi afinitas ikatan antara protein dan ligan.

3.5 Rencana Jalannya Penelitian

3.5.1 Tahap persiapan

Pada tahap ini dilakukan pembuatan proposal skripsi yang sesuai dengan judul.

3.5.2 Tahap pelaksanaan

Pengambilan data dilakukan dengan mengunduh protein di *Protein Data Bank*. pemilihan protein pada situs *pdb* didasarkan pada protein yang diujikan. Enzim protease *6LU7* dalam *format.pdb* diunduh dari *database Research Collaboratory For Structural Bioinformatics (RSCB)* yang diakses melalui situs <http://www.rscb.org/.protein> yang dipilih untuk enzim protease *6LU7* yaitu kode *PDB 6LU7*. Struktur protein yang diunduh dari *PDB* umumnya memiliki struktur protein yang masih mengandung pelarut (air) dan residu lainnya. Dilakukan pengambilan data pada periode Desember-Januari 2023. Data dicatat pada lembar penelitian yang telah dibuat.

3.5.3 Pengolahan data

Pengolahan data dilakukan setelah semua data protein sudah di salin ke lembar pengambilan data. Data ditabulasi sehingga hasil akhir dalam bentuk tabel.

a. Preparasi Struktur Makromolekul

Makromolekul tiga dimensi diunduh dari Protein Data Bank dengan situs <http://www.rcsb.org/pdb/>. Kode *pdb* yang digunakan yaitu *6LU7*. Ligan yang akan digunakan adalah 3 senyawa yang terkandung di dalam kurkumin, bisdemetoksikurkumin, dan demetoksikurkumin yang di unduh dari *PubChem* dapat diakses pada [linkhttps://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/). Ligan tersebut kemudian di unduh dengan display *3D Conformer* di *save* dengan format *SDF* dan file digabungkan di dalam satu folder dengan reseptor. Makromolekul kemudian dipisahkan dari pelarut dan ligan atau residu non standar. Makromolekul kemudian dioptimasi dengan menghapus molekul air menggunakan program *Discovery Studio 3.5 Visualizer*.

b. Preparasi ligan dan preparasi reseptor

Berkas ligan yang telah di unduh di konversi dari format *sdf* ke format *pdb* menggunakan aplikasi *Biovia Discovery Studio 2020*, kemudian di preparasi menggunakan perangkat lunak *Autodock Tools*. Penyesuaian torsi dilakukan dengan *detecting root* dan diatur sesuai yang diinginkan. Kemudian file ligan dan reseptor disimpan ke dalam format file *pdbqt*

dan mengatur *grid box* di bagian ligan yang berikatan dengan reseptor menggunakan *Autodock Tools*.

c. Validasi Metode *Docking*

Validasi metode penambatan dilakukan dengan *software Pyrx*. Validasi ini dilakukan terhadap ligan valid beserta enzim *protease 6LU7* dan hasil *docking*. Parameter yang digunakan yaitu *Root Mean Square Deviation (RMSD)*. Metode *docking* dikatakan valid jika memiliki nilai $RMSD < 2$.

d. Penambatan Molekul

Penambatan molekul ligan dan protein serta kontrol positif dan protein dilakukan menggunakan program *Pyrx* berbasis *Autodock Vina*. Hasil penambatan yang diperoleh yaitu berupa *binding affinity (kcal/mol)* dan nilai *RMSD*. Dengan menggunakan perangkat lunak *AutoDock Vina* dan dijalankan menggunakan *command prompt* dilakukan kalkulasi *docking* pada ligan untuk mendapatkan energi bebas dan nilai *RMSD* terbaik.

e. Visualisasi Hasil *Docking*

Visualisasi hasil *docking* menggunakan program *Biovia Discovery Studio Visualizer*. Hasil visualisasi tersebut berupa interaksi ligan dengan asam amino pada makromolekul protein. Residu asam amino yang berinteraksi dengan ligan dapat menentukan jenis ikatan yang terjadi antara ligan dan protein. Visualisasi hasil *docking* dengan memilih konfirmasi ligan yang memiliki hasil energi bebas yang paling

tinggi dan nilai *RMSD*, lalu di analisis ikatan hidrogen dan residu kontak antara ligan dan reseptor dapat diamati menggunakan perangkat lunak *Biovia Discovery Studio Visualizer*.

3.5.4 Penyusunan laporan

Penyusunan laporan dilakukan setelah pengolahan data sudah selesai. Data-data ditarik kesimpulan untuk hasil kemudian disusun sebagai laporan skripsi.

3.6 Analisa Data

3.6.1 Teknik Pengumpulan

Pengumpulan data dalam penelitian ini adalah data sekunder yaitu sumber data penelitian yang tidak langsung memberikan data ke pengumpul data, data sekunder dalam penelitian ini meliputi data protein yang diperoleh dari *Protein Data Bank*.

3.6.2 Teknik Analisis Data

Data setelah diperoleh selanjutnya adalah melakukan analisis data. Analisa data dilakukan berdasarkan hasil dari uji sifat fisikokimia, *molecular docking* dan interaksi reseptor dengan ligan. Sifat fisikokimia diukur menurut hukum lima *Lipinski* dengan aturan-aturan yang ditetapkan yaitu Berat Molekul (BM) kurang dari 500 Da; nilai *logP* kurang dari 5; jumlah donor ikatan hidrogen tidak lebih dari 5; jumlah akseptor ikatan hidrogen tidak lebih dari 10 dan nilai *molar refractivity* diantara 40-130. Analisa hasil interaksi protein dengan

ligan berdasarkan hasil interaksi hidrogen, interaksi asam amino dan interaksi hidrofobik.

