

BAB III

METODELOGI PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

3.1.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental secara *in silico* yang mengadakan percobaan pada senyawa turunan kurkumin terhadap reseptor *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA).

3.1.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah eksperimental. Dalam desain ini kelompok eksperimen dan kelompok kontrol tidak dipilih secara random. Kelompok eksperimen adalah kelompok yang mendapatkan perlakuan dan kelompok kontrol tidak mendapat perlakuan.

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi Penelitian

Populasi yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah senyawa kurkumin dan turunan kurkumin.

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah senyawa kurkumin dan turunannya sejumlah 12 senyawa yang didapat dari buku "*Anticancer Curcumin: Natural Analogues and Structure-Activity Relationship*" oleh Gupta dkk. Kelompok perlakuan dalam penelitian ini adalah 12 senyawa kurkumin dan turunannya, sedangkan kelompok kontrolnya adalah senyawa AOH1996.

3.3 Variabel Penelitian

Penelitian ini menggunakan variabel bebas dan variabel terikat. Berikut ini variabel yang dipilih.

Variabel bebas : Parameter fisika kimia (Hidrofobik, Elektronik, dan Sterik)

Variabel terikat : Hasil penambatan molekuler (Energy Bebas Gibbs)

3.4 Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala Data
Parameter Fisika Kimia	<p>Setiap senyawa uji dikumpulkan data terkait tiga parameter, terdiri dari Hidrofobik (Log P, Log S), Elektronik (E_{tot}, pKa), Sterik (MR, BM)</p> <p>1. Hidrofobik LogP (Logaritma koefisien partisi), LogS (Logaritma kelarutan dalam air). Sebaiknya, untuk nilai LogP tidak melebihi 5, dan nilai LogS tidak kurang dari -6.</p> <p>2. Elektronik E_{tot} (Total energi elektron), pKa (Negatif logaritma tetapan ionisasi). Sebaiknya, nilai pKa berada dikisaran 6-8, dan E_{tot} bernilai rendah.</p> <p>3. Sterik MR (Refraksi Molar), BM (Berat Molekul). Sebaiknya, untuk nilai BM tidak lebih dari 500, dan MR sebesar 40-130.</p>	<p><i>Software ChemBio Draw Ultra 13.0</i></p>	Rasio
Energi Bebas Gibbs	<p>Senyawa uji dilakukan penambatan molekuler melalui <i>software</i>, untuk mengetahui besar ikatannya dengan reseptor. Semakin kecil hasil, semakin baik dan layak dianalisis HKSP. Ikatan pembentukan kompleks yang kuat ditandai dengan nilai Energi Bebas Gibbs (ΔG) yang rendah, tetapan inhibisi rendah, dan banyaknya jumlah interaksi ikatan hidrogen.</p>	<p><i>Software AutoDock Tools 1.5.7 dan AutoDock Vina</i></p>	Rasio

	Hasil Energi Bebas terbaik, atau senyawa yang dapat dipilih adalah yang memiliki nilai paling mendekati nilai interaksi AOH1996 dengan reseptor.		
Analisis Regresi	<p>Data dilakukan analisis regresi linear bersama dengan hasil energi interaksi untuk mengetahui parameter paling berpengaruh terhadap substituen senyawa turunan.</p> <p>Pemilihan persamaan HKSP terbaik ditentukan dengan beberapa kriteria statistik, yakni:</p> <p>nilai r dan r^2 paling mendekati satu, nilai F terbesar, nilai t dan s terkecil.</p> <p>Jika koefisien korelasi bernilai positif dikatakan korelasi searah, dan sebaliknya jika koefisien korelasi bernilai negatif maka dikatakan korelasi tidak searah. Nilai koefisien korelasi terletak antara -1 hingga 1. Koefisien ini berarti nilai variabel X tinggi, maka nilai variabel Y akan menjadi rendah begitu pula sebaliknya.</p> <p>Panduan interpretasi koefisien korelasi sebagai berikut.</p> <p>0,00-0,199: Sangat rendah 0,20-0,399: Rendah 0,40-0,599: Sedang 0,60-0,799: Kuat 0,80-1,000: Sangat Kuat</p>	<i>IBM SPSS Statistics</i> 27	Rasio

3.5 Alat dan Bahan

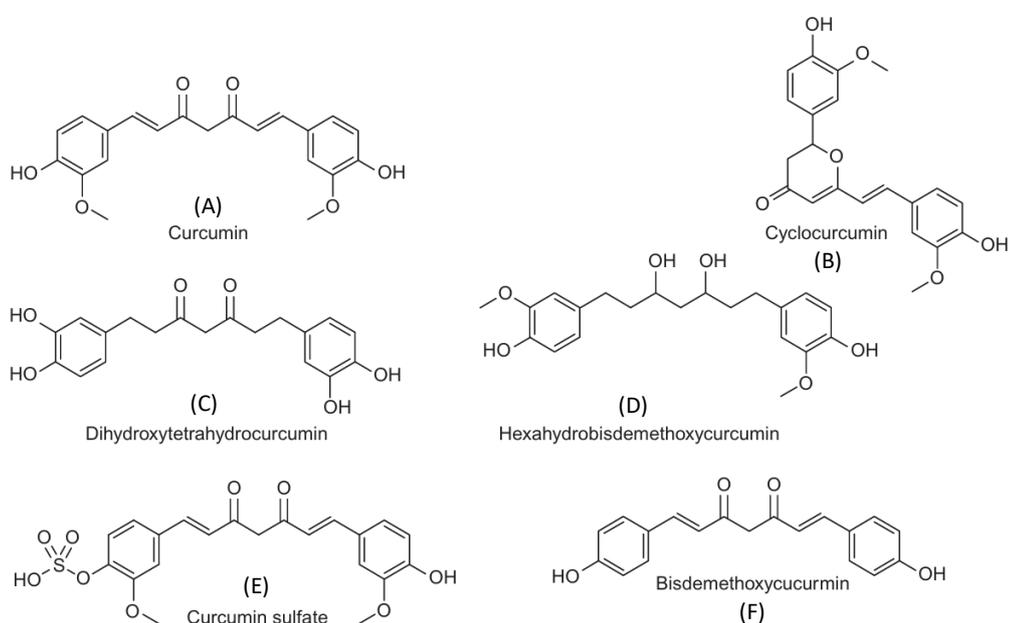
3.5.1 Alat

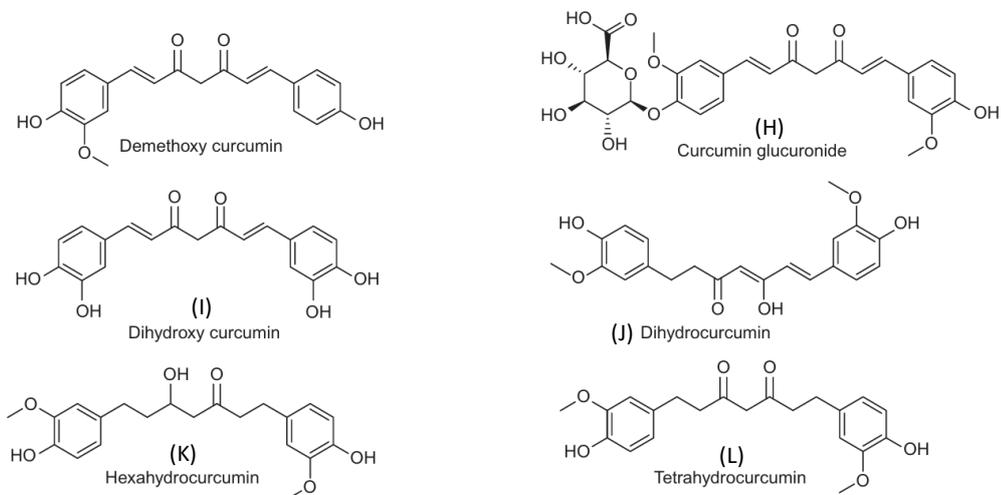
Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah perangkat keras berupa: Laptop 1 dengan spesifikasi: Processor AMD Ryzen 5 5500U with Radeon Graphics 2.10 GHz, RAM 16,0 GB, System type 64-bit operating system, x64-based processor. *ChemOffice trial version (ChemDraw Ultra 8.0 dan Chem3D Ultra 8.0), dan IBM SPSS Statistics 23.*

Laptop 2 dengan spesifikasi: Processor 11th Gen Intel(R) Core(TM) i3-1115G4 @ 3.00GHz, RAM 8,00 GB, System type 64-bit operating system, x64-based processor dilengkapi perangkat lunak yang digunakan berupa *AutoDock Vina, AutoDockTools1.5.7, PyMOL2.5.8, Python 2.7.11, Discovery Studio.*

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah senyawa kurkumin dan turunannya dan struktur protein 3D *Proliferasi Sel Nuklear Antigen (PDB ID: 8GLA).*





Gambar 3.1 Metabolit kurkumin (Gupta dkk., 2017)

3.6 Prosedur Kerja

3.6.1 Preparasi Ligan

Struktur senyawa uji dibuat dengan *software ChemDraw Ultra* dalam bentuk 2D dan disimpan dalam format *.cdx. Struktur diubah ke bentuk 3D dengan menggunakan *Chem3D Ultra*, dilakukan optimasi struktur sampai memiliki bentuk stabil dan energi minimal dengan langkah-langkah sebagai berikut.

1. Struktur 2D dimasukkan ke dalam *Chem3D Ultra*.
2. *Calculations* → *MMFF94* → *Perform MMFF94 Minimization* → *Run Molecular Mechanical MM2 Methods*
3. Simpan file dalam format *.mol2.

Langkah-langkah mengubah molekul ligan dengan *AutoDockTools* adalah sebagai berikut.

1. Struktur ligan/ senyawa uji dengan format *.pdb diimpor ke *AutoDockTools*.
2. Pulihkan gugus hidrogen yang hilang dengan cara *Edit* → *Hydrogens* → *Add* → *Pilih All Hydrogens* → *OK*.
3. Hilangkan gugus hidrogen non polar dengan cara *Edit* → *Hydrogens* → *Merge Non-Polar*.
4. Tambahkan muatan dengan cara *Edit* → *Charges* → *Compute Gasteiger* → *OK*.
5. Beri Torsi dengan cara *Ligand* → *Torsion Tree* → *Choose Torsions* → *Pastikan semua rotatable bonds berwarna hijau* → *Done*.

6. *Ligand* → *Torsion Tree* → *Set number of torsions* → *fewest atom* → atur jumlah → *Dismiss*.
7. Simpan dengan format PDBQT dengan cara *Ligand* → *Output* → *Save as PDBQT* → *Save* dengan nama “ligan.pdbqt”.

3.6.2 Preparasi Protein Reseptor

Struktur protein (PDB ID: 8GLA) diambil dari Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>), lalu diubah dengan *AutoDockTools*. Data struktur PDB diubah untuk menghilangkan molekul air, menambahkan atom H, menambahkan muatan, dan menghapus ligan atau kofaktor yang tidak terkait.

Tahap-tahap pengubahan molekul enzim dengan *AutoDockTools* adalah sebagai berikut:

1. Buka file struktur *Proliferating Cell Nuclear Antigen* yang diperoleh dari PDB dengan *AutoDockTools* menggunakan fitur *File* → *Read molecule* → pilih “protein.pdb” → *open*.
2. *Edit* → *Delete Water*.
3. Hilangkan ligan dan kofaktor dari proteinnya dengan cara memilih pada daftar residu di setiap bagian rantai protein. Setelah semua ligan dan kofaktor yang tidak perlu sudah dipilih, *Edit* → *Delete* → *Delete Selected Atom* → *Continue*.
4. Tambahkan gugus hidrogen yang hilang dengan cara *Edit* → *Hydrogens* → *Add* → *Pilih Polar Only* → *OK*.
5. Tambahkan muatan dengan cara *Edit* → *Charges* → *Add Kollman Charges* → *OK*.
6. Simpan reseptor dalam format *.pdbqt dengan nama protein.pdbqt. *Grid* → *Macromolecule* → *Choose* → Pilih reseptornya → *Select molecule* → Simpan dengan nama “protein.pdbqt”.

3.6.3 Penyiapan Parameter Grid

Parameter grid berisikan informasi tipe map yang akan dikomputasikan, lokasi, dan parameter pasangan energi potensial. Pada umumnya, satu map akan dihitung untuk setiap elemen pada ligan, ditambah map elektrostatik. Tahap-tahap penyiapan parameter grid dengan ADT adalah sebagai berikut:

1. Buka file makromolekul dalam format *.pdbqt. *Grid* → *Macromolecule* → *Open* → *Select Protein.pdb* → *Select molecule* → *Open file* “protein.pdbqt”

2. Buka file ligan dengan cara *Grid* → *Set Map Types* → *Open Ligand* → Pilih “ligand.pdbqt” → *Open*.
3. Tentukan parameter *gridbox*, dengan cara *Grid* → *Gridbox* → *Atur Spacing 1 Angstrom* dan *Atur Size x, y, dan z* hingga ligan tepat berada seluruhnya di dalam *box* (catat secara manual nilai masing-masing *size* dan *center* dari *x, y, dan z*) → *File* → *Saving Current*.
4. Simpan file dengan cara *Grid* → *Output* → *Save GPF* → Simpan file dengan nama “*Dock.gpf*” → *Save*.

3.6.4 Penambatan Molekuler

Dalam menjalankan *AutoDock Vina*, perlu disiapkan beberapa parameter. Langkah-langkah penyiapan parameter adalah sebagai berikut:

1. Menyimpan data ligan dan protein dalam format *.pdbqt disimpan di dalam folder yang sama di *Documents*.

2. Membuat *text documents* yang isinya:

receptor = protein.pdbqt

ligand = ligand.pdbqt

exhaustiveness = 60

out = out.pdbqt

center_x = 35.255

center_y = -9.248

center_z = 36.23

size_x = 30

size_y = 30

size_z = 30

Nilai masing-masing *center* dan *size* dari *x, y, dan z* dimasukkan dari penyimpanan parameter *gridbox*.

3. Kemudian disimpan dengan nama *conf.txt* di dalam folder yang sama di *Documents*.
4. Menjalankan perintah *command prompt*. Alamat menyimpan bahan di *documents*” Alamat menyimpan *AutoDock Vina.exe*” `-config conf.txt -log log.txt`

```
C:\Users\USER\OneDrive\Document\docking>"\Program Files (x86)\MGLTools-1.5.7\Vina"vina.exe --config conf.txt --log log.txt
```

3.6.5 Visualisasi Hasil Docking

Pada akhir perhitungan *AutoDock* menghasilkan *Output* berupa *score* yang menggambarkan Energi Gibbs (kcal/mol), yang dapat dilihat dalam file out.pdbqt. Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam mengevaluasi hasil *docking* ialah nilai afinitas. Hasil *docking* yang diambil ialah nilai Energi Gibbs terendah.

3.6.6 Analisis HKSP

Langkah-langkah analisis HKSP, dihasilkan *Output* berupa persamaan regresi linier dari parameter fisika kimia yang berpengaruh terhadap *binding affinity* senyawa inhibitor.

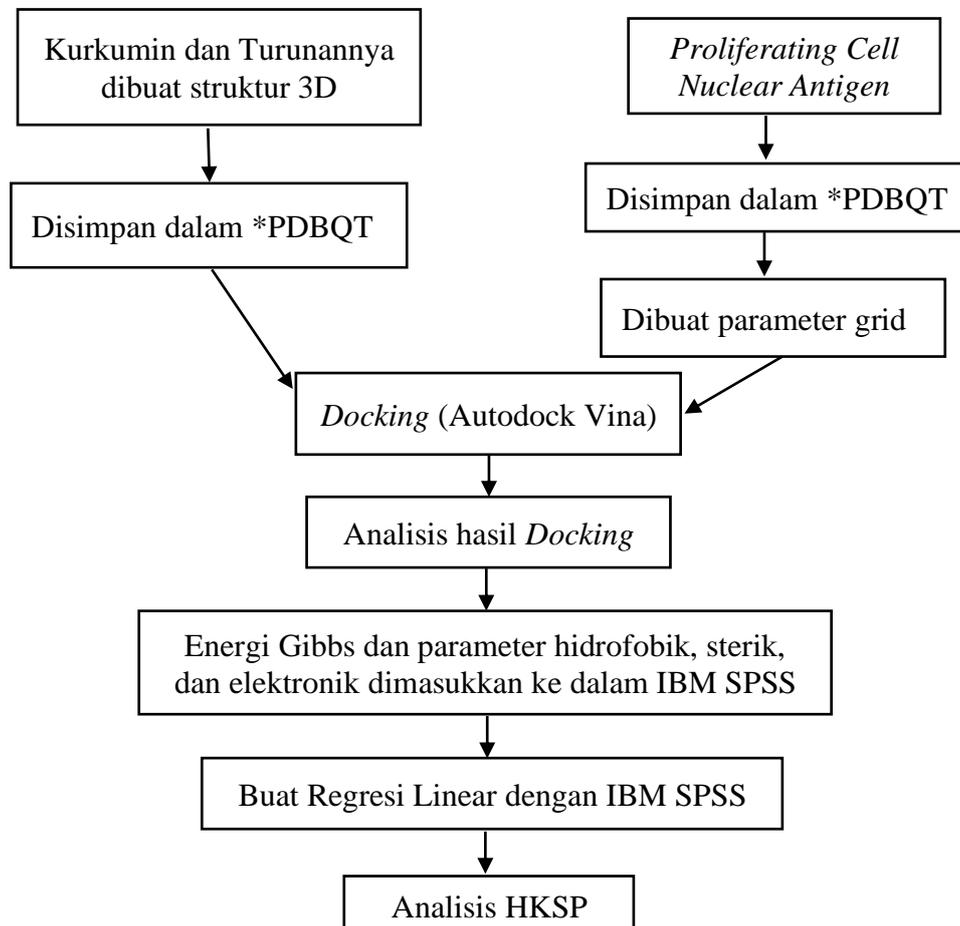
1. Buka IBM SPSS
2. Siapkan pengaturan data dengan cara, pilih *Variable View* lalu atur sesuai kebutuhan analisis regresi
3. Masukkan data setiap variabel penelitian
4. Pilih *Analyze* → *Regression* → *Linear*
5. Masukkan semua variabel penelitian baik variabel independent maupun dependent. Pilih OK
6. Muncul *Output* hasil Regresi Linear.

Hubungan secara kuantitatif dari nilai parameter fisikokimia dengan prediksi aktivitas dianalisis dengan model regresi linear menggunakan IBM SPSS. Persamaan terbaik dipilih berdasarkan nilai r , R^2 , SE, F, dan .sig

3.7 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Komputer STIKes Panti Waluya Malang pada bulan Maret 2024 sampai selesai.

3.8 Kerangka Kerja



Gambar 3.2 Diagram Kerangka Kerja