

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan yaitu penelitian eksperimental laboratoris secara *in silico* dari senyawa turunan 5-trifluorometil asam salisilat terhadap target obat enzim COX-2 (PDB : 3LN1) menggunakan aplikasi *Autodock*, *Avogadro*, *Protein.plus web server* dan *pkCSM web server*.

4.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama kurang lebih sekitar 3 bulan bertempat di Laboratorium Kimia Terpadu Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Malang.

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah struktur kimia (2D dan 3D) senyawa turunan 5-trifluorometil asam salisilat dan struktur enzim COX-2 yang terkompleks dengan selekoksib.

4.3.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu nilai RMSD, nilai energi ikatan, ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik, berat molekul (BM), logaritma koefisien partisi oktanol/air (Log P), *Hydrogen Bond Acceptors* (HBA), dan *Hydrogen Bond Donors* (HBD), data prediksi sifat farmakokinetika berupa absorpsi (*Caco2 permeability*, *human intestinal absorption* dan *skin permeability*), distribusi (VDss, BBB *permeability*, dan CNS *permeability*), metabolisme (*CYP2D6 substrate* dan *inhibitor*), ekskresi (*total clearance* dan *renal OCT2 substrate*), data prediksi toksisitas (AMES *Toxicity*, LD₅₀, LOAEL, *Hepatotoxicity*, dan *Skin sensitisation*).

4.4. Bahan Penelitian

4.4.1. Senyawa Turunan 5-trifluorometil Asam Salisilat

Digunakan senyawa kimia dari turunan 5-trifluorometil asam salisilat. Untuk daftar senyawa dapat dilihat pada tabel IV.1.

Tabel IV. 1 Daftar Senyawa Turunan 5-trifluorometil Asam Salisilat

No.	Bahan Baku Reaksi		Hasil
	Bahan 1	Bahan 2	
1.	5-trifluorometil Asam Salisilat	Benzoil klorida	O-benzoiloksi-5-trifluorometil Asam Salisilat
2.		4-klorobenzoilklorida	O-(4-klorobenzoiloksi)-5-trifluorometil Asam Salisilat
3.		4-nitrobenzoilklorida	O-(4-nitrobenzoiloksi)-5-trifluorometil Asam salisilat
4.		4-fluorobenzoilklorida	O-(4-fluorobenzoiloksi)-5-trifluorometil Asam Salisilat
5.		4-metilbenzoilklorida	O-(4-metilbenzoiloksi)-5-trifluorometil Asam Salisilat

4.4.2. Protein Target

Protein target atau biasa disebut reseptor merupakan suatu syarat pada pengujian *molecular docking* dengan menggunakan perangkat lunak *Autodock*. Protein target yang digunakan pada penelitian ini adalah enzim COX-2 dengan kode pada PDB yaitu 3LN1 (Ahmed *et al.*, 2012).

4.5. Alat Penelitian

4.5.1. Perangkat Keras

Perangkat keras yang digunakan pada penelitian ini berupa HP Laptop 14s-cf1xxx dengan processor Intel(R) Celeron(R) CPU 4205U @ 1,80GHz; Operating System : Windows 10 64-bit; Memory : 4GB RAM.

4.5.2. Perangkat Lunak

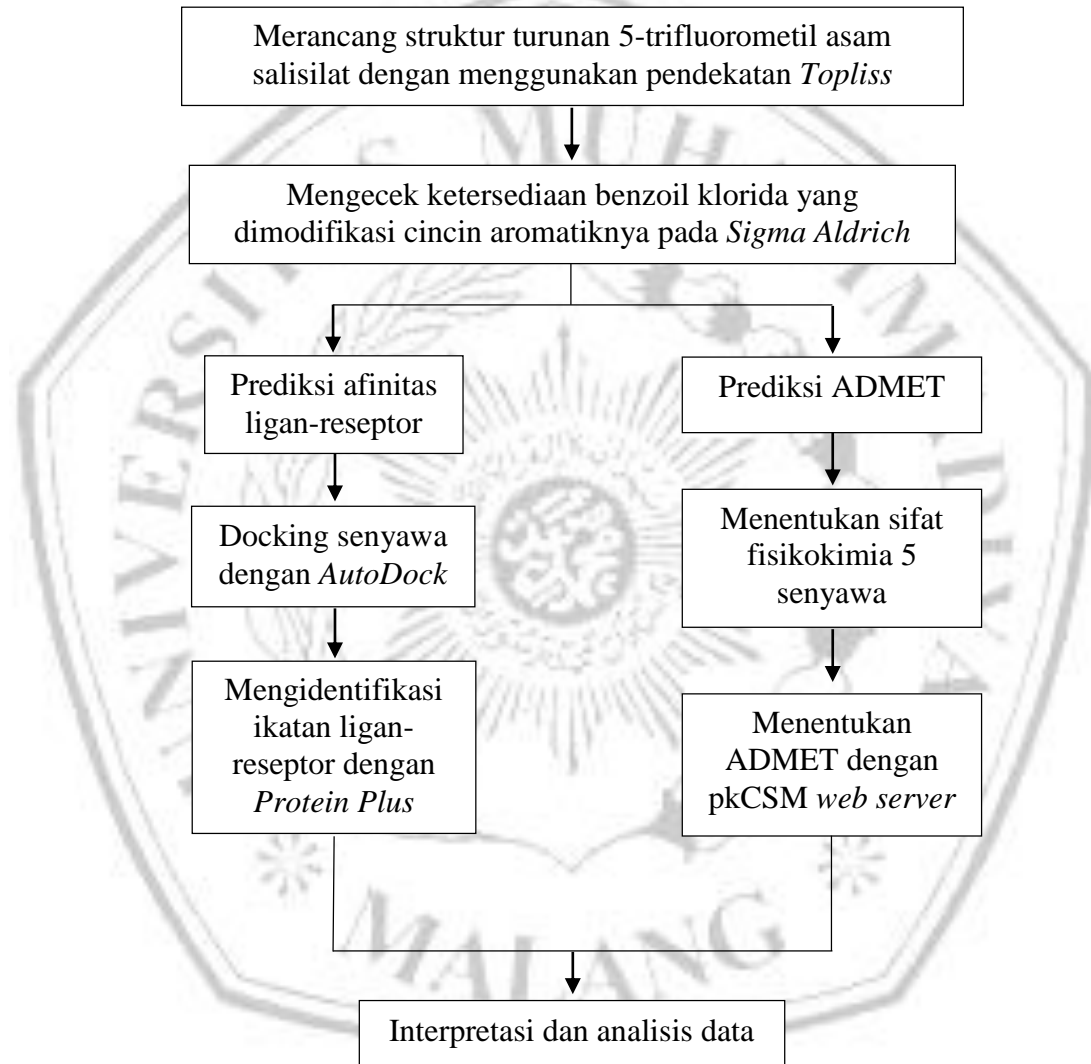
Perangkat lunak yang digunakan pada penelitian ini :

- 1) Marvin Sketch 20.19
- 2) Avogadro seri 1.2.0
- 3) Biovia Discovery Studio 2020
- 4) Autodock PyRx seri 0,8

4.5.3. Database

- 1) Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org>)
- 2) SMILES *Online Translator*
- 3) pkCSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction>)
- 4) Protein plus (<https://proteins.plus/>)

4.6. Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4. 1 Kerangka Operasional Penelitian

4.7. Prosedur Penelitian

4.7.1. Preparasi Senyawa dan Reseptor

Pada penelitian ini 5 senyawa turunan 5-trifluorometil asam salisilat dipilih melalui pendekatan Topliss dibuat dengan memilih substituen untuk modifikasi struktur pada cincin aromatis. Kemudian melakukan pengecekan ketersediaan struktur

turunan bahan baku pembentukan (benzoil klorida) dengan mengakses situs Sigma-Aldrich. Reseptor obat sebanyak 1 golongan obat analgesik yang dapat dicari dengan mengakses PDB dan ligan yang di unduh harus kompleks. Untuk preparasi senyawa yang akan diuji dengan *Autodock* membutuhkan gambar struktur kimia 2D dari senyawa turunan menggunakan program *Marvin Sketch 20.19* dan gambar struktur kimia 3D menggunakan *Avogadro software*. Berikut adalah penjelasan langkah-langkahnya :

a. Marvin Sketch 20.19

- 1) Melakukan modifikasi pada cincin aromatis benzoil klorida dengan metode “*Topliss*”;
- 2) Melakukan pengecekan ketersediaan struktur benzoil klorida yang sudah dimodifikasi cincin aromatisnya dengan mengakses sigma aldrich;
- 3) Membuka *Marvin Sketch* dan menggambar struktur secara manual dengan menggunakan fasilitas *Tool Pallete*;
- 4) Melengkapi struktur dengan unsur-unsur yang diperlukan, misalnya -F, -Cl, -Br, dan sebagainya;
- 5) Kemudian masing-masing struktur senyawa yang telah digambar di save dengan format *.sdf.

b. Avogadro Software

- 1) File yang telah disave dengan format *.sdf. dimasukan ke *Avogadro software*;
- 2) Saat struktur muncul, pada menu *Extentions*, klik “*Molecular Mechanism*”, lalu pilih “*Setup Force Field*” dan ubah pada kolom *Force Field* menjadi MMFF94S;
- 3) Kemudian pada menu *Extentions*, klik “*Optimize Geometry*” untuk megetahui *energy minimize*;
- 4) Simpan struktur dalam bentuk *.pdb.

c. PDB

- 1) Mencari makromolekul yang berisi ligan dan protein target obat golongan analgesik dengan mengakses (<https://www.rcsb.org>);
- 2) Tuliskan kode makromolekul sesuai literatur jurnal (contoh: 3CCW atau 3top) pada kotak pencarian, klik tombol *search*;
- 3) Lihat pada kolom hasil pencarian makromolekul, pastikan protein target sesuai dengan senyawa obat;
- 4) Pada tombol “*Download*” yang berada di pojok kanan atas diklik, kemudian pilih PDB format, dan *save file*.

4.7.2. Prediksi Afinitas Ligan-Reseptor

4.7.2.1. Pemisahan Ligan Dengan Reseptor

a. Pemilihan Ligan

- 1) Membuka *file* PDB yang telah diunduh dengan *Discovery Studio* (tampak gambar 3D);
- 2) Pada menu View, klik "*Hierarchy*" kemudian unsur-unsur ligan yang tersedia dipilih;
- 3) Simpan ligan dengan cara klik Save As lalu beri nama ligan.

b. Pemilihan Protein Target

- 1) Membuka *file* PDB yang diunduh dengan *Discovery Studio* (tampak gambar 3D);
- 2) Pada menu View, klik "*Hierarchy*" kemudian unsur-unsur makromolekul yang tersedia dipilih;
- 3) Menyimpan ligan dengan cara klik "*Save As*" lalu beri nama "PROTEIN" dengan format *.pdb., tekan "save".

4.7.2.2. Preparasi Protein Target dan Ligan

- 1) Buka program *Autodock PyRx*;
- 2) Pada menu *Edit*, klik "*Preferences*";
- 3) Pada kotak dialog *Preferences*, rubah bagian "*Workspace*" dengan menekan tombol *Browse*. Pilih lokasi penyimpanan hasil *molecular docking*;
- 4) Selanjutnya pada lembar kerja *Molecules*, klik kanan dan klik "*Load Molecule*" → pilih file "**Protein**" yang telah disimpan saat tahap pemisahan;
- 5) Klik kanan pada Protein yang muncul yang telah dibuka pada lembar kerja, klik *Autodock* dan pilih "*Make Macromolecules*";
- 6) Akan secara otomatis tersimpan dalam format *.pdbqt. Preparasi protein target selesai;
- 7) Selanjutnya pada lembar kerja *Molecules*, klik kanan dan klik "*Load Molecule*" → pilih file "**Ligand**" yang telah disimpan saat tahap pemisahan;
- 8) Klik kanan pada Ligand yang muncul yang telah dibuka pada lembar kerja, klik *Autodock* dan pilih "*Make Ligand*";
- 9) Akan secara otomatis tersimpan dalam format *.pdbqt. Preparasi Ligand selesai.

4.7.2.3. Validasi Metode *Docking*

Pada awal penelitian dilakukan validasi metode yaitu dengan *docking* seleksib dengan reseptor yang telah di preparasi menggunakan *Autodock* 4.2.1. Metode dikatakan valid apabila diperoleh nilai RMSD $\leq 2\text{\AA}$. Validasi metode *docking* ini perlu dilakukan untuk memastikan metode dapat dilakukan untuk *docking* senyawa uji dengan protein target. Berikut adalah langkah-langkah validasi metode *docking* :

- 1) Buka Aplikasi PyRx (*Autodock*) kemudian klik *Autodock Wizard*;
- 2) Klik *Select Molecul*, kemudian klik Ligan. *pdbqt* dan Protein.*pdbqt*;
- 3) Pastikan bahwa pada *Autodock* Panel telah tercantum Ligan dan protein (Ligan Selected dan Makromolecule Selected);
- 4) Lalu tekan Forward pada bagian pojok kanan bawah;
- 5) Pada kotak hasil 3D *scene* akan muncul kotak *grid box*;
- 6) Atur *grid box* agar berada di tengah ligan. Samakan besarnya angka pada “*number of point in xyz-dimention*”;
- 7) Tekan Run AutoGrid tunggu sampai proses *docking* awal selesai;
- 8) Setelah selesai proses *docking* awal tekan Run *Autodock*, lalu tunggu kembali hasil *docking*;
- 9) Selanjutnya dilihat nilai RMSD dengan cara memilih ikon structure lalu pilih RMSD All atoms. Validasi *docking* dikatakan valid apabila nilai RMSD yaitu jarak rata-rata antara *reference* dengan ligan hasil *docking* adalah kurang dari 2\AA (Megantara, 2014).

4.7.2.4. *Docking* Senyawa Uji

Setelah validasi metode *docking*, tahap selanjutnya yaitu dilakukan *docking* senyawa turunan 5-trifluorometil asam salisilat dan senyawa pembanding dengan protein target. Dilakukan *docking* dengan parameter *Genetic Algoritma* run = 100, jumlah evaluasi maksimal = 500.000, ukuran posisi = 150, dan maksimum generasi = 27.000. Berikut adalah langkah-langkahnya :

- 1) Pada lembar kerja *Molecules*, klik kanan dan klik “*Load Molecule*” → pilih file senyawa uji yang telah disimpan pada tahap preparasi;
- 2) Masing-masing senyawa uji dilakukan klik kanan, klik *Autodock* dan pilih *Make Ligand*;
- 3) Akan secara otomatis tersimpan dalam format *.*pdbqt*. Preparasi senyawa uji selesai;

- 4) Pada lembar kerja *Autodock* pilih *Autodock Wizard* klik *Select Molecules*. Pilih file senyawa uji dan protein target yang akan di *docking*. Setelah terpilih maka klik *Forward* yang terletak pada pojok kanan bagian bawah;
- 5) Karena *AutoGrid* sudah tersetting pada proses *AutoGrid*, maka pada proses *docking* cukup klik *Forward* lagi yang terletak pada pojok kanan bagian bawah;
- 6) Lakukan pengaturan parameter *docking*. Klik *Genetic Algorithm*, klik *Docking Parameter*. Maka dilakukan pengaturan pada *number of GA-runs* menjadi 100 dan pada *Maksimum Number Of Energy Evaluations* menjadi medium. Kemudian klik *Lamarckian GA* dan klik *Run Autodock* pada bagian pojok kiri bawah.

4.7.2.5. Analisis Hasil *Docking*

Analisis hasil *docking* senyawa turunan 5-trifluorometil asam salisilat dan senyawa pembanding dilakukan dengan menggunakan program *Autodock PyRx* seri 0,8. Berikut adalah langkah-langkahnya :

- 1) Pada lembar kerja *Autodock*, pilih file hasil *docking* senyawa dalam format *.dlg;
- 2) Klik *Autodock Wizard* dan klik *Analyze result*. Klik *insert new items*, pilih file *.dlg hasil *docking* senyawa uji yang tersimpan pada folder penyimpanan hasil *docking*;
- 3) Data *clustering* dapat dianalisa melalui data dari file *docking* parameter.dlg yang ditampilkan pada lembar kerja *Autodock*;
- 4) Data yang dipakai adalah data dengan jumlah *cluster* terbanyak atau tertinggi, dan energi terkecil. Apabila data dengan jumlah *cluster* tertinggi memiliki energi lebih besar dibandingkan data dengan jumlah *cluster* yang lebih sedikit, maka data yang digunakan adalah data dengan *cluster* tertinggi;
- 5) Simpan data yang digunakan dalam format *.sdf.

4.7.2.6. Visualisasi Hasil *Docking*

Visualisasi hasil *docking* dilakukan menggunakan *Proteins.plus web server* dengan tujuan untuk melihat interaksi ligan uji dengan protein target secara 2D dan 3D. Berikut langkah-langkahnya :

- 1) Buka *web server* *Proteins.plus*;
- 2) Masukkan protein target dengan format *.pdb dan file senyawa uji terpilih dengan format *.sdf;
- 3) Kemudian klik “Go”. Pilih *Pose View 2D Interaction Diagrams*, klik *Pose View*;

- 4) Klik *structure ligand* setelah terbaca klik *calculate*, tunggu *structure 2D* dari ligand yang dipilih;
- 5) Kemudian *save* dengan format **.png*;
- 6) Untuk melihat visualisasi dalam bentuk 3D, ligan diputar sampai terlihat jelas;
- 7) Lalu klik *screenshot* pilih “original 1x”.

4.7.3. Prediksi Sifat Farmakokinetik dan Toksisitas (ADMET)

Prediksi sifat fisikokimia yang meliputi: Berat Molekul (BM), logaritma koefisien partisi oktanol/air (Log P), *Hydrogen Bond Acceptors* (HBA), dan *Hydrogen Bond Donors* (HBD) dilakukan dengan menggunakan *pkCSM web server*. Prediksi sifat farmakokinetika (ADME: absorpsi, distribusi, metabolisme dan ekskresi) serta toksisitas dari senyawa turunan 5-trifluorometil asam salisilat juga dilakukan dengan menggunakan *pkCSM web server*. Berikut langkah-langkahnya :

- 1) Membuat gambar struktur kimia 2D senyawa turunan 5-trifluorometil asam salisilat dan senyawa perbandingan menggunakan program *Marvin Sketch 20.19*;
- 2) Kemudian masing-masing struktur senyawa yang telah digambar di *save* dengan format **.sdf*;
- 3) File yang telah di *save* dengan format **.sdf*. dimasukkan ke *Avogadro software* untuk membuat struktur 3-D; Simpan struktur dalam bentuk **.pdb*;
- 4) Sebelum menjalankan program *pkCSM web server*, perlu melakukan perubahan data bentuk SD file menjadi bentuk format SMILES dengan menggunakan bantuan *Online SMILES Translator* (<https://cactus.nci.nih.gov/translate/>);
- 5) Setelah mendapat data dalam bentuk SMILES inilah senyawa diproses menggunakan *pkCSM web server* (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction>) untuk memprediksi profil ADME dan toksisitas senyawa.