

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pulp capping merupakan salah satu prosedur penting dalam perawatan gigi yang bertujuan untuk melindungi pulpa yang terpapar serta mendorong regenerasi jaringan melalui pembentukan dentin reparatif. Pembentukan dentin reparatif ini melibatkan berbagai proses biologis yang kompleks, di antaranya peran *growth factor* dan protein khusus yang berfungsi dalam pembentukan dan mineralisasi dentin. Diantara faktor-faktor tersebut, *Transforming Growth Factor Beta 1* (TGF- β 1) dan *Dentin Sialophosphoprotein* (DSPP) memainkan peran kunci dalam proses proliferasi sel dan regenerasi jaringan dentin (Paula *et al.*, 2020; Chuang *et al.*, 2022; Alp and Ulusoy, 2024)

Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF- β 1) sangat tinggi diekspresikan dalam pulpa pada lapisan odontoblast dan sub-odontoblast dari spesimen pulpa dengan pulpitis karena karies. Pada proses pulp capping setelah fase inflamasi, dentin mengalami demineralisasi akibat pH yang tinggi sehingga melepaskan TGF- β 1 yang tersimpan dalam matriks ekstraseluler dentin. Sel mesenkim di sekitar area cedera bermigrasi dan berproliferasi, TGF- β 1 berperan dalam kemotaksis dan menginduksi pembentukan barier dentin yang termineralisasi pada pulpitis, *Dental pulp stem cell* (DPSC) dan sel progenitor lainnya yang diaktifkan pada fase proliferasi dapat berdiferensiasi menjadi *odontoblast-like cells* (Da Rosa, Piva and Da Silva, 2018; Paula *et al.*, 2020; Chuang *et al.*, 2022; Alp and Ulusoy, 2024). Hal ini menjadikan TGF- β 1 memainkan peran penting dalam proses perbaikan dentin setelah inflamasi pulpa. Beberapa penelitian menunjukkan TGF- β 1 dapat meningkatkan ekspresi mRNA dari DSPP serta protein non-kolagen lainnya yang penting untuk mineralisasi dentin. Interaksi ini penting untuk mempertahankan aktivitas TGF- β 1 dalam matriks dentin dalam mendukung proses pembentukan dentin reparatif (Yamakoshi *et al.*, 2014; Niwa *et al.*, 2018).

Dentin Sialophosphoprotein (DSPP) adalah protein non-kolagenous utama dalam dentin yang berfungsi sebagai matriks untuk mineralisasi yang ekspresinya diregulasi oleh asam lipoteikoat. DSPP diproses oleh protease menjadi tiga domain utama: *Dentine Sialoprotein* (DSP), *Dentine Glycoprotein* (DGP) dan *Dentine Phosphoprotein* (DPP). DSPP telah digunakan sebagai indikator diferensiasi odontoblas karena diekspresikan oleh *odontoblast-like cells* yang mendasari pembentukan dentin.



menjadi DPP dan DSP, yang masing-masing memiliki peran spesifik dalam diferensiasi sel odontoblas dan mineralisasi. Sel yang mensekresikan matriks ekstraseluler dentin (pre-dentin). Pre-dentin mengalami mineralisasi menjadi dentin reparatif. Dentin memiliki struktur tubular yang sempurna seperti dentin fisiologis, melindungi pulpa vital. Penelitian menunjukkan bahwa DSPP

tidak hanya berkontribusi pada struktur dentin tetapi juga berperan dalam mengatur respons inflamasi dan reparasi jaringan gigi (Yamakoshi *et al.*, 2014; Niwa *et al.*, 2018; Yoshihara *et al.*, 2020; El Karim *et al.*, 2021). Dengan demikian pengembangan agen pulp capping yang mampu menginduksi aktivasi TGF- β 1 dan DSPP menjadi sangat penting dalam mempercepat pembentukan dentin reparatif dan keberhasilan terapi *pulp capping*.

Kalsium hidroksida (Ca(OH)_2) saat ini masih digunakan sebagai *gold standard* untuk perawatan *pulp capping* karena harganya yang terjangkau dan mudah didapat. Kalsium hidroksida secara kimia diklasifikasikan sebagai basa kuat yang memiliki pH tinggi sekitar 12.5-12.8 dengan mekanisme kerja melepaskan ion kalsium (Ca^{2+}) dan ion hidroksil (OH^-) (Mohammadi and Dummer, 2011; Nugroho *et al.*, 2020). Penelitian yang dilakukan oleh Tanumihardja *et al.*, 2020 menyebutkan bahwa pada kondisi pH yang tinggi, lapisan superfisial yang berkontak langsung dengan kalsium hidroksida akan menyebabkan peradangan dan nekrosis jaringan menyebabkan terbentuknya zona nekrosis likuifaksi 1-2 mm yang dapat memperlambat penyembuhan. Zona ini dapat menyebabkan terbentuknya *tunnel defect* pada pembentukan jembatan dentin dan akan memudahkan masuknya invasi bakteri yang memperlambat proses penyembuhan. Selain itu kalsium hidroksida juga memiliki tingkat solubilitas yang tinggi dan karena adanya *tunnel defect* sehingga dapat menyebabkan mikrofiltrasi dan penetrasi bakteri serta iritan lain ke dalam pulpa. (Mohammadi and Dummer, 2011; Tanumihardja *et al.*, 2020; Zaen El-Din *et al.*, 2020; Pribadi, Widjiastuti and Nadia, 2020)

Berdasarkan kekurangan kalsium hidroksida dan penelitian sebelumnya, menjadi pertimbangan penulis untuk menemukan bahan kombinasi yang efektif untuk menginduksi pembentukan jaringan dentin reparatif dengan efek samping minimal, mengurangi inflamasi, sitotoksitas dan berpotensi sebagai bahan tambahan yang mendukung remineralisasi. Salah satu bahan alam yang potensial sebagai bahan remineralisasi gigi adalah daun kelor (*Moringa Oleifera*).

Salah satu bahan alami yang menarik untuk diteliti adalah daun kelor (*Moringa oleifera*) yang merupakan spesies pohon dalam famili *Moringaceae*, kaya mineral dan vitamin, bergizi, dan berkhasiat sebagai obat, sangat mudah ditemukan khususnya di wilayah asia tenggara (Du Toit, Sithole and Vorster, 2020; Shafiq and Mahdee, 2023). Tanaman ini telah lama dikenal kaya senyawa bioaktif, termasuk flavonoid, fenol, dan alkaloid, yang memiliki berbagai efek farmakologis seperti



teri, dan antioksidan. Pada penelitian sebelumnya melalui studi akan 4 senyawa bioaktif *M. Oleifera* yang mampu mereduksi alui interaksi yang baik terhadap TNF- α , IL-1 β dan IL-1 α , yang i potensi sebagai kandidat bahan tambahan *capping agent* n itu karakteristik lainnya diperlukan juga seperti membantu nyawa bioaktif *M. Oleifera* dalam perbaikan dan pembentukan

Sebuah penelitian oleh Younis *et al*, 2020 melaporkan efek remineralisasi dari ekstrak daun *M. Oleifera* yang ditambahkan pada varnish dan diaplikasikan pada lesi email yang diinduksi secara *in vitro* dengan meningkatkan pembentukan kembali struktur permukaan email yang hampir sempurna. Hal ini dikaitkan dengan kandungan kalsium (Ca^{2+}) dan fosfat (PO_4^{3-}) yang tinggi dan berbagai macam asam amino dalam ekstrak daun *M. Oleifera* mengalami interaksi kimiawi dengan mineral email, dan remineralisasi yang dipandu oleh peptida dapat menjadi dasar untuk kemampuannya dalam mendepositkan lapisan baru yang menyerupai struktur email yang sehat. (Younis, Obeid and Ammar, 2020). Penelitian klinis lainnya oleh Kadhem dan Haidar, 2022 menunjukkan aplikasi *nano-silver fluoride* (NSF) berbasis ekstrak daun *M. Oleifera* (NSF-MOLE) pada karies dentin deciduous dapat menghentikan perkembangan karies dengan tingkat keberhasilan yang signifikan, 86% karies aktif menjadi karies *arrested*, paling tinggi dibandingkan kelompok perlakuan lainnya (Kadhem and Al Haidar, 2022).

Berdasarkan beberapa penelitian terkait keunggulan *M. Oleifera* dalam proses remineralisasi gigi maka peneliti tertarik untuk mengetahui senyawa bioaktif yang memiliki potensi dalam pembentukan dentin reparatif melalui ikatan dengan TGF- β 1 dan DSPP.

Potensi senyawa bioaktif *M. Oleifera* yang berperan dalam pembentukan jaringan mineralisasi belum banyak dieksplorasi. Studi *in silico* menawarkan pendekatan yang efisien dan ekonomis untuk menelusuri senyawa bioaktif (Megantara *et al.*, 2022) dengan memprediksi interaksi senyawa bioaktif dengan protein yang berperan dalam pembentukan jaringan mineralisasi seperti TGF- β 1 dan DSPP. Simulasi ini dapat memberikan wawasan awal adanya senyawa bioaktif tertentu yang memiliki afinitas kuat terhadap TGF- β 1 dan DSPP. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memetakan senyawa bioaktif tertentu dengan manfaat tertentu akan menjadi langkah penting dalam pengembangan agen *pulp capping* dengan memanfaatkan sumber daya alam yang terjangkau dan ramah lingkungan seperti *M. Oleifera*, dan dapat memberikan kontribusi signifikan bagi inovasi dalam bidang kedokteran gigi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka permasalahan yang dapat dirumuskan adalah apakah terdapat senyawa bioaktif *M. Oleifera* yang memiliki ikatan kuat dengan TGF- β 1 dan DSPP melalui analisis *molecular docking* dan stabilitas dalam melalui simulasi dinamika molekul.



1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan Umum

Mengevaluasi interaksi semua senyawa bioaktif *M. Oleifera* terhadap TGF- β 1 dan DSPP melalui analisis *molecular docking* dan mengetahui stabilitas dalam lingkungan fisiologis melalui simulasi dinamika molekul.

Tujuan Khusus

1. Mengevaluasi energi ikatan yang terbentuk dari hasil *docking* senyawa bioaktif *M.Oleifera* terhadap TGF- β 1 dan DSPP.
2. Mengevaluasi jenis interaksi dari hasil *docking* senyawa bioaktif *M.Oleifera* terhadap TGF- β 1 dan DSPP.
3. Mengevaluasi stabilitas kompleks senyawa terbaik terhadap TGF- β 1 dan DSPP melalui simulasi dinamika molekul.
4. Mengevaluasi senyawa bioaktif *M.oleifera* yang memiliki ikatan yang baik dan stabil dengan TGF- β 1 dan DSPP yang berpotensi dalam pembentukan dentin reparatif melalui studi *in silico*. Mengevaluasi dampak kontaminasi *Ferric Sulfate* 20% terhadap kekerasan mikro resin dan kekuatan tekan komposit *bulk-fill scuptable*

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai bahan rujukan referensi, masukan, dan wawasan tentang studi *in silico* senyawa bioaktif *M. Oleifera* terhadap TGF- β 1 dan DSPP yang berpotensi dalam pembentukan dentin reparative.

1.5 Hipotesis

H0 : Tidak terdapat senyawa bioaktif *M. Oleifera* yang memiliki potensi sebagai kandidat bahan tambahan *capping agent* melalui ikatan terhadap TGF- β 1 dan DSPP.

H1 : terdapat senyawa bioaktif *M. Oleifera* yang memiliki potensi sebagai kandidat bahan tambahan *capping agent* melalui ikatan terhadap TGF- β 1 dan DSPP.



BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Rancangan Penelitian

2.1.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental *virtual-digital*.

2.1.2. Desain Penelitian

Desain penelitian adalah observasional-eksperimental.

2.2 Tempat dan Waktu Penelitian

2.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin dan Laboratorium Farmasi Poltekkes Kemenkes Makassar.

2.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret-Mei 2025

2.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

2.3.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas (*independent*) : Struktur senyawa bioaktif pada *M. oleifera*

Variabel terikat (*dependent*) : Efektivitas senyawa bioaktif dalam berinteraksi dengan reseptor TGF- β 1 dan DSPP

Variabel kendali : Jenis reseptor, parameter *molecular docking* dan dinamika molekul

Variabel antara : Nilai *binding affinity*, jenis interaksi, dan stabilitas pengikatan yang dihasilkan dari simulasi.



a. Senyawa Bioaktif *M. oleifera*: adalah senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan *M. oleifera* yang dapat berinteraksi dengan berbagai komponen dalam tubuh, baik dengan efek terapeutik maupun efek samping. Senyawa ini dimodelkan dalam format tiga dimensi (3D) untuk keperluan *molecular docking* dan dinamika molekul.

b. *Molecular Docking*: adalah proses simulasi *in silico* untuk mengevaluasi potensi interaksi antara senyawa bioaktif, reseptor TGF- β 1 dan DSPP. Hasilnya diukur melalui nilai *binding affinity* (kekuatan interaksi) yang dinyatakan dalam satuan energi (kcal/mol).

c. Dinamika Molekul: adalah simulasi dinamika molekuler yang digunakan untuk menganalisis stabilitas kompleks senyawa-reseptor dalam kondisi fisiologis. Parameter yang dievaluasi meliputi RMSD, RMSF, energi total sistem, dan visualisasi perubahan konformasi.

d. *RMSD (Root Mean Square Deviation)*: adalah pengukuran perbedaan antara dua struktur, yaitu struktur target dan referensi untuk mengidentifikasi perubahan besar dalam struktur protein.

e. *RMSF (Root Mean Square Fluctuation)*: adalah pengukuran perpindahan atom tertentu atau kelompok atom relatif terhadap struktur referensi.

f. Nilai Binding Affinity: adalah energi ikatan yang dihasilkan dari *molecular docking*, yang menunjukkan kekuatan interaksi antara senyawa bioaktif dengan reseptor. Nilai yang lebih negatif menunjukkan interaksi yang lebih kuat.

g. Jenis interaksi: adalah ikatan yang dihasilkan dari *molecular docking*, yang menunjukkan jenis interaksi antara senyawa bioaktif dengan reseptor. ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik berupa ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik.

h. Stabilitas ikatan yang dihasilkan simulasi: adalah parameter yang menunjukkan kestabilan interaksi antara senyawa bioaktif dan reseptor histamin dalam simulasi dinamika molekul. Stabilitas diukur melalui nilai *RMSD*, *RMSF*, dan energi total sistem dalam jangka waktu tertentu.

i. Jenis Reseptor adalah protein target berupa reseptor TGF- β 1 dan DSPP spesifik mast, yang struktur tiga dimensinya diperoleh dari *Protein Data Bank* sebagai model untuk interaksi dengan senyawa bioaktif



***Molecular docking* dan dinamika molekul:** adalah parameter yang dipengaruhi kondisi simulasi dinamika molekul berupa pH, suhu, konsentrasi, *force field*, dan kondisi solvasi

2.4 Bahan dan Alat

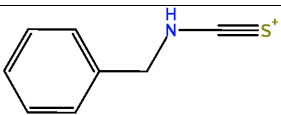
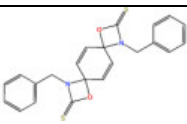
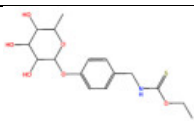
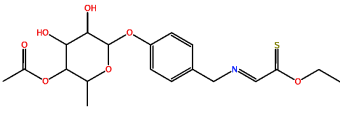
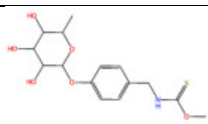
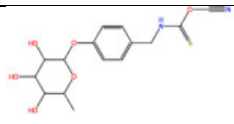
2.4.1 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini :

1. Senyawa Bioaktif Daun Kelor (*Moringa Oleifera*)

Struktur metabolit sekunder diperoleh sebanyak 49 melalui referensi *database* Knapsack (https://www.knapsackfamily.com/KNApSack_Family/). Kemudian diunduh dari Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Tabel 2. 1 Daftar senyawa bioaktif *Moringa Oleifera*

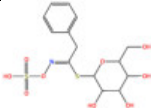
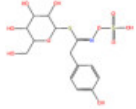
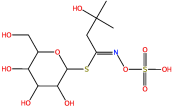
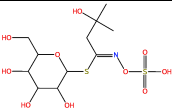
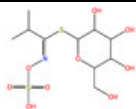
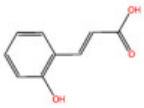
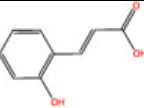
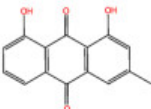
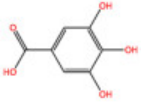
No.	Ligand	Pubchem C_ID	Struktur
1	<i>Benzyl Isothiocyanate</i>	2346	
2	<i>Pterygospermin</i>	72201063	
3	<i>Niazimicin A</i>	10247749	
4	<i>Niaziminin A</i>	44559760	
5	<i>Niazinin A</i>	89812211	
6	<i>Niazidin</i>	11792427	



nd

Pubchem C_ID

Struktur

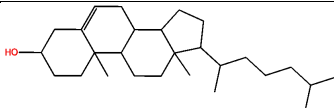
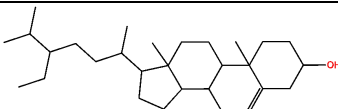
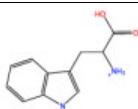
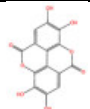
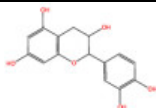
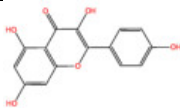
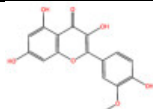
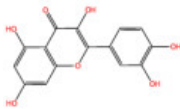
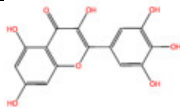
7	<i>Benzylglucosinolate</i>	9548605	
8	<i>Sinabin</i>	76956748	
9	<i>Glucoconringiin</i>	131752365	
10	<i>Glucocochlearin</i>	5281135	
11	<i>Glucoputranjivin</i>	441524	
12	<i>Coumaric Acid</i>	637542	
13	<i>2-Hydroxy Cinnamic Acid</i>	637540	
14	<i>Daidzein</i>	5281708	
15	<i>Gallic Acid</i>	370	
16	<i>Lupenol</i>	236432	



nd

Pubchem C_ID

Struktur

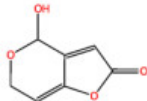
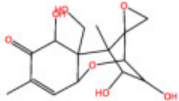
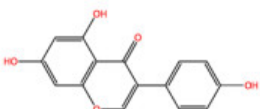
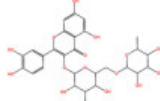
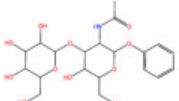
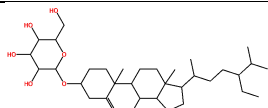
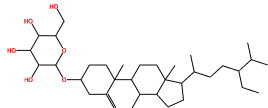
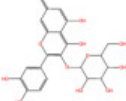
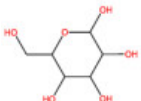
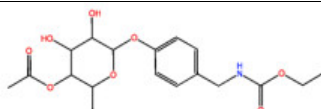
17	<i>Alpha-Amyrin</i>	73170	
18	<i>Cholest5en3ol</i>	304	
19	<i>Sitosterol</i>	222284	
20	<i>Tryptophan</i>	6305	
21	<i>Ellagic Acid</i>	5281855	
22	<i>Epicatechin</i>	72276	
23	<i>Kaempferol</i>	5280863	
24	<i>Isorhamnetin</i>	5281654	
25	<i>Quercetin</i>	5280343	
26	<i>Mvricetin</i>	5281672	



nd

Pubchem C_ID

Struktur

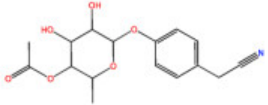
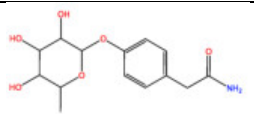
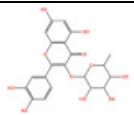
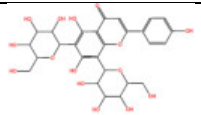
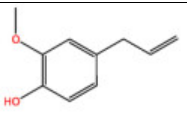
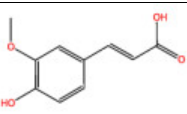
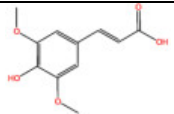
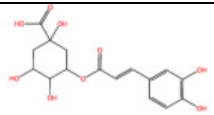
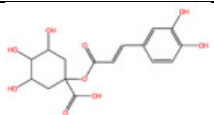
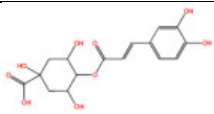
27	<i>Gentisic Acid</i>	3469	
28	<i>Moringyne</i>	131751186	
29	<i>Genistein</i>	5280961	
30	<i>Rutin</i>	5280805	
31	<i>Marumoside B</i>	11671631	
32	<i>Glucopiranosil Sitosterol</i>	70699375	
33	<i>3-O-Beta-Glucopiranosil Sitosterol</i>	12309067	
34	<i>Hirsutrin</i>	74982342	
35	<i>D-Allose</i>	439507	
36	<i>Niazimin</i>	10339912	



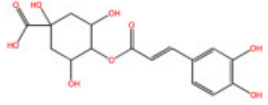
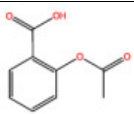
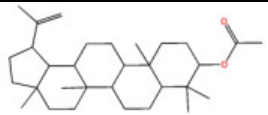
and

Pubchem C_ID

Struktur

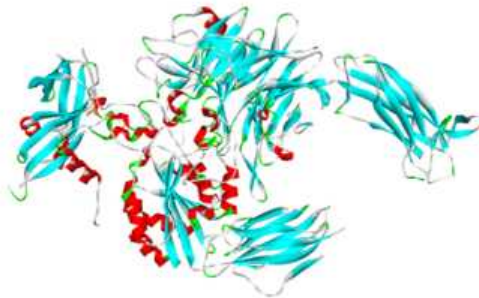
37	Niazirinin	10426197	
38	Marumoside A	101794623	
39	Astragalin	5282102	
40	Vicenin	13644663	
41	Eugenol	3314	
42	Ferulic Acid	445858	
43	Sinapic Acid	1549091	
44	Chlorogenic Acid	1794427	
45	5-Caffeoylquinic Acid	5315832	
46	Caffeoylquinic acid	10155076	



47	4-Caffeoylquinic Acid	58427569	
48	Caffeic acid	689043	
49	Lupeolacetate	92157	

2. Reseptor target

Struktur tiga dimensi dari reseptor Reseptor TGF- β 1 (PDB ID: 6UJA) dan DSPP (RCSB: AF_AFA0A1P8AV76F1), yang berfungsi sebagai protein target diperoleh dari laman PDB ID <https://www.rcsb.org/pdb>.



Gambar 2. 1 Reseptor TGF- β 1 (PDB ID: 6UJA)



2 Reseptor DSPP (RCSB: AF_AFA0A1P8AV76F1)



2.4.2 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini :

1. Perangkat Keras

Perangkat keras yang digunakan dalam penelitian ini adalah Laptop dan sistem operasi *Windows 11*. Laptop terhubung dengan internet.

2. Perangkat Lunak

Perangkat lunak *docking* molekuler adalah alat yang sangat penting dalam biologi komputasi dan penemuan obat. Perangkat lunak ini memungkinkan simulasi dan prediksi interaksi antara molekul kecil dan protein target, dan menggunakan algoritma yang canggih untuk memberikan gambaran rinci tentang fenomena pengikatan molekul. Perangkat lunak yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya : *Protein Data Bank* (PDB), Website Knapsack, Website Pubchem, *AutoDock tools 1.5.6*, Aplikasi *AutoDock 4*, Aplikasi *Biovia Discovery Studio Visualization*, Aplikasi GROMACS.

- a. Website *Protein Data Bank* (PDB) ID (<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) untuk mengunduh data protein



Gambar 2. 3 Tampilan Website Protein Data Bank

- b. Website *Pubchem* yang merupakan arsip terbuka berisi informasi berbagai entitas kimia termasuk molekul kecil, karbohidrat, lipid dan asam amino (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).



Gambar 2. 4 Tampilan Website Pubchem

- c. Aplikasi *Molecular Operating Environment (MOE)*



Gambar 2. 5 Aplikasi MOE

- d. Aplikasi *Autodock* untuk melakukan *docking ligan dan reseptor*



Gambar 2. 6 Aplikasi Autodock 4

- e. Aplikasi *Biovia Discovery Studio Visualization 2017* untuk melakukan pengeditan ligan dan reseptor yang telah dilakukan *docking*.



2. 7 Aplikasi Biovia Discovery Studio Visualizer

- f. Aplikasi GROMACS untuk simulasi dinamika molekul



Gambar 2. 8 Aplikasi GROMACS

2.5 Metode Penelitian

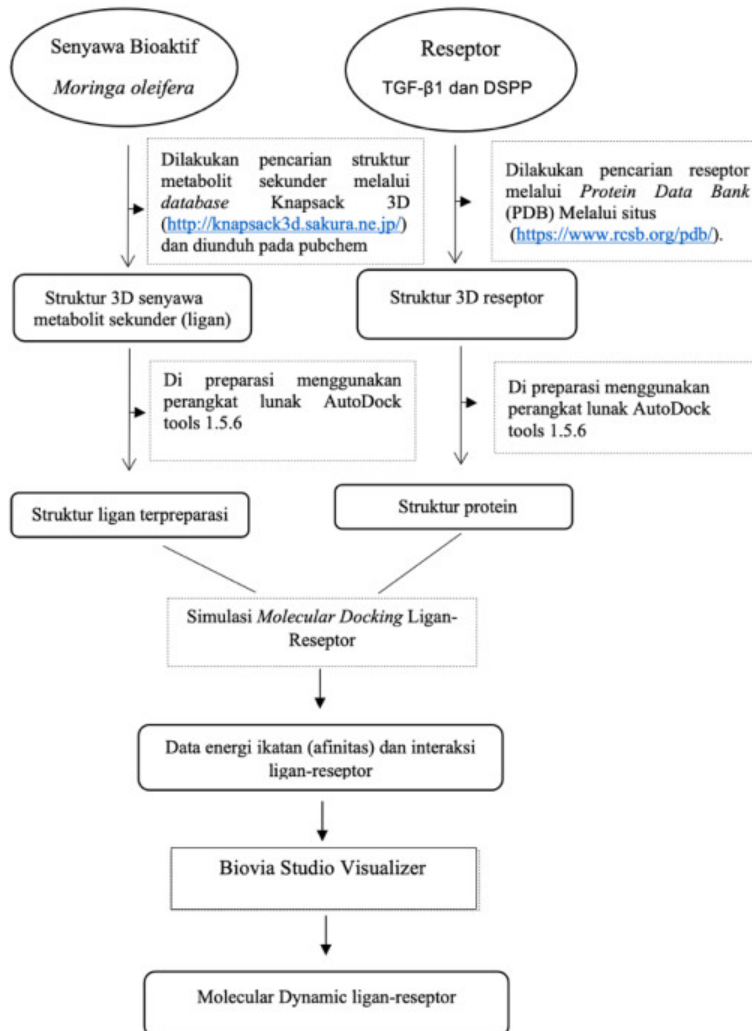
Penelitian ini merupakan jenis penelitian *eksperimental* secara studi *in silico* untuk menguji apakah variabel-variabel eksperimen efektif atau tidak dengan bantuan sistem komputer. Penelitian ini menggunakan analisis *molecular docking* dari interaksi reseptor yang didapatkan dari web *Protein Data Bank* (PDB) ID dan ligan berupa senyawa metabolit sekunder dari referensi *database Knapsack* dan diunduh dari *website Pubchem*. Sisi aktif reseptor kemudian diprediksi dengan Site Finder (MOE) karena ketiadaan *native ligand* reseptor.

Simulasi docking ligan terhadap reseptor TGF- β 1 dan DSPP dilakukan menggunakan AutoDock4 dengan algoritma Genetika Lamarckian dan pengaturan grid $40 \times 40 \times 40$ (jarak 0,375 Å). Hasil docking dianalisis menggunakan BIOVIA Discovery Studio (2017) berdasarkan energi ikatan dan interaksi residu asam amino.

Berdasarkan hasil terbaik dari molecular docking, dilakukan simulasi dinamika molekuler (MD) untuk melihat kestabilan interaksi antara ligan dan protein dalam jangka waktu tertentu. Simulasi dinamika molekuler (MD) dilakukan menggunakan GROMACS 2025.1 untuk mengevaluasi kestabilan kompleks protein-ligan yang diperoleh dari docking, dengan analisis RMSD, RMSF, Rg, dan SASA. Selain itu, afinitas ikatan ligan terhadap reseptor dihitung menggunakan metode MM/PBSA berdasarkan 100 frame dari trajektori simulasi.



2.6 Pelaksanaan Penelitian



Gambar 2. 9 Prosedur penelitian

2.6.1 Parameter Pengamatan



beberapa tahapan kegiatan dengan parameter tertentu, yaitu:

Docking

sisi aktif reseptor TGF-β1 dan DSPP menggunakan *Molecular* (MOE).

etabolit Sekunder

Dalam proses *docking*, parameter yang diamati adalah energi pengikatan bebas dalam satuan kcal/mol. Semakin rendah energi pengikatan antara ligan dan reseptor, semakin stabil ikatannya. (Pratama, Poerwono and Siswodihardjo, 2020)

3. Hasil Visualisasi Molecular Docking dengan Discovery Studio 2017 R2 Client

Parameter yang diamati dalam eksperimen ini adalah kesesuaian antara residu asam amino dan jenis ikatan yang dibentuk antara ligan dan reseptor. Interaksi antara ligan uji dan jenis ikatan yang sebanding dengan ligan asli menunjukkan aktivitas yang sebanding. *Discovery Studio* digunakan untuk menampilkan hasil *docking* molekuler. (Pratama, Poerwono and Siswodihardjo, 2020)

4. Hasil Dinamika Molekul dengan menggunakan GROMACS

RMSD (*root mean square deviation*) dari kerangka utama (*backbone*) protein dimonitor untuk menilai kestabilan konformasi secara keseluruhan. Terbentuknya plateau yang stabil pada grafik RMSD setelah 1 ns menunjukkan bahwa sistem telah mencapai keadaan setimbang. Selanjutnya, RMSF (*root mean square fluctuation*) digunakan untuk menganalisis fleksibilitas residu asam amino secara individual selama simulasi berlangsung. Selain itu, radius girasi (*radius of gyration/Rg*) dihitung untuk mengevaluasi tingkat kekompakan struktur protein seiring waktu. Luas permukaan terakses pelarut (*solvent accessible surface area/SASA*) juga diukur untuk mengamati perubahan tingkat paparan permukaan protein terhadap lingkungan pelarut. Sebagai tambahan, dilakukan perhitungan energi ikatan bebas menggunakan metode MM/PBSA (*Molecular Mechanics/Poisson– Boltzmann Surface Area*) untuk mengevaluasi afinitas pengikatan ligan terhadap reseptor secara kuantitatif. (Wang *et al.*, 2018)

2.6.2 Persiapan Ligan

a. Pengunduhan Ligan

Ligan yang digunakan adalah senyawa bioaktif daun kelor yang diperoleh dari *database knapsack* dan diunduh dengan pubchem ID sesuai senyawa yang akan dilakukan *docking*. Diunduh dengan format .sdf, yang diperoleh dari <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

b. Preparasi Ligan

Preparasi ligan menggunakan aplikasi perangkat lunak *AutoDock tools 1.5.6*.



reptor

in

engan alamat situs (<http://www.rcsb.org/pdb/>) penelitian ini
1 dan DSPP dengan identitas makromolekul PDB ID diunduh

b. Preparasi Reseptor

Preparasi protein target menggunakan *Discovery studio* untuk dihilangkan air, dan ligan yang tidak dibutuhkan kemudian masukkan ke *autodock tools* 1.5.6 dengan cara memprotonasi dan menentukan koordinat dari protein target, untuk diberi muatan dan disimpan dalam format .pdbqt.

2.6.4 Molecular Docking

Struktur molekul yang dioptimalkan secara geometris kemudian digunakan dalam simulasi docking molekul. Simulasi docking molekul dilakukan antara ligan terhadap TGF- β 1 dan DSPP sebagai reseptor menggunakan program AutoDock4. Simulasi docking molekul ini dilakukan dengan torsi maksimum menggunakan pengaturan ukuran kotak 40 x 40 x 40 dengan jarak 0,375 Å. Algoritma Genetika Lamarckian diterapkan sebagai metode pencarian, dengan 100 kali simulasi per docking, ukuran populasi 150, jumlah evaluasi energi maksimum ditetapkan 2.500.000, dan jumlah generasi maksimum ditetapkan 27.000. Data simulasi docking molekul kemudian dianalisis menggunakan program BIOVIA Discovery Studio Visualizer (2017) dengan membandingkan energi ikatan dan interaksi asam amino.

2.6.5 Fungsi Penilaian (Skor)

Penilaian dalam penelitian ini berupa penilaian terhadap *Root Mean Square Deviation* (RMSD) dengan satuan *amstrong* (Å), energi ikatan dalam satuan kcal/mol.

2.6.6 Validasi Metode Docking .

Validasi docking untuk memastikan bahwa orientasi ligan dan posisi yang diperoleh dari studi *docking* bernilai valid dimana nilai RMSD $\leq 2,0$ Å

2.6.7 Visualisasi Hasil Docking

Tujuan visualisasi untuk menganalisis jenis interaksi antara senyawa bioaktif *M. Oleifera* dengan TGF- β 1 dan DSPP. Analisis data dilakukan *Biovia Discovery Studio Visualization* dengan memperhatikan hasil *docking* senyawa aktif *M. Oleifera* dengan TGF- β 1 dan DSPP.



Informasi ligan hasil *docking* dilakukan dengan memilih yang mempunyai afinitas ikatan yang paling rendah dengan pose analisa menggunakan *Biovia Discovery Studio*. Selanjutnya hasil dipilkan dalam bentuk tabulasi dan ilustrasi tiga dimensi, sertaatif.

2.6.8 Dinamika Molekul

Berdasarkan hasil terbaik dari molecular docking, dilakukan simulasi dinamika molekuler (MD) untuk melihat kestabilan interaksi antara ligan dan protein dalam jangka waktu tertentu. Simulasi ini dijalankan menggunakan perangkat lunak GROMACS versi 2025.1. Untuk protein, digunakan force field AMBER99SB-ILDN karena dikenal akurat dalam menggambarkan pergerakan rantai samping dan sering digunakan dalam studi protein-ligan.

Sementara itu, parameter untuk ligan dibuat menggunakan alat ACPYPE, dengan tipe atom GAFF2 dan muatan AM1-BCC. Interaksi elektrostatik jarak jauh dihitung dengan metode Particle Mesh Ewald (PME) menggunakan batas (cutoff) 1,0 nm. Sistem disiapkan dalam lingkungan larutan dengan air model TIP3P, lalu dinetralkan dengan penambahan ion Na^+ dan Cl^- .

Sebelum simulasi utama, dilakukan beberapa tahap persiapan: minimisasi energi, pemanasan hingga suhu 310 K, dan penyeimbangan suhu serta tekanan (equilibration). Simulasi utama berlangsung selama 100 nanodetik dengan langkah waktu 2 femtodetik, dan menggunakan kondisi batas periodik agar sistem tetap stabil. Penyeimbangan dilakukan dalam dua tahap, yaitu NVT (500 ps pada suhu 300 K) dan NPT (1 ns pada tekanan 1 bar). Selama tahap ini, posisi atom berat pada protein dijaga agar tidak berubah banyak.

Untuk menilai kestabilan sistem, digunakan beberapa analisis. Grafik RMSD dari kerangka utama protein digunakan untuk melihat kestabilan struktur keseluruhan. Grafik yang stabil setelah 1 ns menandakan sistem sudah setimbang. Analisis RMSF dilakukan untuk melihat seberapa fleksibel masing-masing residu asam amino. Radius girasi (R_g) digunakan untuk menilai seberapa rapat struktur protein, sedangkan SASA digunakan untuk melihat seberapa besar bagian protein yang terpapar ke air selama simulasi.

Sebagai tambahan, dilakukan juga perhitungan energi ikatan bebas menggunakan metode MM/PBSA. Metode ini menghitung seberapa kuat ligan berikatan dengan reseptor, berdasarkan 100 frame dari hasil simulasi MD. Energi yang dihitung meliputi total energi, energi elektrostatik, van der Waals, dan energi pelarutan. MM/PBSA banyak digunakan karena hasilnya lebih mendekati kondisi nyata dibandingkan dengan docking statis.



ran

akan diolah dan dianalisis, selanjutnya dilaporkan dalam bentuk