

## **BAB 4**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Jenis Penelitian**

Metode penelitian yang akan dipergunakan adalah penelitian secara *in silico*. Penelitian secara *in silico* merupakan metode penelitian yang dilakukan secara komputasional menggunakan perangkat lunak dan algoritma untuk menganalisis dan memodelkan data biologis atau kimia.

#### **4.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian disini akan saya lakukan dengan perkiraan waktu selama 2 bulan dan bertempat di Laboratorium Kimia Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Malang .

#### **4.3 Kriteria inklusi dan Eksklusi Penelitian**

##### **4.3.1 Kriteria Inklusi**

1. Target Protein yang digunakan

Kriteria untuk memasukkan protein target yang dipakai adalah protein yang terlist oleh Protein Data Base, tercatat kedalam grup Homo sapiens, dan dapat diakses melalui jurnal penelitian

2. Senyawa yang digunakan

Kriteria untuk memasukkan senyawa yang dipakai melibatkan secondary metabolite compounds dari (*L. acidissima*) berdasarkan struktur senyawa yang tersedia oleh webserver PubChem dan berdasarkan tingkat bioavailabilitas yang tinggi.

##### **4.3.2 Kriteria Eksklusi**

1. Protein Target yang dipakai

Kriteria yang digunakan untuk memilih protein target yang tidak dapat protein yang terlist oleh Protein Data Base, tidak kedalam grup Homo sapiens, dan tidak dapat diakses melalui jurnal penelitian

2. Senyawa yang tidak digunakan

Kriteria eksklusi dari senyawa metabolit sekunder *Limonia acidissima* yaitu berdasarkan struktur senyawa yang tersedia oleh webserver Pubchem dan mempunyai bioavailabilitas yang tidak baik atau kurang bagus.

## 4.4 Alat dan Bahan Penelitian

### 4.4.1 Bahan Penelitian

Daftar metabolit sekunder tumbuhan (*L. acidissima*) adalah bahan yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan pada senyawa aktif pada tumbuhan kawista (*L. acidissima*) pada buku Bioactive Compound in Underutilized Fruits and Nuts (Murthy & Baphat, 2020).

### 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 protein membran dengankode pada PDB yaitu 5KMD yang menggunakan ligan standart berupa senyawa amlodipin.

### 4.4.3 Alat Penelitian

#### 1. Perangkat Keras (Hardware)

Laptop Asus yang memiliki spesifikasi processor AMD Rayzen7 4000U dan grafis AMD Radeon Graphics 2.30 GHz dan memori yang terpasang 8,00 GB(7,55 GB yang dapat digunakan).

#### 2. Perangkat Lunak (Software)

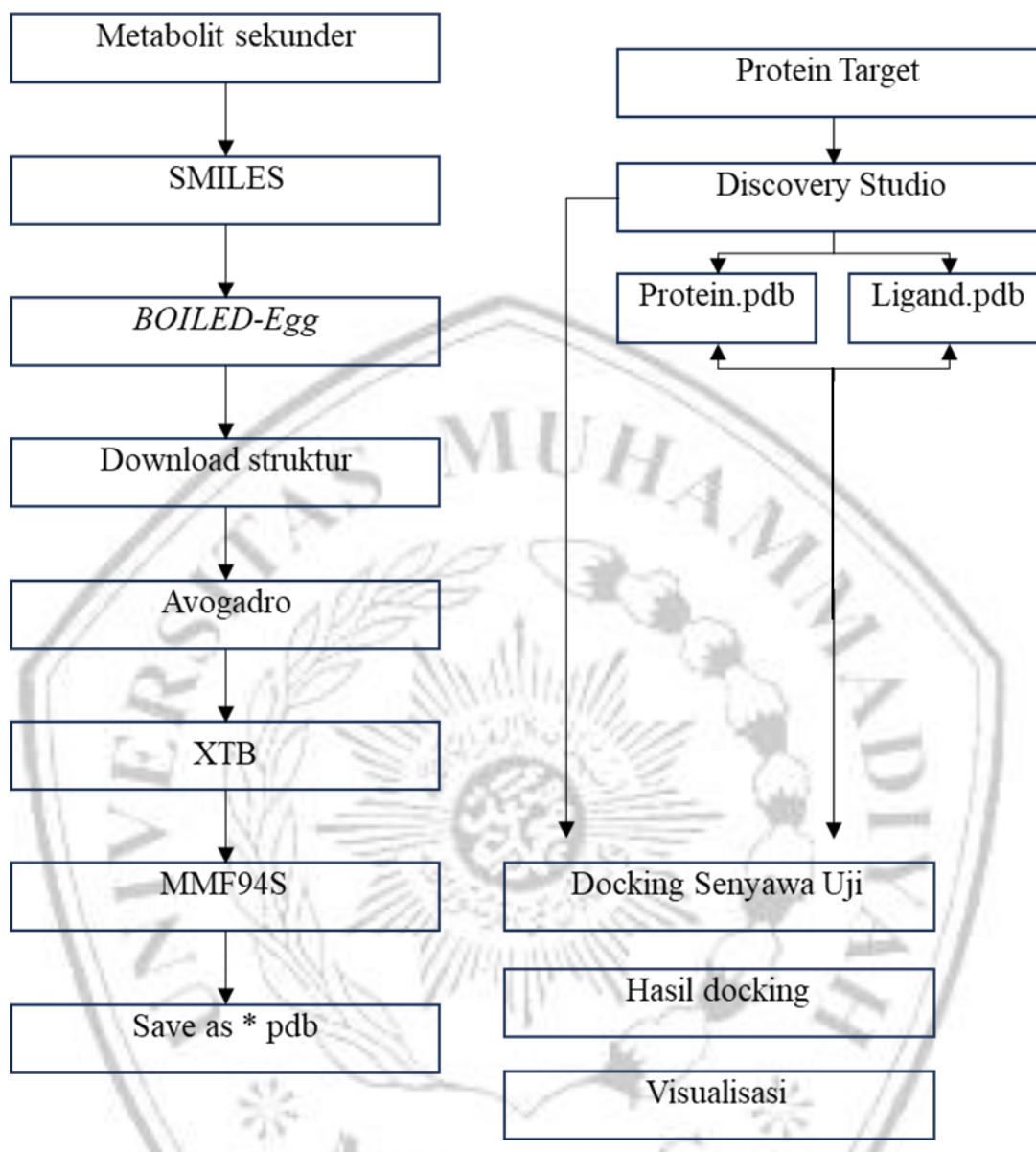
Perangkat lunak yang digunakan pada penelitian ini berupa :

- 1) Marvin Sketch 20,11
- 2) Avogadro seri 1.2.0
- 3) Biovia Discovery Studio 2020
- 4) Autodock Py Rx seri 0,8

#### 3. Database

- 1) Protein Data Bank (PDB) (<https://www.resb.org>)
- 2) SMILES Online Translator (<https://cactus.net.nih.gov/translate>)
- 3) SwissADME (<https://swissadme.ch/>)
- 4) Protein plus (<https://proteins.plus/>)

#### 4.5 Kerangka Operasional



Tabel 4. 1 Kerangka Operasional

#### 4.6 Prosedur Penelitian

##### 4.6.1 Pencarian Metabolit Sekunder

Berdasarkan dari sumber buku *Bioactive compounds in underutilized fruits and nuts* Murthy & Bapat, (2020) didapatkan kandungan senyawa metabolit sekunder yang ada pada (*L. acidissima*) yang akan digunakan untuk penelitian ini.

#### 4.6.2 Prediksi Bioavailabilitas

Senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada (*L. acidissima*) diinput ke dalam webserver PubChem Kemudian di dapatkan SMILES yang diperoleh diinput ke dalam webserver Swiss ADME untuk mendapatkan data bioavailabilitas dengan metode Boiled Egg (Gokhale et al.,2019).

Dalam penelitian ini dimana menggunakan 18 senyawa tumbuhan yang berbeda dan memfokuskan pada 3 reseptor dengan golongan obat antihipertensi. Untuk mencari reseptor obat, menggunakan PDB sebagai sumber informasi. Ligan (protein) yang telah terunduh harus berbentuk kompleks agar sesuai dengan kebutuhan penelitian. Selain itu, juga menggunakan perangkat lunak AutoDock untuk mempersiapkan senyawa yang akan diuji. Data yang diperlukan untuk preparasi senyawa tersebut diperoleh melalui akses ke situs web PubChem dan perangkat lunak Avogadro. Berikut adalah uraian langkah-langkah yang akan dilakukan :

##### 4.6.2.1 PubChem

Untuk mencari senyawa metabolit sekunder dari tumbuhan yang akan diuji, dilakukan dengan mengikuti langkah-langkah berikut:

- a. Akses situs web <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.
- b. Pada kolom pencarian, klik "Compound" pada opsi "Go".
- c. Ketik nama senyawa yang akan dicari (misalnya, creatine). Kemudian tekan tombol "Search".
- d. Setelah hasil pencarian muncul, klik pada nama senyawa yang sesuai dengan penelitian.
- e. Pada halaman senyawa tersebut, temukan dan klik opsi "Download".
- f. Pilih opsi "3D Conformer" dan pilih format file SDF sebagai format penyimpanan. Setelah memilih opsi tersebut, kemudian simpan file tersebut sesuai kebutuhan penelitian.

##### 4.6.2.2 Avogadro

Untuk menggunakan aplikasi Avogadro dan mengoptimalkan geometri senyawa, Anda dapat mengikuti langkah-langkah berikut:

- a. Buka aplikasi Avogadro dan pilih opsi "Open" untuk membuka file yang telah Anda unduh dalam format SDF melalui PubChem.

- b. Setelah struktur senyawa muncul, klik tab "Extensions" di bagian atas jendela aplikasi, lalu pilih "Molecular Mechanics" dan klik "Setup Force Field". Ganti opsi force field menjadi "MMFF94s" dan ubah nilai "Step" menjadi 1000 untuk melakukan minimasi energi.
- c. Selanjutnya, lakukan optimasi geometri senyawa dengan cara memilih opsi "Extensions" lagi, lalu pilih "Optimize Geometry". Lakukan replikasi minimal 3 kali untuk mendapatkan nilai yang konsisten.
- d. Setelah melakukan optimasi geometri, simpan struktur senyawa dalam format PDB.

#### 4.6.2.3 Protein Data Bank (PDB)

Untuk mencari reseptor obat golongan antihipertensi pada website resmi PDB dapat mengikuti langkah-langkah berikut:

- a. Buka website resmi PDB di <https://www.rcsb.org>.
- b. Pada halaman utama, temukan kolom pencarian dan ketik nama reseptor yang ingin dicari (misalnya, Amlodipine).
- c. Setelah itu, klik tombol "Go" atau tekan tombol "Enter" pada keyboard.
- d. Setelah hasil pencarian muncul, klik tab "Refinements" di atas hasil pencarian.
- e. Pada bagian "Species", centang kotak yang sesuai dengan Homo sapiens atau cari spesies yang setara dengan mamalia.
- f. Perhatikan kolom "Ligand" dan pastikan struktur ligan yang terdaftar sesuai dengan senyawa obat yang dicari.
- g. Terakhir, klik "Download Files" di pojok kanan atas halaman dan pilih format penyimpanan PDB format. Simpan file tersebut sesuai kebutuhan penelitian.

#### 4.6.3 Prediksi Interaksi

##### a. Pemisahan Ligan dan Reseptor

Reseptor yang telah diunduh dari PDB berupa kompleks dengan ligan yang harus dilepaskan dari ligan dengan menggunakan Biova Discovery Studio Visualizer, dan harus dibedakan dari residu residu sehingga tidak mengganggu proses docking dan tidak mempengaruhi hasil. Yang pertama dilakukan adalah pemilihan ligan kemudian dilanjutkan dengan pemilihan reseptor, adapun langkah-langkahnya sebagai berikut:

##### 1. Pemilihan Ligan

- a. Buka file PDB yang telah diunduh menggunakan Biova Discovery Studio Visualizer. Kemudian dapat dilihat gambar 3D dari kompleks tersebut.
- b. Menuju jendela "Hierarchy" (hirarki), temukan komponen ligan yang ingin dipisahkan dari kompleks. Biasanya, komponen ligan akan terdaftar sebagai salah satu entitas dalam hirarki.
- c. Pilih komponen ligan tersebut dengan mengkliknya.
- d. Untuk menyimpan ligan yang dipilih, klik "Save as" dan berikan nama pada ligan tersebut.

## **2. Pemilihan Reseptor**

- a. Buka kembali file PDB yang telah diunduh menggunakan Biova Discovery Studio Visualizer. Kemudian dapat dilihat gambar 3D dari kompleks tersebut.
- b. Di jendela "Hierarchy" (hirarki), temukan komponen reseptor yang ingin dipisahkan dari kompleks. Biasanya, komponen reseptor akan langsung terdaftar sebagai entitas terpisah dalam hirarki.
- c. Pilih komponen reseptor tersebut dengan cara diklik.
- d. Untuk menyimpan reseptor yang dipilih, klik "Save as" dan berikan nama pada reseptor tersebut.

## **b. Preparasi Reseptor dan Ligan**

Sebelum melakukan proses docking perlu dilakukan preparasi senyawa obat dan reseptor yang diperlukan kemudian disimpan dengan format dan penyimpanan folder yang sudah ditentukan agar memudahkan tahap selanjutnya. Berikut Langkah-langkahnya:

### **1. Preparasi Reseptor**

- a. Buka program Autodock PyRx;
- b. Klik menu Edit, lalu klik pada bagian Preferences;
- c. Pada kotak dialog yang muncul, dirubah bagian Workspace dengan menekan tombol Browse. Pilih lokasi penyimpanan hasil docking;
- d. Pada lembar kerja Molecules, klik kanan dan pilih Load Molecule, pilih file "Protein" yang telah disimpan pada tahap pemisahan sebelumnya;
- e. Klik kanan pada struktur protein yang muncul pada, klik Autodock dan pilih Make Macromolecules
- f. File akan tersimpan secara otomatis dalam format \*.pdbqt;

g. Preparasi protein selesai.

## 2. Preparasi Ligan

- a. Buka program Autodock PyRx;
- b. Klik menu Edit, kemudian klik bagian Preferences;
- c. Pada kotak dialog Preferences, dirubah bagian Workspace dengan menekan tombol Browse. Pilih lokasi penyimpanan hasil docking;
- d. Pada lembar kerja Molecules, klik kanan dan pilih Load Molecule, pilih file "Ligan" yang telah disimpan pada tahap pemisahan sebelumnya;
- e. Klik kanan pada struktur ligan yang muncul pada lembar kerja, klik Autodock dan pilih Make Ligand
- f. File akan tersimpan secara otomatis dalam format \*.pdbqt;
- g. Preparasi ligan selesai.

## 3. Mencari Sisi Aktif Protein Target (AutoGrid)

- a. Buka program Autodock PyRx dan akan diarahkan lembar kerja Autodock;
- b. Pilih Autodock Wizard dan klik Select Molecules. Masukkan protein dan ligan dengan format \*.pdbqt yang telah dipreparasi sebelumnya;
- c. Klik Forward yang terletak pada bagian bawah sebelah kanan;
- d. Pada kotak hasil 3D scene akan muncul kotak Gridbox. Atur Gridbox tersebut pada bagian tengah ligan dan sesuaikan besarnya angka pada number of points in xyz- dimensions:
- e. Klik Run AutoGrid pada bagian bawah sebelah kiri.

### 4.6.4 Docking Ligan Senyawa Pembanding dan Senyawa Uji

Setelah preparasi, langkah selanjutnya adalah melakukan docking senyawa metabolit sekunder tumbuhan yang diuji ke reseptor obat antihipertensi, serta melakukan docking senyawa pembanding ke reseptor obat. File senyawa dengan format \*.pdb yang telah disimpan sebelumnya dimasukkan ke PyRx seri 0.8, seperti pada pembuatan AutoGrid. Selanjutnya, dilakukan docking terhadap senyawa tersebut dengan ketentuan parameter GA run = 100, jumlah evaluasi maksimal 500.000, ukuran posisi 150, dan maksimum generasi RMSD. 27.000. Hasil docking tersebut akan dikontrol.

Berdasarkan hasil nilai RMSD. Berikut adalah langkah-langkahnya:

- a. Pada lembar kerja Molecules, klik kanan dan klik Load Molecule, kemudian

- pilih file senyawa uji yang telah disimpan pada tahap preparasi sebelumnya,
- b. Klik kanan pada masing-masing senyawa uji, kemudian klik AutoDock dan pilih Make Ligand;
  - c. Secara otomatis, file akan tersimpan dalam format.pdbqt. Persiapan senyawa uji selesai;
  - d. Selanjutnya, buka Kembali Autodock pada bagian lembar kerja dan pilih bagian 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;
  - e. Proses docking dapat dilakukan dengan klik Forward lagi (dengan AutoGrid dipastikan telah diatur pada proses sebelumnya) yang terletak pada bagian bawah sebelah kanan;
  - f. Atur Parameter Docking. Klik Genetic Algorithm, klik Docking Parameter. Selanjutnya diatur tetapan jumlah pengoperasian, yaitu numberof GA-runs menjadi 100 dan pada Maximum Number of Energy Evaluations menjadi medium. Kemudian klik Lamarckian GA dan klik Run Autodock pada bagian pojok kiri bawah;
  - g. Pemantauan proses docking dapat dilakukan dengan aplikasi Notepad++.

#### **4.6.5 Analisa Hasil Docking**

Analisis hasil docking senyawa metabolit sekunder tumbuhan yang diuji ke reseptor obat antihipertensi dilakukan dengan menggunakan program AutodockPyRx seri 0,8. Berikut adalah langkah-langkahnya:

- a. Pada lembar kerja Autodock, pilih file hasil docking senyawa dalam format "dlg";
- b. Klik Autodock Wizard dan klik Analyze result. Klik insert new items, pilih file dlgs hasil docking senyawa uji yang tersimpan pada folder penyimpanan hasil docking
- c. Data clustering dapat dianalisa melalui data dari file docking parameter.dlg yang ditampilkan pada lembar kerja Autodock,
- d. 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:

- e. Simpan data yang digunakan dalam format sdf.

#### **4.6.6 Visualisasi Hasil Docking**

Untuk menggambar hasil docking dan menganalisis interaksi antara ligan uji dengan reseptor target menggunakan Proteins.plus web server, dengan langkah-langkah sebagai berikut:

##### **1. Visualisasi 2D**

- a. Buka webserver Protein plus:
- b. Protein target diimpor dalam format pdb dan file campuran eksperimental yang dipilih dalam format sdf,
- c. Klik "Go" lalu pilih Pose View Diagram Interaktif 2D klik Pose View:
- d. Klik pada ligan struktural dan setelah membaca, pilih calculate. Lalu struktur 2D dari ligan yang dipilih,
- e. Disimpan berdasarkan format.png

##### **2. Visualisasi 3D**

- a. Dibuka aplikasi Discovery Studio,
- b. Diklik "Open" pada menu file dan pilih file protein target,
- c. Kemudian klik insert form pada menu file dan pilih files. Dipilih file senyawa uji yang terpilih,
- d. Klik senyawa uji pada menu receptor ligand dan klik Define ligand
- e. Klik Ligand Interaction kemudian akan muncul struktur 3D dari interaksi antara protein target dan senyawa uji terpilih.