

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian secara *in silico* yakni dengan metode *molecular docking* yang memanfaatkan komputasi untuk memprediksi interaksi senyawa dalam selada terhadap reseptor GABA tipe A pada tubuh manusia.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.2.1 Lokasi penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Komputer Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang.

4.2.2 Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus 2024.

4.3 Alat Penelitian

1. Laptop
2. *Software* (PyRx, Avogadro, Biovia Discovery Studio 2021, XTB, Ligplot+)
3. *Database* (KNapSAcK
PubChem
https://www.knapsackfamily.com/knapsack_core,
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, RCSB PDB <https://www.rcsb.org>,
SwissADME <http://www.swissadme.ch>)

4.4 Prosedur Penelitian

Analisis Uji In Silico

1. Identifikasi Senyawa dalam Selada

Tahap ini dilakukan untuk mengetahui senyawa-senyawa yang terkandung didalam selada dengan menggunakan *Database* KNApSAcK (http://www.KNApSAcKfamily.com/KNApSAcK_core/top.php).

Langkah selanjutnya yaitu mencari informasi secara detail yang akan digunakan sebagai ligan yakni senyawa dari selada dengan menggunakan *Database* PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Informasi yang diperlukan antara lain PubChem ID dan *Canonical* SMILES yang digunakan untuk prediksi *druglikeness*.

Prosedur kerja Database KNApSAcK:

- a. Mengidentifikasi senyawa-senyawa yang terkandung pada tanaman selada dengan mengakses (http://www.KNApSAcKfamily.com/KNApSAcK_core/top.php)
- b. Ketik nama ilmiah tanaman obat yaitu *Lactuca sativa* pada kolom search kemudian klik “*List*”
- c. Terdapat senyawa - senyawa yang muncul. Catat pada Microsoft excel

Prosedur kerja Database PubChem:

- a. Buka *Database* PubChem untuk mencari informasi detail senyawa yang akan digunakan sebagai ligan dengan mengakses (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

- b. Masukkan nama senyawa pada kolom pencarian kemudian klik *Enter*.
Pilih senyawa yang sesuai kemudian akan muncul informasi lengkap mengenai senyawa
- c. Salin *Canonical SMILES* yang nantinya akan digunakan sebagai prediksi *druglikeness*
- d. Pada bagian konformasi 3D, *download* dengan format SDF dan *file* di simpan pada tempat yang dikehendaki.

2. Identifikasi Reseptor

Penelitian ini menggunakan target berupa reseptor GABA tipe A (PDB ID : 6X3X) dengan *Database* yang digunakan adalah RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>) maka didapatkan struktur 3D reseptor.

Prosedur kerja Database RCSB PDB:

- a. Buka *Database* RCSB PDB untuk mencari struktur 3D protein yang akan digunakan sebagai reseptor (<https://www.rcsb.org/>)
- b. Tuliskan kode makromolekul sesuai literatur jurnal (PDB ID : 6X3X) pada kotak pencarian kemudian klik tombol "*search*"
- c. Klik "*Download Files*" pada pojok kanan atas, lalu pilih PDB, kemudian *save file*

3. Analisis Potensi Obat

Analisis potensi obat ini menggunakan *Website* Swiss ADME (<http://www.swissadme.ch/>). *Website* ini dapat menganalisis potensi kemampuan

dari senyawa untuk digunakan sebagai obat. Parameter *druglikeness* yang digunakan adalah parameter Lipinski yang mana sesuai dengan ketentuan berat molekul (≤ 500), koefisien partisi atau $m\log P$ ($\leq 4,15$), Jumlah akseptor ikatan hidrogen (≤ 10), jumlah donor ikatan hidrogen (≤ 5).

Prosedur Kerja SwissADME:

- a. Mencari bioavailabilitas oral senyawa metabolit sekunder dari tanaman dengan mengakses (<http://swissadme.ch/>);
- b. *Canonical SMILES* pada *notepad* disalin pada kotak *input SMILES* pada SwissADME;
- c. Jika sudah, maka klik tombol “*Run!*”;
- d. Langkah selanjutnya adalah prediksi *druglikeness*. Yaitu dengan mengamati nilai *molecular weight*, $m\text{LOGP}$, Asam hidrogen, Donor hidrogen, dan *violation* pada tiap senyawa yang telah dimasukkan *canonical SMILES*-nya pada swissADME. Parameter Lipinski menyatakan bahwa suatu senyawa tidak dikatakan *druglikeness* jika *violation* dari senyawa lebih dari satu. Kandidat obat sebaiknya tidak melanggar lebih dari satu kriteria dalam aturan tersebut.
- e. Kemudian klik tombol “*show BOILED-Egg*”, maka akan muncul gambar berupa telur dengan titik-titik.
- f. Untuk menyimpulkan profil farmakokinetika dilihat berdasarkan hasil *Boiled-Egg* dan data *Druglikeness* yang memiliki bioavailabilitas yang baik. *Boiled-Egg* memiliki dua lingkaran yaitu warna kuning dan juga warna putih, lingkaran warna kuning menunjukkan BBB: *Blood Brain Barrier* (Pembuluh Darah Mikro di dalam sistem saraf pusat) dan

lingkaran warna putih menunjukkan HIA: *Passive Gastrointestinal Absorption* (Absorpsi Pasif *Gastrointestinal*). Atau dapat dilihat dengan mengunduh pada bagian *retrieve data* dan unduh dalam bentuk excel. Dan dilihat senyawa dengan keterangan BBB *permeant* “High” dan *GI Absorption* “Yes”

- g. Senyawa metabolit sekunder dari selada yang masuk dalam *Boiled-Egg* diprediksi memiliki bioavailabilitas yang baik.

4. Preparasi Ligan

Prosedur Kerja XTB dan Avogadro Software

- a. Masukkan file .sdf yang sudah disiapkan pada Avogadro
- b. Ekspor dalam format .xyz
- c. Buka lokasi *software* xtb yang sudah diunduh
- d. Buka *command prompt*
- e. Ketikkan “*xtb* “*nama senyawa.xyz*” --ohess > “*nama senyawa.out*””
- f. Tekan *enter* dan tunggu beberapa saat hingga selesai
- g. Cek lokasi *software* dan cari file “*xtbopt.xyz*” sebagai senyawa hasil minimasi
- h. Lakukan *rename* file hasil tersebut sesuai nama senyawa
- i. Buka file .xyz pada avogadro dan ekspor dalam format .pdb

5. Pemisahan Ligan Dengan Protein GABA Tipe A

A. Pemilihan Ligan

1. Membuka *file* PDB yang telah diunduh menggunakan Discovery Studio (tampak gambar 3D).

2. Pada menu *View*, klik “*Hierarchy*” dan memilih unsur-unsur ligan yang tersedia.
3. Klik “*Save As*” untuk menyimpan ligan dengan memberi nama “LIGAN”.

B. Pemilihan Protein Target

1. Membuka *file* PDB yang telah diunduh menggunakan Discovery Studio (tampak gambar 3D).
2. Pada menu *View*, klik “*Hierarchy*” dan memilih unsur-unsur makromolekul yang tersedia.
3. Klik “*Save As*” untuk menyimpan ligan dengan memberi nama “PROTEIN” dengan format *.pdb, dan kemudian tekan “*save*”

6. Preparasi Ligan dan Target Reseptor

1. Membuka aplikasi Autodock PyRx.
2. Pada menu Edit, klik “*Preferences*”.
3. Pada bagian kotak dialog *Preferences*, ubah bagian “*Workspace*” dengan menekan tombol *Browse*. Pilih *file* lokasi penyimpanan hasil *molecular docking*.
4. Pada lembar kerja *Molecules*, klik kanan dan klik “*Load Molecule*”, pilih *file* “Protein” yang telah disimpan pada saat tahap pemisahan.
5. Klik kanan pada Protein yang muncul yang telah dibuka pada lembar kerja, klik Autodock dan pilih “*Make Macromolecules*”.
6. Secara otomatis akan tersimpan dalam format *.pdbqt. Dengan demikian preparasi protein target selesai.
7. Kemudian pada lembar kerja *Molecules*, klik kanan dan klik *Load Molecule* pilih *file* “Ligan” yang telah disimpan pada saat pemisahan.

8. Klik kanan pada Ligan yang muncul yang telah dibuka pada lembar kerja, klik Autodock dan pilih “*Make Ligand*”
9. Secara otomatis akan tersimpan dalam format *.pdbqt. Dengan demikian preparasi ligan selesai.

7. Validasi Metode Docking

Langkah awal penelitian ini dilakukan melalui validasi metode pada *molecular docking* diazepam dengan protein target yang sebelumnya telah melalui proses preparasi menggunakan Autodock, dengan tujuan untuk penambatan ulang ligan standar yang telah dipisahkan dengan protein GABA tipe A atau yang biasa disebut dengan *re-docking*. Metode ini dikatakan valid dan memenuhi syarat apabila didapatkan nilai RMSD $< 2\text{Å}$ (Dermawan, Sumirtanurdin dan Dewantisari, 2019). Berikut adalah langkah-langkah validasi metode *docking*:

1. Membuka aplikasi PyRx (Autodock) dan klik *Autodock Wizard*.
2. Klik “*Select Molecule*”, kemudian klik Ligan dan Protein yang telah memiliki format *.pdbqt.
3. Memastikan bahwa pada Autodock Panel telah tercantum Ligan dan Protein (*Ligan Selected* dan *Macromolecule Selected*).
4. Tekan *forward* yang terletak pada bagian pojok kanan bawah.
5. Pada kotak hasil 3D *scene* akan tampak *grid box*.
6. Mengatur *grid box* supaya terletak ditengah ligan dan samakan besarnya angka pada “*number of point in xyz-dimension*”. Dengan nilai X,Y,Z masing-masing 50.
7. Tekan Run *AutoGrid* tunggu hingga proses *molecular docking* selesai.

8. Setelah selesai proses *molecular docking* tekan *Run* Autodock untuk mendapatkan hasil *molecular docking*.

Dilakukan *setting* pada Lamarckian GA dipindah ke *Genetic Algorithm* (GA) dengan *Number of GA Run* diubah menjadi 100 dan *Medium Number of Energy Evaluations* diubah menjadi Medium.

9. Kemudian melihat nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) dengan cara memilih ikon “*structure*” dan pilih *RMSD All atoms*. Validasi metode *molecular docking* dikatakan valid atau memenuhi syarat apabila nilai RMSD yang merupakan nilai deviasi perbandingan antara konformasi ligan-reseptor pada proses *molecular docking* yaitu memperoleh nilai kurang dari 2Å (Dermawan, Sumirtanurdin dan Dewantisari, 2019).

8. Molecular Docking Senyawa Uji

Tahap selanjutnya yang dilakukan setelah validasi metode *molecular docking* adalah melakukan *molecular docking* pada senyawa uji yaitu senyawa selada dan reseptor target. Parameter *molecular docking* yaitu parameter *Genetic Algorithm 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 dipreparasi dengan Avogadro.
2. Masing-masing senyawa uji dilakukan klik kanan, kemudian klik AutoDock dan pilih *Make Ligand*.
3. Secara otomatis akan tersimpan dalam format *pdbqt*. Preparasi senyawa uji selesai.

4. Pada lembar kerja AutoDock pilih *AutoDock Wizard* dan klik “*Select Molecules*”. Kemudian pilih *file* senyawa uji dan protein target yang akan dilakukan *docking*. Setelah terpilih klik “*Forward*” yang terletak pada bagian pojok kanan bawah.
5. Pada proses *molecular docking* selanjutnya cukup klik “*Forward*” lagi yang terletak pada bagian pojok kanan bawah, karena *AutoGrid* telah diatur pada proses validasi *molecular docking* .
6. Melakukan pengaturan parameter *docking* dengan cara klik “*Genetic Algorithm*” dan klik “*Molecular 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*” yang terletak pada bagian pojok kiri bawah.
7. Tunggu hingga proses running selesai, apabila telah selesai maka akan memperoleh hasil *molecular docking* dalam bentuk *file* dengan format *.dlg.

9. Analisis Hasil Docking

Selanjutnya melakukan analisis hasil *molecular docking* pada senyawa selada dan reseptor target dengan menggunakan aplikasi Autodock PyRx seri 0.8 berikut adalah langkah-langkah yang dilakukan :

1. Pilih *file* hasil *molecular docking* senyawa uji dengan format *.dlg, pada lembar kerja Autodock.

2. Klik “Autodock Wizard” dan klik “Analyze result”. Kemudian klik “insert new items” dan pilih file hasil docking senyawa uji dengan format *.dlg yang tersimpan pada folder penyimpanan hasil *molecular docking* .
3. Melakukan analisis data *clustering* melalui data yang diperoleh dari file docking parameter .dlg yang ditampilkan pada lembar kerja Autodock.
4. Data yang digunakan adalah data dengan jumlah *cluster* terbanyak atau tertinggi, serta memiliki energi yang 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 yang ditandai dengan tanda pagar atau *hashtag* paling banyak.
5. Simpan data yang digunakan dengan bentuk format *.sdf.



10. Visualisasi Hasil Docking

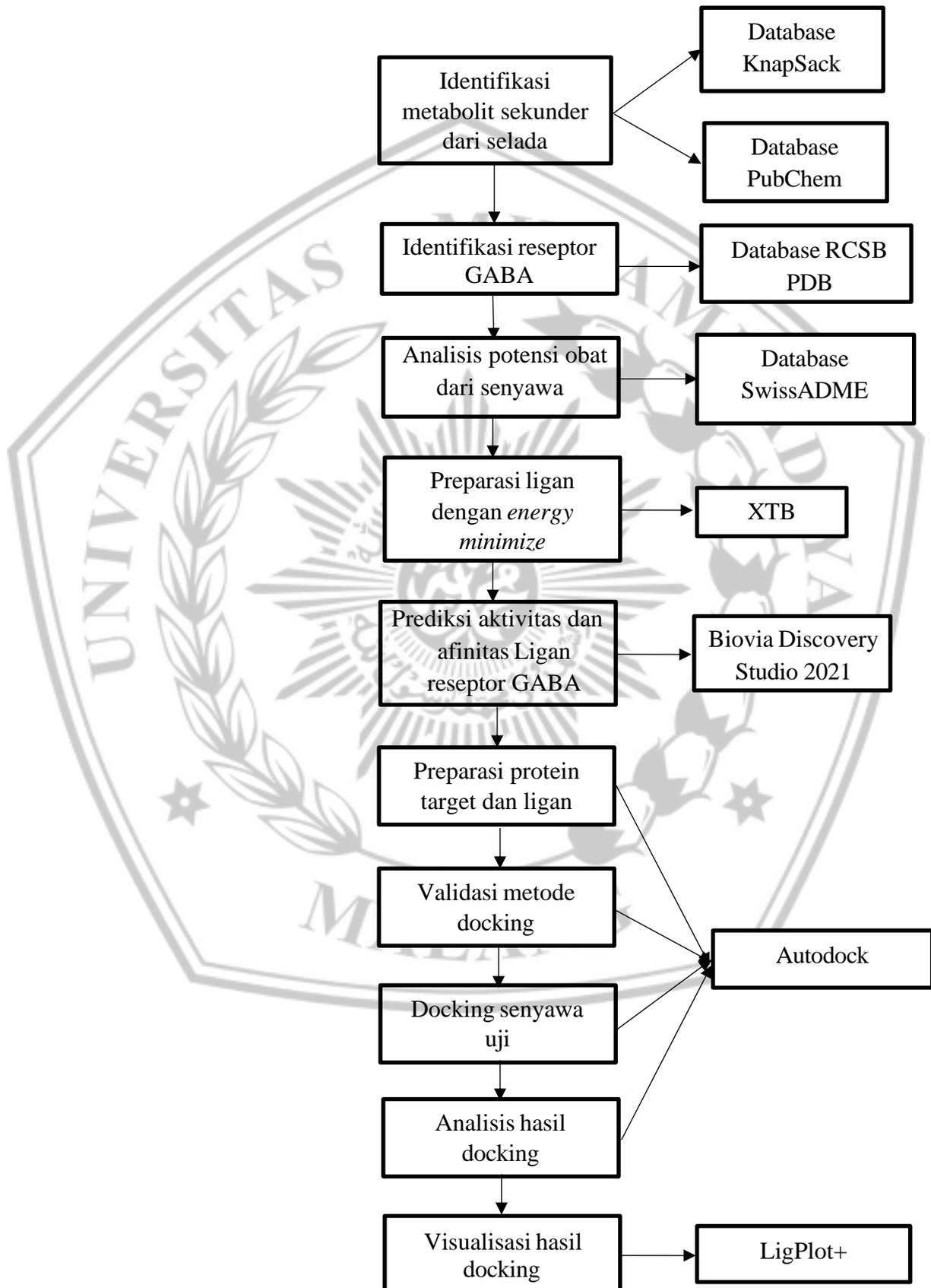
Melakukan visualisasi hasil *molecular docking* dengan menggunakan LigPlot+ yang bertujuan untuk melihat interaksi antara ligan uji dengan protein target dalam bentuk 2D. Berikut adalah langkah-langkah yang dilakukan :

1. Membuka *LigPlot+*.
2. Memasukkan kompleks ligan protein dalam bentuk format *.pdb.
3. Memilih nama ligan yang muncul pada menu
4. Klik “*Run*”
5. Setelah selesai, klik menu “*Print Screen*”
6. Pilih *printer* dan Lokasi ekspor hasil *docking* dalam format .pdf



4.5 Prosedur Kerja

Uji *In Silico*



4.6 Analisis Data

Proses analisis data *in silico* dilakukan dengan meninjau hasil dari *binding energy*, semakin kecil *binding energy* maka ikatan reseptor dengan ligan akan semakin stabil sehingga ikatan yang terbentuk akan semakin kuat. Selanjutnya melalui interaksi ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik, apabila senyawa memiliki interaksi ikatan hidrogen dan hidrofobik pada *binding sites* dari reseptor dengan residu asam amino yang sama dari hasil interaksi antara ligan pembanding yaitu alprazolam dengan GABA tipe A maka dapat disimpulkan bahwa senyawa tersebut memiliki aktivitas biologis yang sama. Kemudian perhatikan residu asam amino, apabila berikatan dengan suatu molekul maka akan menyebabkan kemampuan reseptor teraktivasi sehingga dalam hal ini GABA tipe A menjadi aktif dan efek sedasi dapat terjadi.

