

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian Eksperimental

Pada penelitian ini penulis akan melakukan penelitian secara in-silico.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penulis akan melakukan penelitian ini selama enam bulan di Laboratorium Kimia Terpadu II Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Malang.

4.3 Alat dan Bahan Penelitian

4.3.1 Alat Penelitian

4.3.1.1 Perangkat Keras

Penulis pada penelitian ini menggunakan perangkat keras berupa Asus Laptop dengan processor Intel Core i3-5005U CPU @ 2.00GHz; operating system Windows 10 Pro 64bit; memory 4.00GB RAM.

4.3.1.2 Perangkat Lunak

Pada penelitian ini penulis menggunakan perangkat lunak berupa :

- a. Autodock PyRx seri 0,8
- b. Biovia Discovery Studio 2020
- c. Avogadro seri 1.2.0

4.3.1.3 Data Base

- a. KNApSAcK (http://www.knapsackfamily.com/knapsack_core/top.php)
- b. Dr.Duke (<https://phytochem.nal.usda.gov/phytochem/search>)
- c. PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)
- d. SwissADME (<http://swissadme.ch/>)
- e. PDB (*Protein Data Bank*) (<https://www.rcsb.org>)
- f. *Proteins.plus* (<https://proteins.plus/>)

4.3.2 Bahan Penelitian

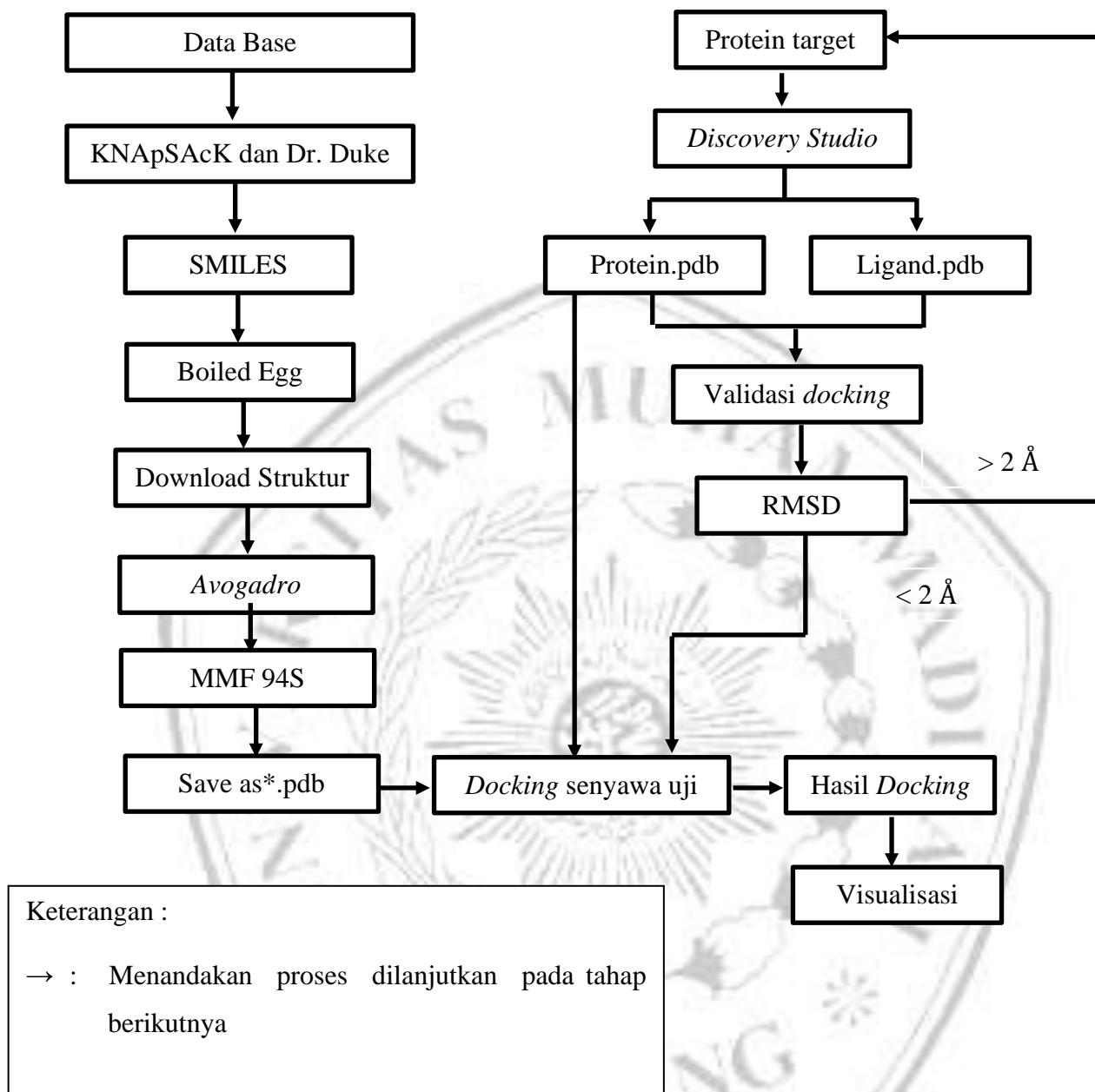
4.3.2.1 Senyawa Metabolit Sekunder Tanaman

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daftar senyawa metabolit sekunder tanaman *P. Indica*

4.3.2.2 Protein Target

Protein target yang digunakan adalah protein target HER-2 *receptor* yang akan dicari pada protein data bank.

4.4 Kerangka Operasional



Gambar 4.1 Kerangka Operasional

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Prediksi Profil Bioavailabilitas

Untuk mendapatkan SMILES untuk setiap bahan kimia, senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman *P. indica* dimasukkan ke dalam website PubChem. Untuk mengumpulkan data bioavailabilitas yang akurat berdasarkan teknik Telur Rebus, SMILES yang diperoleh dimasukkan ke situs web

SwissADME. (Gokhale et al., 2019). Berikut adalah prosedur kerjanya

4.5.1.1 Webserver Dr. Duke

- Mencari metabolit sekunder tanaman pada web <https://phytochem.nal.usda.gov>.
- Ketikkan nama latin tanaman pada kolom pencarian lalu tekan *enter*.
- akan muncul nama-nama metabolit sekunder dari tanaman yang dicari lalu pada bagian pojok kanan klik *excel* untuk mendownload data yang akan berupa format *excel*.

4.5.1.2 Webserver KNAPSAcK

- Mencari metabolit sekunder pada tanaman yang akan diteliti dengan membuka webserver http://www.knapsackfamily.com/KNAPSAcK_Family/
- Pada halaman utama pilih menu "*Core System*".
- Pada kolom pencarian ketikkan nama latin tanaman lalu tekan *enter*
- Akan muncul tabel berisi metabolit sekunder dari tanaman tersebut masukan nama-nama metabolit serta rumus molekul kedalam file *excel*

4.5.1.3 Webserver PubChem

Cari metabolit sekunder pada tanaman yang sedang dipelajari di (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

- Masukkan nama senyawa (misalnya, quercetine) di kolom pencarian dan tekan tombol "Cari".
- Klik nama majemuk saat hasil ditampilkan di kolom pencarian.
- Klik "Unduh" dan simpan file sebagai konformer 2D.
- SDF
- Klik "Canonical SMILES" di bawah "Names and Identifiers" pada pilihan Computed Descriptors pada menu Contents.
- SMILES disalin ke notepad
- Untuk menemukan SMILES untuk setiap bahan kimia, ulangi prosedur sebelumnya. yang ingin dicari.

4.5.1.4 Webserver SwissADME

- Mencari bioavaibilitas oral senyawa metabolit sekunder dari tanaman dengan mengakses (<http://swissadme.ch/>);
- SMILES pada notepad disalin pada kotak input SMILES pada
- Webserver SwissADME;
- Jika sudah, maka klik tombol "Run!"

- e. Kemudian klik tombol “show BOILED-Egg”, maka akan muncul gambar berbentuk telur yang tertutup titik-titik yang mengandung inklusi di dalam telur dan titik ekstra telur
- f. sebagai perbedaan. Ketersediaan hayati oral bahan kimia inklusi sangat baik (penyerapan nilai GI Hight dan Lipinski Ya). Bioavailabilitas oral bahan kimia eksklusi rendah.

4.5.1.5 Protein Data Bank (PDB)

- a. Gunakan (<https://www.rcsb.org>) untuk mencari makromolekul yang mencakup ligan dan protein target untuk obat kelas antikanker;
- b. Masukkan kode makromolekul dari literatur jurnal (misalnya, 3CCW atau 3top) di kotak pencarian dan tekan tombol pencarian;
- c. Periksa kolom protein target pada hasil pencarian makromolekul untuk memastikan cocok dengan senyawa obat.
- d. Pilih format PDB, lalu klik tombol "Unduh" di pojok kanan atas untuk menyimpan file.

4.5.2 Prediksi Interaksi

4.5.2.1 Pemisahan Ligan Dengan Protein Target

1) Pemilihan Ligan Protein Target

- a. *File* PDB yang telah diunduh dibuka dengan *Discovery Studio* (tampak gambar 3D);
- b. Pada menu View, klik “*Hierarchy*” kemudian unsur-unsur ligan yang tersedia dipilih;
- c. Klik “*Save As*” lalu buat folder baru “TEST DOCKING” dengan format *.pdb.

2) Pemilihan Protein Target

- a. *File* PDB yang diunduh dibuka kembali dengan *Discovery Studio* (tampak gambar 3D);
- b. Pada menu View, klik “*Hierarchy*” kemudian unsur-unsur makromolekul yang tersedia dipilih;
- c. Menyimpan ligan dengan cara klik “*Save As*” lalu beri nama “PROTEIN” dengan format *.pdb, tekan “save”.

4.5.2.2 Preparasi Senyawa

Berdasarkan data tentang senyawa dengan bioavailabilitas yang sangat baik yang ditemukan menggunakan teknik Telur Rebus, struktur kimia senyawa tersebut dicari di situs web PubChem. Anda dapat mengunduh struktur kimia dalam

format *.sdf. Rangkaian Avogadro 1.2.0 kemudian digunakan untuk melakukan optimasi geometri pada struktur dengan menggunakan teknik MMFF94S, sehingga data tersimpan dalam format *.pdb. :

- a. File yang telah diunduh pada PubChem dimasukkan ke Avogadro *software*;
- b. saat struktur muncul, pada menu *Extentions*, klik “*Molecular Mechanism*”, lalu pilih “*Setup Force Field*” dan ubah pada kolom *Force Field* menjadi MMFF94S
- c. Kemudian pada menu *Extentions*, klik “*Optimize Geometry*” untuk mengetahui *energy minimize*;
- d. Simpan struktur dalam bentuk *.pdb.

4.5.2.3 Preparasi Protein Target dan Ligan

1) Preparasi Protein Target

- a. Buka program Autodock PyRx;
- b. Pada menu *Edit*, klik “*Preferences*”;
- c. Pada kotak dialog *Preferences*, rubah bagian “*Workspace*” dengan menekan tombol *Browse*. Pilih lokasi penyimpanan hasil docking.
- d. Selanjutnya pada lembar kerja *Molecules*, klik kanan dan klik “*Load Molecule*” → pilih file “**Protein**” yang telah disimpan saat tahap pemisahan (1);
- e. Klik kanan pada Protein yang muncul yang telah dibuka pada lembar kerja, klik *Autodock* dan pilih “*Make Macromolecules*”
- f. Akan secara otomatis tersimpan dalam format *.pdbqt. Preparasi protein target selesai.

2) Preparasi Ligan

- a. Buka perangkat lunak Autodock PyRx;
- b. pilih "Preferensi" pada menu Edit; dan
- c. di kotak dialog Preferensi, pilih ruang kerja yang berbeda dengan mengklik tombol Telusuri. Pilih tempat di mana temuan docking akan disimpan.
- d. Saat itu, pada lembar kerja Molekul, klik kanan, pilih "Muat Molekul", lalu pilih file "Ligan" yang disimpan selama langkah pemisahan (1);
- e. Setelah Ligan dibuka pada lembar kerja, klik kanan, pilih Autodock, lalu pilih "Make Ligand"
- f. Format *.pdbqt akan digunakan untuk menyimpannya secara otomatis.
- g. Ligan telah disiapkan.

4.5.2.4 Mencari Sisi Aktif Protein Target (AutoGrid)

- a. Buka perangkat lunak AutoDock PyRx.
- b. Selanjutnya, pada lembar kerja dAutoDock, pilih AutoDock Wizard dan klik Select Molecules. Pilih protein dan ligan yang sudah dalam kondisi baik
- c. * pdbqt. Klik Maju di pojok kanan bawah setelah menentukan pilihan Anda.
- d. Kotak Gridbox akan muncul di dalam kotak adegan 3D yang dihasilkan. Atur Gridbox sedemikian rupa sehingga berada di tengah ligan. Jadikan angka dalam "jumlah titik dalam dimensi xyz" sama ukurannya. Di pojok kiri bawah, klik Jalankan AutoGrid.

4.5.2.5 Validasi Metode Docking

File pdb protein target dibuka di Discovery Studio, protein dan ligannya dipisahkan, lalu protein dan ligan target disimpan dalam format *protein.pdb dan *ligand.pdb. Kedua file tersebut dibuka di program Pyrx seri 0.8, kemudian dilakukan *molecular docking*. Data yang dilihat adalah nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD), dimana suatu metode *docking* diterima jika nilai RMSD $< 2 \text{ \AA}$ (Megantara, 2014). Root Mean Square Deviation digunakan untuk mengelompokkan hasil *docking*, toleransi $1,0 \text{ \AA}$ (Prasetyawati et al., 2019). Metode *Molecular Docking* divalidasi dengan melakukan *Re-Docking* ligan kristal sebagai *docking control* terhadap HER-2.

4.5.2.6 Docking Senyawa Uji

File gabungan yang disimpan dalam format *.pdb diimpor ke program Pyrx series 0.8 dengan cara yang sama seperti AutoGrids dibuat, dan dipasangkan dengan parameter GA run = 100, jumlah evaluasi maksimum = 500.000, ukuran posisi = 150, dan pembangkitan maksimum = 27.000 seperti pada proses pembuatan AutoGrid. Berdasarkan nilai RMSD mereka, temuan analisis docking diatur.

- a. Klik kanan lembar kerja Molekul dan pilih "Muat Molekul"; lalu, pilih file gabungan pengujian yang disimpan selama proses penyiapan.
- b. Pilih Buat Ligan dari menu AutoDock dengan mengklik kanan setiap senyawa uji.
- c. File *pdbqt akan disimpan secara otomatis. Bahan kimia uji telah disiapkan sepenuhnya.
- d. Pilih AutoDock Wizard, lalu klik Select Molecules pada lembar kerja

AutoDock. Pilih protein target yang akan ditambahkan dan file senyawa uji. Klik Maju di pojok kanan bawah setelah menentukan pilihan Anda.

- e. Karena AutoGrid telah dikonfigurasi dalam proses AutoGrid, cukup klik Forward sekali lagi di pojok kanan bawah proses docking.
- f. Sesuaikan parameter dok. Klik Parameter Docking, lalu klik Algoritma Genetika. Lalu, Maximum Number Of Energy Evaluations diset medium dan jumlah GA-runs diset 100. Lalu, di pojok kiri bawah, pilih Lamarckian GA, lalu klik Run Autodock.
- g. Program Notepad++ dapat digunakan untuk melacak prosedur docking.

4.5.2.7 Analisis Hasil Docking

Interaksi antara protein target dan bahan kimia metabolit dapat divisualisasikan ketika data docking diperiksa di visualizer studio Discovery. Hasil yang diperoleh diurutkan berdasarkan energy bebas yang paling mengikat cluster. Untuk studi ini, lima senyawa teratas dipilih dengan berdasarkan pada energy bebasnya mengikat dan diikuti pemilihan dua senyawa dengan interaksi yang paling bayak disukai (Nurwarda, 2020). Prosedur yang dilakukan:

- a. Buka perangkat lunak *Autodok PyRx seri 0.8*, pada lembar kerja AutoDock, pilih file hasil docking senyawa uji dalam format *.dlg.
- b. Pilih Analisis hasil dari menu Autodock Wizard. Pilih file *.dlg dari hasil docking senyawa uji yang disimpan di folder penyimpanan hasil docking dengan mengklik insert new item.
- c. Data dari parameter docking dapat digunakan untuk menilai data pengelompokan. File dlg terlihat di Notepad ++.
- d. Data dengan jumlah cluster terbesar atau terbesarnya dan energi terendah adalah yang dimanfaatkan. Jika data dengan cluster terbanyak memiliki energi lebih banyak daripada data dengan cluster paling sedikit, maka data dengan cluster terbanyaklah yang digunakan. Konformasi ligan dengan energi bebas ikatan terendah (ΔG), dipilih dari klaster yang paling disukai (Muchtari et al., 2017).
- e. Simpan data yang digunakan dalam format *.sdf.

4.5.2.8 Visualisasi Hasil Docking

1. Visualisasi 2D

- a. Buka webserver Proteins.plus
- b. Masukkan protein target dengan format *.pdb dan file senyawa uji terpilih dengan

format *.sdf.

- c. Kemudian klik “Go”. Pilih *Pose View 2D Interaction Diagrams*, klik *Pose View*.
- d. Klik structure *ligand* setelah terbaca klik *calculate*, tunggu structure 2D dari ligand yang dipilih.
- e. Kemudian save dengan format *.png.

2. Visualisasi 3D

- a. Buka aplikasi Discovery Studio
- b. Pada menu file klik “Open” dan pilih file protein target .
- c. Kemudian pada menu file klik insert from dan pilih files. Pilih file senyawa uji terpilih.
- d. Pada menu receptor ligand interaction klik senyawa uji dan klik *Define Ligand*.
- e. Klik *Ligand Interactions*. Maka akan muncul structure 3D dari interaksi antara protein target dan senyawa uji terpilih.

