

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Metode Penelitian Eksperimental

Penelitian ini dilakukan oleh penulis dengan metode *in silico* pada penelitian ini. *In silico* adalah metode riset yang menggunakan teknik komputasi dan software tertentu untuk memprediksi aktivitas senyawa (Beny et al., 2020).

4.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penulis melaksanakan penelitian di Prodi Studi Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Malang selama tiga bulan dari bulan september sampai november menggunakan komputasi.

4.3. Kriteria Inklusi Penelitian

a. Target Protein yang digunakan

Protein target harus memenuhi kriteria inklusi tertentu agar dapat dimasukkan yaitu harus ditemukan dalam jurnal penelitian, termasuk dalam kelompok *Homo sapiens* (kriteria senyawa yang digunakan).

b. Senyawa yang digunakan

Senyawa yang diinginkan memiliki struktur senyawa metabolit sekunder yang terdaftar dan dapat ditemukan di server web *PubChem* agar bisa memenuhi kriteria inklusi senyawa.

4.4. Alat dan Bahan Penelitian

4.4.1. Alat Penelitian

4.4.1.1. Komponen Keras

Penelitian ini menggunakan komponen keras, komponen keras yang digunakan berupa IdeaPad 3 14ADA05 dengan processor AMD Athlon Silver 3050U with Radeon Graphics 2.30 GHz, System Operasi menggunakan Windows 10 64-bit, dengan memori ram 4,00 GB RAM.

4.4.1.2. Komponen Lunak

Perangkat Lunak pada penelitian ini menggunakan:

- a. *Autodock PyRx* seri 08
- b. *Biovia Discovery Studio* 2020
- c. *Avogadro* seri 1.2.0
- d. *xTB*

4.4.1.3. Data Base

- a. *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)
- b. PDB (Protein Data Base) (<http://www.rcsb.org>)
- c. *Proteins.plus* (<https://proteins.plus>)

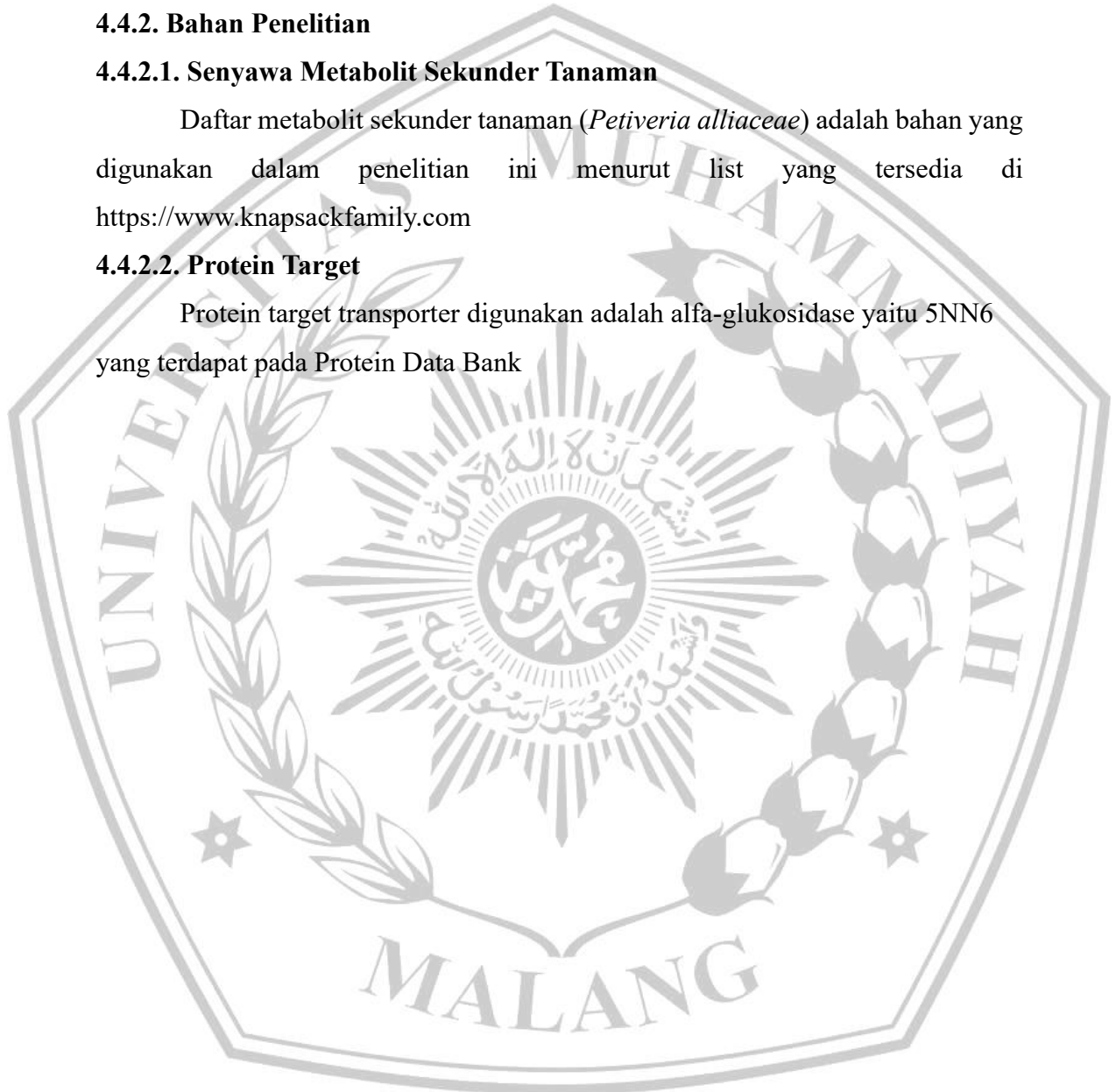
4.4.2. Bahan Penelitian

4.4.2.1. Senyawa Metabolit Sekunder Tanaman

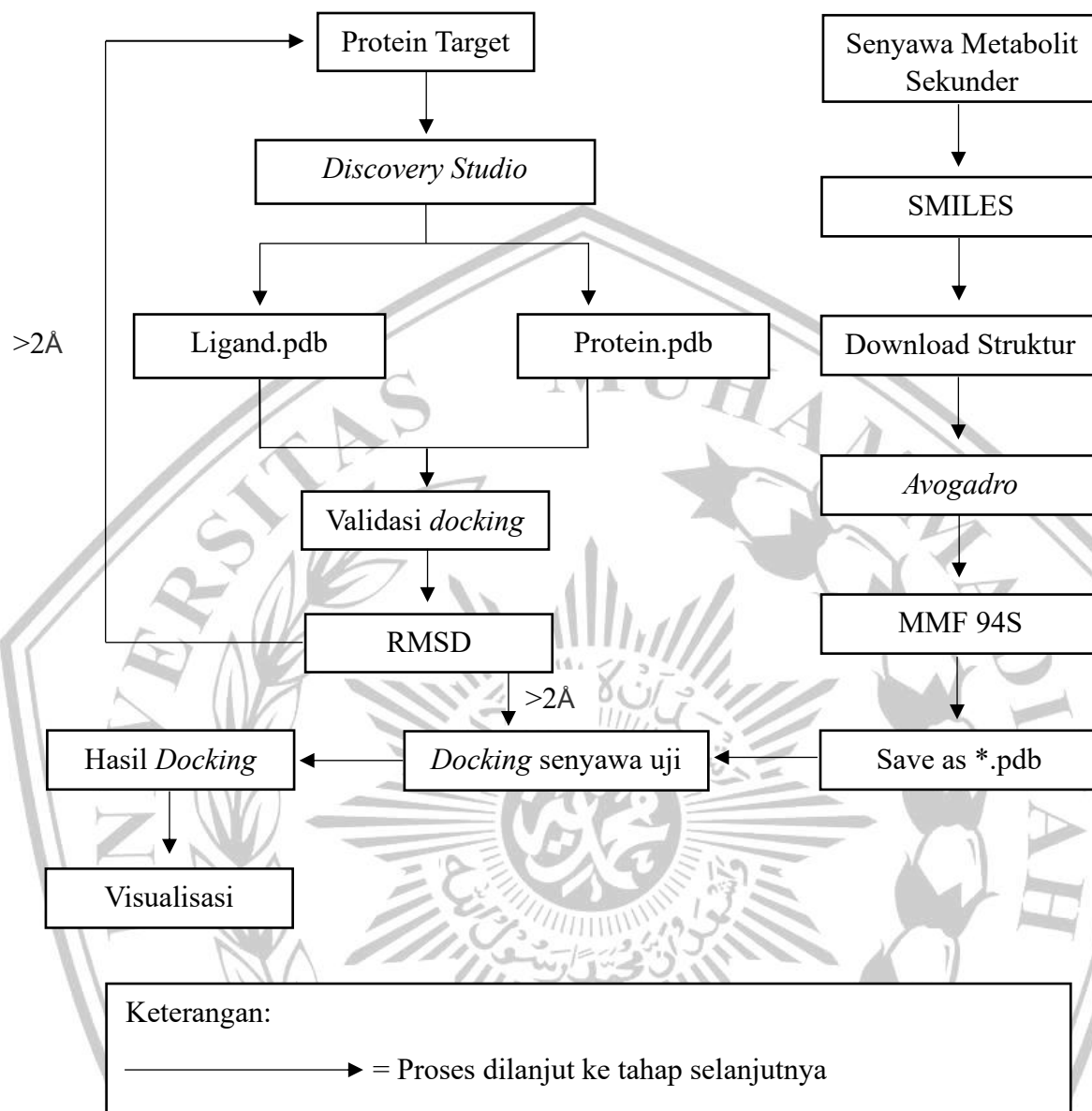
Daftar metabolit sekunder tanaman (*Petiveria alliaceae*) adalah bahan yang digunakan dalam penelitian ini menurut list yang tersedia di <https://www.knapsackfamily.com>

4.4.2.2. Protein Target

Protein target transporter digunakan adalah alfa-glukosidase yaitu 5NN6 yang terdapat pada Protein Data Bank



4.5. Kerangka Operasional



Gambar 4. 1 Kerangka Operasional

4.6. Prosedur Penelitian

4.6.1. Prediksi Interaksi

Untuk memulai penentuan SMILES tiap senyawa, senyawa metabolit sekunder yang ditemukan dalam sediaan *P. alliaceae* harus dimasukkan ke dalam web server *PubChem*.

4.6.1.1. RSCB PDB

Nama protein yang diuji dapat dicari melalui <https://www.rcsb.org/>

- a. Di kotak pencarian, ketik nama protein (Alfa-glukosidase)
- b. Di bagian kiri terdapat kolom “Refinements” “pilih homo sapiens”
- c. Pilih struktur dengan lipid paling baik
- d. Klik “Download file” kemudian pilih bentuk file “PDB Format”

4.6.1.1. Webservice Pubchem

Senyawa metabolit sekunder dari tanaman yang diuji dapat dicari melalui <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

- a. Di kotak pencarian, ketik nama senyawa (*petiveria*)
- b. Klik nama senyawa saat hasil pencarian muncul di kolom pencarian
- c. Pilih “Download” lalu save dalam bentuk 2D conformer
- d. Download file dalam bentuk SDF
- e. Pilih “Names and identifiers” dari deskripsi yang terkomputasi pilih “Canonical SMILES”
- f. Salin SMILES ke dalam notepad
- g. Ulangi proses tersebut untuk setiap senyawa yang ingin dicari.

4.6.1.2. Pemisahan Ligan dengan Protein Target

1. Pemisahan Ligan dengan Protein Target

- a. File PDB yang diunduh dapat dicek oleh *Discovery Studio* (akan terlihat tampilan 3D)
- b. Diklik “Hierarchy” pada menu view, pilih unsur ligan yang tersedia
- c. Pilih “Save as” dan buat folder baru “TEST DOCKING” dengan format *.pdb

2. Pemisahan Protein Target

- a. File PDB yang diunduh dapat dicek lagi oleh *Discovery Studio* (nantinya akan terlihat tampilan 3D)

- b. Diklik “Hierarchy” pada menu view, selanjutnya komponen makromolekul yang ditampilkan dipilih
- c. Ligan disimpan dengan cara klik “Save As” lalu beri nama “PROTEIN” berdasarkan bentuk format *.pdb, tekan “save”

4.6.1.3. Preparasi Senyawa

Dicari struktur kimia senyawa berdasarkan bioavailabilitas oleh webservice *PubChem*. Struktur kimia ini dapat diunduh dengan format *.sdf. Kemudian struktur itu diinput ke dalam *Avogadro* seri 1.2.0 agar mengimplementasikan optimasi geometri dan formatnya diubah menjadi *.xyz dan hasilnya disimpan dalam folder nama XYZ. Metode yang digunakan:

- a. Program *Avogadro* digunakan untuk menggabungkan file *PubChem* yang diunduh
- b. Ketika struktur terlihat, *save as* file dengan format *.xyz
- c. Kemudian dijalankan program *XTB* untuk proses optimasi
- d. Setelah proses optimasi *XTB* selesai, buka data file *XTB* pada penyimpanan, *copy* file g98.out dan xtbpt.xyz pada penyimpanan baru dan *rename* dengan nama “Mol-1” hingga seterusnya
- e. Setelah semua senyawa selesai teroptimasi dengan *XTB*, buka pada *Avogadro* untuk diganti format menjadi *.pdb
- f. Simpan struktur dalam bentuk *.pdb
- g. Saat struktur muncul, klik “*Molecular Mechanism*” pada menu Extentions setelah itu pilih “*Setup Force Field*” dan ubah pada kolom *Force Field* menjadi MMFF94S
- h. Setelah itu klik “*Optimize Geometry*” untuk mengetahui cara energy minimize, lihat pada menu Extentions
- i. Struktur disimpan dalam bentuk *.pdb

4.6.1.4. Preparasi Protein Target dan Ligan

1. Preparasi Protein Target

- a. Jalankan perangkat lunak *Autodock PyRx*
- b. Diklik “Preferences” pada menu Edit
- c. Ditampilkan box dialog Preferences, diubah bagian “Workspace” pilih tempat penyimpanan hasil *docking* dengan menekan tombol Browse

- d. Kemudian di lembar kerja *Molecules*, klik kanan dan pilih “*Load Molecule*”
→ pilih file “Protein” yang tersimpan selama tahap pemisahan
- e. Pada lembar kerja, klik kanan di protein yang terlihat, klik *Autodock* kemudian gunakan “*Make Macromolecules*”
- f. Kemudian akan tersimpan dengan format **pdbqt* secara otomatis
- g. Proses pembuatan Target Protein berhasil

2. Preparasi Ligan

- a. Cek perangkat lunak *Autodock PyRx*
- b. Dimenu Edit, klik “Preferences”
- c. Dibox dialog Preferences, diubah pada “Workspace” dengan memilih tombol Browse cek tempat untuk menyimpan hasil *docking*
- d. Kemudian klik kanan pada lembar kerja *Molecules* dan klik “Load Molecule” → pilih file “Ligand pada saat disimpan selama tahap pemisahan”
- e. Pada lembar kerja, klik kanan pada ligand yang terlihat, klik *Autodock* dan klik “Make Ligand”
- f. Kemudian pasti tersimpan otomatis dengan format **pdbqt*
- g. Preparasi Ligand telah berhasil

4.6.1.5. Mencari Sisi Aktif dari Protein Target (AutoGrid)

- a. Buka perangkat lunak *Autodock PyRx*
- b. Pada lembar kerja *Autodock* pilih *Autodock Wizard* klik select *Molecules*. Pilih ligand dan protein yang telah berbentuk **pdbqt*
- c. Setelah anda memilih opsi, klik tombol “Forward” yang terletak dipojok kanan bawah
- d. Kotak Gridbox akan terlihat di box hasil skenario 3D. Gridbox harus diatur agar selalu ditengah ligand. Disamakan nominal pada “number of points in xyz-dimension”
- e. Klik Run AutoGrid pada pojok bagian kiri bawah

4.6.1.6. Validasi Metode *Docking*

Discovery studio membuka file *pdb* protein target, lalu dibagi antara protein dan ligannya, kemudian save dalam format **protein.pdb* (protein target) dan **ligan.pdb* (ligan). Kedua file tersebut dibuka di program *Pyrx* seri 0.8, kemudian

dilakukan *molecular docking*. Data yang dilihat adalah nilai Root Mean Square Deviation (RMSD), suatu metode *docking* dapat diakui bila nilai RMSD < 2 Å. Root Mean Square Deviation digunakan untuk mengelompokkan hasil *docking*, toleransi 1,0 Å. Validasi metode *Molecular Docking* dilakukan oleh Re-*docking* ligan kristalografi agar menjadi kontrol *docking* DNA Gyrase.

4.6.1.7. *Docking* Senyawa Uji

File kompleks akan tersimpan dalam format *.pdb diimpor ke program Pyrx seri 0.8 sama dengan pembuatan AutoGrid, setelah itu penggabungan dikerjakan berdasarkan parameter run GA = 100, jumlah evaluasi maksimum = 500.000, ukuran posisi = 150, dan generasi maksimal = 27.000. Hasil analisa *docking* diperiksa dan didapatkan hasil RMSD-nya

- a. Pada lembar kerja Molekul, klik kanan dan klik “Muat Molekul” → pilih file campuran uji yang tersimpan saat tahap persiapan
- b. Klik kanan setiap senyawa uji, klik *Autodock*, dan pilih Buat Ligand
- c. Secara otomatis akan disimpan dengan format *.pdbqt. Persiapan senyawa uji berhasil
- d. Pilih *Autodock* Wizard di lembar kerja *Autodock* dan klik Select Molecules pilih Protein Target untuk dipasang ke file senyawa uji. Setelah anda menentukan pilihan, klik berikutnya di sudut kanan bawah
- e. Karena AutoGrid telah tersetting dalam proses AutoGrid selama *docking*, setelah itu klik Next terakhir yang terletak di pojok kanan bawah
- f. Atur *Docking Parameter*. Klik Algoritma Genetika > Parameter *Docking*. Selanjutnya, tetapkan jumlah pengoperasian GA-runs menjadi 100 dan jumlah *Maksimum Number Of Energy Evaluations* menghasilkan menjadi sedang. Selanjutnya, klik *Lamarckian* GA kemudian klik *Run Autodock* di kiri bawah
- g. Kita dapat memantau prosedur *docking* berdasarkan mengaplikasikan Notepad++

4.6.1.8. Analisis Hasil *Docking*

Untuk menunjukkan hubungan dengan protein target dan bahan metabolit, hasil *docking* diperiksa lagi pada Visualizer *Discovery Studio*. Hasil diurutkan berdasarkan energy bebas yang paling mengikat dari kelompok. Untuk penelitian

ini, lima senyawa terbaik dipilih berdasarkan energy bebasnya mengikat. Dua senyawa yang memiliki interaksi yang paling diinginkan (Saddique et al., 2022).

Langkah-langkah yang dilaksanakan:

- a. Cek perangkat lunak *Autodock* PyRx seri 0.8 pada lembar kerja *Autodock*, pilih file akhir *docking* senyawa uji dengan format *.dlg
- b. Klik *Autodock* Assistant, lalu klik Analisis Hasil. Klik Insert New Items, pilih file *.dlg berdasarkan pengujian *docking* yang disimpan pada folder berdasarkan hasil *docking* Notepad++
- c. Data yang digunakan adalah yang memiliki jumlah cluster paling besar atau terbesar dan memiliki energi paling rendah. Jika jumlah cluster terbanyak memiliki energi lebih tinggi daripada jumlah cluster lebih sedikit, maka kumpulan cluster terbanyak digunakan. Konfirmasi ligan oleh energi bebas ikatan terendah (ΔG) menggunakan kluster yang paling populer (Dermawan et al., 2019)
- d. Data disimpan dalam format *.sdf

4.6.1.9. Visualisasi Hasil *Docking*

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 structural 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 Defind Ligand
- e. Klik Ligand Interactions kemudian akan muncul structure 3D dari interaksi antara protein target dan senyawa uji terpilih