

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian Eksperimental

Penelitian ini dilakukan oleh penulis secara *In silico* sebagai metode untuk mengupayakan pendekatan kondisi nyata ke dalam simulasi berbasis komputer menggunakan program aplikasi atau software tertentu (Achyar et al., 2021).

4.2 Tempat dan Waktu 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

4.3.1 Kriteria Inklusi

a) Kriteria Protein Target yang Dipakai

Kriteria inklusi untuk protein target yang digunakan mencakup protein yang disebutkan dalam publikasi penelitian yang terdaftar di PDB, yaitu SGLT2, yang berasal dari kelompok Homo sapiens.

b) Kriteria Senyawa yang Dipakai

Senyawa metabolit sekunder dari *P. alliacea* yang memiliki struktur kimia yang dapat ditemukan di situs webserver PubChem memiliki kriteria inklusi untuk senyawa yang digunakan.

4.4 Alat dan Bahan Penelitian

4.4.1 Alat Penelitian

a) Perangkat Keras

Dalam penelitiannya, penulis menggunakan perangkat keras. berupa Asus PC dengan processor Intel Core i5 -10300H; operation system Windows 11 Pro 64-bit; memory 8.00 GB RAM

b) Perangkat Lunak

Pada penelitian ini penulis menggunakan perangkat lunak berupa:

- Autodock PyRx seri 08
- Biovia Discovery Studio 2020
- Avogadro seri 1.2.0

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

4.4.2 Bahan Penelitian

a) Senyawa Metabolit Sekunder

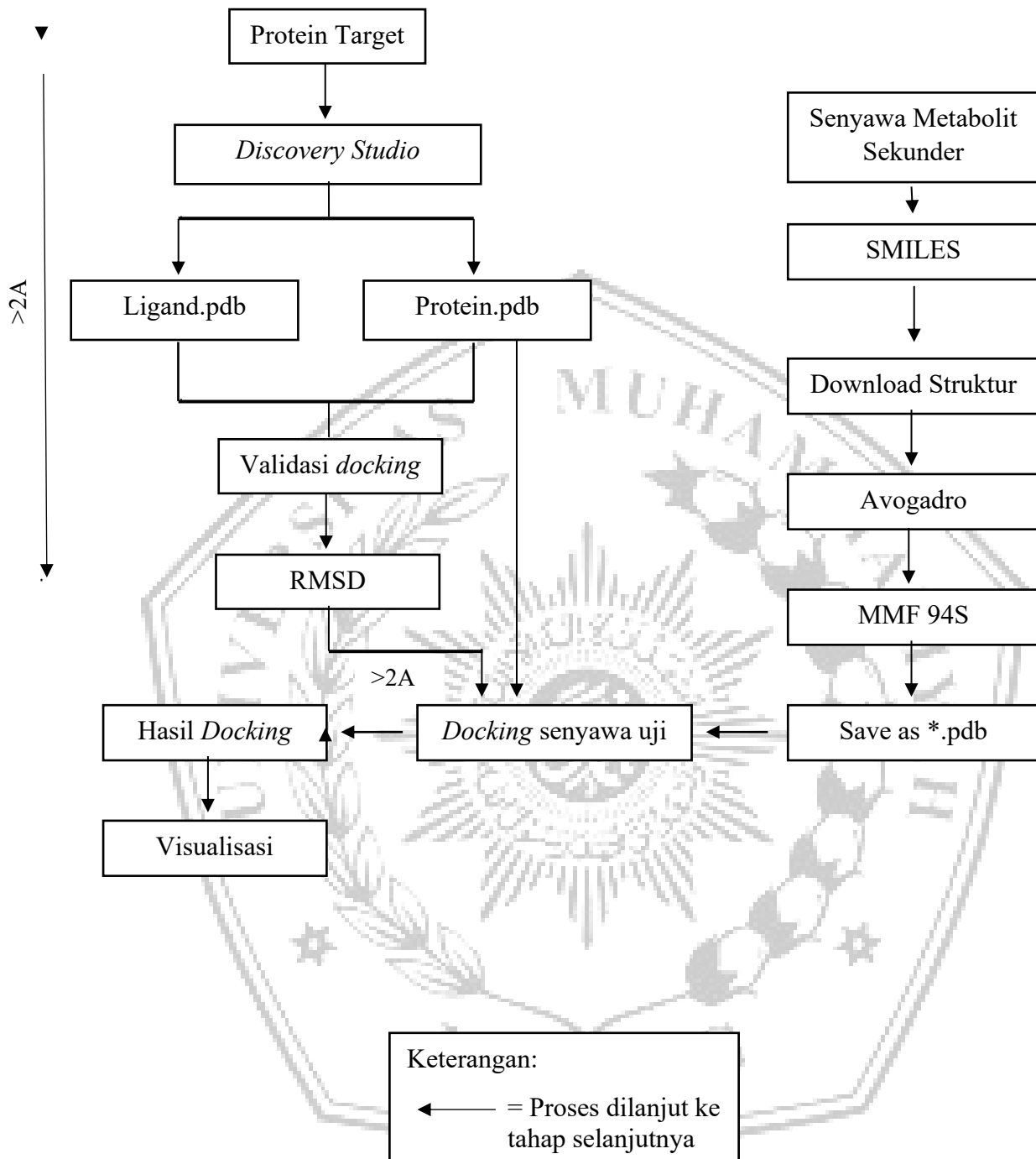
Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi daftar senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam berbagai bagian tumbuhan singawalang, termasuk buah, daun, akar, batang, kulit, dan kulit akar.

b) Protein Target

Protein target yang digunakan adalah protein SGLT2, yang didapatkan dari Protein Data Bank



4.5 Kerangka Operasional



Gambar 4. 1 Kerangka Operasional

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Webservice PubChem

Dicari senyawa metabolit sekunder dari tanaman yang akan diuji melalui <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

- a. Ketik nama senyawa (misalnya quercetine) ke dalam kotak pencarian, lalu klik tombol cari;
- b. Saat hasil ditampilkan, klik nama senyawa;
- c. Klik "Unduh" untuk menyimpannya sebagai konformer 2D;
- d. SDF;
- e. Pada menu Konten, pilih "Nama dan Pengenal" dari opsi Deskriptor Terkomputasi, lalu pilih " SMILES";
- f. Buatlah salinan notepad dari SMILES;
- g. Ulangi prosedur sebelumnya untuk menemukan SMILES untuk setiap bahan kimia.

4.6.2 Protein Data Base (PDB)

- a. Cari makromolekul yang mencakup ligan dan protein target untuk obat antibakteri di <https://www.rcsb.org/>.
- b. Masukkan kode makromolekul dari literatur jurnal pada kotak pencarian, lalu klik "cari";
- c. Periksa kolom hasil pencarian makromolekul untuk memastikan bahwa protein target sesuai dengan bahan kimia terapeutik.
- d. Di pojok kanan atas, klik tombol "Unduh" dan simpan file dalam format PDB.

4.6.3 Prediksi Interaksi

a) Pemisahan Ligan dengan Protein Target

- a. Buka file PDB yang telah diunduh di Discovery Studio (gambar 3D akan muncul);
- b. Pilih elemen ligan yang dapat diakses dengan mengklik "Hierarchy" pada menu view;
- c. Klik "Save as" dan buat folder baru "TEST DOCKING" dengan format *.pdb.

b) Pemilihan Protein Target

- a. Setelah membuka kembali file PDB yang telah diunduh menggunakan Discovery Studio, gambar 3D akan ditampilkan;
- b. Memilih "Hierarchy" dari menu tampilan memungkinkan pemilihan elemen makromolekul yang dapat diakses;
- c. Setelah memilih "Save As" dan memberi nama ligan "PROTEIN" dalam format *.pdb, "save" dieksekusi.

c) Preparasi Senyawa

Struktur kimia senyawa metabolit sekunder dicari di situs webserver *PubChem*. Format *.sdf dari struktur kimia tersebut diunduh. Selain itu, Avogadro versi 1.2.0 digunakan untuk memasukkan struktur dan melakukan optimasi geometri dengan metode MMFF94S. Hasilnya disimpan dalam format *.pdb. Prosedur yang dilakukan:

- a. Membuka file Software Avogadro yang telah diunduh dari PubChem; Setelah struktur muncul, save as file dengan format *.xyz
- b. Kemudian dijalankan program XTB untuk proses optimisasi
- c. Buka file data XTB di penyimpanan setelah proses optimasi XTB selesai, salin file g98.out dan xtbpt.xyz ke penyimpanan yang baru, dan ubah namanya menjadi "Mol-1" dan seterusnya;
- d. Buka di Avogadro setelah semua bahan kimia dioptimasi dengan XTB untuk mengubahnya menjadi format *.pdb;
- e. Simpan kerangka kerja sebagai *.pdb.
- f. Dari menu Extensions, pilih Molecular Mechanism. Kemudian, buka bagian Setup Force Field dan edit kolom Force Field menjadi
- g. *.pdb. dan jadikan MMFF94S sebagai kolom Force Field yang baru;
- h. Untuk menentukan energi, pilih Optimize Geometry dari menu Extensions
- i. Setelah itu, struktur disimpan dalam format *.pdb.

d) Preparasi Protein Target dan Ligan**• Preparasi Protein Target**

- a. Luncurkan aplikasi PyRx Autodock;
- b. Pilih "Preferences" dari menu Edit;

- c. Klik tombol Browse untuk memodifikasi bagian "Workspace" pada kotak dialog Preferences. Pilih folder di mana hasil docking akan disimpan.
 - d. Setelah itu, klik kanan pada lembar kerja Molecules dan pilih "Load
 - e. Molecule" pilih file "Protein" yang telah disimpan pada langkah pemisahan;
 - f. Klik kanan pada Protein yang telah dibuka pada lembar kerja, pilih
 - g. "Make Macromolecules" dari menu Autodock
 - h. Setelah itu, file tersebut akan tersimpan secara otomatis dalam format *pdbqt;
 - i. Protein target telah selesai dibuat.
- **Preparasi Ligan**
 - a. Jalankan aplikasi PyRx Autodock;
 - b. Pilih "Preferensi" dari menu Edit;
 - c. Ubah bagian "Workspace" dengan mengklik tombol Browse pada kotak dialog Preferences. Pilih folder di mana hasil docking akan disimpan.
 - d. Selanjutnya, gunakan menu klik kanan untuk memilih file "Load Molecule" dan kemudian "Ligan", yang telah disimpan selama langkah pemisahan;
 - e. Klik kanan pada Ligan yang terlihat terbuka di lembar kerja, pilih "Make Ligand" dari menu Autodock.
 - f. Setelah itu, ligan akan tersimpan secara otomatis dalam format *pdbqt; Persiapan ligan telah selesai.
 - e) **Mencari Sisi Aktif Protein Target (AutoGrid)**
 - a. luncurkan aplikasi PyRx Autodock.
 - b. Pilih AutoDock Wizard dari lembar kerja AutoDock.
 - c. Klik pada Select Molecules. Pilih protein dan ligan yang sudah ada dalam bentuk *pdbqt.
 - d. Setelah menentukan pilihan Anda, klik tombol Teruskan di sudut kanan bawah.
 - e. Akan ada kotak Gridbox di kotak hasil adegan 3D. Tempatkan Gridbox di pusat ligan. Sesuaikan "jumlah titik dalam dimensi xyz" agar sama. Pilih "Run AutoGrid" yang terletak di pojok kiri bawah.

f) Validasi Metode Docking

Setelah membuka file pdb protein target di Discovery Studio, protein dan ligan dipisahkan dan disimpan dalam format *protein.pdb (protein target) dan *ligand.pdb (ligan). Setelah membuka kedua file tersebut di perangkat lunak Pyrx seri 0.8, penambatan molekuler dilakukan. Informasi yang ditampilkan adalah nilai Root Mean Square Deviation (RMSD); jika nilai RMSD kurang dari 2 Å, metode docking disetujui. Root Mean Square Deviation digunakan untuk mengelompokkan hasil docking, toleransi 1,0 Å. Pengikatan ulang ligan kristal sebagai kontrol pengikatan terhadap SGLT2 berfungsi untuk mengonfirmasi teknik pengikatan molekuler.

g) Docking Senyawa Uji

File seperti pada proses pembuatan AutoGrid, file gabungan yang disimpan dalam format *.pdb diimpor ke dalam program Pyrx 0.8 series. Docking kemudian dilakukan dengan menggunakan parameter berikut: GA run = 100, jumlah maksimum evaluasi = 500.000, ukuran posisi = 150, dan generasi maksimum = 27.000. Nilai RMSD dari hasil docking digunakan untuk menganalisisnya.

- a. Klik kanan pada lembar kerja Molecules dan pilih "Load Molecule"; ini akan memungkinkan Anda untuk memilih file senyawa uji yang telah Anda simpan selama tahap persiapan.
- b. Klik kanan pada setiap bahan kimia uji, pilih Make Ligand dari menu AutoDock.
- c. Format *pdbqt akan secara otomatis disimpan. Bahan kimia uji siap
- d. digunakan.
- e. Pilih AutoDock Wizard dari lembar kerja AutoDock. Pilih Molekul akan terbuka. Pilih protein target untuk docking serta file senyawa uji. Klik tombol Teruskan di sudut kanan bawah setelah dipilih.
- f. Cukup klik Maju di sudut kanan bawah proses docking sekali lagi
- g. karena AutoGrid telah dikonfigurasi dalam prosedur AutoGrid.
- h. Konfigurasi pengaturan docking. Pilih tombol Genetic Algorithm dan Docking Parameter. Selanjutnya, atur Maximum Number of Energy Evaluations ke medium dan jumlah GA-run ke 100. Kemudian

pilih Run Autodock di pojok kiri bawah setelah memilih Lamarckian GA.

- i. Program Notepad++ dapat digunakan untuk melihat prosedur docking.

h) Analisis Hasil Docking

Untuk menunjukkan hubungan dengan protein target dan metabolit, hasil docking diperiksa kembali menggunakan Visualizer Discovery Studio. Hasilnya diurutkan berdasarkan energi bebas ikatan yang paling kuat. Dalam penelitian ini, lima senyawa terbaik dipilih berdasarkan energi bebas ikatannya. Dua senyawa dengan interaksi paling diinginkan dipilih dari kelompok ini (Saddique et al., 2022). Prosedur yang dilakukan:

- a. Periksa perangkat lunak Autodock PyRx versi 0.8 pada lembar kerja Autodock dan pilih file hasil akhir docking senyawa uji dengan format *.dlg.
- b. Klik Autodock Assistant, lalu pilih Analisis Hasil. Klik Insert New Items dan pilih file *.dlg yang sesuai dengan pengujian docking yang disimpan di folder berdasarkan hasil docking Notepad++.
- c. Data yang digunakan adalah yang memiliki jumlah cluster terbanyak dan energi terendah. Jika jumlah cluster terbanyak memiliki energi lebih tinggi dibandingkan dengan cluster yang lebih sedikit, maka tetap digunakan cluster dengan jumlah terbanyak. Konfirmasi ligan dilakukan dengan energi bebas terendah (ΔG) menggunakan cluster yang paling populer (Dermawan et al., 2019).

i) Visualisasi Hasil Docking

● Visualisasi 2D

- a. Luncurkan server web Protein.plus;
- b. Ketik file senyawa uji yang dipilih dalam format *.sdf dan protein target dalam format *.pdb;
- c. Pilih Pose View 2D Interaction Diagram dengan mengklik "Go";
- d. Pilih Hitung setelah mengklik Struktur Ligan dan mengizinkannya untuk dibaca. Perhatikan struktur dua dimensi ligan yang dipilih;
- e. Disimpan dalam ekstensi *.png

- **Visualisasi dalam 3D**
 - a. Meluncurkan aplikasi Discovery Studio.
 - b. Pilih file protein target dengan mengklik "Open" pada pencari file;
 - c. Setelah itu, Anda memilih file dan mengklik opsi insert form pada menu file, Pilih file untuk bahan kimia uji;
 - d. Pilih Defind Ligand setelah memilih bahan kimia uji dari menu ligan reseptor;
 - e. Pilih Ligand Interactions untuk melihat struktur 3D interaksi protein target dengan bahan kimia uji yang dipilih.

