

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Metode Eksperimental Penelitian

Penulis berencana melakukan penelitian dengan metode *in silico* pada penelitian ini. *In silico* adalah metode riset yang memanfaatkan teknologi komputasi dan database untuk mengembangkan penelitian lebih lanjut (Makatita et al., 2020).

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini selama tiga bulan mulai bulan September sampai November menggunakan komputasi di Kampus 2 Universitas Muhammadiyah Malang

4.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi Penelitian

4.3.1 Kriteria Inklusi

- Standar Protein Target yang diterapkan

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

- Senyawa Target yang Ditetapkan

Senyawa yang menjadi target memiliki struktur senyawa metabolit sekunder yang terdaftar dan dapat diakses di server web PubChem memenuhi kriteria inklusi senyawa.

4.4 Alat dan Bahan Penelitian

4.4.1 Alat Penelitian

4.4.1.1 Komponen Keras

Pada penelitian ini, penulis menggunakan perangkat keras yakni ASUS X555Q dengan processor AMD A12-9700P RADEON R7, 10 COMPUTE CORES 4C+6G 2.50 GHz, Sistem Operasi Windows 10 64-bit, dengan 8,00 GB RAM memori.

4.4.1.2 Komponen Lunak

Perangkat Lunak yang digunakan pada penelitian ini diantaranya :

- a. Autodock PyRx 0.8
- 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>)

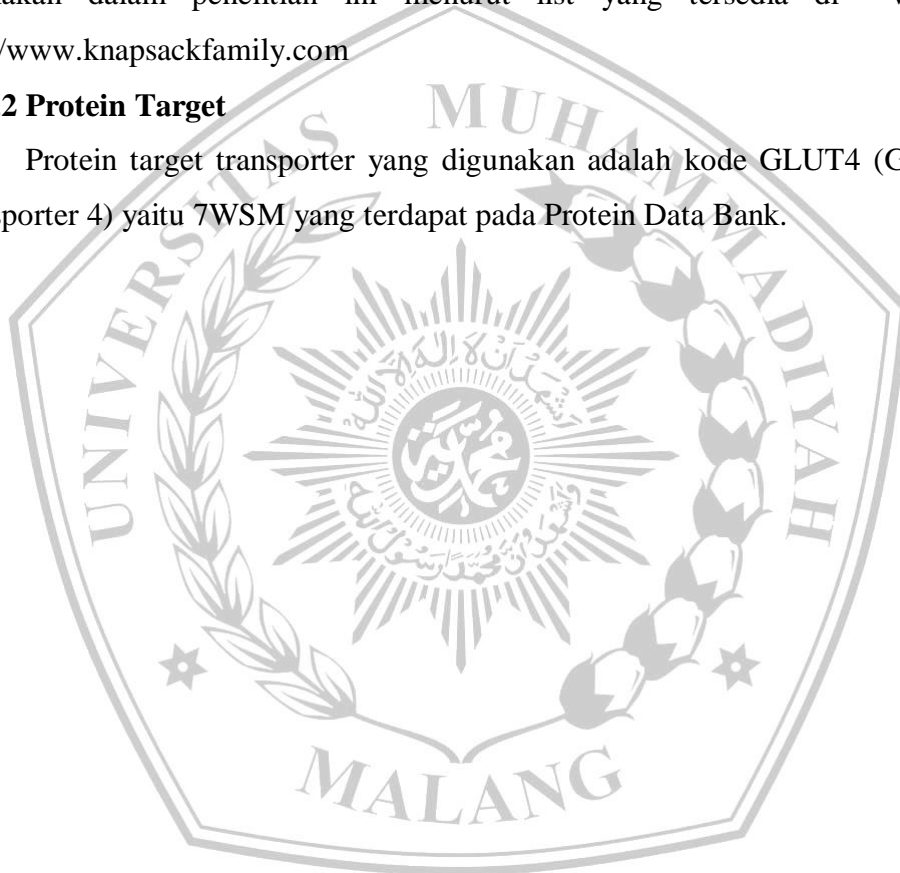
4.4.2 Bahan Penelitian

4.4.2.1 Senyawa Metabolit Sekunder Tanaman

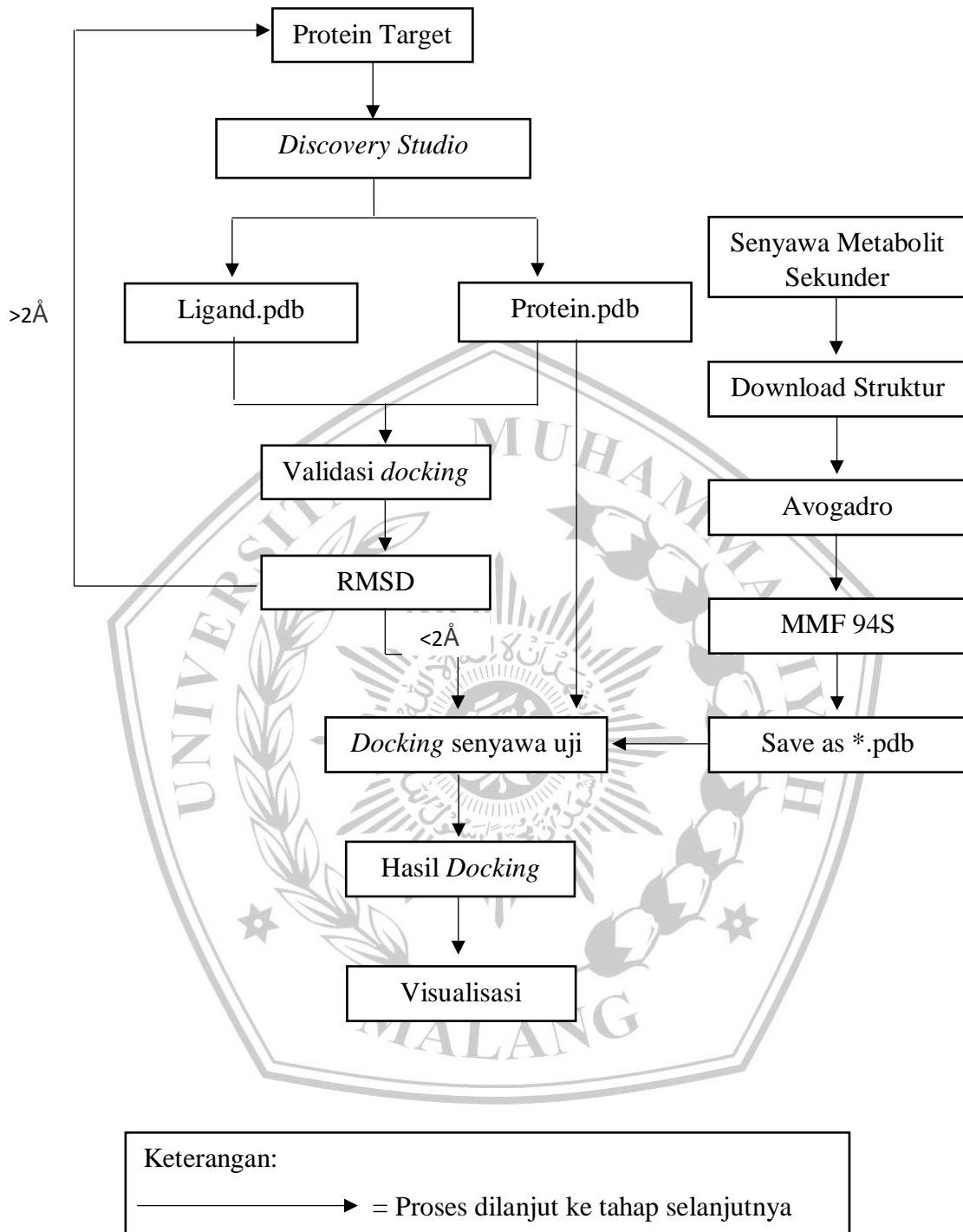
Daftar metabolit sekunder tanaman (*Petiveria alliacea*) adalah bahan yang digunakan dalam penelitian ini menurut list yang tersedia di website <http://www.knapsackfamily.com>

4.4.2.2 Protein Target

Protein target transporter yang digunakan adalah kode GLUT4 (Glucose Transporter 4) yaitu 7WSM 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. alliacea* harus dimasukkan ke dalam web server PubChem.

4.6.1.1 RSCB PDB

Dengan mengakses URL <https://www.rcsb.org/>, peneliti mampu mencari nama protein yang diuji.

- a) Di kotak pencarian, ketik nama protein (GLUT4);
- 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”

4.6.1.2 Webservice PubChem

Dengan mengakses URL <https://pubchem.ncbi.nlm.gov>, peneliti mampu mencari senyawa metabolit sekunder dari tanaman yang diuji.

- a) Di kotak pencarian, ketik nama senyawa (petiveria);
- b) Klik nama senyawa saat hasil pencarian muncul di kolom pencarian;
- c) Pilih “Unduh” dan simpan sebagai konformer 2D;
- d) Download file dalam bentuk SDF;
- e) Pilih “nama dan pengenalan” dari deskripsi yang terkomputasi “SMILES Kanonik”;
- f) Salin SMILES ke dalam notepad;
- g) Ulangi proses tersebut untuk setiap senyawa yang ingin dicari.

4.6.1.3 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 menu “Hierarchy” pada menu view, selanjutnya komponen makromolekul yang muncul dipilih
- c. Ligan disimpan dengan cara klik “Save As” lalu bernama “PROTEIN” berdasarkan bentuk format *.pdb, tekan “save”

4.6.1.4 Preparasi Senyawa

Dicari struktur kimia senyawa berdasarkan webserver PubChem. Struktur kimia ini dapat diunduh dengan format *.sdf. Kemudian struktur itu diinput ke dalam aplikasi Avogadro seri 1.2.0 agar mengimplementasikan optimasi geometri dan formatnya diubah menjadi *.xyz dan hasilnya dapat 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 aplikasi XTB untuk proses optimasi
- d. Setelah proses optimasi XTB selesai, buka data file XTB pada penyimpanan, *copy* file g98.out dan xtbt.xyz pada penyimpanan baru dan *rename* dengan nama “Mol-1” hingga seterusnya
- e. Setelah semua senyawa selesai teroptimasi dengan XTB, buka pada aplikasi 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 data disimpan dalam bentuk *.pdb

4.6.1.5 Preparasi Protein Target dan Ligan

1. Preparasi Protein Target

- a. Jalankan perangkat lunak Autodock PyRx

- b. Diklik menu “Preferences” pada 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 padapenyimpanan
- e. Pada lembar kerja, klik kanan di protein yang terlihat, klik Autodock kemudian gunakan menu “Make Macromolecules”
- f. Kemudian akan tersimpan dengan format *.pdbqt secara otomatis
- g. Proses pembuatan Target Protein berhasil

2. Preparasi Ligan

- a. Cek dan jalankan perangkat lunak Autodock PyRx
- b. Dimenu Edit, klik menu “Preferences”
- c. Dibox dialog Preferences, diubah pada “Workspace” dengan memilih tombol ,menu 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 menu Autodock dan klik menu “Make Ligand”
- f. Kemudian pasti tersimpan otomatis dengan format file *.pdbqt
- g. Preparasi Ligand telah berhasil

4.6.1.6 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 file format *.pdbqt
- c. Setelah anda perlu 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 dari segi 3D. Disamakan nominal pada “number of points in xyz-dimension”
- e. Klik Run AutoGrid pada pojok bagian kiri bawah

4.6.1.7 Validasi Metode Docking

Discovery studio membuka file pdb protein target, lalu dibagi antara protein dan ligan, kemudian lakukan save dalam format *protein.pdb (protein target) dan *ligan.pdb (ligan). Kedua file tersebut dibuka di dalam program Pyrx seri 0.8, kemudian dilakukan molecular docking. Data yang dilihat adalah nilai Root Mean Square Deviation (RMSD), suatu metode docking telah dapat diakui bila nilai RMSD <2 Å. Root Mean Square Deviation digunakan untuk mengelompokkan hasil docking, dengan toleransi 1,0 Å. Validasi metode Molecular Docking dilakukan oleh proses Re-docking ligan kristalografi agar menjadi kontrol docking DNA Gyrase.

4.6.1.8 Docking Senyawa Uji

File kompleks akan tersimpan dalam bentuk 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” kemudian pilih file campuran uji yang tersimpan saat tahap persiapan
- b. Klik kanan setiap senyawa uji, klik Autodock, dan pilih Buat Ligand
- c. Secara otomatis file 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 pada file senyawa uji. Setelah anda menentukan pilihan, klik “next” 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. Kitadapat memantau prosedur docking berdasarkan mengaplikasikan Notepad++

4.6.1.9 Analisis Hasil Docking

Untuk menunjukkan hubungan antara protein target dan bahan metabolit, hasil docking diperiksa lagi pada aplikasi Visualizer Discovery Studio. Hasil visualisasi tersebut berupa interaksi ligan dengan asam-asam amino pada makromolekul protein. Residu asam amino yang berinteraksi dengan ligan dapat menentukan jenis ikatan yang terjadi antara ligan dan protein (Ramayanti, 2014).

Langkah-langkah yang dilaksanakan diantaranya:

- a. Cek perangkat lunak Autodock PyRx seri 0.8 pada lembar kerja Autodock, pilih file akhir docking senyawa uji dengan format file *.dlg
- b. Klik Autodock Assistant, lalu klik Analisis Hasil. Klik Insert New Items, pilih file *.dlg berdasarkan pengujian docking yang telah disimpan pada folder berdasarkan hasil docking Notepad++
- c. Data yang digunakan adalah data yang memiliki jumlah cluster paling besar atau terbesar dan memiliki energi paling rendah. Jika jumlah cluster terbanyak memiliki energi lebih tinggi dari pada jumlah cluster lebih sedikit maka kumpulan cluster terbanyak digunakan.
- d. Data disimpan dalam format file *.sdf

4.6.1.10 Visualisasi Hasil Docking

1. Visualisasi 2D

- a. Buka webserver Protein.plus
- b. Protein target diimpor dalam bentuk format *.pdb dan file campuran eksperimental yang dipilih dalam format file *.sdf
- c. Klik “Go” lalu pilih Pose View Diagram Interaktif 2D klik Pose View
- d. Klik pada ligan structural dan setelah membaca, pilih menu calculate. Lalu struktur 2D dari ligan yang telah dipilih
- e. Disimpan berdasarkan format file *.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 ditentukan
- d. Klik senyawa uji pada menu receptor ligand dan klik Define Ligand
- e. Klik Ligand Interactions kemudian akan muncul structure 3D dari interaksi antara protein target dan senyawa uji yang terpilih

