

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian Eksperimental

Molecular Docking adalah jenis penelitian yang akan digunakan dengan metode *in silico*.

4.2. Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan selama tiga bulan, perencanaan dan penelitian dilakukan menggunakan komputasi.

4.3. Kriteria Inklusi dan Eksklusi penelitian

4.3.1. Kriteria Inklusi dan Eksklusi Penelitian

a. Target Protein yang digunakan

Kriteria protein target yang dipakai adalah Protein yang terdaftar di Protein Data Base, termasuk dalam grup Homo sapiens, dan dapat ditemukan dalam jurnal penelitian.

b. Senyawa yang digunakan

Komponen *secondary metabolite compounds* dari (singawalang) digunakan sebagai kriteria untuk memasukkan senyawa. Kriteria ini didasarkan pada struktur senyawa yang tersedia oleh webserver Pubchem.

4.3.2. Kriteria Eksklusi

a. Protein Target yang dipakai

Kriteria eksklusi digunakan untuk memilih protein target yang tidak dapat ditemukan dalam Database Protein, tidak termasuk dalam kelompok Homo sapiens, dan tidak dapat ditemukan dalam jurnal penelitian.

b. Senyawa yang tidak digunakan

Kriteria eksklusi digunakan untuk memilih senyawa metabolit sekunder singawalang, yang berdasarkan struktur senyawa yang tersedia oleh webserver Pubchem,

4.4. Alat dan Bahan Penelitian

4.4.1. Alat Penelitian

4.4.1.1. Komponen Keras

Komponen keras yang digunakan dalam penelitian ini adalah IdeaPad 3 14ADA05, yang memiliki processor AMD Athlon Silver 3050U dengan Radeon

Graphics 2.30 GHz dan sistem operasi Windows 10 64-bit. Laptop ini juga memiliki memori RAM 4,00 GB.

4.4.1.2. Komponen Lunak

Perangkat Lunak yang digunakan dalam penelitian ini:

- 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>)

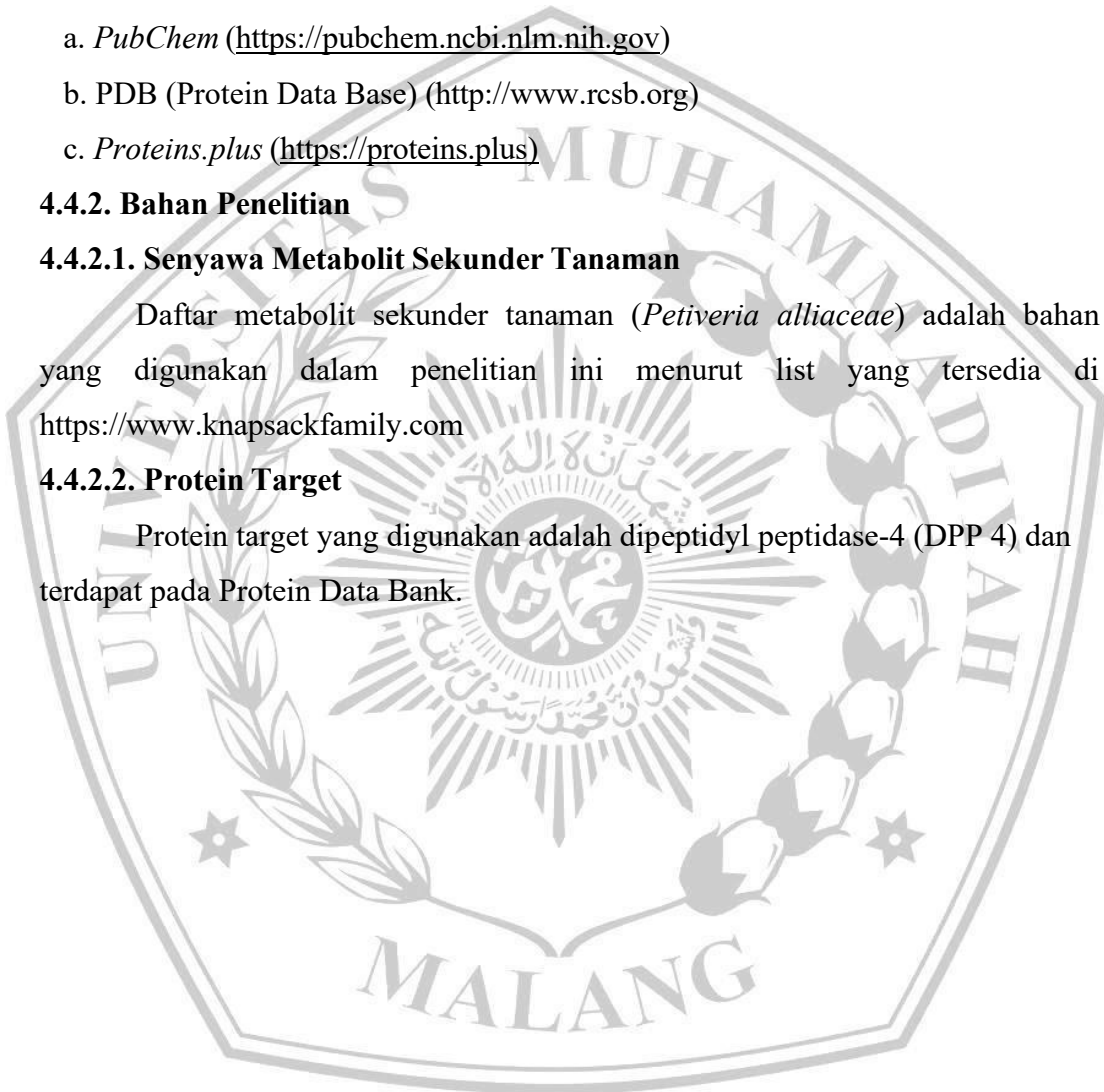
4.4.2. Bahan Penelitian

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 yang digunakan adalah dipeptidyl peptidase-4 (DPP 4) dan terdapat pada Protein Data Bank.



4.6. Prosedur Penelitian

4.6.1. Prediksi Interaksi

4.6.1.1. Webservice PubChem

Senyawa metabolit sekunder dari (*Petiveria alliaceae*) akan dilakukan uji coba dapat dicari melalui <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

- a. Ketikkan nama senyawa (contoh: quercetine) pada kotak penelusuran, selanjutnya klik tombol pencarian
- b. Saat hasil di kolom pencarian muncul, klik nama senyawa
- c. Klik "Download" lalu save dalam bentuk 2D conformer
- d. SDF
- e. Pada menu Content, klik submenu "Names and identifiers"
- f. Pada pilihan Computed descriptors, klik "Canonical SMILE"
- g. Disalin SMILES pada norepad
- h. Untuk menemukan SMILES pada setiap senyawa yang dimaksud, ulangi Langkah-langkah di atas

4.6.1.2. Pemisahan Ligan dengan Protein Target

1. Pemisahan Ligan dengan Protein Target

- a. Pengecekan dengan menggunakan Discovery Studio dan File PDB dapat diunduh (akan terlihat tampilan 3D).
- b. Klik "Hierarchy" di menu view dan pilih komponen ligan yang tersedia. Pilih unsur ligan yang tersedia.
- c. Kemudian, pilih "Save as" dan buat folder baru bernama "TEST DOCKING" dengan format *.pdb.

2. Pemisahan Protein Target

- a. Discovery Studio dapat memeriksa file PDB yang diunduh (akan terlihat tampilan 3D).
- b. Kemudian klik "Hierarchy" di menu view, dan pilih komponen makromolekul yang ditampilkan.
- c. Terakhir, simpan ligan dengan mengklik "Save As", beri nama "PROTEIN" dan tekan "save".

4.6.1.3. Preparasi Senyawa

Dengan menggunakan webservice PubChem, cari struktur kimia senyawa berdasarkan bioavailabilitas. Struktur kimia ini dapat diunduh dalam format *.sdf. Untuk menerapkan optimasi geometri, struktur dimasukkan ke dalam seri Avogadro 1.2.0 dan formatnya diubah menjadi *.xyz, dan hasilnya disimpan dalam folder nama XYZ. Metode yang digunakan adalah sebagai berikut:

- a. Menggabungkan file PubChem yang diunduh dengan program Avogadro.
- b. Menyimpan file dengan format *.xyz .
- c. Kemudian menjalankan program XTB untuk melakukan 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 telah dioptimasi dengan XTB, buka Avogadro untuk mengubah format menjadi *.pdb.
- f. Simpan struktur dalam bentuk *.pdb.
- g. Saat struktur muncul, klik menu Extensions, lalu pilih "Molecular Mechanism" dan ubah kolom kekuatan menjadi MMFF94S.
- h. Klik "Optimize Geometry" untuk mengetahui cara mengurangi energi.
- 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, membagi protein dan ligannya, dan kemudian menyimpan keduanya sebagai *.protein.pdb dan *.ligan.pdb. Molecular docking digunakan untuk membuka kedua file di program Pyrx seri 0.8. Data yang dilihat adalah nilai Root Mean Square Deviation (RMSD). Jika nilai RMSD <2 Ao, metode docking dapat diakui. Hasil docking dikelompokkan dengan nilai RMSD <1,0 Ao. Metode docking selular divalidasi dengan mengembalikan 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 memantau prosedur *docking* berdasarkan mengaplikasikan Notepad++

4.6.1.8. Analisis Hasil *Docking*

Hasil *docking* diperiksa lagi di Visualizer Discovery Studio untuk menunjukkan hubungan antara protein target dan metabolit. 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 juga dipilih berdasarkan energi bebasnya mengikat (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