

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif kuantitatif. Penelitian deskriptif adalah metode penelitian yang digunakan untuk menggambarkan gejala, peristiwa, maupun kejadian yang ada. Variabel yang dikaji dalam penelitian deskriptif tidak diberi perlakuan dan tidak memiliki kelompok pembanding atau variabel kontrol (Drummond & Murphy-Reyes, 2018). Penelitian ini dilakukan untuk memprediksi epitop dari virus *monkeypox* yang dapat dikembangkan menjadi vaksin. Epitop virus *monkeypox* dianalisis terlebih dahulu terkait karakter imunologis, interaksi dengan sistem imun, dan struktur yang kemudian akan dilakukan penambatan molekuler dengan MHC I dan II.

3.2. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret sampai Juli 2023. Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Persiapan Alat dan Data Sekunder

Alat yang digunakan adalah laptop Lenovo dengan spesifikasi prosesor AMD A8-6410 APU with AMD Radeon R5 Graphics (4 CPUs), ~2.0GHz, 4GB RAM dengan sistem operasi Windows 10 Pro 64-bit. Laptop ditunjang dengan koneksi internet untuk mengakses perangkat lunak secara daring. Penelitian ini menggunakan perangkat lunak yang dioperasikan secara daring atau tidak membutuhkan koneksi internet dan luring atau tidak membutuhkan koneksi internet.

Tabel 3.1 Perangkat Lunak yang Digunakan

Nama	Kegunaan	Keterangan
Immune Epitope Database (IEDB) - TepiTool	Prediksi epitop pada protein envelope virus <i>monkeypox</i>	http://tools.iedb.org/tepitool/
VaxiJen v2.0	Prediksi kemampuan epitop untuk stimulasi pembentukan antibodi	http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html

AllergenFP v.1.0	Prediksi kemampuan epitop memicu reaksi alergi	http://ddg-pharmfac.net/AllergenFP/
ToxinPred	Prediksi toksisitas epitop	https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred/design.php
IEDB - konservasi	Prediksi nilai konservasi epitop	http://tools.iedb.org/conservancy/
Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	Prediksi homologi epitop dengan protein manusia	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
PEP-FOLD3	Prediksi struktur 3D epitop virus <i>monkeypox</i>	https://mobylye.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::PEP-FOLD3
AutoDock dan SPDBV	Preparasi protein MHC	Offline (diunduh dari https://autodock.scripps.edu/download-autodock4/ dan https://spdbv.unil.ch/disclaim.html#)
ClusPro	Penambatan molekuler epitop dengan MHC I dan II	https://cluspro.org/home.php
Discovery Studio	Visualisasi hasil penambatan molekuler dalam 3D dan 2D	Offline (diunduh dari https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download)
WebGRO	Prediksi dinamika molekuler epitop dengan MHC I dan II	https://simlab.uams.edu/
C-ImmSim	Prediksi interaksi epitop dengan sistem imun	https://kraken.iac.rm.cnr.it/C-IMMSIM/index.php?page=1
IEDB – cakupan populasi	Prediksi cakupan populasi epitop	http://tools.iedb.org/population/

Bahan berupa data sekunder yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu data sekuens protein envelope virus monkeypox yang diperoleh dari GenBank di NCBI. Protein target yang akan digunakan untuk penambatan molekuler dengan epitop dari virus monkeypox ditentukan dari hasil analisis data interaksi epitop dengan MHC. Alel MHC hasil analisis data kemudian dicari pada laman Protein Data Bank (PDB) dan diunduh struktur 3D dalam format pdb.. Keterangan terkait laman untuk mengakses data dicantumkan pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2 Laman Akses Data Bahan yang Digunakan

Nama	Kegunaan	Keterangan
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	Pencarian data sekuens protein <i>envelope</i> virus <i>monkeypox</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB)	Pencarian model protein MHC kelas I dan II	https://www.rcsb.org/

3.3.2. Analisis Prediksi Epitop

Data FASTA *Envelope* protein virus *monkeypox* dianalisis pada The Immune Epitope Database (IEDB) <http://tools.iedb.org/> untuk menemukan epitop. Pencarian epitop dilakukan agar ditemukan sekuens peptida yang dapat berikatan dengan MHC kelas I dan II pada manusia menggunakan TepiTool (Paul *et al.*, 2017) yang terdapat dalam webserver IEDB.

3.3.3. Immunological Properties Analysis

Epitop yang berhasil ditemukan kemudian dianalisis menggunakan beberapa web server untuk mengetahui karakter imunologis.

- a. Prediksi Antigenisitas, yaitu prediksi kemampuan epitop untuk menstimulasi pembentukan antibodi spesifik dilakukan pada Vaxijen v.2.0 (Doytchinova & Flower, 2007).
- b. Prediksi Alergenisitas, yaitu prediksi kemampuan epitop memicu reaksi alergi dilakukan pada AllergenFP v.1.0 (Dimitrov *et al.*, 2014).
- c. Prediksi toksisitas, yaitu prediksi potensi epitop tersebut bersifat toksik yang dilakukan pada ToxinPred (Gupta *et al.*, 2013).
- d. Prediksi konservasi, yaitu prediksi persentase epitop tersebut terkonservasi yang dilakukan pada IEDB (Bui *et al.*, 2007).
- e. Prediksi homologi, yaitu prediksi kemiripan epitop dengan protein manusia pada Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990).

3.3.4. Prediksi Interaksi Epitop dengan MHC

Alel MHC dianalisis berdasarkan hasil prediksi epitop yang telah dilakukan. Hasil prediksi epitop yang menggunakan indikator *percentile rank* dan IC50 dapat menunjukkan data terkait alel MHC yang berpotensi untuk berikatan dengan epitop. Penentuan kandidat alel MHC dilakukan dengan memilih alel yang memiliki nilai *percentile rank* dan IC50 yang mencapai syarat alel dapat berikatan kuat hingga lemah. Struktur 3D MHC dicari dan diunduh dari Protein Data Bank.

3.3.5. Pemodelan Struktur Epitop dan Preparasi Protein MHC

Struktur epitop virus *monkeypox* perlu dirancang menjadi model 3D. Struktur epitop dalam model 3D dibutuhkan pada tahapan penambatan molekulur. Tahapan ini dilakukan pada PEP-FOLD3 (Lamiabile *et al.*, 2016).

Alel MHC yang akan digunakan dalam penambatan molekuler perlu dilakukan preparasi berupa penghapusan molekul air dan ligan asli, penambahan muatan Kollman dan hidrogen polar, serta minimasi energi. Tahapan preparasi protein yang dilakukan pada AutoDock, yaitu penghapusan dan penambahan molekul maupun muatan pada protein. Minimasi energi dilakukan pada SPDBV.

3.3.6. Simulasi Penambatan Molekuler

Penambatan molekuler akan dilakukan antara struktur 3D epitop virus *monkeypox* dengan struktur 3D MHC kelas I dan II. Simulasi penambatan molekuler dilakukan pada laman ClusPro (Desta *et al.*, 2020). Sebelum menggunakan laman ClusPro untuk melakukan penambatan molekuler, perlu melalui tahap pembuatan akun terlebih dahulu.

3.3.7. Simulasi Dinamika Molekuler

Simulasi dinamika molekuler hanya dilakukan pada epitop terbaik dari MHC I maupun MHC II. Prediksi dinamika molekuler yang terjadi pada epitop virus *monkeypox* dengan MHC kelas I dan II disimulasikan pada laman WebGRO (Abraham *et al.*, 2015). Simulasi dinamika molekuler dapat dihasilkan data Root Mean Square Deviation (RMSD) dan Root Mean Square Fluctuation (RMSF). RMSD adalah data akar kuadrat rata-rata deviasi dalam geometri tiga dimensi molekul yang digunakan untuk membandingkan pergeseran atau perubahan konformasi molekul. RMSF adalah data akar kuadrat rata-rata fluktuasi yang digunakan untuk menggambarkan pergeseran setiap residu asam amino penyusun protein selama simulasi.

3.3.8. Prediksi Interaksi Epitop dengan Sistem Imun

Analisis epitop virus *monkeypox* dilanjutkan dengan prediksi kemampuan imunogenik atau kemampuan menghasilkan respon imun yang dilakukan pada laman C-ImmSim (Rapin *et al.*, 2010).

3.3.9. Prediksi Cakupan Populasi

Analisis cakupan populasi berfungsi untuk memprediksi perkiraan efektivitas vaksin pada daerah tertentu yang dilakukan pada laman IEDB (Bui *et al.*, 2006).

3.4. Analisis Data

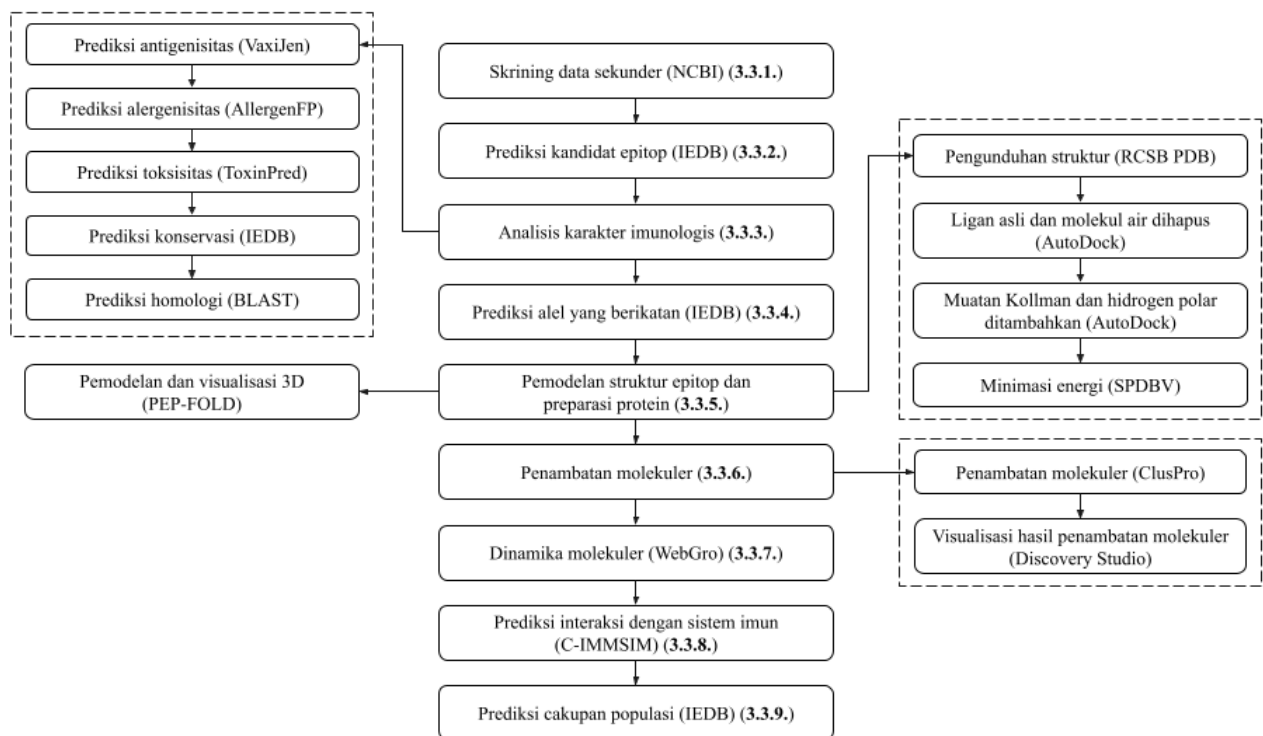
Data hasil pengujian dianalisis berdasarkan beberapa parameter sebagai berikut (Tabel 3.3).

Tabel 3.3 Parameter Analisis Data

Kegiatan	Parameter
Prediksi epitop pada protein envelope virus <i>monkeypox</i>	<i>Percentile rank</i> < 0,5 dan IC50 < 50 nM
Prediksi karakter imunologis epitop	Epitop bersifat antigen, non-alergen, non-toksik, terkonservasi 100%, dan tidak memiliki homolog dalam tubuh manusia
Prediksi interaksi epitop dengan alel MHC	Alel MHC I: - Berikatan kuat (<i>percentile rank</i> ≤ 0,5 dan IC50 < 50 nM) - Berikatan lemah (0,5 < <i>percentile rank</i> ≤ 2 dan IC50 < 500 nM) Alel MHC II: - Berikatan kuat (<i>percentile rank</i> ≤ 2 dan IC50 < 50 nM) - Berikatan lemah (2 < <i>percentile rank</i> ≤ 20 dan IC50 < 1000 nM)
Pemodelan struktur 3D epitop virus <i>monkeypox</i>	Nilai energi <i>optimized potential for efficient structure prediction</i> (sOPEP) terendah
Simulasi penambatan molekuler	Nilai <i>binding free energy</i> (BFE) terendah
Simulasi dinamika molekuler epitop dengan MHC I dan II	Nilai RMSD < 2Å dan nilai RMSF ≤ 4Å.

3.5. Alur Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan dengan alur yang disajikan dalam diagram alur sebagai berikut (Gambar 3.1).



Gambar 3.1 Diagram Alur Penelitian