

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan penelitian dengan metode penelitian deskriptif kuantitatif. Penelitian deskriptif kuantitatif bertujuan untuk menggambarkan, mengendalikan, atau memprediksi suatu fenomena yang sedang diteliti (Purba, 2021). Penelitian ini meliputi: pengumpulan data dari berbagai database struktur kimia senyawa dan analisis senyawa potensial untuk mendapatkan ligan dari senyawa ikan sidat. Penentuan farmakokinetik dan toksisitas senyawa. Selain itu ditentukan protein yang terlibat dalam penyakit Alzheimer kemudian dilakukan konstruksi *Protein-Protein Interaction* (PPI) untuk menentukan protein target. Selanjutnya dilakukan analisis afinitas ligan dan terakhir interaksi molekul senyawa potensial dengan protein target secara *molecular docking*.

### 3.2. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Maret sampai Juli 2023. Lokasi yang digunakan untuk penelitian ini adalah Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, UPI Bandung.

### 3.3. Prosedur Penelitian

Berikut tahapan prosedur yang digunakan dalam penelitian ini:

#### 3.3.1. Persiapan Alat dan Data Sekunder

Berikut alat dan data sekunder yang digunakan dalam penelitian ini (Tabel 3.1 dan Tabel 3.2):

Tabel 3. 1. Alat yang Digunakan dalam Penelitian

Alat	Spesifikasi	Jumlah
Laptop Macbook Air 2020 M1	Chip Apple M1, <i>memory</i> 8GB, macOS Ventura Version 13.0, <i>displays: built-in retina display</i> 13,3-inch (2560-1600), <i>storage</i> 256GB.	1 unit
Koleksi Struktur Senyawa Kimia Ikan Sidat		
PubChem	<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov</a>	1 unit

Alat	Spesifikasi	Jumlah
Prediksi Potensi Senyawa		
PASS online	<a href="http://www.way2drug.com/passonline/predict.php">http://www.way2drug.com/passonline/predict.php</a>	1 unit
Prediksi Sifat Farmakokinetik dan Toksisitas Senyawa		
SwissADME	<a href="http://www.swissadme.ch/">www.swissadme.ch/</a>	1 unit
ProTox-II	<a href="https://tox-new.charite.de/protox_II/">https://tox-new.charite.de/protox_II/</a>	1 unit
Prediksi Target Protein Ikan Sidat ( <i>Anguilla bicolor bicolor</i> ) terhadap Penyakit Alzheimer		
GeneCard database	<a href="https://www.genecards.org/">https://www.genecards.org/</a>	1 unit
UniPort	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot">https://www.uniprot.org/uniprot</a>	1 unit
Konstruksi dan Analisis <i>Protein-Protein Interaction</i> (PPI)		
STRING	<a href="https://string-db.org">https://string-db.org</a>	1 unit
Preparasi Ligan		
Marvin Sketch	MarvinSketch V 23.10.0	1 unit
Chimera	Chimera 1.5	1 unit
Preparasi Protein Target		
Protein Data Bank	<a href="http://www.rcsb.org/pdb/">http://www.rcsb.org/pdb/</a>	1 unit
<i>Molecular Docking</i>		
GNINA	GNINA 1.0	1 unit
Analisis Hasil <i>Molecular Docking</i>		
LigPlot	LigPlot+ V 2.1	1 unit
PyMol.	PyMol 1.20	1 unit

Tabel 3. 2. Data Sekunder yang Digunakan dalam Penelitian

No	Data Sekunder	Jenis	Spesifikasi	Jumlah
1	SMILES senyawa pada ikan sidat ( <i>Anguilla bicolor bicolor</i> )	ligan	Rumus kimia	-
2	Struktur 2D & 3D senyawa pada ikan sidat ( <i>Anguilla bicolor bicolor</i> )	ligan	.pdb	-
3	Gen pada <i>Homo sapiens</i>	Protein	-	-
4	Data struktur 3D protein target	Protein	.pdb	-
5	Protein BACE1 PDB: 4J00	Protein	.sdf	-

Lathifah Halim Purnama Sari, 2023

**PENDEKATAN NETWORK PHARMACOLOGY UNTUK MENGIDENTIFIKASI MEKANISME DAN TARGET MOLEKUL DARI IKAN SIDAT (*Anguilla bicolor bicolor*) SEBAGAI ANTI ALZHEIMER SECARA IN SILICO**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

No	Data Sekunder	Jenis	Spesifikasi	Jumlah
6	Interaksi senyawa dan protein	Ligan & protein	.pdb	-

### 3.3.2. Analisis Senyawa Ikan Sidat

#### 3.3.2.1. Koleksi Struktur Senyawa Kimia Ikan Sidat

Senyawa yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari hasil analisis metabolomik *Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (UPLC-MS) ikan sidat usia 12-13 bulan tahap *silver eel*. Struktur senyawa kimia yang ada pada ikan sidat (*Anguilla bicolor bicolor*) tersebut dicari dari PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) yang kemudian dilakukan pengkoleksian struktur tiga dan dua dimensi dengan format sdf dan koleksi *Simple Molecule Input Line Entry System* (SMILES) senyawa.

#### 3.3.2.2. Prediksi Potensi Senyawa Ikan Sidat

Prediksi potensi senyawa ikan sidat secara daring dilakukan melalui laman PASSONLINE (<http://www.way2drug.com/passonline/predict.php>). Prediksi menggunakan SMILES senyawa yang didapat pada web PubChem lalu diinput ke laman PASSONLINE dengan memilih menu *GO for prediction > predict new compound > SMILES > insert your SMILES > Get prediction*. Hasil kemudian akan ditampilkan dalam bentuk tabel yang berisi bioaktivitas senyawa dengan nilai *Probable activity* (Pa) dan *Probable inactivity* (Pi).

#### 3.3.2.3. Prediksi Sifat Farmakokinetik dan Toksisitas Senyawa

Struktur senyawa kimia yang ada pada ikan sidat (*Anguilla bicolor bicolor*) yang telah diperoleh dari PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) kemudian dilakukan *drug likeness* dan sifat farmakokinetik dari senyawa tersebut menggunakan Swiss ADME ([www.swissadme.ch](http://www.swissadme.ch)) untuk mengevaluasi *absorption, distribution, metabolisme & excretion* (ADME) senyawa di dalam tubuh manusia, struktur SMILES ligan yang telah didapatkan dari PubChem diletakkan pada kolom yang tersedia, lalu pilihan “run” dipilih. Hasil prediksi kemudian dapat disimpan dalam bentuk csv. Evaluasi toksisitas senyawa digunakan laman ProToxII ([https://tox-new.charite.de/protox\\_II/](https://tox-new.charite.de/protox_II/)) dengan memilih menu *Tox Prediction*, lalu

masukan SMILES pada kolom *Canonical Smiles* dan pilih kriteria yang diinginkan lalu *Start Tox-Prediction*.

### 3.3.3. Analisis Protein Target Alzheimer

#### 3.3.3.1. Prediksi Protein yang terlibat Penyakit Alzheimer

Prediksi protein yang terlibat Alzheimer menggunakan database gene dari *GeneCard database* (<https://www.genecards.org/>). Dari database tersebut kemudian diperiksa kembali menggunakan web UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprot>) untuk mencocokkan nama protein yang sesuai dengan spesies manusia.

#### 3.3.3.2. Konstruksi dan Analisis *Protein-Protein Interaction (PPI)*

Konstruksi dan analisis protein menggunakan laman STRING (<https://string-db.org>) dengan spesies yang dibatasi sebagai *Homo sapiens* untuk mengetahui interaksi protein protein (PPI) yang memiliki target sebagai terapeutik penyakit Alzheimer. Dipilih satu target protein yang berperan dalam penyebab penyakit Alzheimer.

### 3.3.4. *Molecular Docking*

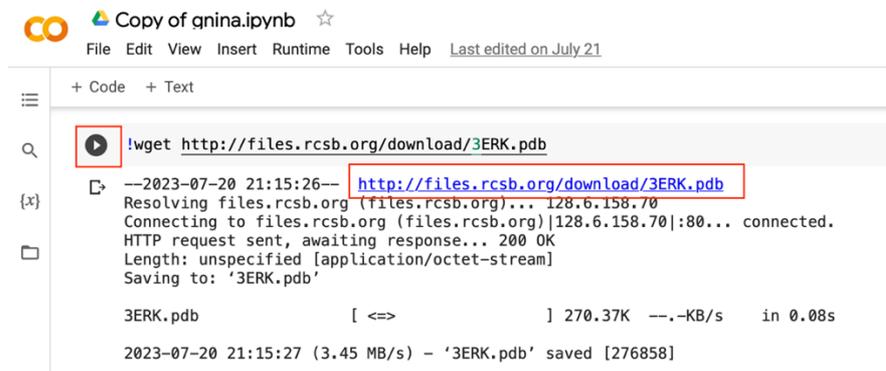
#### 3.3.4.1. Preparasi Ligan

Struktur kimia SMILE dari senyawa ikan sidat diubah menjadi bentuk dua dimensi menggunakan aplikasi MarvinSketch V 23.10.0 lalu disimpan dalam bentuk format pdb. File ligan dalam bentuk pdb tersebut kemudian dilakukan optimasi ligan dan minimasi energi dengan aplikasi Chimera 1.5 dengan cara memilih menu *File > open > open ligan > tools> structure editing > minimize structure > steepest descent steps 1000 > minimize> Ok> Gasteiger > Ok*. Kemudian ligan yang telah diminimasi energinya disimpan dalam bentuk format pdb.

#### 3.3.4.2. Preparasi Protein Target

Preparasi protein target dilakukan pada langsung melalui laman GNINA pada *google collaboration*. Protein yang ingin digunakan dipilih pada laman Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>). GNINA dapat dibuka pada laman <https://github.com/gnina/gnina> lalu pilih “here”. Terdapat dua pilihan dalam

penggunaan protein pada GNINA, yaitu protein yang disediakan oleh Protein Data Bank atau protein selain dari Protein Data Bank. Pada GNINA, url “<http://files.rcsb.org/download/3ERK.pdb>” diganti dengan url yang didapatkan dari Protein Data Bank. Kemudian dilakukan *running* dengan mengklik tombol *run away* (Gambar 3.1).



```
Copy of gnina.ipynb ☆
File Edit View Insert Runtime Tools Help Last edited on July 21
+ Code + Text
!wget http://files.rcsb.org/download/3ERK.pdb
--2023-07-20 21:15:26-- http://files.rcsb.org/download/3ERK.pdb
Resolving files.rcsb.org (files.rcsb.org)... 128.6.158.70
Connecting to files.rcsb.org (files.rcsb.org)|128.6.158.70|:80... connected.
HTTP request sent, awaiting response... 200 OK
Length: unspecified [application/octet-stream]
Saving to: '3ERK.pdb'

3ERK.pdb          [ <=>          ] 270.37K  --.-KB/s  in 0.08s

2023-07-20 21:15:27 (3.45 MB/s) - '3ERK.pdb' saved [276858]
```

Gambar 3. 1. Persiapan Protein Data Bank

Langkah selanjutnya adalah menghilangkan atom atau molekul residu air dan molekul yang tidak diperlukan pada protein dengan cara mengganti coding “`!grep ATOM 3ERK.pdb > rec.pdb`” menjadi kode protein yang digunakan (3ERK menunjukkan kode protein yang didapatkan dari laman Protein Data Bank). Selanjutnya dilakukan *running* dengan menekan tombol *run away* (Gambar 3.2).



```
!grep ATOM 3ERK.pdb > rec.pdb
```

Gambar 3. 2. Penghilangan Atom Pada Protein Reseptor

Keterangan gambar: `rec.pdb` merupakan format nama reseptor dari *protein data bank* yang telah dibersihkan oleh GNINA, format nama ini bisa disesuaikan.

### 3.3.4.3. Pemisahan *Native Ligand*

Pemisahan *native ligand* dari protein reseptor diperlukan untuk tahapan *redocking*. Pemisahan dilakukan dengan cara mengganti “`!grep SB4 3ERK.pdb > lig.pdb`” sesuai dengan kode *native ligand* yang ada pada protein reseptor (Gambar 3.3) dan dilakukan *running* dengan menekan tombol *run away*.



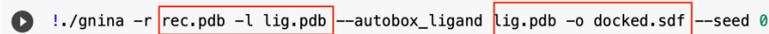
```
!grep SB4 3ERK.pdb > lig.pdb
```

Gambar 3. 3. Pemisahan Native Ligand dengan Protein Reseptor

Keterangan gambar: lig.pdb merupakan format nama *native ligand* dari *protein data bank* yang telah dibersihkan oleh Gnina, format nama ini bisa disesuaikan. SB4 merupakan kode nama *native ligand*.

#### 3.3.4.4. Simulasi *Molecular Docking* menggunakan GNINA

Pada tahap selanjutnya adalah melakukan *molecular docking* untuk senyawa ikan sidat dengan protein terpilih dan *redocking native ligand* dengan protein terpilih. *Redocking native ligand* dilakukan dengan cara menginput hasil dari pemisahan *native ligand* dengan format pdb dan protein yang telah dibersihkan atomnya dengan format pdb pada coding “!./gnina -r rec.pdb -l lig.pdb --autobox\_ligand lig.pdb -o docked.sdf --seed 0” lalu dipilih tombol *run away* untuk melakukan proses *running* (Gambar 3.4).



```
!./gnina -r rec.pdb -l lig.pdb --autobox_ligand lig.pdb -o docked.sdf --seed 0
```

Gambar 3. 4. Redocking Native Ligand dengan Protein Reseptor

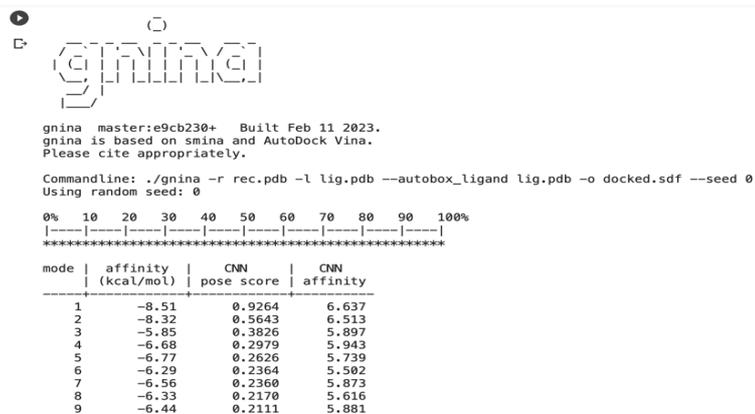
Keterangan Gambar: Hasil redocking disimpan dalam bentuk format file sdf. docked.sdf merupakan format file hasil redocking

Ligan dari senyawa yang telah dipreparasi kemudian diunggah pada laman GNINA. *Molecular docking* untuk ligan yang berasal dari senyawa ikan sidat dilakukan dengan cara mengganti lig.pdb menjadi nama ligan sesuai dengan file ligan yang telah diunggah, contoh “!./gnina -r rec.pdb -l lig.pdb --autobox\_ligand lig.pdb -o docked.sdf --seed 0” menjadi “!./gnina -r rec.pdb -l Docosahexaenoic\_acid.pdb --autobox\_ligand Docosahexaenoic\_acid\_mini.pdb -o docked\_Docosahexaenoic\_acid\_mini.sdf --seed 0”. Hasil *docking* akan ditampilkan dalam bentuk tabel yang berisi Sembilan kemungkinan posisi ligan dalam protein resptor dengan nilai afinitasnya (Gambar 3.5). Kemudian dilakukan analisis skor *redocking* menggunakan PyMol yang terdapat pada GNINA berupa

Lathifah Halim Purnama Sari, 2023

*PENDEKATAN NETWORK PHARMACOLOGY UNTUK MENGIDENTIFIKASI MEKANISME DAN TARGET MOLEKUL DARI IKAN SIDAT (Anguilla bicolor bicolor) SEBAGAI ANTI ALZHEIMER SECARA IN SILICO*  
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

nilai RMSD atau *Root Mean Square Deviation (RMSD)*. Nilai RMSD yang lebih kecil dari 2Å menunjukkan bahwa prosedur *redocking* akurat (Tallei et al., 2022).



```

gnina master:e9cb230+ Built Feb 11 2023.
gnina is based on smina and AutoDock Vina.
Please cite appropriately.

CommandLine: ./gnina -r rec.pdb -l lig.pdb --autobox_ligand lig.pdb -o docked.sdf --seed 0
Using random seed: 0

0% 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100%
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
*****

mode | affinity | CNN | CNN
(kcal/mol) | pose score | affinity
-----|-----|-----|-----
1 | -8.51 | 0.9264 | 6.637
2 | -8.32 | 0.5643 | 6.513
3 | -5.85 | 0.3826 | 5.897
4 | -6.68 | 0.2979 | 5.943
5 | -6.77 | 0.2626 | 5.739
6 | -6.29 | 0.2364 | 5.502
7 | -6.56 | 0.2360 | 5.873
8 | -6.33 | 0.2170 | 5.616
9 | -6.44 | 0.2111 | 5.881

```

Gambar 3. 5. Contoh Hasil *Docking*

### 3.3.4.5. Analisis *Docking Score* dan Interaksi Molekular

Hasil *docking* dianalisis menggunakan PyMol dan LigPlot+ dan untuk mengetahui interaksi dan residu asam amino. Pada aplikasi PyMol digunakan untuk mengubah format pdb pada interaksi ligan-reseptor menjadi pdbqt. File pdbqt antara ligan-reseptor kemudian divisualisasikan menggunakan LigPlot+ untuk melihat jenis ikatan dan residu asam amino dalam bentuk dua dimensi.

## 3.4. Analisis Data

Analisis data tiap langkah metode menggunakan parameter sebagai berikut (Tabel 3.3).

Tabel 3. 3. Matriks Penelitian

No	Kegiatan	Parameter
1	Prediksi Sifat Farmakokinetik dan Toksisitas Senyawa	Golongan toksisitas kelas V-VI agar kemungkinan toksik untuk tubuh kecil
2	Prediksi Target Senyawa dalam Mencegah Penyakit Alzheimer	Pa> Pi
3	Skrining <i>intersection</i> gen protein target	Didapatkan gen protein target yang terlibat dalam Alzheimer
4	Konstruksi dan Analisis <i>Protein-Protein Interaction (PPI)</i>	Terbentuk interaksi antar protein

Lathifah Halim Purnama Sari, 2023

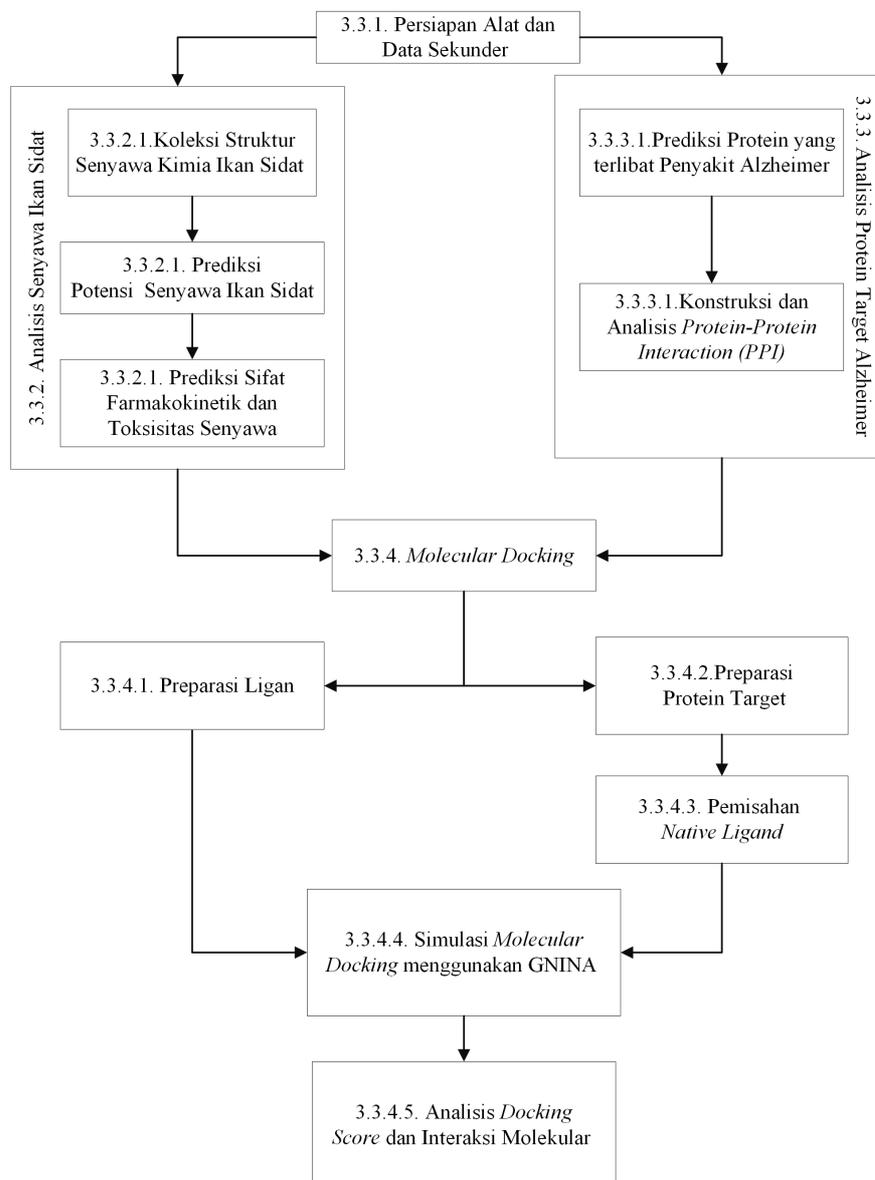
**PENDEKATAN NETWORK PHARMACOLOGY UNTUK MENGIDENTIFIKASI MEKANISME DAN TARGET MOLEKUL DARI IKAN SIDAT (*Anguilla bicolor bicolor*) SEBAGAI ANTI ALZHEIMER SECARA IN SILICO**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

No	Kegiatan	Parameter
5	Analisis Target Senyawa dengan Patologi Penyakit Alzheimer	Tervisualisasi data untuk membandingkan tingkat ekspresi gen
6	<i>Molecular Docking</i>	<i>Binding Affinity</i> negatif Terbentuk residu asam amino

### 3.5. Alur Penelitian

Berikut merupakan alur penelitian yang digunakan dalam penelitian ini seperti yang dijelaskan sebelumnya pada prosedur penelitian (Gambar 3.1).



Gambar 3. 6. Alur Penelitian

Lathifah Halim Purnama Sari, 2023

***PENDEKATAN NETWORK PHARMACOLOGY UNTUK MENGIDENTIFIKASI MEKANISME DAN TARGET MOLEKUL DARI IKAN SIDAT (*Anguilla bicolor bicolor*) SEBAGAI ANTI ALZHEIMER SECARA IN SILICO***

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu