

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan menggunakan sistem dalam jaringan (daring) yang dilakukan di tempat tinggal peneliti di Kabupaten Bandung, Jawa Barat. Waktu penelitian dimulai bulan Februari sampai Mei 2020.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada uji *in silico* berupa laptop dengan prosesor Intel Core i3, Windows 10 64-bit sebagai sistem operasi dan perangkat lunak yang terdiri atas AutoDock Tools, PyMol, Open Babel GUI, MOPAC 2016, AutoDock Vina, dan Discovery Studio 2020.

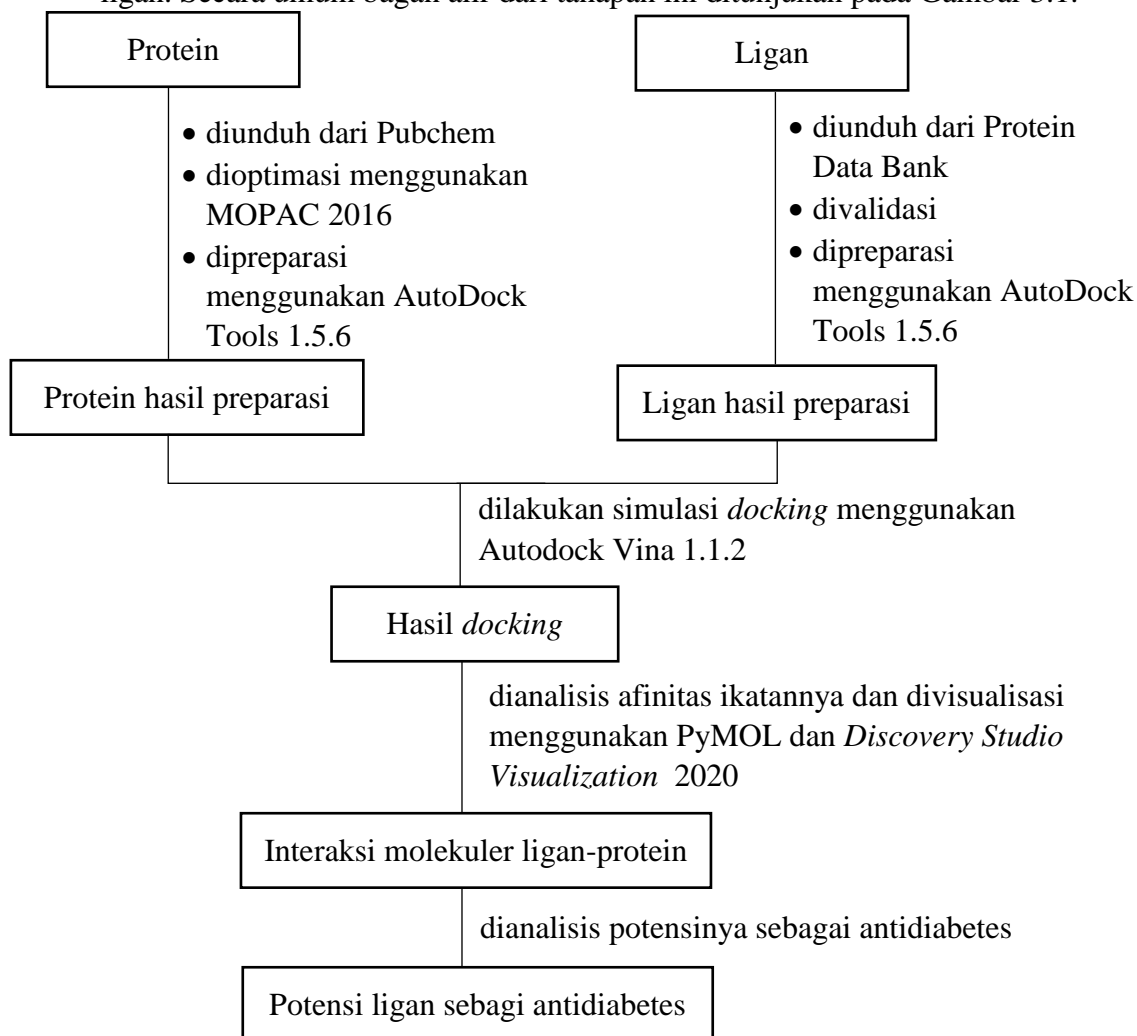
3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada uji *in silico* adalah struktur kristal yang diunduh dari <https://www.rcsb.org/> dengan PDB ID 1XH0 untuk α -amilase, 2QMJ untuk α -glukosidase, 3KWF untuk dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV), dan 2BHL untuk glukosa-6-fosfat dehidrogenase (G6PD). Adapun struktur senyawa akarbosa dengan ID 41774, linagliptin dengan ID 10096344, polidatin dengan ID 5281718, feofitin dengan ID 135398712, β -karoten dengan ID 5280489, zeaxanthin dengan ID 5280899, dan fikosianobilin dengan ID 5460417 diunduh melalui <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

3.3 Prosedur Penelitian

Secara umum, penelitian ini terdiri atas beberapa tahap, yaitu: (1) Preparasi ligan; (2) Preparasi protein; (3) Validasi metode *docking*; (4) *Docking* ligan-protein menggunakan AutoDock Vina 1.1.2; (5) Visualisasi interaksi molekuler dan analisis hasil *docking* menggunakan Discovery Studio Visualization 2020. Hasil

visualisasi docking digunakan untuk memprediksi interaksi antara protein dan ligan. Secara umum bagan alir dari tahapan ini ditunjukkan pada Gambar 3.1.

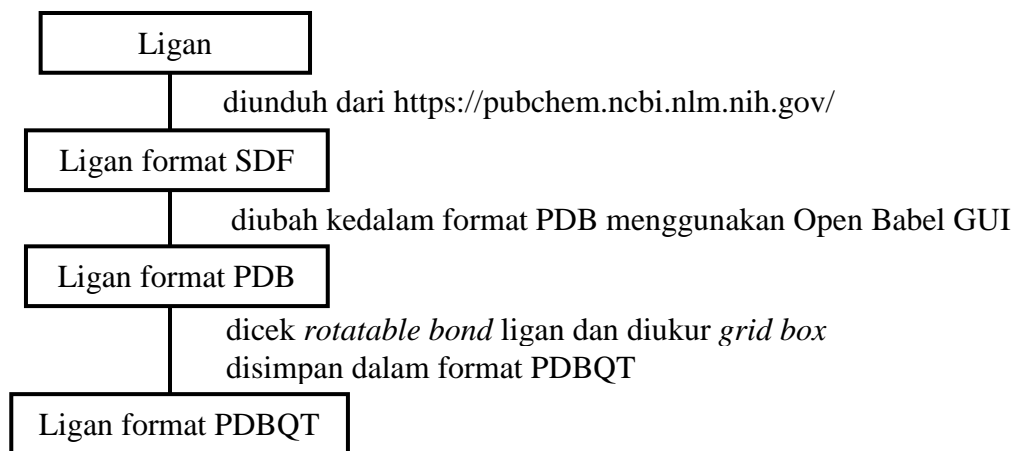


Gambar 3.1 Bagan alir uji *in silico*

3.3.1 Preparasi Ligan

Struktur ligan yang digunakan diantaranya akarbosa, linagliptin, dan polidatin masing-masing sebagai kontrol positif dari keempat enzim, serta pigmen feofitin, β -karoten, zeaxanthin dan fikosianobilin diunduh dari laman <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> dengan format .sdf diunduh kemudian diubah formatnya kedalam bentuk .mop menggunakan perangkat lunak Open Babel GUI untuk dioptimasi menggunakan MOPAC 2016. Struktur yang telah teroptimasi dengan format .out diubah menjadi format .PDB menggunakan Open Babel GUI menyesuaikan format yang diproses dalam AutodockTools 1.5.6. Preparasi ligan

dilakukan dengan mengatur rotasi ligan. Tahapan preparasi ligan ditunjukkan pada Gambar 3.2.

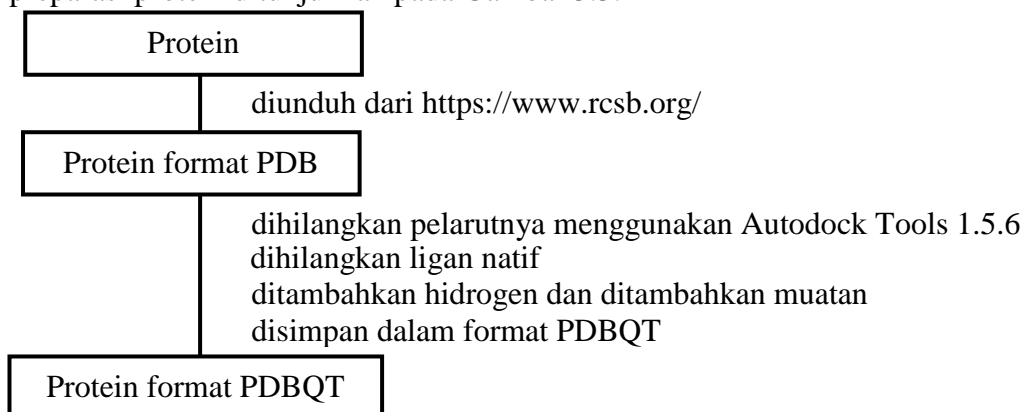


Gambar 3.2 Bagan alir preparasi ligan

3.3.2 Preparasi Protein

Protein yang digunakan dalam penelitian ini yaitu enzim α -amilase, α -glukosidase, dipeptidil peptidase (DPP-IV), dan glukosa-6-fosfat dehydrogenase (G6PD) dengan format .PDB yang diunduh dari *Protein Data Bank* (PDB) pada laman <https://www.rcsb.org/> (Rose *et al.*, 2013). Preparasi protein dilakukan menggunakan AutodockTools 1.5.6 dengan menghilangkan pelarut yang terdapat pada struktur protein. Protein-protein dilakukan penghilangan pelarut supaya selanjutnya dapat dilakukan simulasi *molecular docking* (Baspinar *et al.*, 2014; Tuncbag *et al.*, 2011). Protein yang telah dihilangkan pelarutnya ditambahkan hidrogen dan muatan untuk mencegah bias terhadap konfigurasi ligan (Bianco *et al.*, 2016). Molekul lain yang berikatan dan tidak dibutuhkan dalam proses *docking* dihilangkan, sehingga hanya bagian rantai protein yang akan digunakan. Protein

yang sudah dipreparasi kemudian disimpan dalam format .PDBQT. Tahapan preparasi protein ditunjukkan pada Gambar 3.3.



Gambar 3.3 Bagan alir preparasi protein

3.3.3 Validasi Metode *Docking*

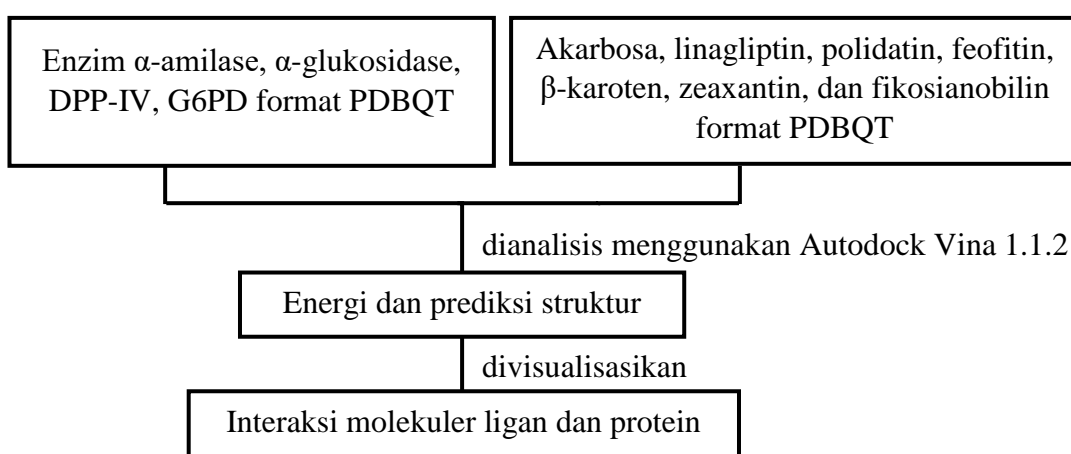
Metode validasi yang digunakan untuk proses *docking* adalah *redocking* dengan *pose selection* yang dilakukan pada bagian sisi aktif reseptor yang berikatan dengan ligan (Kontoyianni *et al.*, 2004). Validasi protocol *docking* bertujuan untuk memverifikasi realibilitas simulasi (Munawaroh *et al.*, 2020). Validasi ini dilakukan dengan cara memisahkan ligan natif yang terikat pada reseptor, kemudian dilakukan *redocking* untuk menentukan nilai *root mean square deviation* (RMSD) dan memastikan konformasi inhibitor serta energi ikat yang diprediksi (Deepa *et al.*, 2010). Metode penambatan dikatakan valid apabila nilai RMSD dibawah 2Å (Bajda *et al.*, 2013). Pada proses *redocking* dilakukan penentuan posisi situs penambatan yang diatur sesuai dengan posisi dan ukuran ligan uji. Posisi penambatan (*grid box*) yang telah diatur sesuai dengan posisi dan ukuran ligan kemudian disimpan dalam *note* dengan format .txt untuk simulasi *docking* dan hasil preparasi disimpan dalam format PDBQT. Koordinat *grid box* situs penambatan reseptor (protein) berdasarkan hasil validasi ditunjukkan pada Tabel 3.1

Tabel 3.1
Koordinat *grid box* pada *molecular docking*

Reseptor	Koordinat (Å)			Ukuran (Å)			RMSD (Å)
	X	Y	Z	X	Y	Z	
α-amilase	7.033	15.159	39.944	26	24	26	1.145
α-glukosidase	-21.727	-6.323	-5.281	22	20	26	0.467
DPP-IV	46.499	51.555	34.033	38	38	40	1.543
G6PD	1.233	124.127	11.208	24	24	24	1.778

3.3.4 Docking Ligan-Protein

Ligan dan protein hasil preparasi dilakukan *docking* ligan-protein menggunakan Autodock Vina. Posisi *grid box* enzim yang telah disimpan dalam *note* digunakan dalam proses *docking* sesuai dengan nama reseptor (protein) dan ligan uji yang akan diproses. Proses *molecular docking* ligan-protein melibatkan *command prompt* atau perintah komputer (Morris *et al.*, 2009; Trott & Olson, 2009). Parameter kestabilan yang ditentukan adalah energi bebas Gibbs dan interaksi kimia yang terbentuk. Tahapan *molecular docking* ligan-protein ditunjukkan oleh Gambar 3.5.



Gambar 3.5 Bagan alir *molecular docking* ligan-protein

3.3.5 Visualisasi Interaksi Molekuler dan Analisis Hasil Docking

Visualisasi penting untuk mendalami dan memahami struktur suatu molekul (Delano & Bromberg, 2004). Visualisasi dari ligan dan reseptor divisualisasikan menggunakan perangkat lunak Discovery Studio Visualization 2020. Hasil visualisasi akan memperlihatkan jenis ikatan, panjang ikatan hidrogen dengan klasifikasi jarak ikatan hidrogen yang ditunjukkan pada Tabel 3.2, atom pada ligan yang berikatan dengan reseptor (protein), dan melihat interaksi residu-residu asam amino antara ligan dengan reseptor (protein).

Tabel 3.2
Klasifikasi Jarak Ikatan Hidrogen (Guedes *et al.*, 2014)

No.	Jarak (Å)	Keterangan
1.	2.2-2.5	Kuat
2.	2.5-3.2	Moderat dan elektrostatik
3.	3.2-4.0	Lemah