

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Februari sampai Mei 2020. Penelitian dilakukan di Laboratorim Riset Departemen Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI), serta melalui sistem dalam jaringan (*daring*) menggunakan software Molekuler *docking*.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian (Molekuler *docking*) ini adalah perangkat keras berupa Laptop *Lenovo ideapad320* 14” dengan spesifikasi sebagai berikut: *AMD 7th gen APU A9-9420/AMD 7th Gen APU A12-9720P, RAM 4GB, Windows 7 32-bit* sebagai sistem operasi sedangkan perangkat lunak yang digunakan adalah *AutoDock Vina, Babel GUI, Chimera 1.13.1, DSV (Discovery studio visual)*, dan *PyMoL*.

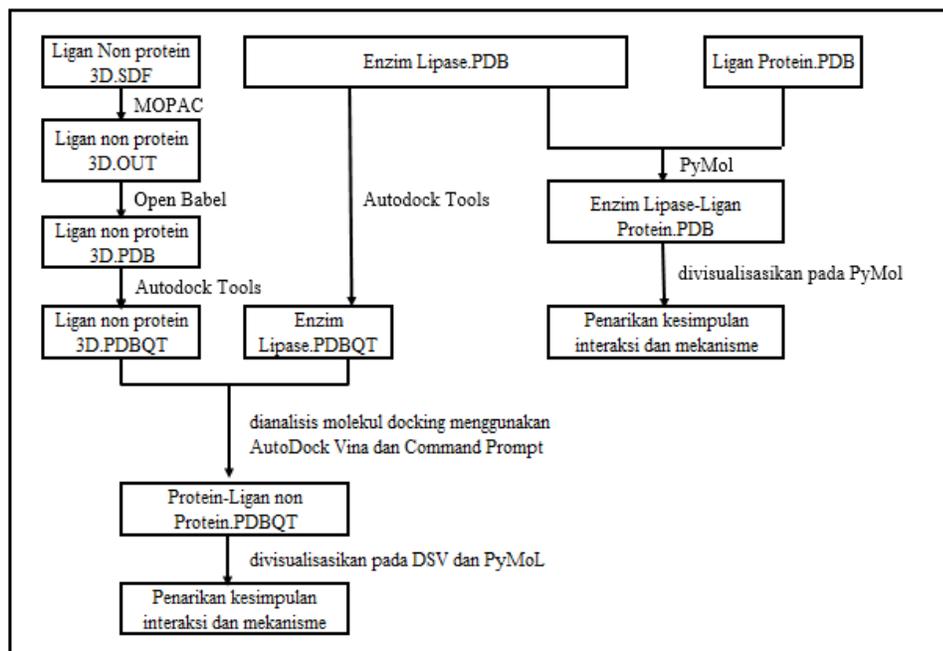
3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada studi *in silico* molekuler *docking* adalah sebagai berikut: Pigmen *S. platensis* dan *C. vulgaris* yang digunakan diunduh dari website pubchem.ncbi.nlm.nih.gov dalam bentuk 3D pigmen tersebut diantaranya pigmen turunan karotenoid adalah astaxantin, β -karoten, cantaxantin, fukoxantin, kriptoxantin, lutein, violaxantin, dan zeaxantin. Untuk pigmen turunan fikobilin adalah fikosianobilin dan fikoeritrobilin. Untuk turunan klorofil adalah feofitin a. Diunduh dengan format *.SDF*. kemudian ligan diubah format menjadi *.pdbqt*. Protein lipase

diperoleh dari website www.rcsb.org ialah lipase kode PDB 1R4Z dengan inhibitorynya memiliki resolusi 1.8Å dengan klasifikasi *hydrolase* yang berasal dari organisme *Bacillus subtilis*. Sedangkan untuk pigmen fikosianin didownload dengan kode 1GH0. Kemudian didownload dengan format pdb, protein dibuat formatnya menjadi protein.pdbqt. Pembentukan ligan untuk direaksikan dengan protein dilakukan dengan menggunakan aplikasi command prompt. Analisis ikatan yang terbentuk menggunakan aplikasi PyMoL disimpan dalam bentuk format pdb dan sedangkan untuk melihat visualisasi 2D dan 3D interaksi antara residu asam amino dengan ligan dapat menggunakan DSV.

3.3 Prosedur Penelitian

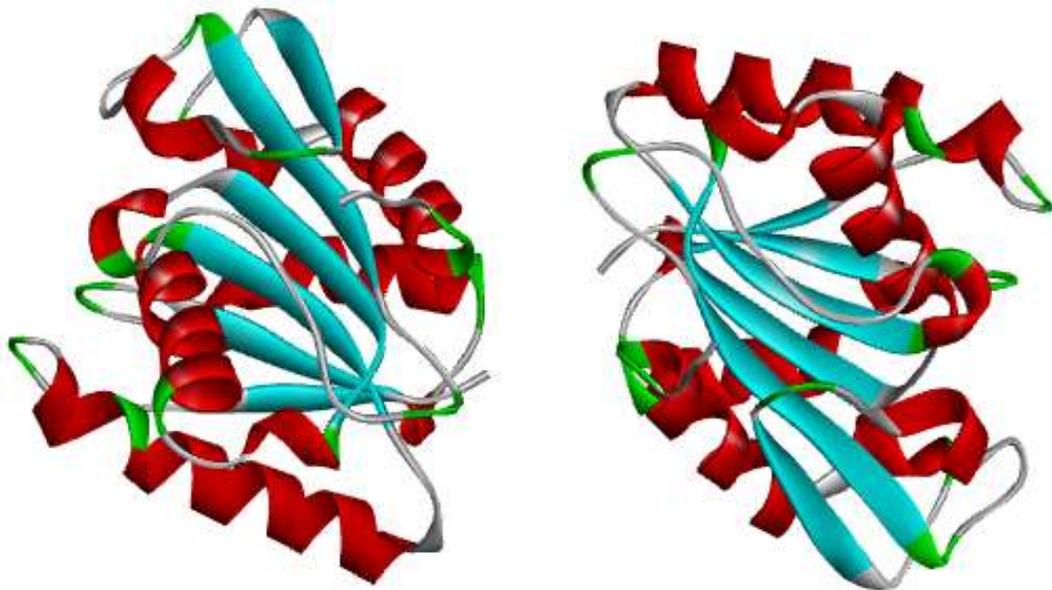
Penelitian ini dilakukan secara *in silico* dengan menggunakan molekuler *docking*. Masing-masing pigmen diuji aktivitas membentuk ikatan dengan lipase. Pada studi *in silico* terdapat beberapa tahapan yang diantaranya: preparasi protein, preparasi ligan, validasi *docking*, dan analisis mekanisme inhibisi serta analisis interaksi molekuler. Secara garis besar metode *docking* dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3. 1 Bagan Alir secara Keseluruhan

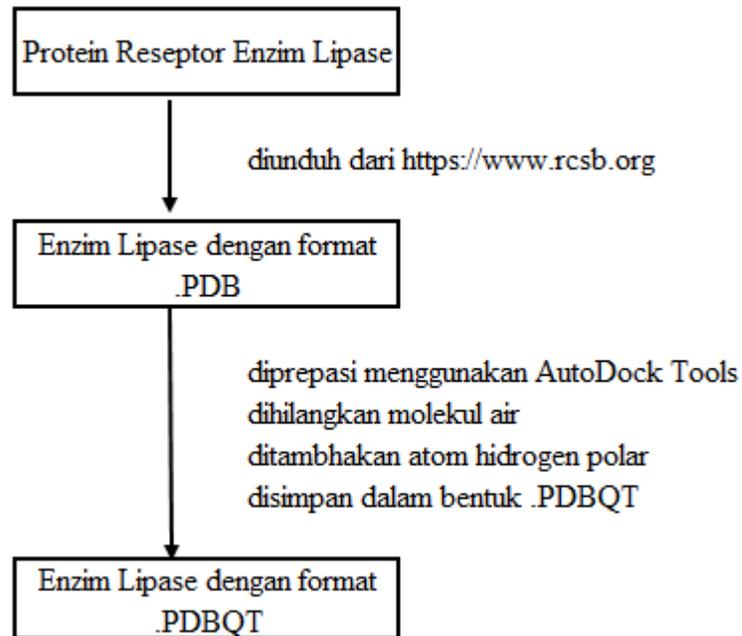
3.3.1 Preparasi Protein

Preparasi protein dilakukan dengan menghilangkan semua molekul air, heteroatom, kristal pelarut, dan ligan. Pada file pdb hidrogen menghilang sehingga dilakukan penambahan atom hidrogen polar dan *Gasteiger charge* ditambahkan pada struktur menggunakan AutoDock Tools (Versi 1.5.6) (Khedidja *et al.*, 2018) dengan mengklik Read Molecul>Edit>Delete Water>Add atom Hidrogen(only polar)>Add Gasteiger charger>Select rantai AB>Unselect ligan lainnya>Makromolekul>Choose>klikreseptor>Ok>save.pdbqt. Penambahan atom hidrogen polar ditambahkan kedalam reseptor (Seeliger & De Groot, 2010). Visualisasi reseptor hasil preparasi dapat dilihat pada Gambar 3.2



Gambar 3. 2 Visualisasi 3D Lipase sebagai Reseptor

Adapun alur preparasi proteinnya ditunjukkan pada Gambar 3.3



Gambar 3. 3 Bagan Alir Proses Preparasi Lipase

3.3.1.1 Validasi Metode Molekuler *Docking*

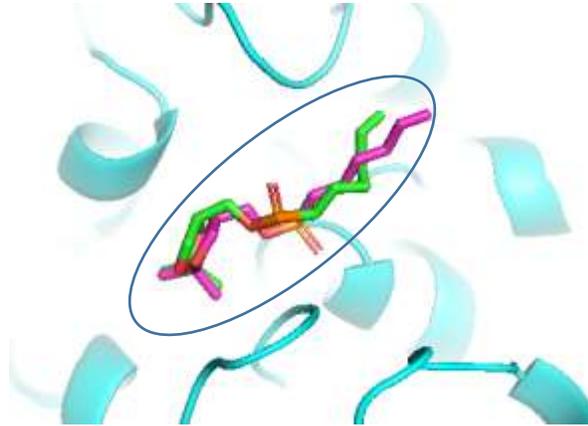
Validasi penambatan dilakukan dengan cara yang biasa dilakukan ialah dengan *mendocking* kembali struktur co-kristal *native* ligan pada sisi aktif seyawa dengan konformasi yang telah diketahui. Ligan *native* lipase 1r4z bertindak sebagai inhibitor dan ligan tersebut adalah *[(4r)-2, 2-dimethyl-1, 3-dioxolan-4-yl] methyl* (Ni *et al.*, 2011). Hal ini dilakukan untuk mendapatkan nilai RMSD yang digunakan sebagai dasar akurasi untuk memprediksi posisi *docking* kemudian penentuan pose dikatakan benar jika memiliki nilai RMSD $<2.0\text{\AA}$. Konformasi *docking* dari setiap ligan dikelompokkan dengan basis RMSD dan perolehan nilai energi bebas pengikatan. Peringkat utama dari konformasi yang divisualisasikan pada PyMoL dan dianalisis. Jika nilai RMSD sudah didapatkan $<2.0\text{\AA}$ maka menandakan posisi dan orientasi yang dipilih ligan memiliki akurasi yang baik (Ni *et al.*, 2011). Validasi protokol *docking*

Intan Sulistyani, 2020

KAJIAN POTENSI PIGMEN *Chlorella vulgaris* DAN *Spirulina platensis* SEBAGAI INHIBITOR LIPASE DALAM APLIKASINYA SEBAGAI ANTI JERAWAT BERDASARKAN STUDI MOLEKULER *DOCKING*

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

bertujuan untuk memverifikasi reabilitas simulasi *docking* (Munawaroh *et al*, 2020). Visualisasi posisi *native* ligan *didocking* kembali dapat dilihat pada Gambar 3.4.



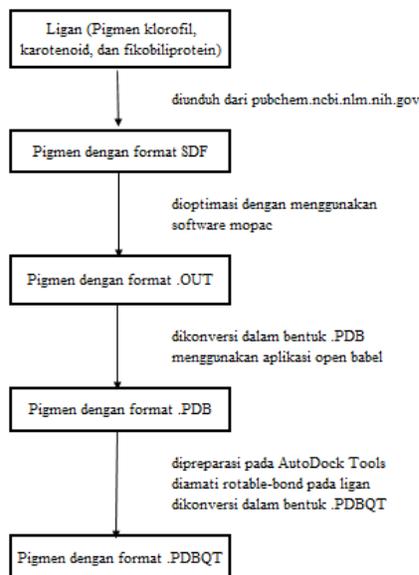
Gambar 3. 4 Visualisasi Hasil Validasi RMSD *Re-docking* Ligan Nativ pada Sisi Aktif Lipase.

Keterangan: warna biru merupakan enzim lipase, struktur hijau merupakan hasil *re-docking*, dan struktur warna ungu merupakan ligan nativ

3.3.2 Preparasi Ligan

a. Ligan Non Protein

Senyawa antijerawat komersial (klindamisin, tetrasiklin, eritromisin) dan pigmen mikroalga *C. vulgaris* dan *S. platensis* yaitu feofitin a, fikosianobilin, fikoeritrobin, astaxanthin, β -karoten, cantaxantin kriptoxantin, lutein, violaxantin, dan zeaxantin diunduh dari Website PubChem pada laman pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. Pengunduhan dilakukan dengan struktur 3D dengan format SDF. Kemudian struktur SDF tersebut dioptimasi menggunakan Mopac dan dipreparasi pada aplikasi Babel GUI dan didapatkan format .pdb. Format .pdb tersebut diubah dalam AutoDock Tools dengan mengklik Ligan>input>Choose kemudian format akan menjadi .pdbqt sehingga ligan siap untuk dianalisis interaksinya dengan pigmen lipase. Bagan alir proses preparasi ligan non protein dapat dilihat pada Gambar 3.5.



Gambar 3. 5 Bagan Alir Proses Preparasi Ligan

b. Ligan Protein

Ligan protein yang digunakan adalah fikosianin yang diunduh dari website www.rscb.org. Ligan tersebut diunduh dengan format .pdb dan dilakukan interaksi molekuler *docking* menggunakan website www.cosbi.ku.edu.tr/prism/. Ligan protein dilakukan analisis molekuler *docking* tanpa dipreparasi terlebih dahulu.

3.3.3 Preparasi Simulasi Molekuler *Docking*

Molekuler *docking* dilakukan menggunakan AutoDock Vina (Trott & Olson, 2009). Data lipase, data pigmen-pigmen yang digunakan dan telah dipreparasi digunakan sebagai input dalam aplikasi. Lokasi penambatan disesuaikan dengan inhibitor atau *native* ligan dengan mengklik Grid>set map>Type>Choose Ligan, kemudian pilih *Grid Box*>Center>Center on Ligand. Lokasi penambatan (*grid box*) disesuaikan dengan ukuran ligan *native*. Pengaturan *grid box* dilakukan dengan menggunakan ligan *native* sebagai posisi tengah dari *grid box*nya. Kemudian diatur ukuran *grid box* yang akan digunakan disesuaikan dengan ukuran ligan *native* dan ligan

Intan Sulistyani, 2020

KAJIAN POTENSI PIGMEN *Chlorella vulgaris* DAN *Spirulina platensis* SEBAGAI INHIBITOR LIPASE DALAM APLIKASINYA SEBAGAI ANTI JERAWAT BERDASARKAN STUDI MOLEKULER *DOCKING*

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

yang akan di ujikan terhadap reseptor. Dari *native* ligan reseptor ditentukan nilai *grid box*, yaitu 20 x 26 x 28 dengan *grid point* dan posisi tengah *native* ligan adalah (x = -19.432; y = 18.716; z = 24.014) sedangkan untuk nilai *spacing* ditentukan sebesar 1Å.

3.3.3.1 Simulasi Molekuler Docking

Analisis penambatan molekul dilakukan menggunakan AutoDock Vina pada AutoDock Tools dengan *Command prompt*: `vina -config conf.txt -log log.txt`. Hasil penambatan akan didapatkan dalam bentuk prediksi struktur dan nilai energi gibbs (-). Afinitas pengikatan molekul dikatakan bagus apabila energi bebas gibbs pigmen lebih rendah atau memiliki nilai afinitas pengikatan yang besar (-) (Trott & Olson, 2009) jika dibandingkan dengan energi bebas gibbs antibiotik komersial.

3.3.4 Visualisasi Molekuler

Visualisasi molekuler yang terbentuk dilakukan dengan perangkat lunak PyMoL dan DSV. Visualisasi yang terbentuk dapat diamati dengan mengklik *surface*. Gambar yang terbentuk disimpan dalam bentuk format .PNG. Dalam pengamatan ini data yang diamati ialah posisi interaksi ligan dengan lipase, sehingga letak dan interaksinya dapat dianalisis. Selain itu pengamatan interaksi antara asam amino lipase dengan ligan dapat divisualisasikan dalam bentuk 2D maupun 3D pada DSV. Interaksi yang teramati pada DSV meliputi gaya Van der Waals, Ikatan hidrogen, dan Interaksi hidrofobik. Kategori interaksi hidrogen yang terbentuk berdasarkan jarak dapat dilihat pada Tabel 3.1

Tabel 3. 1

Kategori Kekuatan Hidrogen yang Terbentuk.

(Guedes *et al.*, 2014)

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

3.3.5 Analisis Interaksi Molekuler

Analisis interaksi dilakukan menggunakan *Discovery Studio Visualizer* (DSV). Data yang digunakan untuk analisis intermolekuler terhadap ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan gaya Van der Waals. Parameter yang diamati ialah jumlah ikatan hidrogen, jarak ikatan hidrogen yang terbentuk, residu asam amino, interaksi hidrofobik, dan gaya Van der Waals yang terbentuk dari hasil *docking* ligan dengan residu asam amino pada lipase.

3.3.6 Analisis Jenis Inhibisi Pigmen

Analisis jenis inhibisi yang terbentuk dilakukan dengan melihat interaksi yang terlibat antara ligan residu katalitik lipase *Bacillus subtilis* yaitu Ser77, Asp133, dan His156 (Hu *et al.*, 2015). Ligan yang berinteraksi ikatan hidrogen atau interaksi hidrofobik dengan residu katalitik merupakan ligan yang bertindak sebagai inhibitor kompetitif sedangkan ligan yang tidak merupakan inhibitor non kompetitif (Benarous *et al.*, 2015).