

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai dari bulan Februari sampai bulan Agustus 2020. Penelitian bertempat di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Kimia, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI) dan secara *daring* dari tempat tinggal peneliti di kota Batam, Kepulauan Riau.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Perangkat yang digunakan dalam penelitian ini adalah perangkat keras berupa satu set *notebook* dengan spesifikasi: *Processor* tipe Intel® Core™ i5-4300U 2,49 GHz, *RAM* 8 GB dan *harddisk* 238,47 GB. Penelitian ini turut menggunakan perangkat lunak sistem operasi *Windows™ Professional*, *OpenBabel GUI 2.4.1.*, *MOPAC 2016*, *BIOVIA Discovery Studio Visualizer (DSV) 20.1.0.*, *MGL Tools* (meliputi *Autodock Vina*, *Autodock Tools 1.5.6*, dan *Python 2.7.15*), *Pymol® 2.2.3*, dan *Protein Interactions by Structural Matching (PRISM)*.

3.2.2 Bahan

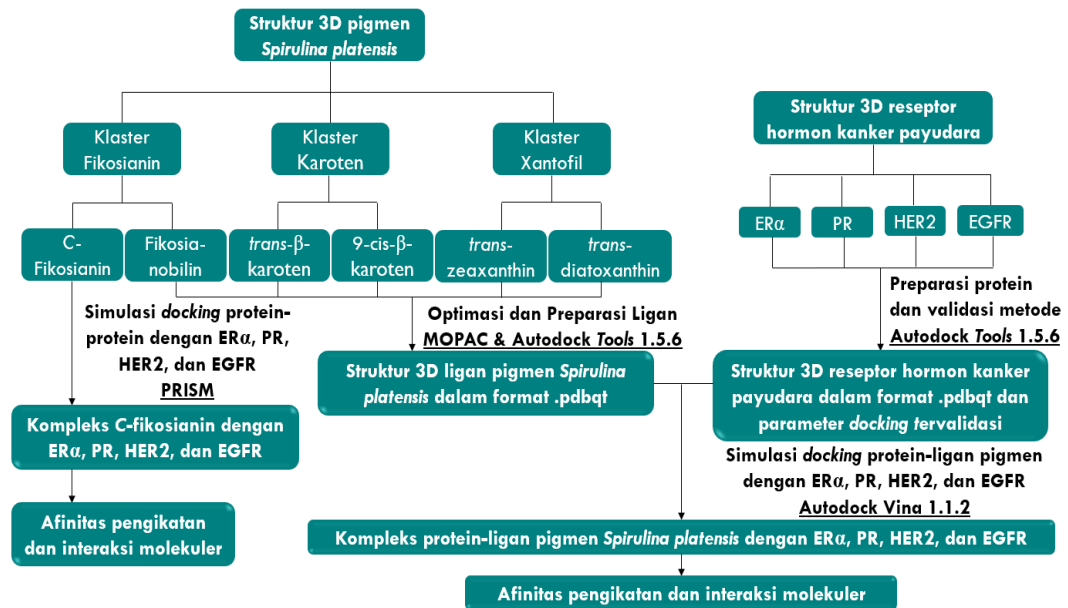
Penelitian ini menggunakan struktur senyawa *C*-fikosianin, fikosianobilin, *trans*- β -karoten, *9-cis*- β -karoten, *trans*-zeaxanthin, *trans*-diatoxanthin, dan reseptor hormon kanker payudara. Kontrol positif untuk aktivitas antikanker payudara menggunakan struktur senyawa obat komersial yang umum digunakan dalam terapi kanker payudara, yaitu: tamoxifen; paclitaxel; dan docetaxel. Struktur tiga dimensi (3D) fikosianobilin, *trans*- β -karoten, *9-cis*- β -karoten, *trans*-zeaxanthin, *trans*-diatoxanthin, tamoxifen, paclitaxel, dan docetaxel diperoleh dari PubChem (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov), sedangkan struktur terkrystalisasi protein *C*-fikosianin dan reseptor hormon kanker payudara ER α , PR, HER2, dan EGFR diperoleh dari *Protein Data Bank (PDB)*. Sumber data struktur senyawa kimia dan protein yang digunakan dalam penelitian ini tertera pada **Tabel 3.1**.

Tabel 3.1.
Sumber data struktur senyawa kimia.

| Senyawa Kimia | Sumber |
|---|-----------------------|
| Fikosianobilin | PubChem CID: 5460417 |
| C-fikosianin | PDB ID: 1GH0 |
| <i>trans</i> - β -karoten | PubChem CID: 5280489 |
| 9- <i>cis</i> - β -karoten | PubChem CID: 12085802 |
| <i>trans</i> -zeaxanthin | PubChem CID: 5280899 |
| <i>trans</i> -diatoxanthin | PubChem CID: 6440986 |
| Tamoxifen | PubChem CID: 2733526 |
| Paclitaxel | PubChem CID: 36314 |
| Docetaxel trihidrat | PubChem CID: 148123 |
| Reseptor estrogen alfa (<i>estrogen receptor alpha</i> , ER α) | PDB ID: 3ERT |
| Reseptor progesteron (<i>progesteron receptor</i> , PR) | PDB ID: 3D90 |
| Reseptor faktor pertumbuhan epidermal manusia (<i>Human epidermal growth factor receptor</i> , HER2) | PDB ID: 3PP0 |
| Reseptor faktor pertumbuhan epidermal (<i>Epidermal growth factor receptor</i> , EGFR) | PDB ID: 2J6M |

3.3 Prosedur Penelitian

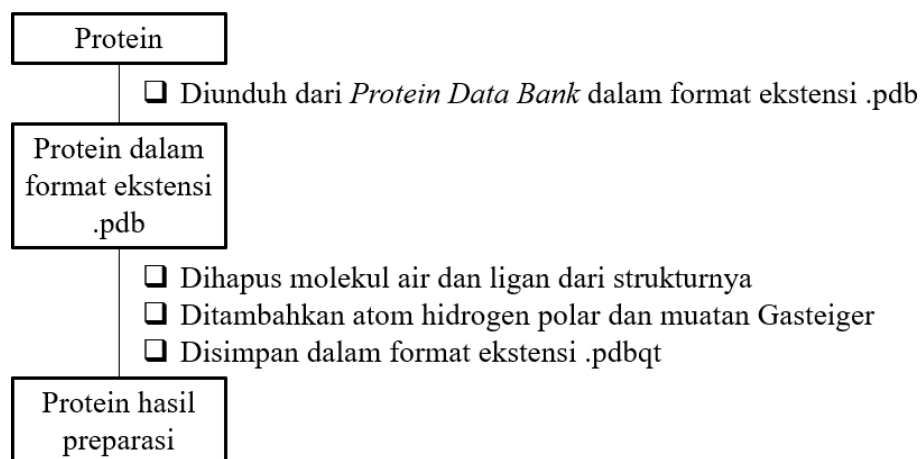
Penelitian ini terdiri atas lima tahapan penelitian utama, yaitu: (1) preparasi protein; (2) validasi metode *docking*; (3) preparasi ligan; (4) simulasi *docking* protein-ligan; (5) simulasi *docking* protein-protein. Alur penelitian divisualisasikan pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1. Alur penelitian.

3.3.1 Preparasi Protein

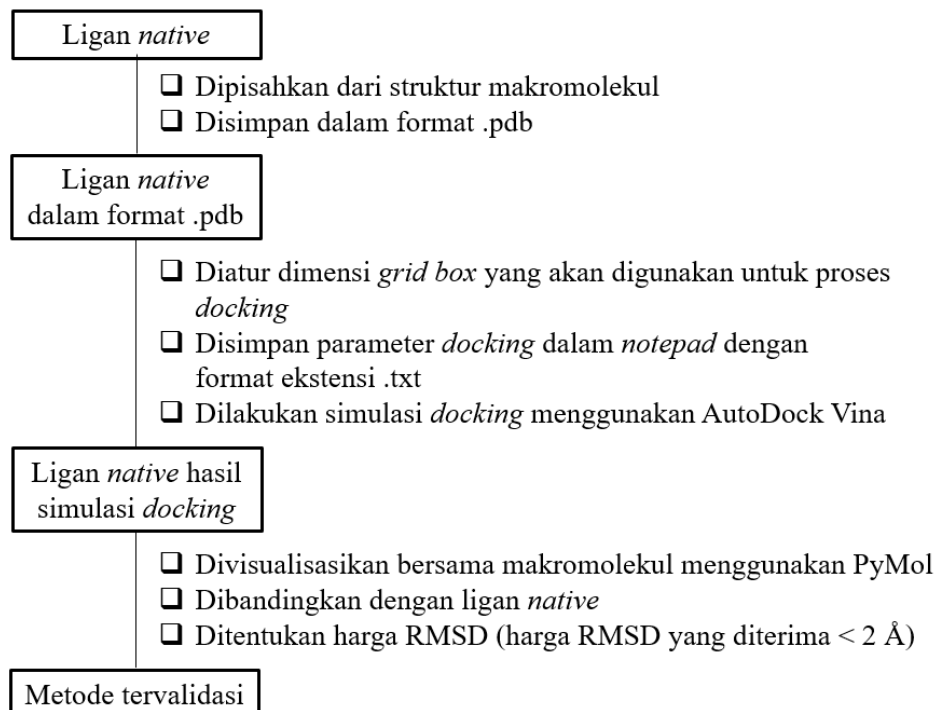
Dalam penelitian ini, protein yang dipreparasi adalah reseptor hormon kanker payudara ER α , PR, HER2, dan EGFR. Struktur kristal protein diunduh dari *Protein Data Bank* dalam format ekstensi .pdb (*protein data bank*, PDB). Protein di preparasi menggunakan perangkat lunak Autodock Tools dengan menghapus molekul air dan ligan serta menambahkan atom hidrogen polar dan muatan Gasteiger (Huey & Morris, 2006). Struktur protein hasil preparasi disimpan dalam format.pdbqt. Diagram alir preparasi protein ditunjukkan pada **Gambar 3.2**.



Gambar 3.2. Diagram alir preparasi protein.

3.3.2 Validasi Metode Docking

Validasi protokol *docking* bertujuan untuk memverifikasi reliabilitas simulasi *docking* (Munawaroh *et al.*, 2020). Proses validasi metode diawali dengan memilih ligan sebagai basis jenis peta *grid box* yang akan digunakan. Selanjutnya, dilakukan pengaturan dimensi *grid box* untuk proses *docking*. Ukuran *grid box* disesuaikan dengan ukuran ligan *native* dan cukup besar agar ligan dapat berotasi dengan bebas (Huey & Morris, 2006; Munawaroh *et al.*, 2020). Dimensi *grid box* disimpan sebagai parameter output dengan format ekstensi .txt. Parameter reseptor, ligan, ukuran *grid box*, jumlah konformasi *docking*, dan *exhaustiveness* dicatat secara lengkap dalam *notepad* dengan format ekstensi .txt sebagai dokumen konfigurasi *docking*. Penambatan molekuler dilakukan menggunakan Autodock Vina melalui *command prompt*. Hasil *docking* terbaik divisualisasikan menggunakan PyMol dan ditentukan harga RMSD dengan membandingkan ligan *native* dan ligan hasil simulasi *docking*. Harga RMSD yang diterima untuk validasi metode menggunakan Autodock Vina adalah $< 2 \text{ \AA}$ (Trott & Olson, 2009; Munawaroh *et al.*, 2020). Diagram alir validasi metode ditunjukkan pada **Gambar 3.3**. Data afinitas pengikatan dan nilai RMSD validasi metode *docking* dengan ligan *native* tertera dalam **Tabel 3.2**.



Gambar 3.3. Diagram alir validasi metode *docking*.

Tabel 3.2.
Afinitas pengikatan dan nilai RMSD dalam validasi metode *docking* reseptor hormon kanker payudara dan ligan *native*.

| Kode ligan <i>native</i> | Reseptor target | Afinitas pengikatan (kcal/mol) | Nilai RMSD (Å) |
|--------------------------|-----------------|--------------------------------|----------------|
| TAM | ER α | -9,8 | 1,698 |
| NOG | PR | -12,2 | 0,339 |
| 03Q | HER2 | -11,2 | 1,985 |
| AEE | EGFR | -9,9 | 1,462 |

Berdasarkan **Tabel 3.2.**, parameter *docking* yang digunakan telah valid. Validitas metode diketahui dari nilai RMSD untuk keempat reseptor: ER α , PR, HER2, dan EGFR yang berada dibawah 2 Å. Parameter *docking* selanjutnya dapat digunakan dalam proses *docking* ligan uji.

Dimensi *grid box* yang digunakan dalam simulasi penambatan molekuler berbeda-beda untuk setiap reseptor. Dimensi *grid box* ini mengacu pada dimensi *grid box* yang digunakan dalam validasi metode ligan *native*. Koordinat *grid box* dalam *molecular docking* ditunjukkan dalam **Tabel 3.3.**

Tabel 3.3.
Koordinat *grid box* simulasi *docking* reseptor hormon kanker payudara dan pigmen mikroalga *Spirulina platensis*.

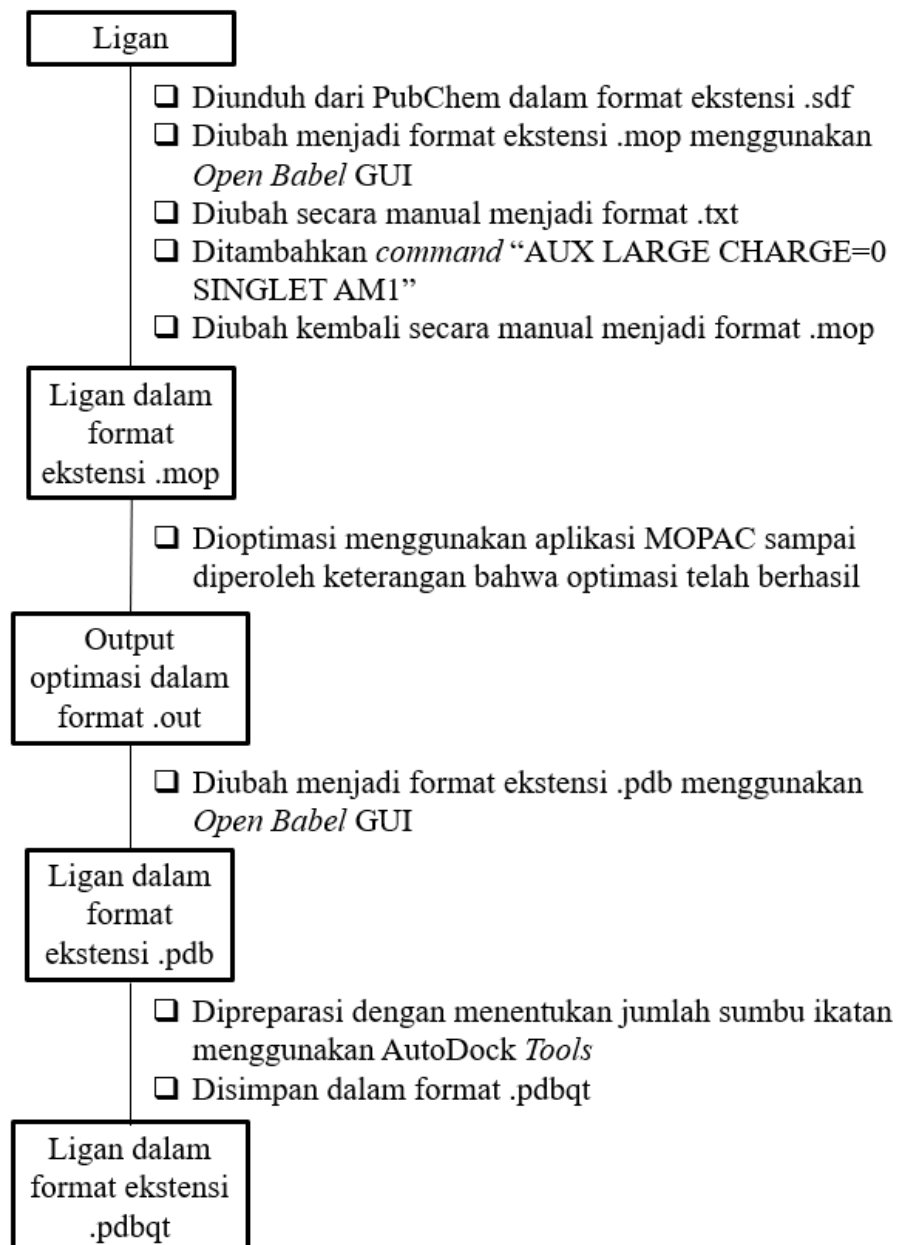
| No. | Reseptor | Koordinat (Å) | | | Ukuran (Å) | | |
|-----|-------------|---------------|--------|---------|------------|----|----|
| | | X | Y | Z | X | Y | Z |
| 1. | ER α | 30,282 | -1,913 | 24,207 | 30 | 30 | 22 |
| 2. | PR | 11,232 | 14,859 | 7,910 | 34 | 34 | 34 |
| 3. | HER2 | 16,387 | 17,394 | 26,218 | 30 | 30 | 22 |
| 4. | EGFR | -51,828 | -0,483 | -18,944 | 30 | 30 | 22 |

3.3.3 Optimasi dan Preparasi Ligan

Struktur tiga dimensi (3D) ligan diunduh dari PubChem dalam format .sdf. Format ligan kemudian dikonversi menjadi .mop menggunakan *Open Babel* GUI agar diperoleh format kartesian MOPAC. Format ligan dalam bentuk .mop diubah secara manual menjadi format .txt, kemudian *command* ditambahkan menggunakan *notepad* menjadi “AUX LARGE CHARGE=0 SINGLET AM1”. Selanjutnya, format ligan kembali diubah secara manual menjadi .mop. Ligan dioptimasi

menggunakan aplikasi MOPAC sampai diperoleh keterangan bahwa optimasi ligan telah berhasil. Ligan hasil optimasi dalam format .out dikonversi menjadi format .pdb menggunakan *Open Babel* GUI.

Preparasi ligan dilakukan menggunakan Autodock Tools dengan menginput ligan ke dalam jendela aplikasi tersebut dan menentukan jumlah sumbu ikatan ligan. Ligan lalu disimpan dalam format ekstensi .pdbqt. Diagram alir preparasi ligan divisualisasikan pada **Gambar 3.4**.



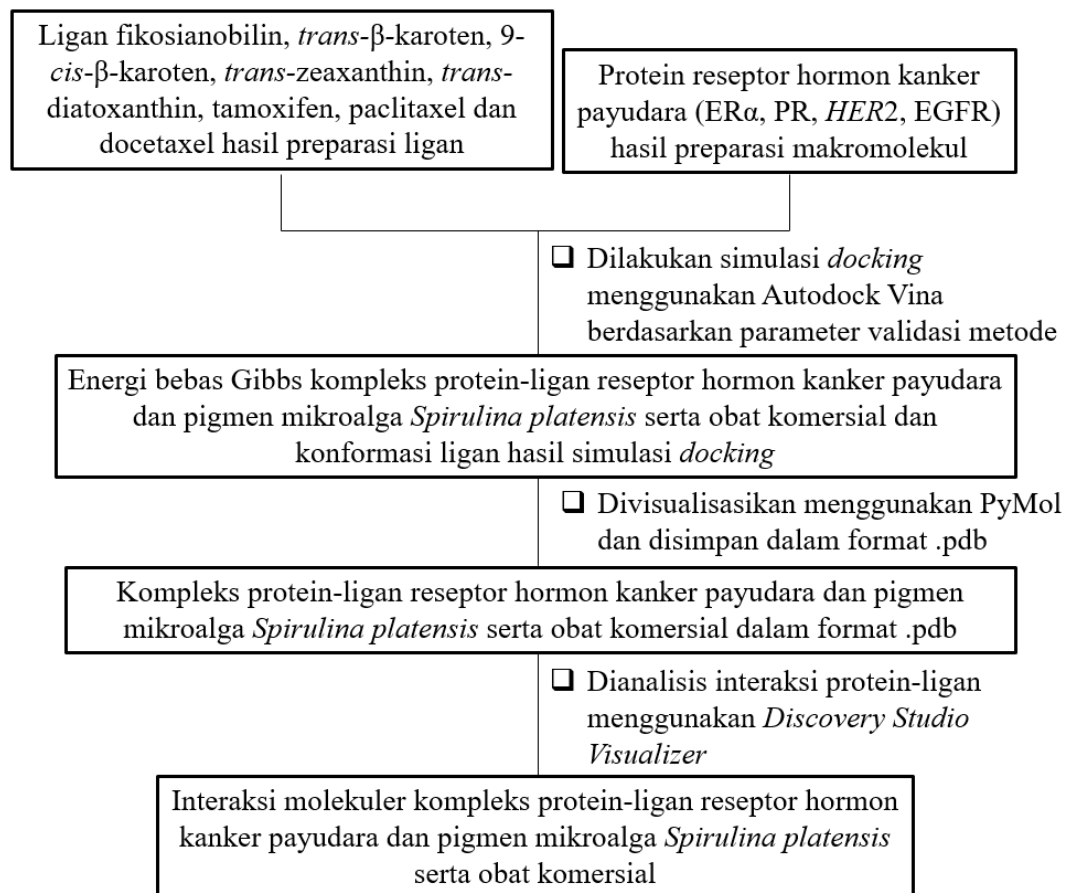
Gambar 3.4. Diagram alir preparasi ligan.

3.3.4 Simulasi *Docking* Protein-Ligan

Penambatan molekuler pigmen fikosianobilin dan karotenoid (*trans-β*-karoten, *9-cis-β*-karoten, *trans*-zeaxanthin dan *trans*-diatoxanthin) dengan reseptor hormon kanker payudara ER α , PR, HER2, dan EGFR disimulasikan menggunakan Autodock *Tools*. Selain pigmen fikosianobilin dan karotenoid, obat komersial tamoxifen, paclitaxel, dan docetaxel turut berperan sebagai ligan. Tamoxifen merupakan obat komersial untuk kanker payudara subjenis reseptor hormon positif (ER α dan PR), paclitaxel untuk terapi kanker payudara subjenis reseptor hormon negatif (HER2), sedangkan docetaxel untuk terapi kanker payudara subjenis *triple-negative* (EGFR).

Pertama, reseptor hormon kanker payudara yang telah dipreparasi sebelumnya ditambahkan pada jendela AutoDock *Tools*. Kedua, ligan senyawa fikosianobilin, karotenoid, tamoxifen, paclitaxel, dan docetaxel ditambahkan dalam jendela Autodock *Tools* untuk ditentukan jumlah sumbu ikatannya. Ligan yang sudah dipreparasi disimpan dalam format .pdbqt. Parameter *docking* berupa reseptor, ligan, dimensi *grid box*, jumlah konformasi, dan *exhaustiveness* dicatat dalam *notepad* dan disimpan dalam format ekstensi .txt. Dimensi *grid box* yang digunakan mengacu pada dimensi *grid box* ligan reseptor hormon kanker payudara hasil simulasi *docking* pada validasi metode yang memiliki harga RMSD < 2 Å.

Simulasi penambatan molekuler dilakukan menggunakan Autodock Vina melalui *command prompt* agar diperoleh energi ikatan dari kompleks protein-ligan reseptor hormon kanker payudara dan ligan senyawa fikosianobilin, karotenoid (*trans-β*-karoten, *9-cis-β*-karoten, *trans*-zeaxanthin dan *trans*-diatoxanthin), tamoxifen, paclitaxel, dan docetaxel. Output terbaik dari simulasi penambatan molekuler divisualisasikan menggunakan PyMol dan disimpan dalam format .pdb. Interaksi ligan dan makromolekul dianalisis menggunakan *Discovery Studio Visualizer*. Diagram alir simulasi *docking* reseptor hormon kanker payudara dan ligan senyawa fikosianin, karotenoid (*trans-β*-karoten, *9-cis-β*-karoten, *trans*-zeaxanthin dan *trans*-diatoxanthin), tamoxifen, paclitaxel, dan docetaxel ditunjukkan pada **Gambar 3.5**.



Gambar 3.5. Diagram alir simulasi *docking* protein-ligan pigmen fikosianobilin dan karotenoid dengan reseptor hormon kanker payudara ($ER\alpha$, PR, HER2, dan EGFR).

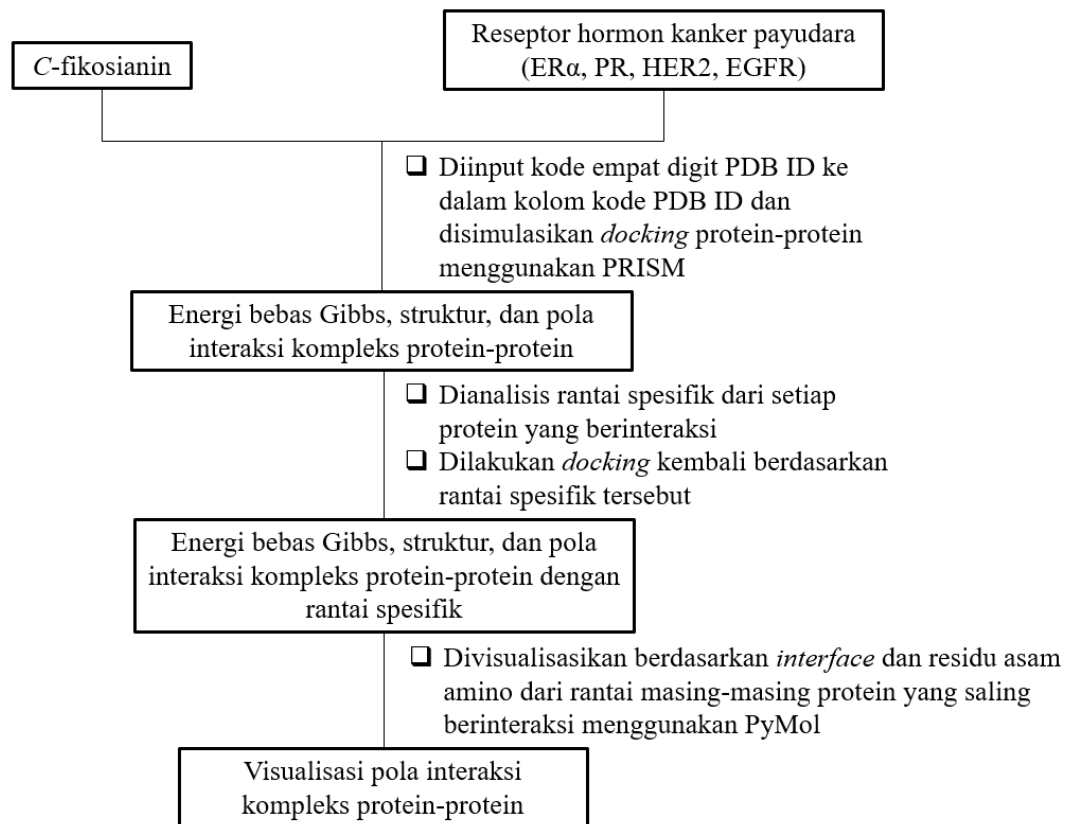
3.3.5 Simulasi *Docking* Protein-Protein

Simulasi penambatan molekuler protein-protein C-fikosianin dan reseptor hormon kanker payudara $ER\alpha$, PR, HER2, dan EGFR dilakukan menggunakan *webservice* PRISM. Kode empat digit berikut rantai spesifik protein ditambahkan dalam kolom kode PDB ID. PRISM akan memberikan informasi mengenai energi ikatan dan letak interaksi kompleks protein-protein. PRISM turut memvisualisasikan struktur dari kompleks protein-protein yang terbentuk.

Proses *docking* protein-protein diawali dengan melakukan simulasi penambatan molekuler menggunakan struktur keseluruhan protein. Dari hasil *docking* akan diperoleh rantai-rantai protein yang saling berinteraksi. Rantai-rantai tersebut kemudian akan di *docking* kembali secara spesifik (Fernandes *et al.*, 2018).

Struktur kompleks protein-protein hasil simulasi penambatan molekuler menggunakan PRISM divisualisasikan berdasarkan residu asam amino protein-

protein dari rantai-rantai yang saling berinteraksi satu sama lain dan *interface*. Diagram alir simulasi *docking* protein-protein digambarkan pada **Gambar 3.6**.



Gambar 3.6. Diagram alir simulasi *docking* protein-protein C-fikosianin dan reseptor hormon kanker payudara ER α , PR, HER2, dan EGFR.