

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian dimulai pada bulan Februari sampai Agustus 2020. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan sistem dalam jaringan (daring) yang dilakukan di tempat tinggal peneliti di Kecamatan Bogor Utara, Kota Bogor, Jawa Barat.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Perangkat yang digunakan dalam penelitian ini adalah perangkat keras berupa satu set komputer dengan spesifikasi: *Processor* tipe Intel[®] *Core* (TM) i3- 7100 *CPU* 3.9 GHz, *RAM* 4 GB, dan *Harddisk* 500 GB serta perangkat lunak sistem operasi Windows 10 Pro, MGL Tools (Autodock Vina, Autodock Tools 1.5.6, dan Python 2.7.15), Pymol[®] 2.2.3 dan *Biovia Discovery Studio* 2020 untuk visualisasi molekul

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain, struktur tiga dimensi M^{PRO} SARS-CoV-2 (PDB ID: 6W63), *Receptor Binding Domain* (RBD) SARS-CoV-2 dan *Angiotensin Converting Enzyme 2* (ACE2) (PDB ID: 6M0J) yang diperoleh dari basis data *RCSB Protein Data Bank*. Struktur tiga dimensi dari ligan uji dan ligan pembanding diperoleh dari basis data *PubChem* yang diakses pada link <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Ligan uji yang digunakan adalah 9 senyawa derivat senyawa florotanin, yaitu: floroglusinol (Pubchem ID: 359), ekol (Pubchem ID: 145937), dioksinodehidroekol (Pubchem ID: 10429214), 2-floroekol (Pubchem ID: 5320532), 7-floroekol (Pubchem ID: 10480940), fukodifloroetol G (Pubchem ID: 44590821), diekol (Pubchem ID: 3008868), florofukofuroekol A (Pubchem ID: 130976) dan trifloretol A (Pubchem ID: 21626545). Ligan pembanding yang digunakan adalah nelfinavir (Pubchem ID: 64143), klorokuin, (Pubchem ID: 2719) dan hidroksiklorokuin (Pubchem ID: 3652).

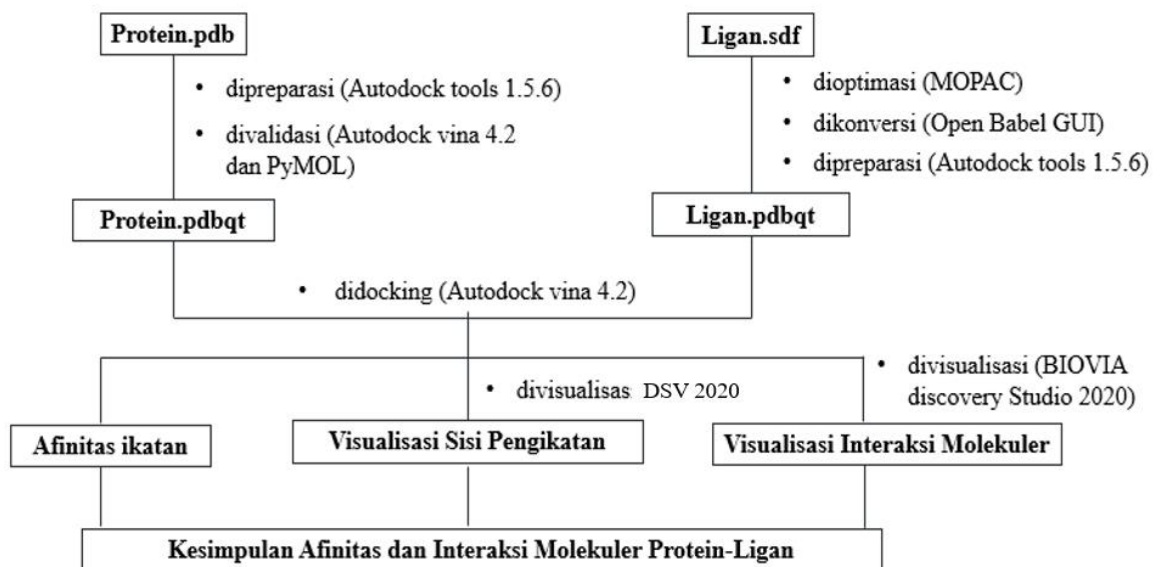
Maudy Shintia, 2020

KAJIAN SENYAWA DERIVAT FLOROTANIN *Ecklonia cava* SEBAGAI KANDIDAT ANTI SARS-CoV-2 BERDASARKAN PENDEKATAN MOLECULAR DOCKING

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

3.3 Prosedur Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi preparasi protein menggunakan Autodock Tools 1.5.6, validasi metode *docking* dengan menggunakan Autodock Vina 4.2 dan PyMol 2.2.3, optimasi dan preparasi ligan menggunakan MOPAC dan Autodock Tools 1.5.6, *molecular docking* menggunakan Autodock Vina 4.2 dan visualisasi sisi pengikatan serta interaksi molekuler menggunakan *Biovia Discovery Studio 2020*. Hasil visualisasi *docking* digunakan untuk memprediksi interaksi molekuler antara protein dan ligan. Tahapan uji umum *in silico* ditunjukkan pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1. Prosedur penelitian secara umum.

3.3.1 Preparasi Protein (Reseptor)

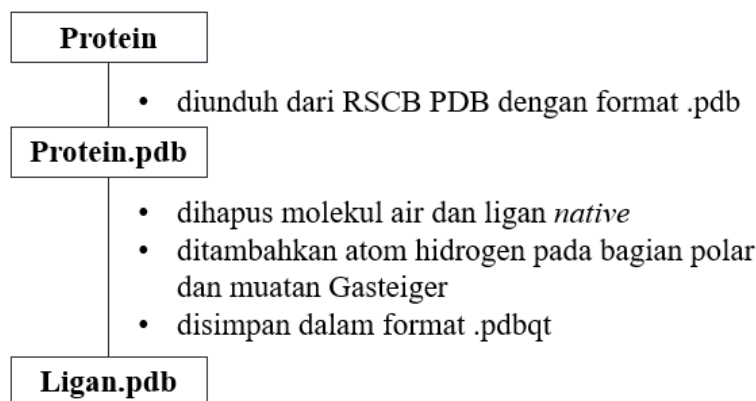
Main protease (M^{pro}) SARS-CoV-2 (PDB ID: 6W63), RBD SARS-CoV-2 dan reseptor ACE2 (PDB ID: 6M0J) diperoleh dari *Protein Data Bank* (PDB) pada situs <http://www.rcsb.org>. Molekul dipreparasi dengan menggunakan *software* Autodock Tools 1.5.6. Dalam preparasi molekul ini dilakukan penghilangan gugus H_2O , pemisahan ligan *native* yang terdapat pada molekul protein tersebut dan penambahan atom hidrogen, Protein ditambahkan atom hidrogen pada gugus polar saja dan

Maudy Shintia, 2020

KAJIAN SENYAWA DERIVAT FLOROTANIN *Ecklonia cava* SEBAGAI KANDIDAT ANTI SARS-CoV-2 BERDASARKAN PENDEKATAN MOLECULAR DOCKING

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

ditambahkan muatannya dengan *compute gasteiger*. Kemudian file disimpan dalam format .pdbqt. Diagram alir preparasi protein divisualisasikan pada **Gambar 3.2**.

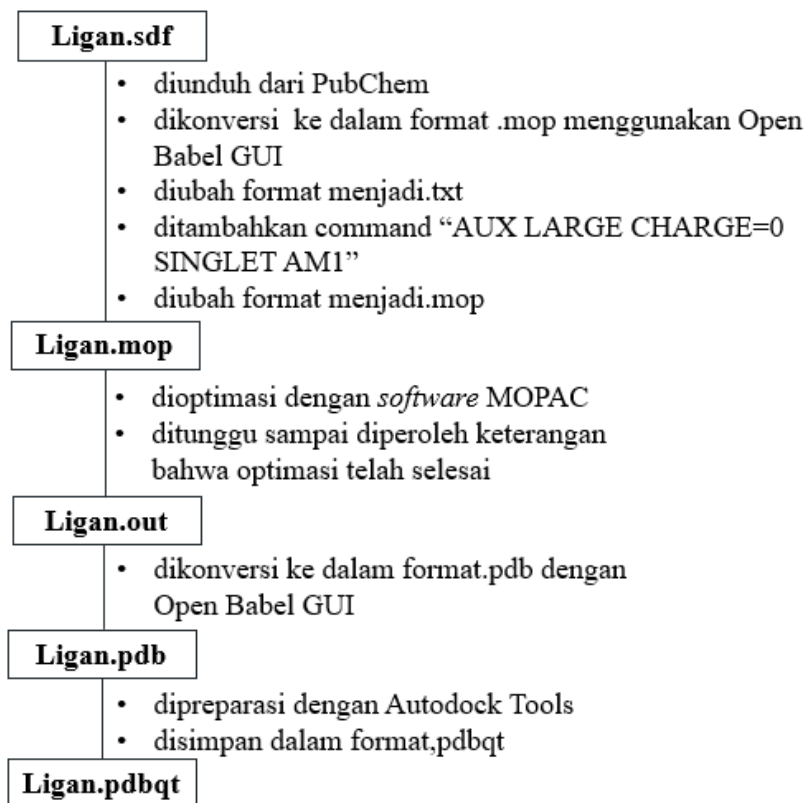


Gambar 3.2. Diagram preparasi protein.

3.3.2 Preparasi Ligan

Struktur tiga dimensi (3D) senyawa derivat florotanin dan senyawa pembanding diunduh dari PubChem pada situs <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> 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 kembali 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.

Hasil pencarian konformasi terbaik kemudian disimpan dalam bentuk PDB dengan menggunakan perangkat lunak Open Babel GUI. Ligan yang sudah dioptimasi kemudian dipreparasi menggunakan perangkat lunak Autodock Tools. Penyesuaian torsi dilakukan dengan *detecting root* dan diatur sesuai yang diinginkan. Kemudian file disimpan dalam format.pdbqt. Diagram alir optimasi dan preparasi ligan divisualisasikan pada **Gambar 3.3**.



Gambar 3.3. Diagram alir optimasi dan preparasi ligan.

3.3.3 Validasi Metode *Docking*

Hasil uji penambatan molekuler dengan Autodock Vina memerlukan uji keabsahan metode terhadap area *docking* yang digunakan dalam proses *molecular docking*. Validasi protokol *docking* bertujuan untuk memverifikasi reliabilitas simulasi *docking* (Munawaroh *et al.*, 2020). Hal ini dilakukan dengan cara melakukan *docking* ulang ligan *native* yang sudah tertambat dengan masing-masing protein target. Ukuran grid box disesuaikan dengan ukuran ligan *native*. Dimensi grid box disimpan sebagai parameter output dengan format ekstensi .txt. Hasil *docking* ulang ligan *native* kemudian dibandingkan dengan ligan *native* hasil eksperimental. Kemudian dilakukan visualisasi untuk melihat kesejajaran konformasi struktur ligan *native* eksperimental dengan ligan natif hasil *docking* ulang yang dinyatakan dalam RMSD (*root mean square deviation*). Nilai RMSD dibawah 2 Å menunjukkan metode *docking* diterima

(Moitessier *et al.*, 2008). Koordinat *grid box* dalam *molecular docking* ditunjukkan dalam **Tabel 3.1**.

Tabel 3.1.

Koordinat *grid box* simulasi *docking* senyawa derivat florotanin dengan M^{pro} SARS-CoV-2, RBD SARS-CoV-2 dan ACE2.

No.	Protein Target	Koordinat (Å)			Ukuran (Å)		
		X	Y	Z	X	Y	Z
1.	M ^{pro}	-19.340	18.376	-27.228	18	18	18
2.	RBD	-36.980	29.067	3.801	16	38	20
3.	ACE2	-34.939	27.628	-3.063	18	46	18

3.3.4 Molecular Docking Protein-Ligan

Penambatan molekuler protein hasil preparasi dengan ligan hasil preparasi dilakukan menggunakan autodock Vina 4.2. Formasi *grid box* yang sudah dibuat, disimpan dalam notepad yang akan digunakan dalam simulasi *molecular docking*. Proses ini melibatkan perintah komputer atau *command Prompt* (Trott, Oleg & Olson, 2010). Jumlah ulangan (*exhaustiveness*) dilakukan sebanyak 16 kali.

3.3.5 Analisis dan Visualisasi Hasil

Visualisasi sisi pengikatan dan interaksi molekuler senyawa derivat florotanin dan kandidat obat komersial dengan protein target divisualisasikan dalam struktur dua dimensi (2D) dan tiga dimensi (3D) dengan menggunakan *Biovia Discovery Studio* 2020. Visualisasi dari hasil *molecular docking* ini digunakan untuk mengetahui interaksi residu asam amino dari M^{pro} SARS-CoV-2, RBD SARS-CoV-2 dan ACE2 dengan senyawa derivat florotanin dan kandidat obat komersial.