

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Februari hingga Juli 2021. Penelitian dilakukan di tempat tinggal peneliti di Kecamatan Cibogo, Kabupaten Subang, Jawa Barat, melalui sistem dalam jaringan (daring) menggunakan perangkat lunak *molecular docking*.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

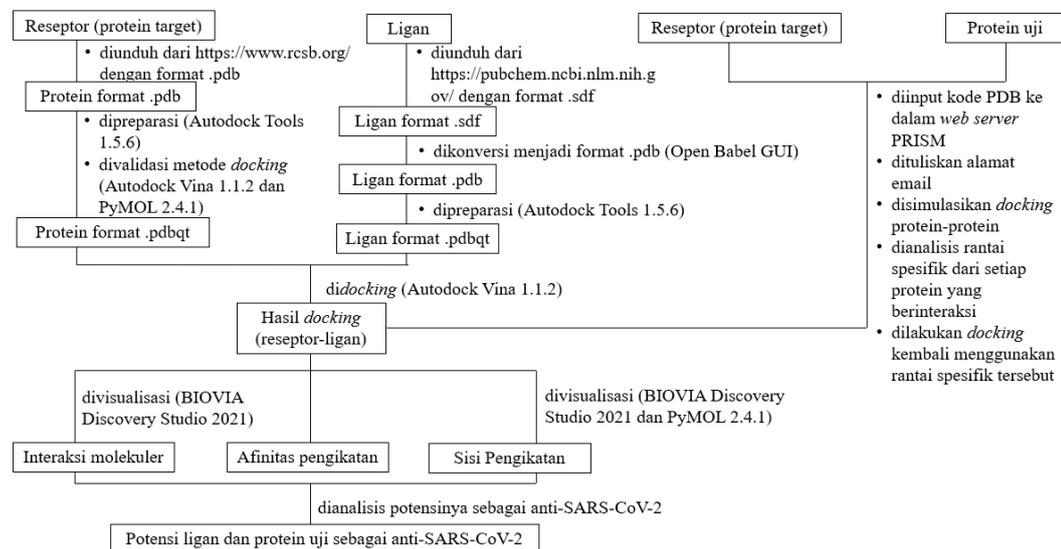
Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah perangkat keras berupa laptop Lenovo Ideapad Slim 3 14” dengan spesifikasi sebagai berikut: Prosesor AMD Dual-Core Athlon Silver 3050U 2.3 GHz Up to 3.2 GHz, Radeon Graphics, RAM 4 GB DDR4, SSD 256 GB, dan sistem operasi Windows 10. Perangkat lunak yang digunakan adalah AutoDock Vina 1.1.2, AutoDock Tools 1.5.6, *web server* PRISM (*Protein Interaction by Structural Matching*), Open Babel GUI 2.3.1, dan Swiss-PDB Viewer 4.1.0 untuk *molecular docking*; serta PyMOL 2.4.1 dan BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2021 untuk visualisasi molekul.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini, antara lain struktur tiga dimensi *main protease* (M^{Pro}) SARS-CoV-2 (PDB ID: 6W63), *Receptor Binding Domain* (RBD) SARS-CoV-2 dan *Angiotensin Converting Enzyme 2* (ACE2) (PDB ID: 6M0J), serta *RNA dependent RNA polymerase* (RdRp) SARS-CoV-2 (PDB ID: 6M71) yang diperoleh dari basis data *RCSB Protein Data Bank* (PDB) (<https://www.rcsb.org/>). Ligan uji yang digunakan adalah fikosianin (PDB ID: 1GH0), alofikosianin (PDB ID: 1ALL), fikoeritrin (PDB ID: 5NB3), fikosianobilin (PubChem ID: 365902), dan fikoeritrobin (PubChem ID: 6443764). Ligan pembanding yang digunakan merupakan kandidat obat komersial COVID-19, yaitu klorokuin (PubChem ID: 2719), hidroksiklorokuin (PubChem ID: 3652), nelfinavir (PubChem ID: 64143), dan remdesivir (PubChem ID: 121304016). Struktur tiga dimensi dari ligan uji dan ligan pembanding diperoleh dari basis data PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dan *RCSB Protein Data Bank*.

3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara *in silico* dengan metode *molecular docking*. Secara umum, tahapan penelitian *molecular docking* meliputi preparasi protein dan ligan menggunakan AutoDock Tools 1.5.6, validasi metode *docking* menggunakan AutoDock Vina 1.1.2 dan PyMOL 2.4.1, simulasi *docking* protein-ligan menggunakan AutoDock Vina 1.1.2, simulasi *docking* protein-protein menggunakan *web server* PRISM, visualisasi sisi pengikatan dan interaksi molekuler menggunakan BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2021 dan PyMOL 2.4.1, serta analisis hasil simulasi *docking*. Tahapan penelitian penentuan potensi fikobiliprotein dan fikobilin sebagai kandidat anti-SARS-CoV-2 dengan simulasi *molecular docking* ditunjukkan pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1 Tahapan penelitian penentuan potensi fikobiliprotein dan fikobilin sebagai kandidat anti-SARS-CoV-2 dengan simulasi *molecular docking*

3.3.1 Preparasi Protein (Reseptor)

Preparasi reseptor target dilakukan untuk memastikan bahwa interaksi antara reseptor dengan ligan dapat membentuk ikatan yang stabil (Fakih & Dewi, 2020). M^{Pro} SARS-CoV-2 (PDB ID: 6W63), RBD SARS-CoV-2 dan ACE2 (PDB ID: 6M0J), serta RdRp SARS-CoV-2 (PDB ID: 6M71) diunduh dari basis data *Protein Data Bank* (PDB) dengan format .pdb. Protein dipreparasi menggunakan perangkat lunak AutoDock Tools 1.5.6.

Preparasi protein dilakukan dengan cara menghilangkan molekul air, memisahkan ligan *native* yang terdapat pada protein tersebut, dan ekstraksi rantai

protein yang akan digunakan (Huey *et al.*, 2012). Adanya molekul air pada reseptor dapat mengganggu proses *molecular docking*, menurunkan tingkat akurasi dan mengganggu proses pencarian konformasi terbaik (Munawaroh *et al.*, 2020). Oleh karena itu, penghilangan molekul air bertujuan agar molekul air tidak mengganggu proses *docking*, sehingga dapat dipastikan yang berinteraksi hanya ligan dengan protein (Susanti *et al.*, 2019). Khusus untuk protein RdRp (NSP12), setelah dihilangkan NSP7 dan NSP8, terdapat beberapa atom yang hilang pada residu Phe70, Lys73, Arg74, Glu83, Lys98, Phe101, Phe102, Ile114, Arg365, dan Asp824, maka sebelum dipreparasi harus dimodelkan menggunakan Swiss-Pdb Viewer 4.1.0 untuk melengkapi atom yang hilang tersebut (Yuqui *et al.*, 2020).

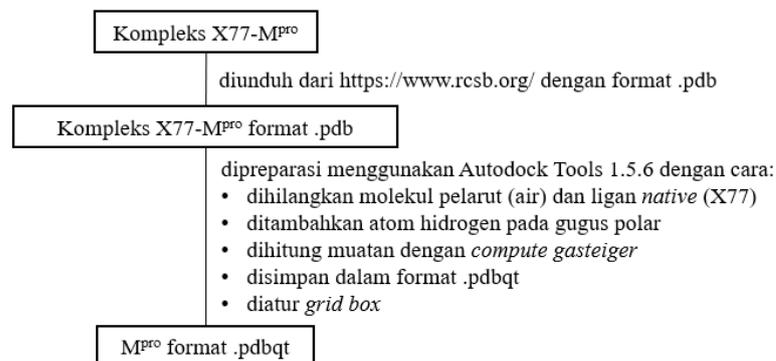
Pada proses preparasi, protein juga ditambahkan atom hidrogen pada gugus polar saja untuk memunculkan kembali atom hidrogen pada protein sehingga ikatan hidrogen yang terbentuk dapat teramati dan dihitung muatan atom parsialnya dengan *compute gasteiger* (Silva *et al.*, 2018; Susanti *et al.*, 2019). Hasil difraksi sinar-X tidak dapat secara jelas menggambarkan posisi atom hidrogen dalam protein. Oleh karena itu, ikatan hidrogen yang terbentuk antara ligan dan residu asam amino dapat dimodelkan dengan penambahan atom hidrogen polar (Munawaroh *et al.*, 2020). Ikatan hidrogen mempengaruhi tingkat afinitas antara reseptor dan ligan. Selain itu, penambahan hidrogen bertujuan untuk menyesuaikan suasana *docking* agar mendekati suasana pH di dalam tubuh (Susanti *et al.*, 2019). Kemudian, *file* protein yang telah dipreparasi disimpan dalam format *.pdbqt* (*Protein Data Bank, Partial Charge (Q), & Atom Type (T)*). Setelah itu, diatur *grid box* untuk menghasilkan posisi pengikatan yang tepat antara ligan dan protein.

Grid box merupakan tempat dimana ligan akan berinteraksi dengan residu asam amino pada protein target. Penentuan *grid box* dilakukan untuk mengetahui titik koordinat pada *binding site* dari suatu protein. Pengaturan *grid box* yang dilakukan adalah pengaturan koordinat *grid center* dan pengaturan *grid size* (Susanti *et al.*, 2019). Ukuran *grid box* ditentukan pada protein dengan nilai sumbu *x*, *y*, dan *z*, dengan satuan Angstrom (Å), hingga tepat menutupi seluruh sisi aktif permukaan protein (Noviardi & Fachrurrazie, 2015). Koordinat *grid center* dan *grid size* simulasi *docking* senyawa fikobilin dengan M^{PfO}, RBD, ACE2, dan RdRp ditunjukkan pada **Tabel 3.1**.

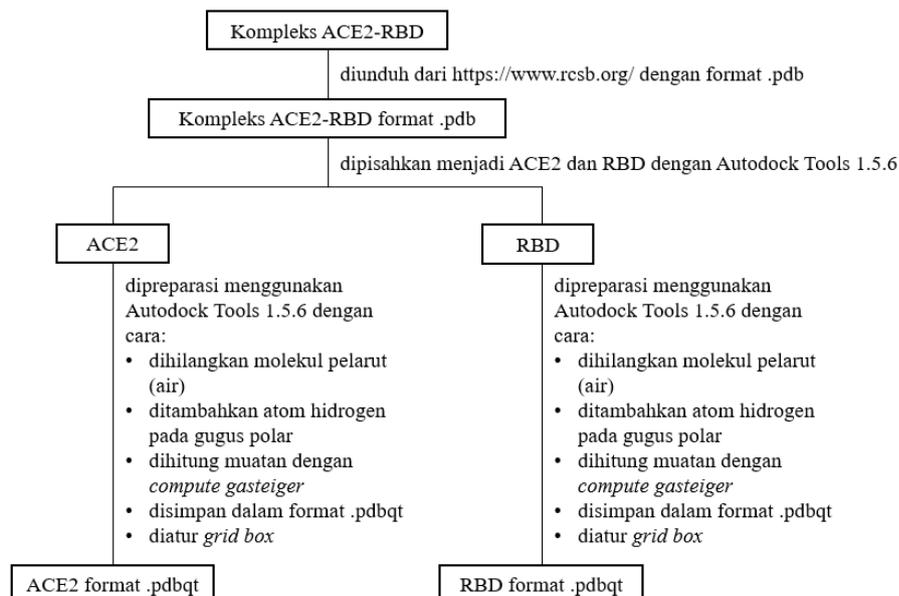
Tabel 3.1
Koordinat *grid center* dan *grid size* protein

Protein Target	Grid Box					
	Center (Å)			Size (Å)		
	X	Y	Z	X	Y	Z
M ^{pro} SARS-CoV-2	-19,340	18,376	-27,228	18	18	18
RBD SARS-CoV-2	-36,980	29,067	3,801	20	40	20
ACE2	-34,939	27,628	-3,063	18	46	18
RdRp SARS-CoV-2	115,900	116,200	132,100	32	30	24

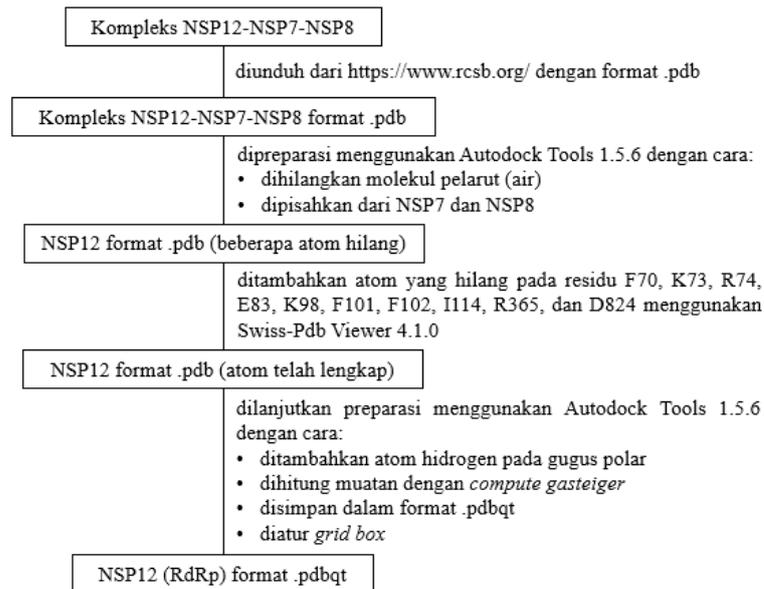
Koordinat *grid center* dan *grid size* protein tersebut disimpan dalam *notepad* dengan format .txt untuk simulasi *molecular docking*. Tahapan preparasi M^{pro}, RBD dan ACE2, serta RdRp secara berturut-turut ditunjukkan pada **Gambar 3.2**, **Gambar 3.3**, dan **Gambar 3.4**. Protein hasil preparasi divisualisasikan pada **Gambar 3.5**.



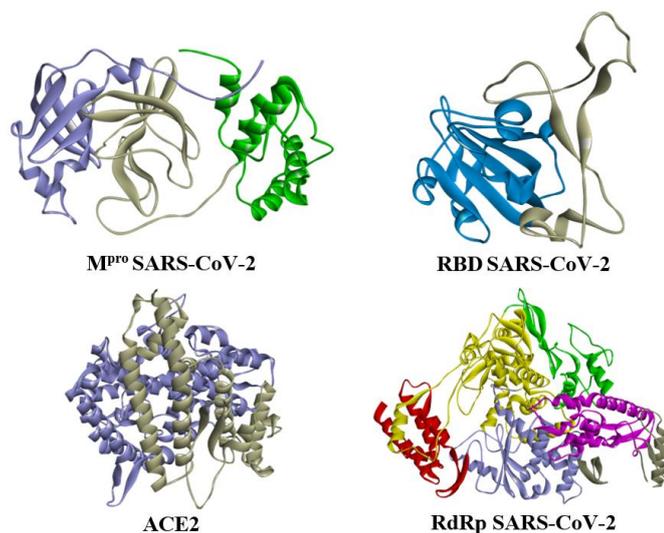
Gambar 3.2 Tahapan preparasi protein M^{pro} SARS-CoV-2



Gambar 3.3 Tahapan preparasi RBD SARS-CoV-2 dan ACE2



Gambar 3.4 Tahapan preparasi RdRp SARS-CoV-2

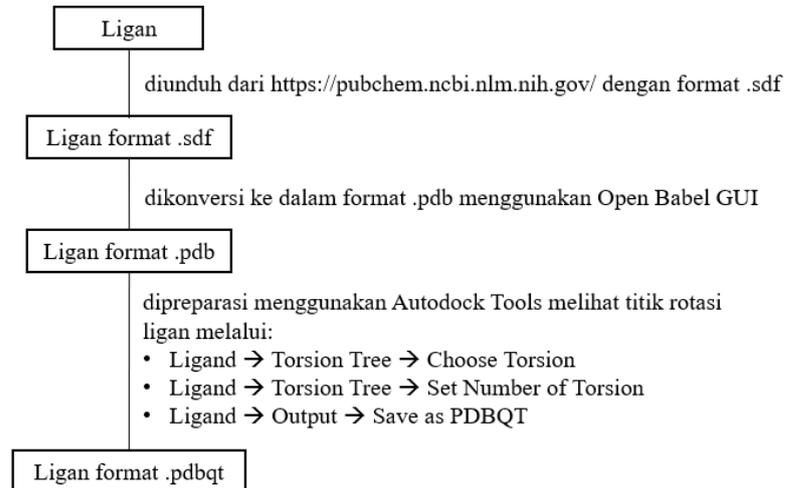


Gambar 3.5 Visualisasi struktur protein target hasil preparasi

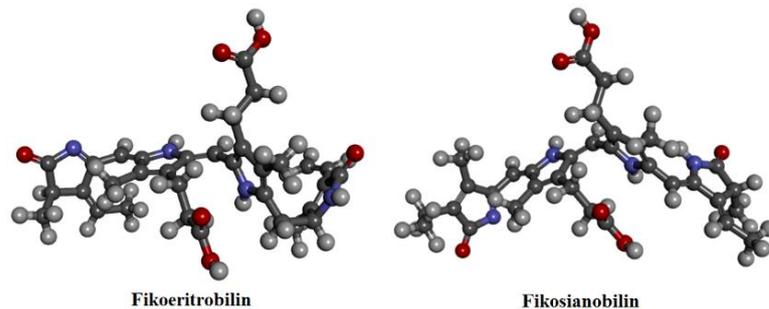
3.3.2 Preparasi Ligan

Struktur tiga dimensi (3D) ligan uji dan ligan pembanding diunduh dari situs PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dengan format .sdf. Ligan uji pada penelitian ini yaitu senyawa fikosianobilin dan fikoeritrobin, sedangkan ligan pembandingnya adalah klorokuin, hidrosiklorokuin, nelfinavir, dan remdesivir. Format ligan kemudian dikonversi menjadi .pdb menggunakan Open Babel GUI 2.3.1 untuk menyesuaikan format yang diproses pada simulasi *molecular docking*. Lalu, ligan dipreparasi menggunakan perangkat lunak AutoDock Tools 1.5.6 dengan melihat titik rotasi ligan dengan cara (Ligand → Torsion Tree → Choose

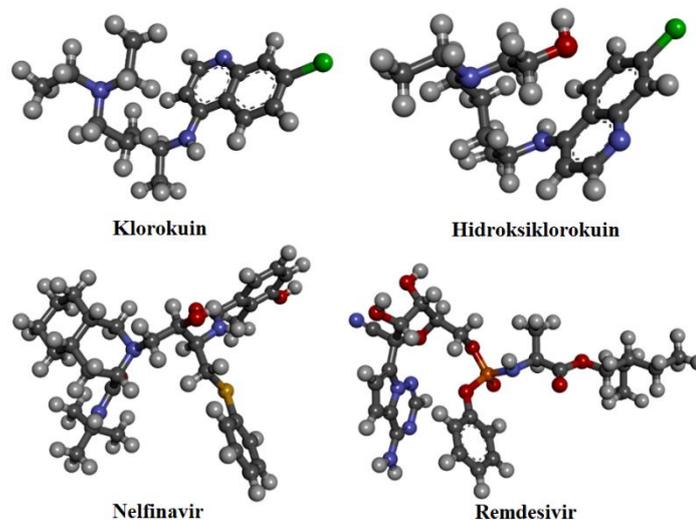
Torsion), (Ligand → Torsion Tree → Set Number of Torsion). Kemudian, hasil preparasi ligan disimpan dalam format .pdbqt dengan cara Ligand → Output → Save as PDBQT. Tahapan preparasi ligan ditunjukkan pada **Gambar 3.6**. Struktur 3D ligan uji (fikobilin *Spirulina platensis*) dan ligan pembanding (kandidat obat komersial) divisualisasikan pada **Gambar 3.7** dan **Gambar 3.8**.



Gambar 3.6 Tahapan preparasi ligan



Gambar 3.7 Visualisasi struktur 3D ligan uji (fikobilin *Spirulina platensis*)



Gambar 3.8 Visualisasi struktur 3D ligan pembanding (kandidat obat komersial)

3.3.3 Validasi Metode *Docking*

Sebelum dilakukan simulasi *docking*, metode terhadap area *docking* yang digunakan perlu divalidasi terlebih dahulu. Validasi program *docking* bertujuan untuk memverifikasi reliabilitas simulasi *docking* (Munawaroh *et al.*, 2020). Hal ini dilakukan dengan cara memisahkan protein dengan ligan *native* yang terikat pada protein menggunakan AutoDock Tools 1.5.6, lalu dilakukan *redocking* menggunakan AutoDock Vina 1.1.2. Ligan *native* hasil *redocking* kemudian dibandingkan dengan ligan *native* hasil eksperimental dengan cara visualisasi menggunakan pyMOL 2.4.1 untuk melihat kesejajaran konformasi struktur ligan *native* eksperimental dengan ligan *native* hasil *redocking* yang dinyatakan dalam RMSD (*root mean square deviation*). Metode *docking* dianggap valid jika memenuhi nilai RMSD kurang dari 2 Å (Noviardi & Fachrurrazie, 2015), sehingga dapat dilakukan *docking* ligan uji dan ligan pembanding dengan protein target.

Ligan *native* yang terdapat pada M^{pro} SARS-CoV-2 adalah X77 [N-(4-tert-butilfenil)-N-[(1R)-2-(sikloheksilamino)-2-okso-1-(piridin-3-il)etil]-1H-imidazol-4-karboksamida]. Pada penelitian ini, kompleks X77-M^{pro} menghasilkan nilai RMSD sebesar 0,922 Å. Pada reseptor ACE2, RBD, dan RdRp tidak dilakukan validasi karena tidak terdapat ligan *native* pada reseptor tersebut yang digunakan untuk *redocking* sehingga tidak dapat ditentukan nilai RMSDnya. Oleh karena itu, penentuan nilai *grid box* dilakukan menggunakan informasi residu dari sisi aktif protein tersebut (Ahmed *et al.*, 2020; Teli *et al.*, 2021).

3.3.4 Simulasi *Molecular Docking Protein-Ligan*

Struktur protein dan ligan hasil preparasi dengan format .pdbqt dilakukan penambatan molekuler (*molecular docking*) menggunakan AutoDock Vina 1.1.2. Protein dijaga tetap kaku dan molekul ligan diperlakukan fleksibel selama proses *docking*. Sebelum dilakukan simulasi *docking*, terlebih dahulu dibuat *file* konfigurasi yang berisi informasi mengenai nama *file* reseptor, nama *file* ligan, koordinat *grid center* dan *grid size*, nama *file* hasil *docking*, jumlah energi terendah yang akan diambil, serta jumlah ulangan (*exhaustiveness*). Jumlah ulangan (*exhaustiveness*) dilakukan sebanyak 16 kali. Proses *molecular docking* protein-ligan melibatkan perintah komputer atau *command prompt* (Khan *et al.*, 2020).

Hasil dari proses ini adalah nilai afinitas pengikatan dan prediksi struktur hasil *docking*. Nilai energi afinitas pengikatan terendah ditampilkan dalam bentuk tabel. Afinitas pengikatan menunjukkan kekuatan ikatan antara ligan dan reseptor. Semakin negatif energi ikatan, maka semakin kuat/stabil ikatan antara ligan dan reseptor (Susanti *et al.*, 2018). Jika nilai energi afinitas pengikatan yang diperoleh dari kedua senyawa fikobilin lebih negatif dibandingkan nilai energi afinitas pengikatan ligan *native* dan senyawa obat komersial, maka dapat disimpulkan bahwa kedua senyawa fikobilin tersebut dapat berpotensi untuk menghambat reseptor M^{pro}, RBD, ACE2, dan RdRp, serta lebih potensial sebagai anti-SARS-CoV-2 (Wardaniati & Herli, 2018).

Konformasi kompleks protein-ligan yang dipilih adalah kompleks yang memiliki nilai energi afinitas pengikatan terendah untuk kemudian dilakukan analisis lebih lanjut (Noviardi & Fachrurrazie, 2015). Konformasi ligan dengan energi terendah tersebut disimpan secara otomatis dalam format .pdbqt. Lalu, format *file* harus diubah menjadi .pdb menggunakan Open Babel GUI untuk visualisasi sisi pengikatan dan interaksi molekuler.

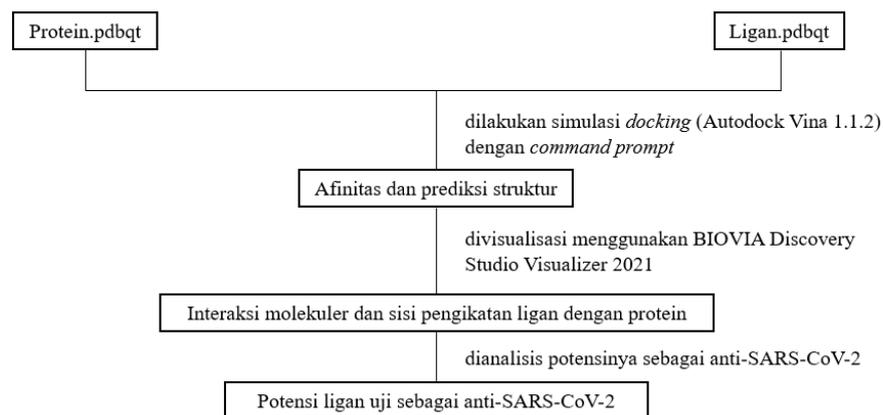
3.3.5 Analisis dan Visualisasi Hasil

Visualisasi struktur kompleks (sisi pengikatan) dilakukan menggunakan perangkat lunak BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2021. Reseptor divisualisasikan dalam bentuk permukaan (*surface*) dan bentuk pita (*ribbon*), sedangkan ligan divisualisasikan dalam bentuk stik dan bola (*ball and stick*). Interaksi molekuler fikobilin *Spirulina platensis* dan kandidat obat komersial dengan protein target divisualisasikan dalam struktur dua dimensi (2D) dan tiga dimensi (3D) menggunakan BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2021. Visualisasi hasil *molecular docking* ini digunakan untuk mengetahui interaksi residu asam amino dari M^{pro}, RBD, ACE2, dan RdRp dengan fikobilin dan kandidat obat komersial. Data interaksi molekuler dan sisi pengikatan tersebut dapat digunakan untuk analisis potensi ligan sebagai anti-SARS-CoV-2. Interaksi yang dapat terbentuk adalah ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, interaksi elektrostatik, dan interaksi van der Waals. Jarak ikatan hidrogen dibagi menjadi beberapa klasifikasi dalam satuan Amstrong (Å) yang ditunjukkan pada **Tabel 3.2**.

Tabel 3.2
Kategori kekuatan hidrogen yang terbentuk (MacLeod & Rosei, 2011)

No.	Jarak (Å)	Keterangan
1.	2,2-2,5	Kuat
2.	2,5-3,2	Moderat
3.	3,2-4,0	Lemah

Tahapan *molecular docking* protein-ligan dan visualisasi hasil ditunjukkan pada **Gambar 3.9**.



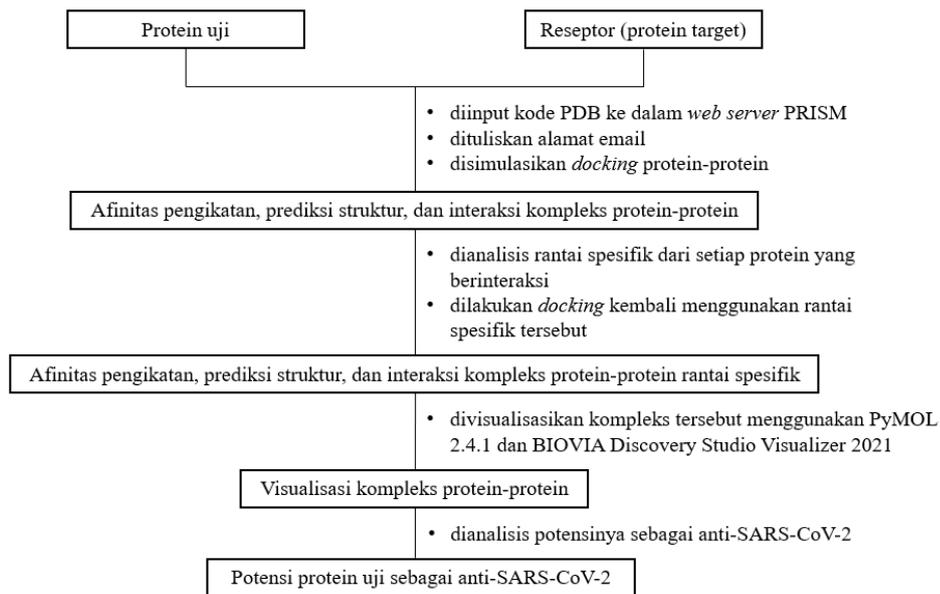
Gambar 3.9 Tahapan *molecular docking* protein-ligan dan visualisasi hasil

3.3.6 Simulasi *Molecular Docking* Protein-Protein

Simulasi penambatan molekuler (*molecular docking*) protein-protein C-fikosianin, alofikosianin, dan C-fikoeritrin dengan reseptor M^{pro}, RBD, ACE2, dan RdRp dilakukan menggunakan *web server* PRISM (<http://cosbi.ku.edu.tr/prism/>). Kode PDB serta rantai spesifik protein ditambahkan dalam kolom kode PDB ID. Pengguna dapat memberikan alamat email di kolom opsional email untuk diberi tahu ketika pekerjaan telah selesai. Permintaan akan dimasukkan ke dalam antrian pekerjaan untuk dieksekusi. Waktu berjalan tergantung pada ukuran protein target dan jumlah *interface* yang cocok setelah langkah penyetaraan struktural. Namun, jika *docking* protein tertentu pernah dilakukan, maka hasil akan muncul secara langsung di *database* (Baspinar *et al.*, 2014).

PRISM akan memberikan informasi mengenai energi ikatan, prediksi struktur kompleks, dan data residu asam amino yang berinteraksi antara kompleks protein-protein. PRISM juga 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 *didocking* kembali secara spesifik (Silva *et al.*, 2018). Struktur kompleks protein-protein hasil simulasi *docking* menggunakan PRISM divisualisasikan berdasarkan residu asam amino protein-protein dari rantai yang saling berinteraksi satu sama lain dan *interface* menggunakan PyMOL 2.4.1 dan BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2021. Tahapan simulasi *molecular docking* protein-protein ditunjukkan pada **Gambar 3.10**.



Gambar 3.10 Tahapan simulasi *molecular docking* protein-protein