

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di tempat tinggal peneliti yaitu kota Cianjur, Jawa Barat dengan menggunakan sistem dalam jaringan (daring). Waktu penelitian dimulai bulan Februari sampai bulan Mei 2021.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian adalah perangkat keras Laptop Asus X441M dengan spesifikasi prosesor Intel(R) Celeron(R) N4000 CPU @1.10 GHz 1.10 GHz, Windows 10 *Home Single Language* sebagai sistem operasi, AutoDock Tools 1.5.6, AutoDock Vina 1.1.2, PyMOL 4.6.0, Open Babel GUI 2.4.1 dan BIOVIA *Discovery Studio Visualizer* 2021.

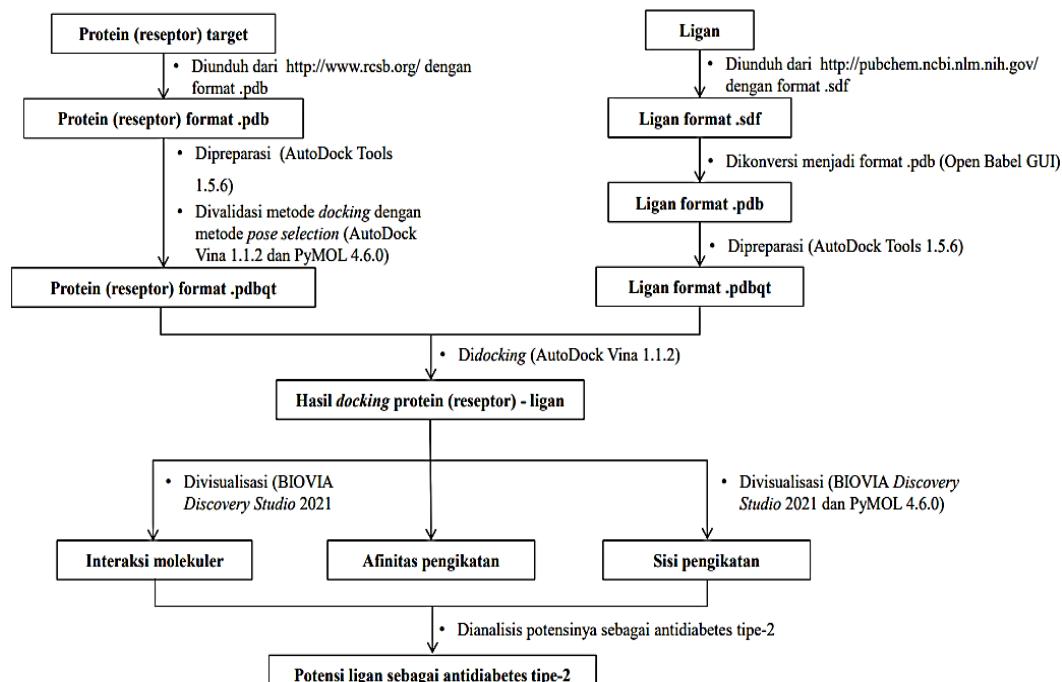
3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam uji *in silico* studi *molecular docking* potensi florotanin sebagai kandidat antidiabetes tipe-2 adalah protein target diantaranya α -amilase, α -glukosidase, dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV) dan glukosa-6-fosfat dehidrogenase (G6PD). Kristal protein target diunduh dari <https://www.rcsb.org/>. Kristal protein α -amilase diunduh dengan kriteria pemilihan kata PDB ID 1XH0 (struktur varian N298S dari α -amilase pankreas manusia), kristal protein α -glukosidase diunduh dengan kriteria pemilihan kata PDB ID 3L4V (Kompleks kristal N-terminal Maltase-Glukoamilase dari manusia), kristal protein dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV) dengan kriteria pemilihan kata PDB ID 3KWF (struktur DPP-IV manusia) dan glukosa-6-fosfat dehidrogenase (G6PD) dengan kriteria pemilihan kata PDB ID 2BHL (struktur x-ray glukosa-6-fosfat dehidrogenase (varian delesi) manusia). Struktur ligan senyawa florotanin (pentafuhalol A, pentafuhalol B dan hidroksipentafuhalol A), akarbosa, linagliptin, polidatin, pati, maltosa dan glukosa-6-fosfat (G6P) diunduh dari laman <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Pentafuhalol A (Pubchem ID: 102402297), pentafuhalol B (Pubchem ID: 102402304) dan hidroksipentafuhalol A (Pubchem ID: 102274236). Sebagai kontrol positif inhibitor α -amilase dan α -glukosidase

digunakan akarbosa (Pubchem ID: 41774). Kontrol positif inhibitor enzim DPP-IV digunakan linagliptin (Pubchem ID: 10096344) dan kontrol positif inhibitor enzim G6PD digunakan polidatin (Pubchem ID: 528171). Pembanding lainnya digunakan substrat alami dari tiap enzim yaitu substrat enzim α -amilase digunakan pati (Pubchem ID: 439341), substrat enzim α -glukosidase digunakan maltosa (Pubchem ID: 12302688), substrat enzim G6PD digunakan glukosa-6-fosfat (GG6P) (Pubchem ID: 5958) dan untuk substrat enzim DPP-IV tidak digunakan pada proses *docking*. Struktur inkretin yang terlalu besar menyebabkan ligan membutuhkan perubahan konformasi yang lebih besar di dalam protein, sehingga saat pengikatan tidak dapat ditempatkan dengan benar atau akan menghasilkan kesalahan dengan metode *docking* (Claußen *et al.*, 2001; Kurkinen *et al.*, 2018).

3.3 Prosedur Penelitian

Secara umum, metode penelitian yang dilakukan terdiri atas beberapa tahap, yaitu: (1) Preparasi protein; (2) Preparasi ligan; (3) Validasi metode *docking*; (4) Proses *docking* (*docking* ligan-protein menggunakan AutoDock Vina 1.1.2); (5) Visualisasi interaksi molekuler dan analisis mekanisme inhibisi. Tahapan penelitian ditunjukkan pada Gambar 3.1.

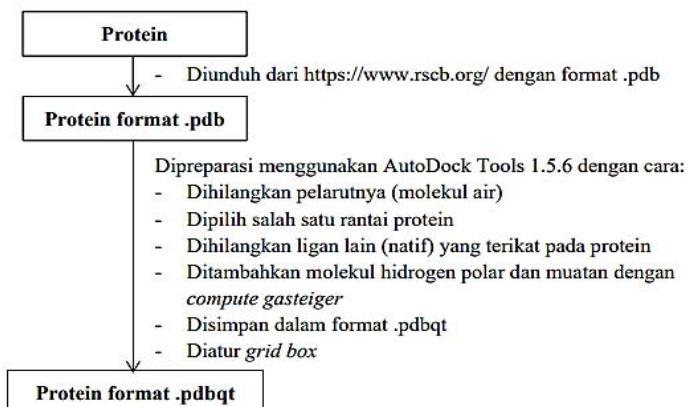


Gambar 3.1 Tahapan penelitian penentuan potensi senyawa florotanin sebagai kandidat antidiabetes tipe-2 dengan pendekatan *molecular docking*

3.3.1 Preparasi Protein

Protein yang digunakan dalam uji *in silico* adalah enzim α -amilase, α -glukosidase, dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV) dan glukosa-6-fosfat dehidrogenase (G6PD). Struktur 3D protein diunduh dari *Protein Data Bank* (PDB) dengan menggunakan format .pdb. yang dapat diakses pada laman <https://www.rcsb.org> (Rose *et al.*, 2018). Protein dipreparasi menggunakan AutoDock Tools 1.5.6. Pada saat preparasi protein, dilakukan penghilangan pelarut (molekul air) agar tidak mengganggu pada saat proses simulasi *docking* sehingga interaksi yang terjadi hanya antara ligan-protein (reseptor) karena pada umumnya struktur protein yang diunduh dari PDB mengandung pelarut berupa air dan residu lainnya. Kemudian, dipilih salah satu rantai protein, dihapus ligan lain yang terikat pada protein atau pemisahan ligan *native* yang terdapat pada molekul protein (Rasouli *et al.*, 2017).

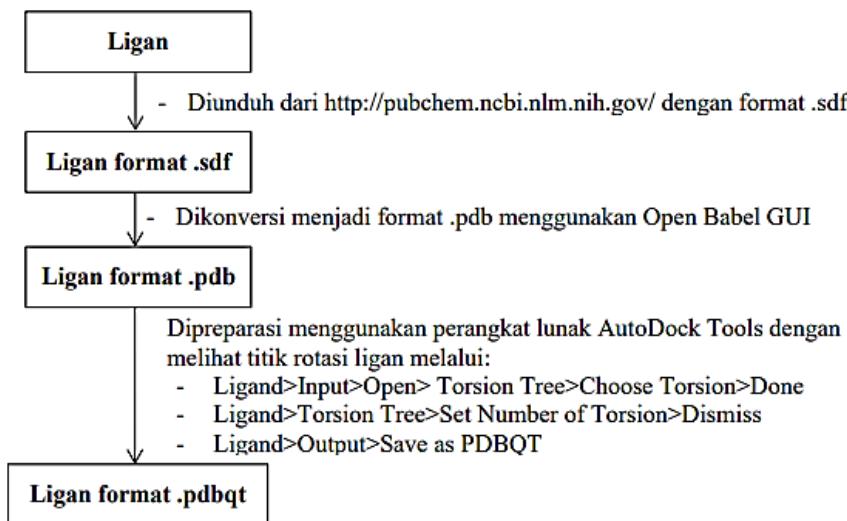
Struktur protein hasil preparasi disimpan dalam format .pdb untuk dilakukan preparasi selanjutnya. Preparasi lanjutan untuk protein yaitu dengan penambahan hidrogen polar dan muatan dengan *compute gasteiger*. Penambahan atom hidrogen polar bertujuan untuk menyesuaikan suasana *docking* agar mendekati pH 7 (mendekati suasana pH dalam tubuh) serta agar struktur protein kembali memiliki atom hidrogen sehingga jika terdapat interaksi berupa ikatan hidrogen dapat teramat. Penambahan muatan *gasteiger* dilakukan agar dapat menyesuaikan dengan lingkungan penambatan molekul sehingga dapat diperoleh perhitungan yang benar (Huey *et al.*, 2012). Data protein dengan format .pdb dimuat pada perangkat lunak AutoDock Tools dengan mengklik *Grid>Macromolecule>Choose*. Data protein disimpan dalam format .pdbqt dan diatur *grid box*. Tahapan preparasi protein ditunjukkan pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2 Tahapan preparasi protein

3.3.2 Preparasi Ligan

Struktur ligan/senyawa kontrol positif inhibitor dari keempat enzim (akarbosa, linagliptin dan polidatin), substrat enzim (pati, maltosa dan glukosa-6-fosfat (G6P)) serta senyawa uji florotanin (pentafuhalol A, pentafuhalol B dan hidroksipentafuhalol A) diunduh dari website PubChem pada laman <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> menggunakan format .sdf, kemudian di konversi menjadi format .pdb menggunakan perangkat lunak Open Babel GUI untuk menyesuaikan dengan format yang di proses pada simulasi *molecular docking*. Data kontrol positif, substrat dan senyawa uji florotanin dengan format .pdb dipreparasi menggunakan perangkat lunak AutoDock Tools 1.5.6 dengan mengklik *Ligand>Input>Open> Torsion Tree>Choose Torsion>Done*, kemudian *Ligand>Torsion Tree>Set Number of Torsion>Dismiss* dan *Ligand>Output>Save as PDBQT* (data disimpan dengan format .pdbqt). Tahapan preparasi ligan ditunjukkan pada Gambar 3.3. Pada penelitian ini senyawa florotanin yang digunakan yaitu pentafuhalol A, pentafuhalol B serta hidroksipentafuhalol A dikarenakan hanya senyawa tersebut yang tersedia pada *database* PDB dari kelompok senyawa fuhalol.



Gambar 3.3 Tahapan preparasi ligan

3.3.3 Validasi Metode Docking

Validasi dilakukan dengan metode *pose selection* dimana program *docking* digunakan untuk mendock *ligand* kembali suatu senyawa/ligan yang telah diketahui orientasi dan konformasinya pada sisi aktif reseptornya (Hevener *et al.*, 2009).

Validasi protokol *docking* bertujuan untuk memverifikasi reliabilitas simulasi *docking* (Munawaroh *et al.*, 2020). Validasi dilakukan dengan cara memisahkan struktur protein dari ligan natif yang sudah terikat dengan protein (reseptor), kemudian dilakukan proses *docking* ulang (*redocking*) untuk mengetahui nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*), yaitu nilai standar deviasi yang menunjukkan perbedaan struktur ligan hasil *docking* ulang dengan ligan natif awal yang sudah terikat pada protein (Ferencz & Muntean, 2015). RMSD merupakan salah satu parameter yang menggambarkan seberapa besar perubahan interaksi antara ligan-protein pada struktur kristal sebelum dan sesudah dilakukan *docking*. Metode *docking* dikatakan valid apabila memiliki nilai RMSD dibawah 2Å (Trot & Olson, 2010). Hal ini berarti semakin kecil nilai RMSD semakin dekat posisi ligan alami hasil *docking* dengan ligan alami hasil kristalografi. Sistem *docking* yang digunakan dalam kondisi ligan yang fleksibel. Kondisi ligan fleksibel memungkinkan ligan untuk melakukan penyesuaian struktur demi mencapai konformasi yang stabil saat berikatan dengan sisi aktif reseptor (Muttaqin *et al.*, 2019). Nilai RMSD diperoleh dari kalkulasi menggunakan perangkat lunak PyMOL dengan memasukan perintah “rms_cur[spasi](nama ligan sebelum di *docking*),[spasi](nama ligan yang telah di *docking*).

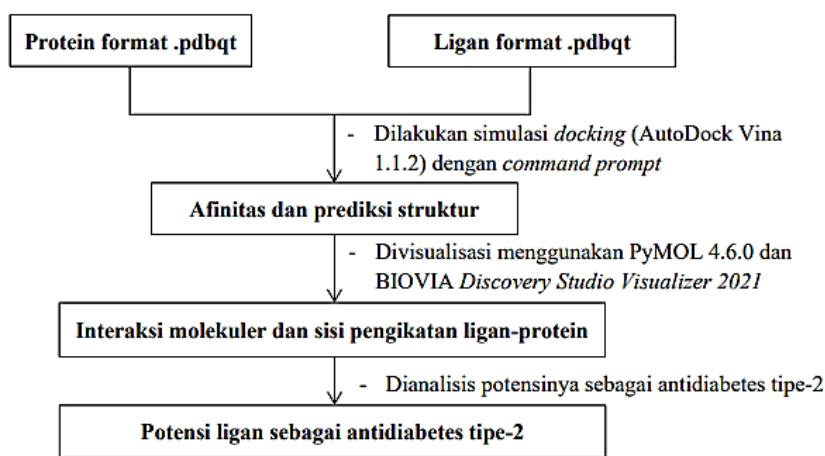
Pada proses *docking* ulang (*redocking*) dilakukan penentuan lokasi/posisi situs penambatan yang diatur sesuai dengan posisi dan ukuran inhibitor dengan mengklik *Grid>Set Map Types>Choose Ligand*, kemudian pilih *Grid Box>Center>Center on Ligand Spacing Angstrom = 1*. *Grid box* adalah tempat/posisi dimana ligan akan berinteraksi dengan residu asam amino pada protein. Penentuan *grid box* ini dilakukan agar diketahui titik koordinat *binding site* dari suatu protein. Lokasi penambatan (*grid box/kubus kisi*) disesuaikan dengan ukuran ligan (tidak lebih kecil dari ukuran ligan). Konfigurasi penambatan molekuler dibuat dan disimpan dalam *note* dalam format .txt untuk *simulasi docking* dengan mengklik *Docking>Output>Vina configuration* dan hasil preparasi disimpan dalam format .pdbqt. Koordinat *grid box* situs aktif protein untuk *docking* ligan uji berdasarkan hasil validasi ditunjukkan pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Koordinat *Grid Box* pada *Molecular Docking*

No	Reseptor	Koordinat (Å)			Ukuran (Å)			RMSD (Å)
		X	Y	Z	X	Y	Z	
1	α -amilase	7,033	15,159	39,944	24	12	16	0,812
2	α -glukosidase	44.118	89.842	33.527	10	14	10	1,676
3	Dipeptidil Peptidase-IV (DPP-IV)	67.522	75.127	72.095	8	8	16	0,518
4	Glukosa-6-Fosfat Dehidrogenase (G6PD)	6.364	122.352	6.612	18	14	18	1,558

3.3.4 Proses *Docking (Docking Ligan-Protein)*

Molecular docking dilakukan dengan Autodock Vina (Trot & Olson, 2010). Data reseptor/protein dan data ligan yang telah dipreparasi digunakan sebagai input. Lokasi penambatan (*grid box*) disesuaikan dengan ukuran ligan natif yang telah dilakukan validasi. File konfigurasi *molecular docking* dibuat dan disimpan dengan nama conf.txt. File konfigurasi dibuat untuk masing-masing senyawa dan tiap-tiap protein. Proses analisis *molecular docking* protein-ligan melibatkan perintah komputer atau *command prompt* (Trot & Olson, 2010). Analisis *molecular docking* menggunakan program Autodock Vina 1.1.2 dengan perintah: vina --config conf.txt --log log.txt. Hasil *docking* keluar dalam prediksi struktur dan nilai energi bebas Gibbs (-). Afinitas pengikatan dikatakan baik apabila nilai energi bebas senyawa uji lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol positif inhibitor (dalam negatif). Data struktur ligan hasil *docking* kemudian disimpan dalam format .pdbqt dengan perintah: Vina_split --input all.pdbqt. Tahapan *molecular docking* protein-ligan seperti yang ditunjukkan pada Gambar 3.4.

Gambar 3.4 Tahapan *molecular docking* protein-ligan

3.3.5 Visualisasi Interaksi Molekuler dan Analisis Mekanisme Inhibisi

Visualisasi model akarbosa, linagliptin, polidatin, pati, maltosa, glukosa-6-fosfat (G6P) dan senyawa florotanin (pentafuhalol A, pentafuhalol B dan hidroksipentafuhalol A) serta data reseptor di visualisasikan dengan menggunakan perangkat lunak PyMOL. Visualisasi digunakan untuk mendalami dan memahami struktur dari suatu molekul. Visualisasi data reseptor dengan menggunakan model *surface*, sedangkan model akarbosa, linagliptin, polidatin, pati, maltosa, glukosa-6-fosfat (G6P) dan senyawa florotanin (pentafuhalol A, pentafuhalol B dan hidroksipentafuhalol A) divisualisasikan dengan model 3D. Hasil visualisasi disimpan dalam format .png. Parameter yang diamati adalah posisi ligan terhadap reseptor, sehingga dapat dianalisis mekanisme inhibisinya. Analisis interaksi molekuler kompleks kontrol positif dan ligan uji dengan masing-masing enzim menggunakan perangkat lunak BIOVIA *Discovery Studio Visualizer* 2021. Analisis interaksi molekuler dilakukan terhadap enam jenis interaksi yaitu ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, interaksi elektrostatik, interaksi *unfavorable* (interaksi tidak menguntungkan yang terbentuk antara protein-ligan, ada yang bersifat donor-donor maupun akseptor-akseptor) dan interaksi van der Waals serta interaksi lain yang mungkin terbentuk seperti interaksi π -sulfur dan π -*lone pair*. Hasil analisis interaksi molekuler yang terbentuk antara senyawa uji dengan enzim dibandingkan dengan interaksi molekuler kontrol positif inhibitor enzim untuk mengetahui aktivitas senyawa yang diujikan sebagai antidiabetes. Menurut jarak, ikatan hidrogen terbagi menjadi beberapa klasifikasi dalam satuan *Amstrong* (\AA) yang terdapat pada Tabel 3.2.

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

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