

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari 2021 sampai dengan bulan Mei 2021. Penelitian dilakukan di tempat tinggal peneliti di Kota Bandung menggunakan sistem penelitian menggunakan sistem dalam jaringan (daring) yang dilakukan di tempat tinggal peneliti di Kota Bandung, Jawa Barat.

#### 3.2. Alat dan Bahan

##### 3.2.1. Alat

pada penelitian kajian potensi karagenan dari alga merah (*Rhodophyta*) sebagai kandidat antidiabetes tipe-2 menggunakan simulasi molekular *docking* alat-alat yang digunakan antara lain adalah laptop dengan prosesor Intel Core i3, Windows 10 64-bit sebagai sistem operasi dan perangkat lunak yang terdiri dari AutoDock Tools, PyMol, Open Babel GUI, MOPAC 2016, AutoDock Vina, dan BIOVIA *Discovery Studio Visualizer* 2021.

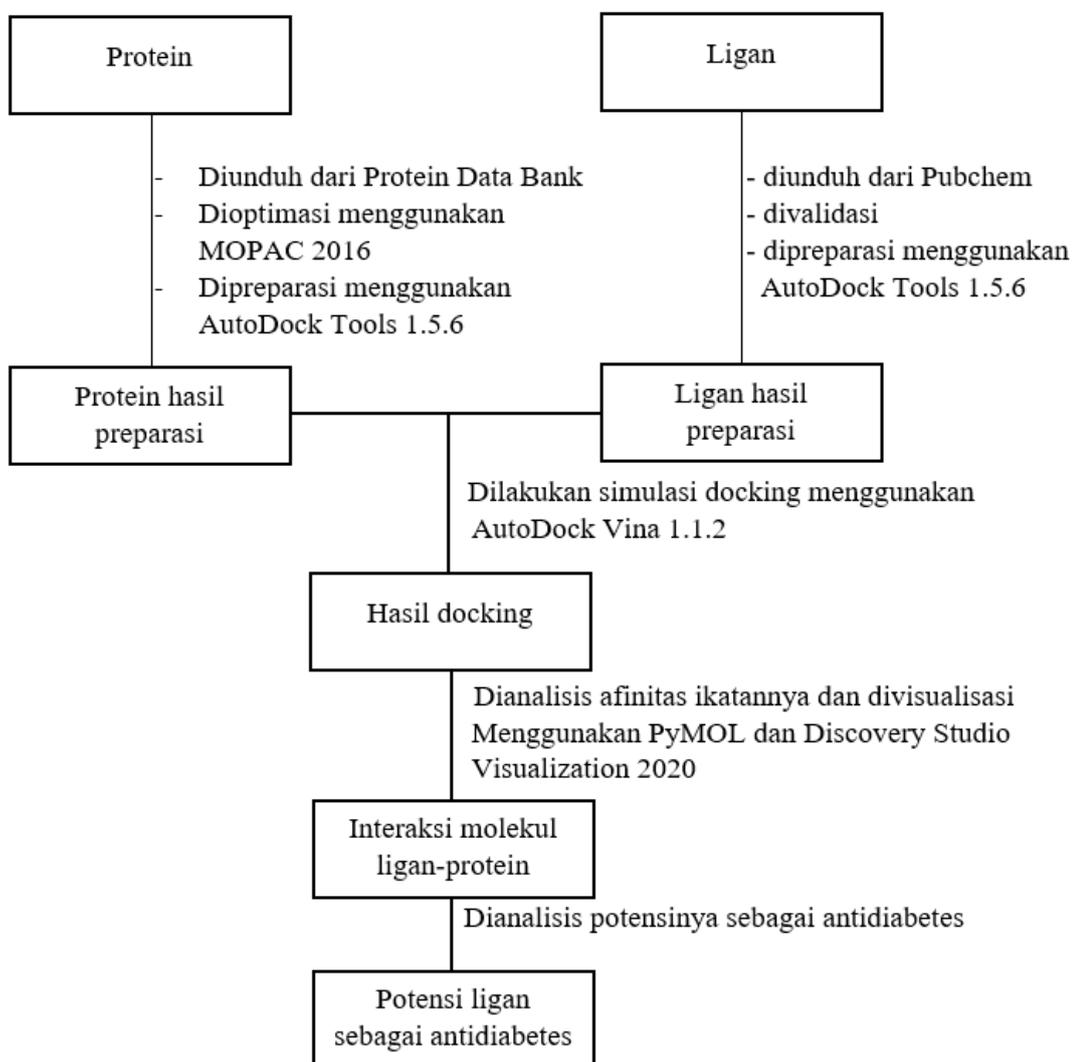
##### 3.2.2. Bahan

Pada proses penelitian kajian potensi karagenan dari alga merah (*Rhodophyta*) sebagai kandidat antidiabetes tipe-2 menggunakan simulasi *molecular docking* bahan yang digunakan adalah struktur kristal yang diunduh dari <https://www.rcsb.org/> dengan PDB ID 1XH0 untuk  $\alpha$ -amilase, ID 2BHL untuk G6PD, ID 3L4V untuk  $\alpha$ -glucosidase, serta ID 3KWF untuk DPP-IV. Adapun untuk struktur ligan antara lain akarbosa dengan ID 41774, senyawa  $\kappa$ -karagenan dengan ID 11966249, senyawa  $\iota$ -karagenan dengan ID 11966245, senyawa polidatin dengan ID 5281718, senyawa linagliptin dengan ID 10096344 yang diunduh melalui <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

#### 3.3. Tahapan Penelitian

Pada proses penelitian kajian potensi karagenan dari alga merah (*Rhodophyta*) sebagai kandidat antidiabetes tipe-2 menggunakan simulasi

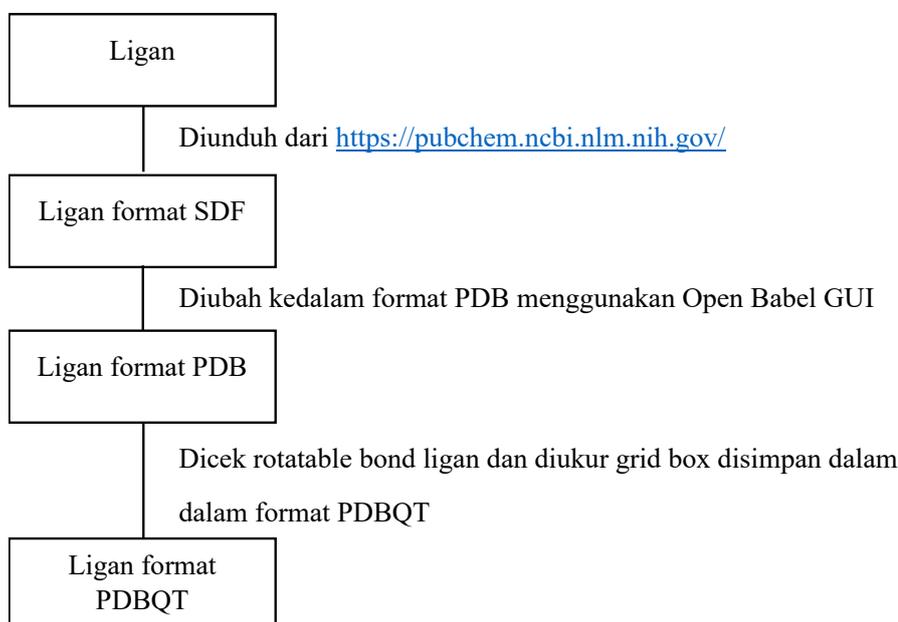
*molecular docking* dilakukan penelitian yang terdiri dari beberapa tahap, antara lain: (1) Preparasi ligan; (2) Preparasi protein; (3) Validasi metode *docking*; (4) *Docking* ligan-protein menggunakan AutoDock Vina 1.1.2; (5) Visualisasi interaksi molekuler dan analisis hasil *docking* menggunakan *Discovery Studio Visualizer* 2021. Dari hasil visualisasi *docking* yang telah dilakukan, digunakan untuk memprediksi interaksi antara protein dan ligan. Bagan alir dari penelitian yang dilakukan ditunjukkan pada **Gambar 3.1**.



**Gambar 3. 1** Bagan alir penentuan potensi karagenan sebagai kandidat antidiabetes menggunakan simulasi molekular docking

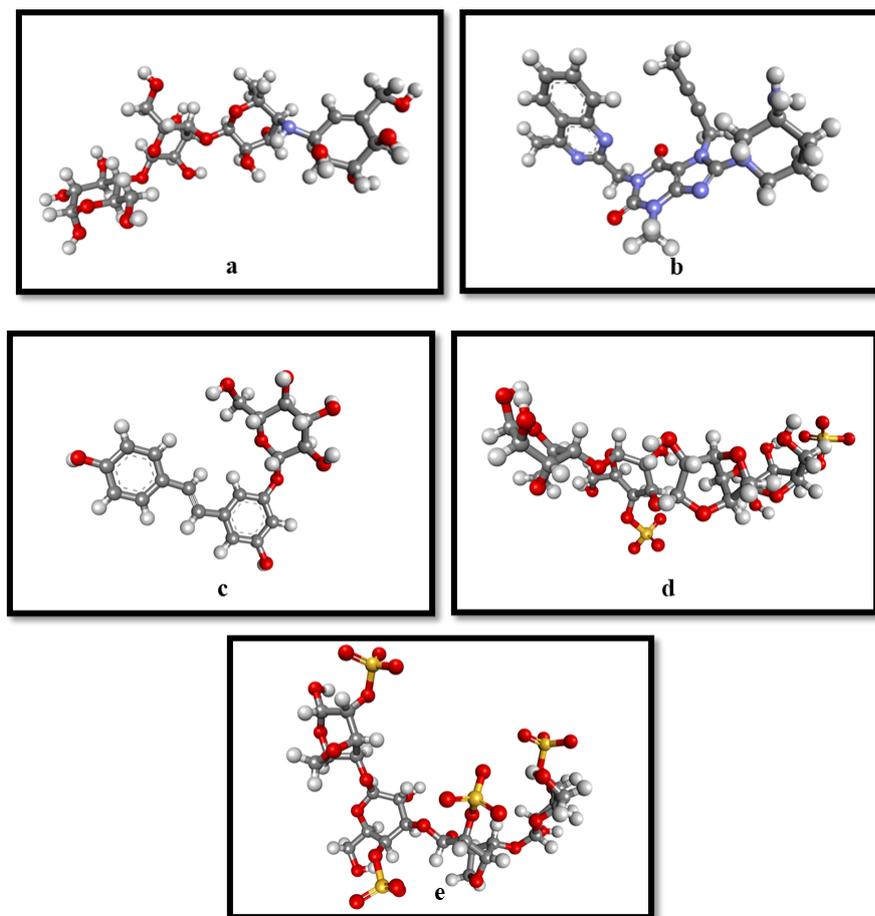
### 3.3.1. Preparasi Ligan

Pada penelitian kajian potensi karagenan dan turunannya dari alga merah (*rhodophyta*) sebagai kandidat antidiabetes tipe-2 menggunakan simulasi *molecular docking* yang telah dilakukan ligan yang digunakan antara lain akarbosa, polidatin, linagliptin sebagai kontrol positif dari enzim, serta  $\kappa$ -karagenan,  $\iota$ -karagenan. Ligan diunduh dari laman <https://pubchem.ncbi.gov/> dengan format .sdf kemudian diubah formatnya kedalam bentuk .PDB menggunakan Open Babel GUI menyesuaikan yang diproses dalam AutodockTools 1.5.6. Preparasi ligan dilakukan dengan mengatur rotasi ligan. Alur preparasi ligan tertera pada **Gambar 3.2**.



**Gambar 3. 2** Bagan alir preparasi ligan

Preparasi ligan dilakukan pada aplikasi *AutoDockTools*. Selain ligan uji yaitu  $\kappa$ -karagenan dan  $\iota$ -karagenan, dilakukan pula preparasi terhadap akarbosa sebagai ligan pembanding untuk enzim  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase, linagliptin sebagai ligan pembanding untuk protein DPP-IV, dan polidatin sebagai ligan pembanding untuk protein G6PD. Pemodelan dari ligan yang telah melalui proses preparasi tervisualisasikan pada **Gambar 3.3**.



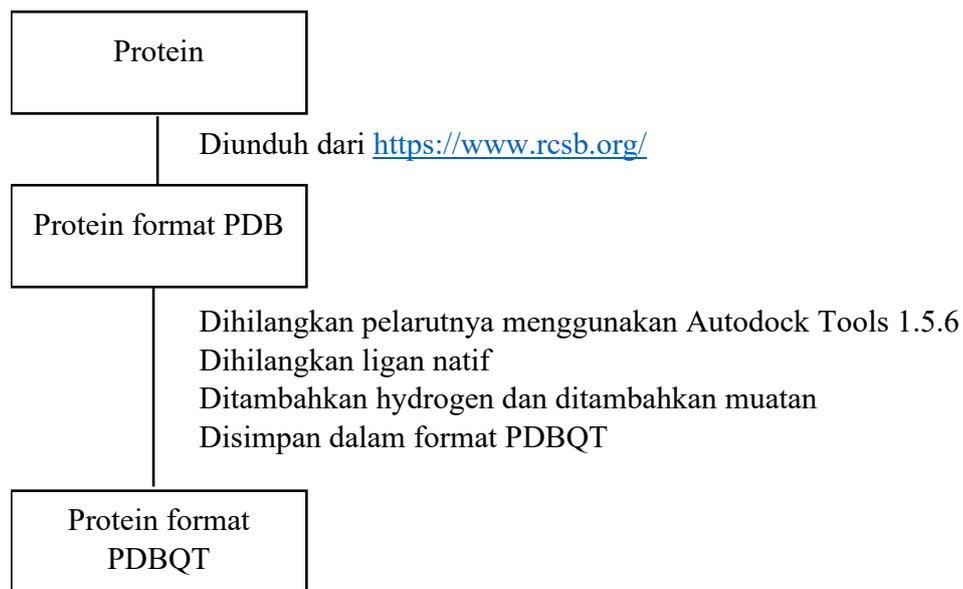
**Gambar 3.3** Visualisasi Ligan Hasil Preparasi  
(a) akarbosa (b) polidatin (c) linagliptin (d)  $\kappa$ -karagenan (e)  $\iota$ -karagenan

### 3.3.2. Preparasi Protein

Pada penelitian kajian potensi senyawa karagenan ditentukan dengan melakukan simulasi penambatan (*docking*) senyawa  $\kappa$ -karagenan dan  $\iota$ -karagenan, terhadap protein-protein berikut antara lain  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glukosidase, G6PD dan DPP-IV dengan format .PDB yang diunduh dari Protein Data Bank (PDB) yang terdapat dalam laman <https://www.rcsb.org/> (Rose, 2013). Protein-protein tersebut dipreparasi menggunakan AutodockTools 1.5.6 dengan menghilangkan pelarut yang terdapat pada struktur protein. Dilakukan penghilangan pelarut pada protein-protein agar selanjutnya dapat dilakukan simulasi *molecular docking* (Baspinar, 2014). Pelarut yang dihilangkan adalah molekul air karena dikhawatirkan molekul air akan mengganggu keberlangsungan proses *docking*. Gangguan yang terjadi

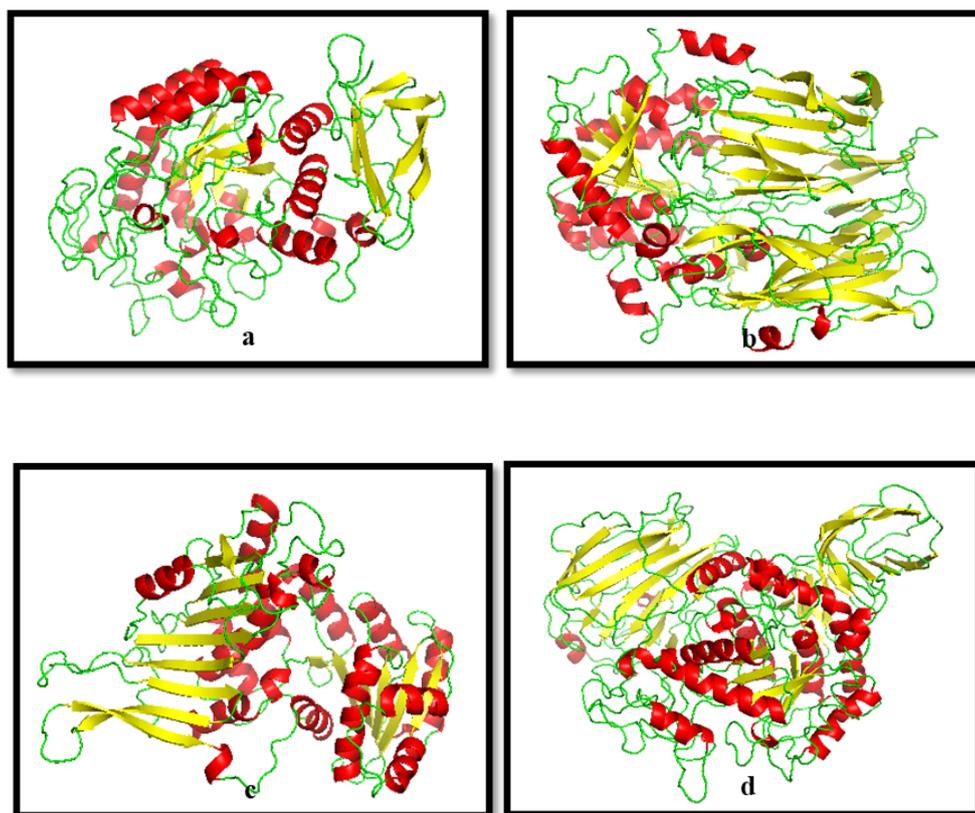
akibat adanya molekul air pada protein seperti menurunnya tingkat akurasi dikarenakan terhambatnya proses pencarian konformasi (Gilson, 2007).

Setelah protein dihilangkan pelarutnya ditambahkan hidrogen dan muatan yang bertujuan untuk mencegah bias terhadap konfigurasi ligan (Bianco, 2016) selain itu penambahan hidrogen polar bertujuan untuk memungkinkan adanya interaksi intramolekuler antara asam amino pada protein dengan ligan, karena interaksi reseptor dan ligan dapat membentuk ikatan hidrogen yang dapat mempengaruhi tingkat afinitas antara reseptor dengan ligan (Nurjanah, 2019). Molekul-molekul yang berikatan namun tidak dibutuhkan dalam proses *docking* dihilangkan terlebih dahulu, karena hanya bagian rantai protein saja yang akan digunakan. Protein yang telah selesai dipreparasi selanjutnya disimpan pada format PDBQT. Tahapan preparasi protein ditunjukkan pada **gambar 3.4**.



**Gambar 3. 4** Bagan alir preparasi protein

Pemodelan dari protein yang telah melalui proses preparasi tervisualisasikan pada **Gambar 3.5**.



**Gambar 3. 5** Visualisasi protein  
(a)  $\alpha$ -Amilase (b) DPP-IV (c) G6PD (d)  $\alpha$ -Glukosidase

### 3.3.3. Validasi Metode *Docking*

Validasi metode yang dilakukan pada proses *docking* kali ini adalah metode *redocking* dengan *pose selection* yang dilakukan pada sisi aktif reseptor yang berikatan dengan ligan (Kontoyianni, 2004). Tujuan dari protokol *docking* adalah untuk memverifikasi realibilitas simulasi (Munawaroh, 2020). Dilakukan validasi dengan cara pemisahan protein dari ligan natif yang terikat pada reseptor, kemudian dilakukan *redocking* yang dilakukan untuk menentukan nilai *root mean square deviation* (RMSD) dan memastikan konformasi inhibitor serta energi ikat yang diprediksi (Deepa, 2010).

*Root Mean Square Deviation* (RMSD) adalah fitur yang biasa digunakan untuk membandingkan perbedaan konformasi dari system molekuler dimana dalam dinamika molekuler dan protein-ligan *docking* (PLD) *Root Mean Square Deviation* (RMSD) merupakan metode yang digunakan untuk validasi hasil program *docking* dan digunakan secara rutin. RMSD digunakan untuk mengukur kualitas hasil suatu

ikatan yang diketahui dengan membandingkan bentuk ligan yang diperoleh dengan bentuk ligan eksperimen (Coutsias, 2019). Apabila RMSD berada pada nilai dibawah 2Å maka metode penambatan dapat dikatakan valid (Bajda, 2013). Dilakukan penentuan posisi situs penambatan pada proses *redocking* yang diatur sesuai dengan posisi dan ukuran ligan uji. Posisi penambatan (*grid box*) yang telah diatur sesuai dengan posisi dan ukuran ligan kemudian disimpan dalam *note* dengan format .txt untuk simulasi *docking* dan hasil preparasi disimpan dalam format PDBQT. Berdasarkan hasil validasi koordinat *grid box* situs penambatan reseptor (protein) ditunjukkan pada **Tabel 3.1**.

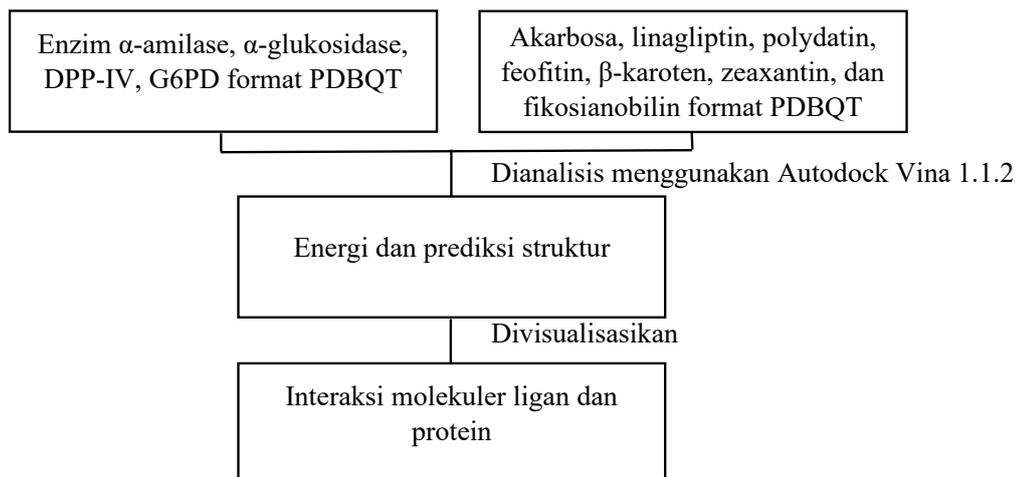
**Tabel 3. 1** Koordinat *grid box* pada *molecular docking*

Reseptor	Koordinat (Å)			Ukuran (Å)			RMSD (Å)
	X	Y	Z	X	Y	Z	
<b>α-amilase</b>	7,033	15,159	39,944	22	12	14	0,738
<b>α-glukosidase</b>	44,118	89,842	33,527	10	14	10	1,483
<b>DPP-IV</b>	46,499	51,555	34,033	10	6	16	0,456
<b>G6PD</b>	1,233	124,12	11,208	20	15	20	1,106

Dari data nilai RMSD yang terdapat pada Tabel 3.1 nilai RMSD yang didapatkan pada hasil uji *docking* seluruhnya memiliki nilai <2 sehingga metode yang digunakan pada masing masing uji *molecular docking* dapat diterima. Nilai RMSD yang paling rendah didapatkan pada hasil *docking* protein DPP-IV dan nilai RMSD yang paling tinggi didapatkan pada hasil *docking* protein G6PD. Semakin rendah nilai rmsd yang didapatkan menandakan bahwa hasil tersebut menunjukkan hasil yang memiliki ketelitian yang semakin bagus dan begitupun sebaliknya.

### 3.3.4. *Docking* Ligan-Protein

Ligan dan protein hasil preparasi dilakukan *docking* ligan-protein menggunakan Autodock Vina. Posisi *grid box* enzim yang telah disimpan dalam *note* digunakan dalam proses *docking* sesuai dengan nama reseptor (protein) dan ligan uji yang akan diproses. Proses *molecular docking* ligan-protein melibatkan *command prompt* atau perintah computer (Morris, 2009). Parameter kestabilan yang ditentukan adalah energi bebas Gibbs dan interaksi kimia yang terbentuk. Tahapan *molecular docking* ligan-protein ditunjukkan oleh **Gambar 3.6**.



**Gambar 3. 6** Bagan alir molecular docking ligan-protein

### 3.3.5. Visualisasi Interaksi Molekuler dan Analisis Hasil *Docking*

Visualisasi interaksi molekuler merupakan tahapan yang penting untuk mendalami dan memahami struktur suatu molekul (Delano, 2004). Perangkat lunak BIOVIA *Discovery Studio Visualization* 2021 digunakan untuk memvisualisasikan ligan dan reseptor. Dari hasil visualisasi diperlihatkan jenis ikatan, Panjang ikatan dengan klasifikasi jarak ikatan yang ditunjukkan pada **Tabel 3.2** atom pada ligan yang berikatan dengan reseptor (protein), dan melihat interaksi residu-residu asam amino antara ligan dengan reseptor (protein).

**Tabel 3. 2** Klasifikasi Jarak Ikatan (Guedes, 2014)

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