

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan penelitian deskriptif. Penelitian deskriptif diartikan sebagai metode penelitian yang digunakan untuk menggambarkan fenomena yang ada. Tujuan dari studi deskriptif adalah untuk menggambarkan individu, peristiwa, atau kondisi dengan mempelajarinya sebagaimana adanya di alam, selain itu studi deskriptif menerangkan hubungan, menguji, membuat prediksi dari suatu fenomena secara sistematis (Siedlecki, 2020). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui nilai afinitas dan interaksi molekuler senyawa metabolit yang terkandung pada dagin Ikan sidat (*Anguilla bicolor bicolor*) sebagai inhibitor terhadap *main protease SARS-CoV-2*, *receptor binding domain* (RBD) SARS-CoV-2, dan *Angiotensin-converting Enzyme 2* (ACE2).

3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Kegiatan penelitian ini dilakukan di rumah tempat tinggal penulis yaitu di Kecamatan Batujajar, Kabupaten Bandung Barat pada bulan Maret sampai Juli 2021.

3.3 Alat dan Bahan

Penelitian ini dilakukan secara *in silico* dengan bantuan perangkat keras komputer (*Hardware*) dan lunak (*Software*) yang dapat diakses siapapun (*Open-source*). Adapun spesifikasi dari perangkat yang digunakan dapat dilihat pada tabel 3.1. Bahan yang digunakan didapatkan dari database Protein Data Bank di RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>) dan database senyawa kimia di Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) yang dapat dilihat pada tabel 3.2 berikut ini.

Tabel 3.1 Alat yang digunakan

No.	Perangkat Keras/Lunak	Spesifikasi	Jumlah
1.	Laptop MSI Modern 14 B10RASW-224ID	Intel® Core™ i5-10210; RAM 8GB; VGA NVIDIA GeForce® MX330 2GB; OS Windows 10 64-bit	1 Unit
2.	<i>Software</i> Google Chrome	Versi 91.0.4472.124	1 Unit

3.	<i>Software</i> Open Babel GUI	Versi 2.4.1	1 Unit
4.	<i>Software</i> Swiss PDB Viewer (SPDBV)	Versi 4.1.0	1 Unit
5.	<i>Software</i> UCSF Chimera	Versi 1.15	1 Unit
6.	<i>Software</i> AutoDock Tools	Versi 1.5.7	1 Unit
7.	<i>Software</i> Biovia Discovery Studio	Versi 20.10.0	1 Unit
8.	Perangkat Lunak Autodock Vina	Versi 1.1.2	1 Unit
9.	<i>Software</i> PyMOL	Versi 2.4.1	1 Unit

Tabel 3.2 Bahan yang digunakan

No.	Nama Bahan	ID	Jenis Bahan	Spesifikasi
1.	Remdesivir	121304016	Kontrol	Tiga Dimensi (3D) .SDF
2.	Nelfinavir	64143	Kontrol	Tiga Dimensi (3D) .SDF
3.	Hydroxychloroquine	3652	Kontrol	Tiga Dimensi (3D) .SDF
4.	Molnupiravir	145996610	Kontrol	Tiga Dimensi (3D) .SDF
5.	15(R)-Prostaglandin D2	132282632	Ligan	Tiga Dimensi (3D) .SDF
6.	1beta-Hydroxycholic acid	5283893	Ligan	Tiga Dimensi (3D) .SDF
7.	4,4-dimethyl-5alpha-cholesta-8,14,24-trien-3beta-ol	443212	Ligan	Tiga Dimensi (3D) .SDF
8.	Carboprost	5281075	Ligan	Tiga Dimensi (3D) .SDF
9.	6-acetyloxy-7-ethenyl-1,4a,7-trimethyl-3,4,4b,5,6,8,10,10a-octahydro-2H-phenanthrene-1-carboxylic acid	51694232	Ligan	Tiga Dimensi (3D) .SDF
10.	Androstanolone	10635	Ligan	Tiga Dimensi (3D) .SDF
11.	19(R)-hydroxy Prostaglandin A2	16061098	Ligan	Tiga Dimensi (3D) .SDF
12.	4-[(2,4-Dihydroxyphenyl)diazenyl] benzenesulfonic acid	11035	Ligan	Tiga Dimensi (3D) .SDF

13.	Androst-4-en-3-one	250294	Ligan	Tiga Dimensi (3D) .SDF
14.	8-(4-Sulfophenyl) octanoic acid	53987276	Ligan	Tiga Dimensi (3D) .SDF
15.	Chenodeoxycholic acid 3-sulfate	21252312	Ligan	Tiga Dimensi (3D) .SDF
16.	Cannabigerol	132282632	Ligan	Tiga Dimensi (3D) .SDF
17.	<i>Main Protease</i> (Mpro) Sars-Cov-2	6W63	Protein	Hasil Kristalografi .PDB
18.	<i>Receptor Binding Domain</i> (RBD) Sars-Cov-2	6M0J (Chain E)	Protein	Hasil Kristalografi .PDB
19.	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i> 2 (ACE2)	6M0J (Chain A)	Protein	Hasil Kristalografi .PDB

Tabel 3.1 Laman Unduh Perangkat Lunak yang digunakan

No	Nama	Laman
1.	Google Chrome	https://www.google.com/intl/id_id/chrome/
2.	Open Babel	http://openbabel.org/wiki/Category:Installation
3.	Swiss PDB Viewer	https://spdbv.vital-it.ch/download_prerelease.html
4.	UCSF Chimera	https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html
5.	AutoDock Tools	http://autodock.scripps.edu/downloads/autodock-registration/autodock-4-2-download-page/
6.	Biovia Discovery Studio	https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download
7.	AutoDock Vina	http://vina.scripps.edu/download.html
8.	PyMOL	https://pymol.org/2/

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Analisis Metabolomik UPLC-MS Pada Daging Sidat (*Anguilla bicolor bicolor*)

Ligan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah senyawa yang diperoleh berdasarkan hasil analisis metabolomik nontarget daging dari daging ikan sidat (*Anguilla bicolor bicolor*) umur 12-13 bulan dari alam dan budidaya. Ikan sidat dari alam memiliki berat 100 gram dan dari budidaya memiliki berat 200-250 gram. Analisis metabolik menggunakan *Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (UPLCMS). Didapatkan 935 senyawa metabolit primer dan sekunder yang terkandung dalam daging buah sidat (*Anguilla*

bicolor bicolor). Hasil dari analisis metabolomik tersebut kemudian dibedakan berdasarkan metabolit primer dan sekunder yang dilakukan Institut Bioinformatika Indonesia (INBIO-Indonesia). Setelah dilakukan identifikasi, didapatkan sebanyak 629 senyawa yang merupakan metabolit sekunder. Metabolit sekunder dibagi secara acak menjadi dua, masing-masing mengandung total 314 dan 315 senyawa.

3.4.2 Prediksi Potensi Aktivitas Antiviral dengan PASS Online

Hasil dari analisis metabolomic sebanyak 315 senyawa dilakukan prediksi potensi aktivitas biologis pada webserver PASS online (<http://www.way2drug.com/>). Pencarian dilakukan berdasarkan struktur canonical SMILE. Selain itu terdapat batasan pencarian prediksi pada dua aktivitas biologis, yaitu antiviral, immunostimulant, immunomodulator, antiinflamasi, dan antioksidan pada setiap senyawa. Tujuan penggunaan analisis ini untuk skrining senyawa yang menunjukkan aktivitas sebagai antiviral (influenza) dengan nilai $P_a > 0,6$ dan antiviral (non influenza) dengan nilai $P_a > 0,7$ sebagai ligan pilihan dalam penelitian ini.

3.4.3 Prediksi Molekul Kandidat Obat dengan Lipinski's Rule of Five

Sebanyak 9 senyawa dengan potensi aktivitas antiviral dengan nilai $P_a > 0,6$ dilakukan prediksi kemiripan dengan molekul obat pada webserver SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>). Prediksi ini dilakukan dengan *input* struktur canonical SMILE yang diperoleh dari database Pubchem. Prediksi ini dilakukan untuk memberikan gambaran suatu senyawa kandidat menjadi obat dengan mengikuti 2 aturan dari Lipinski yaitu massa molekul < 500 da, tinggi lipofilisitas atau LogP kurang dari 5, jumlah ikatan dan akseptor hydrogen masing-masing kurang dari 5 dan 10, serta reaktivitas molar dalam rentang 40-130.

3.4.4 Pemilihan Senyawa Berdasarkan Aktivitas pada Hewan

Metabolit sekunder yang diidentifikasi berdasarkan aktivitasnya biologis pada hewan dan tumbuhan, pencarian data mengenai informasi metabolit yang didapatkan ditelusuri pada database yang tersedia secara online seperti Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>), *Human Metabolome Database* (<https://hmdb.ca/>), *KEGG Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (<https://www.genome.jp/kegg/>), *DrugBank Online*

(<https://go.drugbank.com/>) serta dari literatur penelitian. Senyawa yang diketahui ditemukan pada tumbuhan dikecualikan dari pemilihan untuk diuji penambatannya.

3.4.5 Pengunduhan Data Ligan Uji dan Reseptor

Data dari setiap senyawa didapatkan dari pencarian berdasarkan kesesuaian data seperti berat molekul, canonical SMILE dan struktur 3D pada database senyawa kimia Pubchem. Kemudian struktur ligan diunduh struktur tiga dimensi (3D) dengan format sdf. Ligan dengan format sdf diubah menjadi pdb dengan perangkat lunak OpenBabel. (O'Boyle dkk., 2011). Tujuan perubahan format ini agar file ligan yang digunakan dapat sesuai dengan format yang dibutuhkan pada *software* Autodock Tools.

Struktur Reseptor dari M^{pro} Sars-CoV-2, RBD Sars-CoV-2, dan ACE2 diunduh dari database Protein Data Bank dalam format pdb. Ligan alami (*native ligand*) yang berikatan dengan protein kompleks M^{pro} Sars-CoV-2 dipisahkan menggunakan perangkat lunak Biovia Discovery Studio dan disimpan dalam format pdb. Hasil dari pemisahan *native ligand* akan digunakan dalam validasi penambatan pada reseptor M^{pro} Sars-CoV-2.

3.4.6 Preparasi Ligan Uji dan Reseptor

Preparasi Ligan dilakukan dengan penambahan hidrogen polar dan muatan Gasteiger menggunakan perangkat lunak AutoDock Tools. Selain itu jumlah torsi pada ligan diperiksa pada pilihan “*Torsion tree>Choose Torsions>Set Number of Torsions*” dan struktur ligan disimpan dalam format pdb untuk dilakukan minimisasi energi. Setelah dilakukan minimisasi energi, struktur ligan yang sudah dipreparasi disimpan dengan format pdbqt.

Preparasi reseptor dilakukan dengan penghapusan molekul air yang ditemukan di sekeliling struktur reseptor menggunakan perangkat lunak Biovia Discovery Studio. Kemudian ditambahkan hidrogen polar dan muatan Kollman menggunakan perangkat lunak AutodockTools. Selanjutnya struktur dilakukan minimisasi energi dengan menggunakan SPDBV. Reseptor yang telah selesai dipreparasi disimpan menggunakan AutodockTools pada pilihan “*Grid>Molecules>Choose>Pilih struktur protein>Select Molecule>Klik OK>Save*”, maka secara otomatis file akan tersimpan dalam format .pdbqt.

Penyimpanan file stuktur ligan dan reseptor dalam format pdbqt perlu dilakukan agar file pdb yang telah dipreparasi sudah mengandung muatan, selain itu format pdbqt merupakan file input yang akan digunakan dalam penambatan molekuler pada Autodock Vina.

3.4.7 Penentuan Sisi Aktif Reseptor

Penentuan sisi aktif ini dilakukan dengan membuat kotak ruang (*grid box*) pada reseptor menggunakan AutodockTools. Pembuatan *grid box* meliputi pemilihan tipe map dengan memilih ligan pada pilihan “*Grid>Set Map Types>Choose Ligand*” kemudian kotak ruang diletakan tepat pada ligan dengan pilihan “*Grid Box>Center>Center on Ligand*”. Setelah itu ukuran *grid box* disesuaikan pada setiap koordinatnya (X, Y, Z). Reseptor RBD dan ACE2 yang tidak memiliki ligan alami, sisi penambatan dibuat berdasarkan situs aktif protein tersebut. Data pembuatan dari setiap *grid box* disimpan dalam format gpf (*grid parameter file*).

Tabel 3.4 Ukuran Sisi Penambatan (*grid box*) Reseptor

Protein	Sisi Penambatan (<i>grid box</i>)					
	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	-36.588	28.757	3.603	24	40	24
ACE2	-34.607	31.063	-3.383	20	40	20

3.4.8 Validasi Penambatan Molekuler

Ligan alami yang ditemukan pada struktur kompleks M^{pro} Sars-CoV-2 digunakan dalam validasi penambatan dengan menggunakan perangkat lunak Autodock Vina. Validasi dilakukan untuk pengujian dari konfigurasi yang digunakan pada penambatan molekuler M^{pro} Sars-CoV-2. Hasil dari pengujian penambatan ini ditentukan dari nilai RMSD (*root mean square deviation*) tidak melebihi 2Å. Pada tahap ini ligan alami hasil kristalografi akan dibandingkan kemiripan strukturnya berdasarkan konfigurasi yang telah dibuat pada preparasi penambatan. Perhitungan nilai RMSD dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak PyMol dengan memasukan perintah “rms_cur Ligan_X77uji, Ligan_X77validasi”.

3.4.9 Penambatan Molekuler

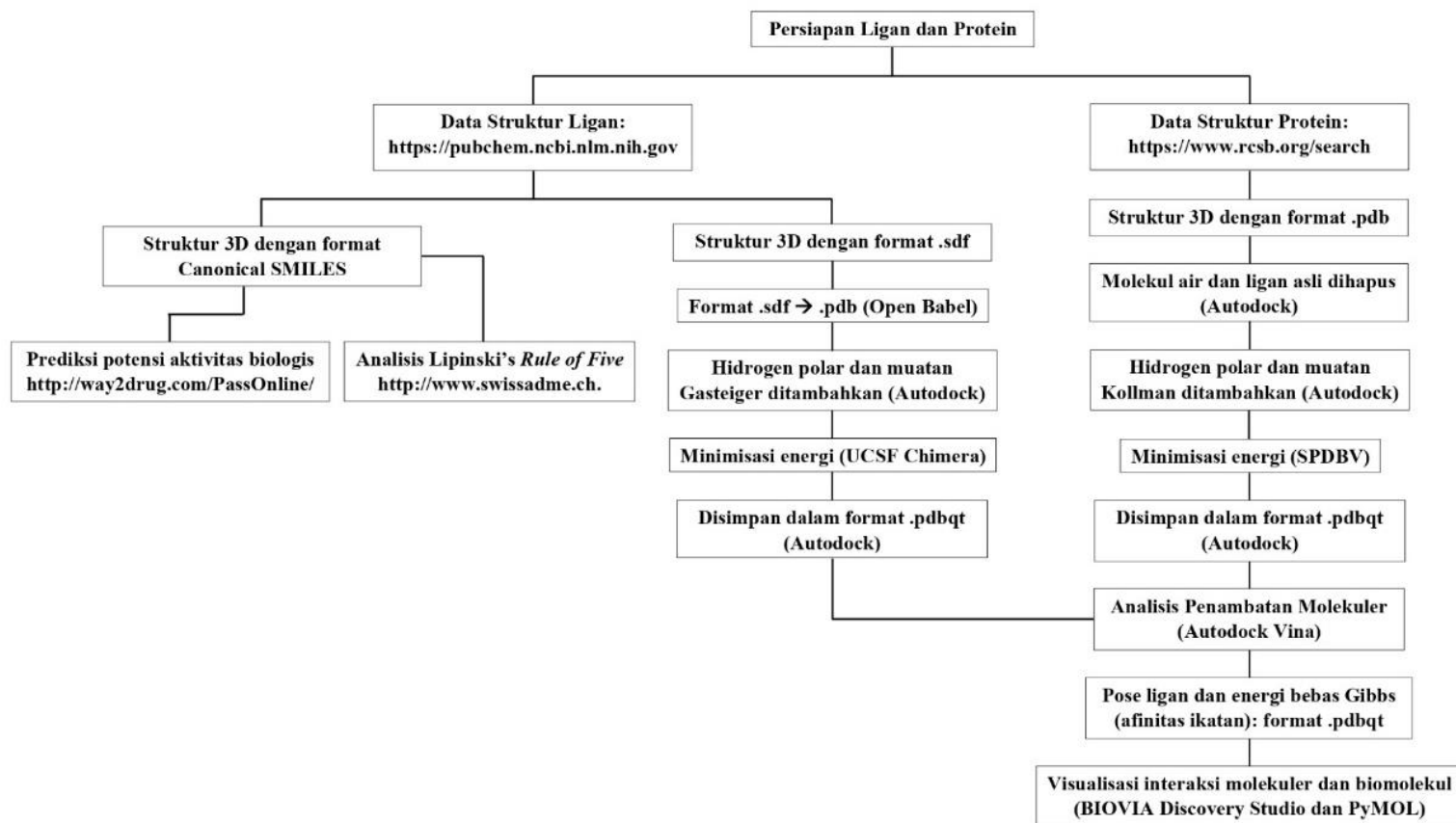
Proses penambatan molekuler dilakukan dengan menggunakan AutoDock Vina. Pada tahap ini diperlukan berkas meliputi (1) Struktur ligan yang telah dipreparasi dalam format pdbqt, (2) Struktur reseptor yang telah dipreparasi dalam format pdbqt (3) Konfigurasi penambatan dalam format txt. Konfigurasi penambatan meliputi data ligan, reseptor, ukuran *grid box* setiap koordinat *center X*, *center Y*, *center Z* dan volume kotak *size X*, *size Y*, *size Z*, *log*, *number modes*, dan *exhaustiveness*. Penambatan molekuler pada Autodock Vina dijalankan dengan memasukan perintah “vina --config ReseptorID_LiganID.txt --log Log_ReseptorID_LiganID.txt --out Hasil_ReseptorID_LiganID.pdbqt --cpu 8” pada program *command prompt*. Hasil dari penambatan penambatan akan didapatkan berupa peringkat energi bebas Gibbs (ΔG) dalam format txt dan struktur ligan dalam format pdbqt. Hasil Energi bebas (ΔG) dari AutodockVina secara otomatis akan diurutkan berdasarkan nilai RMSD yang terkecil (peringkat ke-1) hingga terbesar (peringkat ke-9). Ligan dengan nilai afinitas terkecil pada perangkat pertama disimpan dalam format pdb.

3.4.10 Visualisasi Penambatan Molekuler

Hasil penambatan molekuler divisualisasi menggunakan perangkat PyMol dan BIOVIA Discovery Studio. Visualisasi dilakukan untuk interaksi antara ligan uji dan reseptor berupa posisi dan jenis ikatan, dan afinitas dari setiap ikatan yang terbentuk. Interaksi yang dapat dibentuk antara ligan dan reseptor berupa ikatan, hidrogen, elektrostatik, hidrofobik dan van der Waals.

3.5 Alur Penelitian

Alur penelitian diawali dengan penentuan ligan yang akan diuji dari hasil analisis metabolomik, prediksi potensi aktivitas biologis antiviral, prediksi molekul obat. Selanjutnya dilakukan penambatan molekuler meliputi preparasi ligan dan reseptor, penentuan sisi aktif reseptor, validasi penambatan molekuler dan visualisasi interaksi molekuler dan rongga pengikatan.



Gambar 3.1 Alur Penelitian Penambatan Molekuler