

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian dilakukan dalam bentuk penelitian deskriptif untuk mengetahui sifat bioaktif dari metabolit yang ada pada daging ikan sidat (*Anguilla bicolor bicolor*) sebagai imunomodulator terhadap protein target dengan penambatan molekuler.

3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Kegiatan penelitian dilakukan dengan menggunakan perangkat internet di rumah masing-masing mulai Desember 2021 hingga Juni 2022.

3.3 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini tercantum dalam Tabel 3.1, 3.2 dan 3.3, dengan semua perangkat lunak yang digunakan dalam penelitian ini gratis (*open source*).

Tabel 3.1 Perangkat yang Digunakan

| No | Alat | Spesifikasi | Jumlah | Referensi |
|----|--------------------------------------|---|--------|-----------------------------------|
| 1. | Laptop Lenovo Ideapad 330 | 8th Gen Intel® Quad Core i7-8550U. 4 GB onboard DDR4 + 8 GB DIMM. 14" FHD (1920 x 1080). NVIDIA MX 130. 128 GB SATA SSD + 1 TB SATA HDD | 1 unit | - |
| 2. | Perangkat Lunak Cytoscape | Versi 3.8.2 | 1 unit | (Zhai <i>et al.</i> , 2021) |
| 3. | Perangkat Lunak Open Babel GUI 2.4.1 | Versi 2.4.1 | 1 unit | (O'Boyle <i>et al.</i> , 2011) |
| 4. | Perangkat lunak AutoDock Tools | Versi 4.2.6 | 1 unit | (Quan, 2019) |
| 5. | Perangkat Lunak AutoDock Vina | Versi 1.1.2 | 1 unit | (Flamandita <i>et al.</i> , 2020) |

| | | | | |
|-----|---|--------------------|--------|--------------------------------|
| 6. | Perangkat Lunak USCF Chimera | Versi 1.14 | 1 unit | (Elzupir, 2020) |
| 7. | Perangkat Lunak Swiss PDB Viewer | Versi 4.1.0 | 1 unit | (Kumar <i>et al.</i> , 2018) |
| 8. | Perangkat Lunak PyMOL | Versi 2.4.0 | 1 unit | (Chen <i>et al.</i> , 2020) |
| 9. | Perangkat Lunak BIOVIA Discovery Studio 2020 | Versi 20.1.0 | 1 unit | (Cherian <i>et al.</i> , 2021) |
| 10. | Perangkat Lunak Google Chrome | Versi 87.0.4280.88 | 1 unit | - |

Tabel 3.2 Bahan yang Digunakan

| No | Bahan | Jenis | Spesifikasi | Jumlah |
|----|---|-------|-------------|--------|
| 1. | Data struktur 3D 1-Palmitoyl Lysophosphatidic Acid | Ligan | .SDF | 1 unit |
| 2. | Data struktur 3D Shrimp Shell | Ligan | .SDF | 1 unit |
| 3. | Data struktur 3D Cholesteryl Sulfate | Ligan | .SDF | 1 unit |
| 4. | Data struktur 3D Chenodeoxycholic Acid 3-Sulfate | Ligan | .SDF | 1 unit |
| 5. | Data struktur 3D Phosphopantothenic Acid | Ligan | .SDF | 1 unit |
| 6. | Data struktur 3D Prostaglandin D2 Ethanolamide | Ligan | .SDF | 1 unit |
| 7. | Data struktur 3D Anandamide | Ligan | .SDF | 1 unit |
| 8. | Data struktur 3D Uridine-5- Monophosphate | Ligan | .SDF | 1 unit |
| 9. | Data struktur 3D All-Trans-Retinal | Ligan | .SDF | 1 unit |

| | | | | |
|-----|--|---------|------------------------------|--------|
| 10. | Data struktur 3D Gen <i>Mitogen-activated protein kinase 3</i> (MAPK3) | Protein | PDB (PDB ID: 2ZOQ, Chain A) | 1 unit |
| 11. | Data struktur 3D Gen <i>Proto-Oncogene Tyrosine-Protein Kinase Src</i> (SRC) | Protein | PDB (PDB ID: 2BDF, Chain A) | 1 unit |
| 12. | Data struktur 3D Gen <i>Mitogen-activated protein kinase 1</i> (MAPK1) | Protein | PDB (PDB ID: 2Y9Q, Chain A) | 1 unit |
| 13. | Data struktur 3D Gen AKT <i>Serine/Threonine Kinase 1</i> (AKT1) | Protein | .PDB (PDB ID: 3OCB, Chain A) | 1 unit |

Tabel 3.3 Laman Akses dan Laman Unduh Perangkat Lunak yang Digunakan

| No | Nama | Laman |
|-----|-------------------------|---|
| 1. | Google Chrome | https://www.google.com/chrome/ |
| 2. | PubChem | http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov |
| 3. | RCSB PDB | https://www.rcsb.org/search |
| 4. | PASS Online | http://way2drug.com/PassOnline/ |
| 5. | AdmetSAR 2.0 | http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2/ |
| 6. | Protox Versi II | https://tox-new.charite.de/protox_II/ |
| 7. | Swiss Target Prediction | http://www.swisstargetprediction.ch . |
| 8. | SEA Search Server | https://sea.bkslab.org/ |
| 9. | STITCH | http://stitch.embl.de/ |
| 10. | STRING | https://string-db.org/ |
| 11. | Cytoscape 3.8.2 | https://cytoscape.org/download.html |
| 12. | GOnet | http://tools.dice-database.org/GOnet/ |
| 13. | AutoDock Tools | http://autodock.scripps.edu/downloads/autodockregistration/autodock-4-2-download-page/ |

| | | |
|-----|-------------------------|---|
| 14. | AutoDock Vina | http://vina.scripps.edu/download.html |
| 15. | UCSF Chimera | https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html |
| 16. | Swiss PDB Viewer | https://spdbv.vital-it.ch/download_prerelease.html |
| 17. | Biovia Discovery Studio | https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizerdownload |
| 18. | PASS Online | http://www.way2drug.com/PASSOnline/ |

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Prediksi Senyawa Sebagai Ligan

3.4.1.1 Prediksi Aktivitas Senyawa Imunomodulator

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan sampel senyawa yang diperoleh dari data hasil analisis metabolomik tidak tertarget pada daging sidat (*Anguilla bicolor bicolor*) berdasarkan penelitian Kusumawaty *et al.* pada tahun 2021. Senyawa dari hasil analisis metabolomik tersebut kemudian dicari struktur kanonik SMILE (*simplified molecular-input line-entry system*) dan isomernya dalam database PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Priyadarshini *et al.*, 2019). Metabolit sekunder dari daging ikan sidat (*Anguilla bicolor bicolor*) dianalisis menggunakan *web server* PASS Online (<http://way2drug.com/PassOnline/>) untuk mengetahui potensi aktivitas biologis senyawa sebagai imunomodulator (Abuzaid *et al.*, 2020). Senyawa dengan aktivitas biologis imunomodulator dipilih berdasarkan nilai $P_a > 0.6$ (Lagunin *et al.*, 2000).

3.4.1.2 Prediksi AdmetSAR Senyawa Bioaktif

Prediksi farmakologi senyawa dievaluasi melalui absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, dan toksisitas (ADMET). Struktur kanonik SMILE (*simplified molecular-input line-entry system*) untuk masing-masing senyawa bioaktif yang dipilih dan disiapkan menggunakan data dari database PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Setiap SMILE dimasukkan sebagai kata kunci untuk pencarian data ADMET melalui AdmetSAR (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2/>) (Rolta *et al.*, 2021). Nilai toksisitas senyawa kimia untuk penemuan obat diketahui menggunakan Protox versi II (https://tox-new.charite.de/protox_II/index.php?site=compound_input) (Banerjee *et al.*, 2018).

Adapun beberapa ketentuan yang memenuhi kriteria pemilihan senyawa bioaktif, yaitu (i) Massa molekul kurang dari 500 Dalton, (ii) Lipofilik tinggi (dinyatakan sebagai LogP kurang dari 5), (iii) Memiliki kurang dari 5 donor ikatan hydrogen, (iv) Memiliki kurang dari 10 akseptor ikatan hydrogen, (v) Refraktivitas molar antara 40-130 (Doak *et al.*, 2014).

3.4.2 Prediksi Protein Sebagai Reseptor

3.4.2.1 Prediksi Protein Target

Daftar prediksi protein target diperoleh dari tiga *database* yang berbeda: Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch>), SEA Search Server (<https://sea.bkslab.org/>), dan STITCH (<http://stitch.embl.de/>) (Daina *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2018; Szklarczyk *et al.*, 2017). Prediksi protein target menggunakan Swiss Target Prediction dan SEA Search Server dilakukan menggunakan kata kunci pencarian dalam bentuk struktur SMILE. Nilai probabilitas (SWISSTarget) dan TC atau Tanimoto similarity (SEA) ditentukan sebesar >50% (>0,5) sebagai dasar pemilihan daftar protein target untuk setiap senyawa bioaktif. Sementara itu pada menu *multiple name* di STITCH, daftar nama senyawa bioaktif dan kata kunci dimasukkan dengan memilih *Homo sapiens* sebagai jenis organisme dan skor interaksi minimum 0.700.

3.4.2.2 Analisis Jaringan Farmakologi

Target yang diperoleh diproses menggunakan *database* STRING (<https://string-db.org/>) untuk kontruksi jaringan PPI (*Protein-Protein Interaction*) (Yu *et al.*, 2020). Jaringan PPI dengan rentang kepercayaan tinggi (>0,7) digunakan dalam penelitian (Szklarczyk *et al.*, 2017). Selanjutnya, jaringan target potensial divisualisasikan menggunakan Cytoscape 3.8.2 (Zhai *et al.*, 2021). Dilakukan analisis untuk mengetahui parameter jaringan PPI, yaitu *degree centrality* (DC), *betweenness centrality* (BC), dan *closeness centrality* (CC) menggunakan fungsi *Network Analyzer* pada Cytoscape 3.8.2 (Jin *et al.*, 2021).

Hal yang menentukan keberhasilan dalam analisis farmakologi jaringan adalah nilai tinggi dari ketiga hal tersebut, yaitu: (i) Variabel *degree centrality*, jika terdapat banyak interaksi antara satu *node* dan *node* lainnya maka dapat menjadi protein utama (*influencer regulator*), (ii) Variabel *betweenness centrality* diartikan memiliki fungsi

yang dominan, (iii) Variabel *closeness centrality*, jarak relatif terpendek untuk mengakses *node* pada *pathway*, dimana nilai tinggi dapat diartikan mudah dijangkau dan mudah untuk menjadi pusat pengatur protein lain (Tallei *et al.*, 2021). Dalam jaringan, *node* mewakili komponen aktif dan target, *edge* mewakili hubungan antara komponen aktif dan target, parameter *degree* menyajikan jumlah koneksi antara node dalam jaringan yang kemudian digunakan untuk mengevaluasi target penting, sehingga jaringan dipilih berdasarkan nilai *degree* (Tabassum *et al.*, 2022).

Analisis protein target juga dilakukan dengan menentukan jalur pensinyalan utama untuk aktivitas biologis dan molekuler dalam imunologi yaitu dengan *Gene Ontology* (GO) menggunakan *server web online* GOnet yang menunjukkan fungsi biologis gen (Pomaznoy *et al.*, 2018). Pengaturan yang digunakan adalah pencarian *biological_process>Annotation analysis options>GO subset>GO slim for immunology>Select output type>CSV*, lalu hasil akan diperoleh dalam bentuk *workbook excel*.

3.4.3 Penambatan Molekuler

3.4.3.1 Preparasi Ligan

Preparasi ligan diawali dengan pencarian struktur senyawa yang digunakan, yaitu hasil analisis bioaktivitas imunomodulator dengan PASS Online (<http://way2drug.com/PassOnline/>). Sebanyak delapan struktur senyawa 3D yang digunakan diperoleh dari Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) dengan format *.sdf*. Kedelapan senyawa tersebut adalah 1-Palmitoyl Lysophosphatidic Acid (Pubchem CID: 89566), Shrimp Shell (Pubchem CID: 1738118), Chenodeoxycholic Acid 3-Sulfate (Pubchem CID: 21252312), Phosphopantothenic Acid (Pubchem CID: 41635), Prostaglandin D2 Ethanolamide (Pubchem CID: 5283120), Anandamide (Pubchem CID: 5281969), Uridine-5-Monophosphate (Pubchem CID: 1172), dan All-Trans-Retinal (Pubchem CID: 638015).

Preparasi ligan asli (*native ligand*) dilakukan dengan memisahkan ligan asli yang terdapat pada kompleks kristalisasi protein. Struktur 3D yang diperoleh kemudian diubah ke dalam format *.pdb* menggunakan Open Babel GUI versi 2.4.1 untuk kemudian digunakan pada tahap preparasi dan minimisasi (O'Boyle *et al.*, 2011). Tahap preparasi dilakukan dengan menghapus senyawa hidrogen, menambahkan

hidrogen polar, dan menambahkan muatan Gasteiger menggunakan perangkat AutoDock Tools 4.2.6 (Quan, 2019). Struktur ligan hasil preparasi kemudian dilakukan minimisasi energi dengan perangkat USCF Chimera (Elzupir, 2020). Titik rotasi pada struktur ligan menggunakan AutoDock Tools 4.2.6, dan struktur ligan yang sudah siap disimpan dalam format .pdbqt dengan cara memilih opsi *Ligand>Output>Save As .pdbqt*.

3.4.3.2 Preparasi Reseptor

Reseptor protein berupa stuktur 3D diperoleh dari Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org>) yang meliputi protein target terhadap senyawa imunomodulator sesuai hasil prediksi, yaitu MAPK3 (PDB ID: 2Z0Q; Rantai A), SRC (PDB ID: 2BDF; Rantai A), MAPK1 (PDB ID: 2Y9Q; Rantai A), dan AKT1 (PDB ID: 3OCB; Rantai A) (Liu *et al.*, 2020). Preparasi protein sebagai reseptor dilakukan dengan penghapusan ligan asli (inhibitor) dari protein, penghapusan hidrogen, penambahan hidrogen polar, dan muatan Kollman dengan AutoDock Tools 4.2.6 dan disimpan dalam format .pdb. Struktur protein hasil preparasi kemudian diminimisasi menggunakan Swiss PDB Viewer (Kumar *et al.*, 2018). Struktur protein yang hasil minimisasi kemudian disimpan dalam format .pdbqt dengan penggunaan opsi *Grid>Molecules>Choose>Struktur protein yang akan digunakan>Select Molecule>Klik OK>Save* pada perangkat AutoDock Tools 4.2.6.

3.4.4 Preparasi Penambatan

Struktur ligan dan reseptor yang sudah dipreparasi dan diminimisasi dalam format .pdbqt kemudian digunakan untuk menentukan lokasi sisi penambatan dengan menyesuaikan antara stuktur reseptor dan ligan asli menggunakan opsi pada AutoDock Tools 4.2.6 *Grid>Macromolecule>Choose Macromolecul* dan *Grid>Set Map Types>Choose Ligand*.

Tabel 3.4 Ukuran Sisi Penambatan (*Grid Box*) Protein

| Protein | Sisi Penambatan (<i>Grid Box</i>) | | | | | |
|---------|-------------------------------------|--------|--------|----------|----|----|
| | Center (Å) | | | Size (Å) | | |
| | X | Y | Z | X | Y | Z |
| MAPK3 | 28.903 | 6.753 | 18.399 | 14 | 12 | 12 |
| SRC | 13.615 | 13.718 | -9.961 | 16 | 14 | 14 |
| MAPK1 | 52.690 | 32.091 | 9.526 | 16 | 18 | 14 |
| AKT1 | 13.377 | 0.171 | 18.464 | 14 | 16 | 14 |

Penentuan *grid box* dilakukan dengan *Grid Box>Center>Center on Ligand* dengan *spacing angstrom* 1.000, lalu hasil disimpan dalam bentuk .txt melalui *Grid Options>File>Output Grid Dimensions File*. Sisi penambatan untuk setiap reseptor ditunjukkan pada Tabel 3.4.

3.4.5 Validasi Penambatan

Ligan asli hasil kristalografi pada situs aktif protein yang telah melalui preparasi dan minimisasi energi kemudian dipasang kembali pada situs aktif menggunakan AutoDock 4.2.6. Validasi antara ligan asli hasil penambatan molekuler dengan ligan asli hasil kristalografi dilakukan menggunakan PyMOL 2.3, hal tersebut dilakukan untuk memastikan ligan asli hasil penambatan molekuler mengikat tepat ke situs aktif protein. Akurasi hasil penambatan didasarkan pada *nilai root-mean-square deviation* (RMSD) dari dan dapat diterima jika nilai RMSD ligan lebih kecil dari 2.0 Å (Xiao *et al.*, 2018). Nilai *root mean square deviation* (RMSD) dihitung dengan perintah “*rms_cur* nama file ligan asli, nama file ligan asli hasil penambatan ulang” kemudian gambar tiga dimensi *binding pocket* dari ligan terhadap reseptor divisualisasikan menggunakan PyMOL 2.3 (Chen *et al.*, 2020).

3.4.6 Penambatan Molekuler

Reseptor dan ligan yang sudah diproses kemudian dilakukan penambatan molekuler dengan AutoDock Vina (Flamandita *et al.*, 2020). Hasil konfigurasi dalam bentuk .txt yang terdiri atas data reseptor, ligan, *center_x*, *center_y*, *center_z*, *size_x*, *size_y*, *size_z*, *log*, *number modes*, dan *exhaustiveness* digunakan untuk penambatan molekuler. Penambatan molekuler dilakukan pada *command prompt* AutoDock Vina dengan perintah *vina.exe –config* (nama data konfigurasi).txt –log (nama data log hasil penambatan molekuler).txt –out (nama data *output* hasil penambatan molekuler).pdbqt –cpu 8. Hasil penambatan molekuler berupa nilai ikatan afinitas dalam bentuk pengikatan afinitas dan energi bebas Gibbs (ΔG).

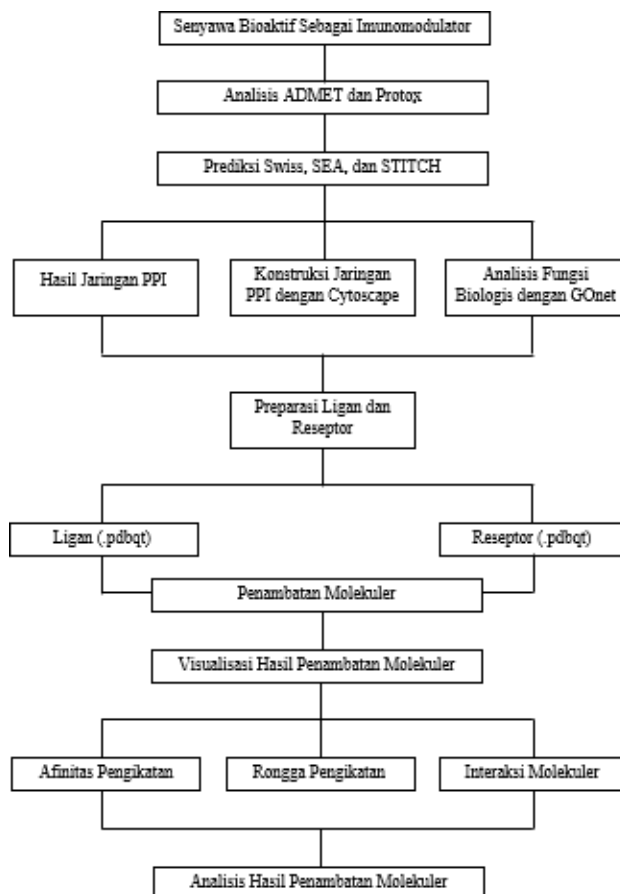
3.4.7 Visualisasi Hasil Penambatan

Hasil diperoleh dan diurutkan berdasarkan afinitas pengikatan yang diprediksi sebagai skor negatif energi bebas Gibbs (ΔG) (kkal/mol) pada *command prompt* AutoDock Vina (Singh *et al.*, 2019). Letak penambatan ligan dan protein hasil penambatan molekuler disimpan menggunakan PyMOL dan interaksi protein dan ligan

dianalisis menggunakan BIOVIA Discovery Studio Visualizer. Interaksi molekuler protein dengan ligan dianalisis, yaitu interaksi ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan jarak ikatan (Joshi *et al.*, 2021).

3.5 Alur Kerja Penelitian

Alur kerja penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1. Alur kerja penelitian diawali dengan perolehan senyawa bioaktif sebagai imunomodulator untuk kemudian melalui analisis ADMET. Senyawa yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan Swiss, SEA, dan STITCH untuk mendapatkan protein target. Tahap selanjutnya setelah dihasilkan jaringan PPI, yaitu dilakukan konstruksi jaringan PPI dengan Cytoscape, dan analisis fungsi biologis dengan GOnet. Tahap berikutnya yaitu preparasi ligan dan reseptor, penambatan molekuler, visualisasi hasil penambatan molekuler, dan analisis hasil penambatan molekuler.



Gambar 3.1 Alur Kerja Penelitian
(Dokumentasi Pribadi, 2022)