

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif, untuk mengetahui aktivitas, pola interaksi, dan stabilitas senyawa tanaman sidaguri (*Sida rhombifolia*) sebagai kandidat obat MRSA menggunakan penambatan dan simulasi dinamika molekuler

#### **B. Subjek Penelitian**

Subyek pada penelitian ini adalah 15 senyawa tanaman sidaguri yang diduga memiliki aktivitas sebagai kandidat obat MRSA yang diperoleh berdasarkan studi penambatan dan simulasi dinamika molekuler.

#### **C. Populasi dan Sampel**

##### **1. Populasi**

Populasi pada penelitian ini adalah keseluruhan obyek yang akan diteliti yaitu senyawa dalam tanaman sidaguri.

##### **2. Sampel**

Sampel pada penelitian ini adalah sebanyak 15 senyawa tanaman sidaguri yang diduga memiliki aktivitas potensial sebagai kandidat obat MRSA.

#### **D. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variable utama**

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah 15 senyawa tanaman sidaguri yang diduga memiliki aktivitas potensial sebagai kandidat obat MRSA. Variabel utama kedua makromolekul protein target MRSA 4CJN (PBP2a), 6O9S (MecR1), 8HTB (FtsZ), dan 4FAK (SCCmec). Variabel utama ketiga adalah perangkat lunak yang digunakan untuk penambatan dan simulasi dinamika molekuler, analisis hasil penambatan molekuler, serta analisis hasil simulasi dinamika molekuler.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama yang diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkontrol.

Variabel bebas yang dimaksud adalah variabel yang diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah senyawa tanaman sidaguri yang diduga memiliki aktivitas sebagai kandidat obat Antibakteri dan makromolekul protein target MRSA 4CJN (PBP2a), 6O9S (MecR1), 8HTB (FtsZ), dan 4FAK (SCCmec).

Variabel terkendali yang dimaksud adalah variabel yang dianggap berpengaruh selain variabel bebas. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah file PDB protein yang digunakan berasal dari bakteri *S.aureus* dan sudah terkompleks dengan natif ligan yang aktivitasnya sama dengan ligan yang akan kita ujikan, pada proses penambatan molekuler seperti dimensi dan koordinat gridbox, number of GA runs 100, population size 150, serta pada proses simulasi dinamika molekuler seperti NaCl 0,9%, pH 7,4, pada suhu 310K, dan lamanya simulasi adalah 20 ns.

Variabel tergantung adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria dari penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah nilai energi bebas ikatan, konstanta inhibisi, pola interaksi ligan-protein, serta hasil uji stabilitas ligan-protein.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, senyawa tanaman sidaguri sebagai ligan uji adalah 15 struktur kimia yang terkandung dalam tanaman sidaguri yaitu 2d-hydroxyecdysone, acacetin, ecdysone, peganine, vasicinol, vasicinone, quercetin, 24-methylenecholesterol, scopoletin, quindolinone, stigmasterol, campesterol, kaempferol, pterosterone-3-o- $\beta$ -dglucopyranoside, dan sanguinine.

Kedua, makromolekul adalah kompleks natif ligan + protein yang berasal dari manusia (*Homo sapiens*) yang diunduh dari Protein Data Bank (RCSB PDB) dengan kode PDB 4CJN (PBP2a), 6O9S (MecR1), 8HTB (FtsZ), dan 4FAK (SCCmec).

Ketiga, PBP2a merupakan enzim yang berperan pada resistensi terhadap antibiotik  $\beta$ -laktam termasuk methicillin strain MRSA pada bakteri *S. aureus* dan bertanggung jawab dalam katalisis produksi peptidoglikan di dalam dinding sel bakteri. MecR1 merupakan protein pengkode transduser sinyal gen *mecA*. SCCmec merupakan protein elemen yang memfasilitasi gen *mec* sebagai regulatori dari *mecR1* dan *mecI*. Kumpulan gen tersebut akan mengkodekan PBP2a yang akan

memproduksi peptidoglikan dinding sel sehingga sel resistensi terhadap beta-laktam.

Keempat, energi bebas ikatan adalah nilai yang diperoleh dari hasil docking, yang dapat memprediksi kemampuan ligan untuk berikatan dengan protein target dengan melihat energi binding yang melebihi energi natif ligan.

Kelima, persentase kesamaan interaksi adalah bentuk interaksi/ikatan antara ligan dengan asam-asam amino pada binding site dari target/reseptor, baik berupa interaksi hidrofobik hidrogen dan Van der Waals yang mempunyai energi tinggi dan persentase asam amino yang sama dengan natif ligan.

Keenam, stabilitas 1 senyawa terbaik dalam masing-masing protein target ikatan ligan-protein untuk mempertahankan ikatannya dalam kurun waktu tertentu untuk menjamin kualitasnya dinyatakan dalam RMSD dan RMSF.

## **E. Bahan dan Alat (Bahan dan Alat Uji)**

### **1. Bahan**

Struktur tiga dimensi ligan uji. Kode SMILES ligan uji yang diperoleh dari PubChem dibuat dalam struktur tiga dimensi menggunakan aplikasi ChemDraw dan MarvinSketch.

Struktur tiga dimensi makromolekul. Struktur tiga dimensi makromolekul yaitu 4CJN (PBP2a), 6O9S (MecR1), 8HTB (FtsZ), dan 4FAK (SCCmec) yang diunduh dari Protein Data Bank (RCSB PDB).

### **2. Alat**

**2.1 Perangkat keras.** Asus ROG S13 X330FA\_S3330FA, Windows 11 Pro 64-bit (10.0, Bulid 22621) dengan spesifikasi Processor Intel(R) Core(TM) i7-8145U CPU @ 2.10Ghz, Memory 8,00 GB RAM, Direct Version : DirectX 12.

**2.2 Perangkat lunak dan Laman Web.** AutoDock 4.0, AutoDockTool, MarvinSketch, PyMOL, LigPlot+ Biovia Discovery Studio, Notepad++, SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) dan YASARA Dynamics.

## **F. Cara Kerja**

### **1. Skrining ligan uji**

Skrining ligan uji dimulai dengan mencari ligan uji yang dapat dijadikan kandidat uji terapi pada MRSA. Dr. Dukes Phytochemical

salah satu webserver yang dipilih untuk menentukan senyawa potensial sebagai target. Pengumpulan senyawa kimia tanaman pada webserver KNApSACk yang ditabulasi dan diuji dengan *Lipinski's rules of five* dengan maksud mengidentifikasi senyawa yang dapat dijadikan obat secara oral. Skrining pathway atau jalur pensinyalan juga perlu dilakukan melalui KEGG Pathway (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) *keywords* MRSA map01501 untuk memastikan apakah pathway yang digunakan sudah sesuai dengan kriteria prediksi *in silico* nantinya (Fernández & Hancock, 2012).

*Drug-likeness* dari senyawa tanaman sidaguri dilakukan sebagai ligan uji menggunakan SwissADME. Canonical SMILES dari senyawa sidaguri didapat dari PubChem. Laman SwissADME dapat diakses pada <http://www.swissadme.ch/>. Kode Canonical SMILES dicopy > dipaste dalam kotak "Enter a list of SMILES here" yang terdapat pada laman SwissADME > diklik "Run!". Dilihat profil Drug-likeness dari senyawa tersebut apakah memenuhi syarat atau tidak sebagai kandidat obat oral (Daina *et al.*, 2017).

## **2. Optimasi dan preparasi ligan uji**

Struktur dua dimensi (2D) dibangun terlebih dahulu sebelum pembuatan struktur tiga dimensi (3D). Struktur 2D dibangun menggunakan software MarvinSketch dalam format .mol dengan menyisipkan string canonical SMILES dari webserver PubChem. Struktur 3D ditampilkan pada software BIOVIA DS. Kemudian dilakukan optimasi pada software MarvinSketch untuk pembuatan struktur 3D dari ligan uji. Protonasi disesuaikan dengan pH darah manusia yaitu 7,4 kemudian dioptimasi guna mendapatkan konformasi terbaik serta stabil dan disimpan sebagai .mol2 (Dwi Agistia *et al.*, 2013). Setelah dioptimasi kemudian dibuka dengan YASARA View untuk mengeliminasi molekul H<sub>2</sub>O untuk meringankan kerja program dan dilakukan penambahan atom H. setelah preparasi selesai, ligan uji disimpan sebagai .mol2 (Dwi Agistia *et al.*, 2013).

## **3. Pengunduhan makromolekul**

Target marko diunduh dari webserver RCSBS PDB dengan kode 4CJN (PBP2a), 6O9S (MecR1), 8HTB (FtsZ), dan 4FAK (SCCmec) dalam format .pdb.

## **4. Preparasi makromolekul**

Preparasi makromolekul dilakukan dengan memisahkan natif ligan dengan proteinnya menggunakan YASARA View. Beberapa

makromolukul menyusun menjadi protein target yang akan dipisahkan menjadi skuen tunggal dengan cara membuka file makromolekul yang sudah diunduh dalam format .pdb. pada protokol docking, perlu menghapus bagian dari sistem yang tidak diperlukan sehingga menyisakan satu protein dan satu natif ligan. Optimasi makromolekul menggunakan software YASARA View dengan penambahan atom H dan disimpan format .yob. Protein target yang telah dipisah kemudian disimpan sebagai *protein.mol2* pada ekstensi file .mol2 (Tegar & Purnomo, 2013).

Natif ligan dipisahkan dari makromolekul dalam format .yob, dilakukan pengoptimasi ligan asli menggunakan YASARA dengan penambahan atom hidrogen lalu disimpan dalam format *ref\_ligand.mol2* (Tegar & Purnomo, 2013). Preparasi ligan mengikuti protokol docking dengan menggunakan kombinasi dari beberapa konformasi menggunakan MarvinSketch. File *ref\_ligand.mol2* dibuka dalam software tersebut kemudian dilakukan check protonasi di pH 7,4 pada menu Tools kemudian protonasi dan disimpan sebagai *ligand\_2D* dengan file tipe .mrv. Setelah itu dilakukan pencarian konformasi pada menu Tools dan pilih conformation dan pilih conformers. Setelah pencarian konformasi selesai simpan dengan nama ligan dan tipe file .mol2 (Tegar & Purnomo, 2013).

## **5. Validasi metode penambatan molekul**

Pada proses validasi ini akan dibandingkan konformasi ligan alami terhadap reseptor pada struktur kristalografi eksperimental dengan konformasi ligan alami yang di-redocking-kan terhadap reseptornya menggunakan AutoDockTools dengan cara diatur Grid box x, y, z, center x, y, z, spacing secara Default. Hasil perbandingan ini dinyatakan dengan nilai root mean square deviation (RMSD). Metode docking dikatakan valid jika nilai RMSD-nya  $\leq 2\text{\AA}$ . Jika nilai RMSD yang diperoleh lebih besar dari  $2\text{\AA}$  maka metode yang digunakan tidak valid, jadi nilai Grid box x, y, z, center x, y, z, spacing diatur secara manual sampai didapatkan hasil  $\text{RMSD} \leq 2\text{\AA}$  (Mukherjee *et al.*, 2010).

## **6. Proses penambatan molekul**

Proses docking molekuler dilakukan dengan menggunakan AutoDock4.0 (AD4.0) dan AutoDock Tools (ADT). Struktur Protein dan ligan yang telah dioptimasi secara terpisah disimpan dalam satu folder yang sama. Sebelum melakukan proses docking, terlebih dahulu disiapkan file parameter grid dengan tahapan sebagai berikut: dipilih

menu Grid > Macromolecule > Open: file protein format pdbqt. Kemudian dipilih menu Grid > Set Map Types > Open: file ligan (natif ligan saat proses Validasi) format pdbqt. Selanjutnya dipilih menu Grid > Grid box, lalu dipilih menu Center > Center on ligand (untuk validasi Default) dan diatur ukuran x, y, z, center x, y, z, spacing pada kotak dialog Grid Options yang akan muncul (Mengikuti nilai Grid Box Validasi untuk ligan uji). Kemudian dipilih menu File > Close saving current, lalu dipilih menu Grid > Output > Save GPF dan disimpan dengan format gpf, penamaan file perlu diperhatikan karena penamaan yang salah tidak akan membuat running docking berjalan Langkah selanjutnya adalah menjalankan Autogrid dengan cara diklik menu Run > Run AutoGrid, lalu pada "Program Pathname" dipilih file "autogrid4.exe" sedangkan pada "Parameter Filename" dipilih file dengan format "gpf" tadi kemudian diklik "Launch" dan ditunggu proses berjalan hingga selesai. Setelah proses autogrid selesai, langkah selanjutnya adalah menyiapkan file parameter docking dengan tahapan sebagai berikut, dipilih menu Docking > Macromolecule > Set Rigid Filename dan dipilih file protein dengan format pdbqt. Kemudian dipilih lagi menu Docking > Ligand > Choose pilih ligan > Select Ligand > Accept. Selanjutnya menentukan parameter docking dengan cara dipilih menu Docking > Search Parameters > Genetic Algorithm, Number of GA Runs diatur pada angka 100 dan Population Size diatur 150 pada kotak dialog yang akan muncul, lalu diklik Accept. Setelah itu dipilih menu Docking > Docking Parameters > Accept. Selanjutnya dipilih menu Docking > Other Options > AutoDock4.2 Parameters > akan muncul kotak Set Autodock4.2 Options > pada Include Parameter\_file in dpf diklik "Yes" > pada bagian Enter Parameter\_File dituliskan "AD4.1\_bound.dat" Kemudian dipilih menu Docking > Output > Lamarckian GA dan disimpan dengan format dpf Langkah selanjutnya adalah menjalankan Autodock dengan cara diklik menu Run > Run AutoDock, lalu pada "Program Pathname" dipilih file "autodock4.exe" sedangkan pada "Parameter Filename" dipilih file dengan format "dpf" tadi kemudian klik Launch dan ditunggu proses berjalan hingga selesai. Hasil docking yang diperoleh selanjutnya dianalisis dan divisualisasi menggunakan Biovia Discovery Studio (Huey *et al.*, 2012) Rizvi *et al.*, 2013)

Analisis model interaksi dilakukan visualisasi menggunakan software Biovia DS dan PyMOL untuk mendapati pola interaksi asam

amino yang terlibat dan analisis ikatan yang terbentuk antara senyawa uji dan protein target. Potensi penghambatan dapat dilihat berdasarkan ikatan asam amino yang terbentuk (Dwi Agistia *et al.*, 2013). PyMoL membutuhkan pengaturan berupa file dalam format .pdb. Proses visualisasi dimulai dengan membuka aplikasi PyMOL kemudian memasukkan file yang akan divisualisasi dalam bentuk .pdb dan juga dapat menggunakan kode perintah yang sesuai dengan bahasa PyMOL.

## **7. Proses simulasi dinamika molekuler**

Satu ligan uji terbaik dari setiap ke-4 protein yang memiliki nilai energi bebas ikatan terkecil dan residu asam amino yang mirip dengan natif ligan. Apabila suatu senyawa memiliki nilai energi bebas ikatan yang terbaik/terkecil tetapi tidak berinteraksi dengan residu asam amino yang mirip dengan natif ligan, maka senyawa tersebut tidak memiliki pola interaksi yang terbaik dan belum bisa dikatakan memiliki aktivitas yang sama dengan ligan alami) dilanjutkan dengan uji simulasi MD. Proses simulasi MD dilakukan dengan menggunakan YASARA Dynamics. Struktur kompleks ligan uji-protein dan kompleks natif ligan-protein ditempatkan pada folder yang sama. Sebelum menjalankan program diatur Script-nya pada “md\_run.mcr” dengan NaCl 0,9%, pH 7,4, pada suhu 298K, dan lamanya simulasi adalah 20 ns, serta menggunakan ForceField (Bakal *et al.*, 2022) (Karplus & Petsko, 1990). Langkah dilanjutkan dengan menjalankan program YASARA. Kemudian dipilih menu Option > Macro & Movie > Set Target (dipilih target yang ingin dianalisis dalam format .pdb). Selanjutnya dipilih kembali menu Option > Macro & Movie > Play Macro > md\_run.mcr > OK (Script yang sudah diatur sebelumnya) dan ditunggu proses berjalan hingga selesai secara otomatis. Setelah proses selesai, dilakukan analisis pada ligan-protein dengan cara dipilih menu Option > Macro & Movie > Set Target (dipilih target yang ingin dianalisis dalam format .pdb). Selanjutnya dipilih Option > Macro & Movie > Play Macro > md\_analyze.mcr > OK ditunggu proses berjalan hingga selesai. Data yang didapatkan dianalisis nilai RMSD dan RMSF-nya (jika stabilitasnya buruk, maka diuji ligan uji ke-2 terbaik pada penambatan molekuler) (Land & Humble, 2018).

## **G. Analisis Data**

### **1. Validasi**

Pada proses ini validasi berguna mencari konformasi 3D dari natif ligan terhadap reseptor. Menurut Listyani *et al* (2019) konformasi berfungsi untuk mengetahui nilai kesejajaran antara konformasi struktur natif ligan sebelum dan sesudah dilakukan proses docking. Nilai kesejajaran dikatakan valid jika nilai RMSD kurang dari 2Å (Sari *et al.*, 2024).

### **2. Energi Ikatan**

Nilai energi ikatan reseptor-ligan uji yang diperoleh ditabulasikan dalam tabel dan dibandingkan dengan nilai energi ikatan reseptor-ligan alami. Jika energi ikatan semakin kecil maka ikatan antara ligan dan reseptor kuat. Semakin kuat ikatan yang terbentuk maka dapat diprediksi interaksi ligan terhadap reseptor semakin besar.

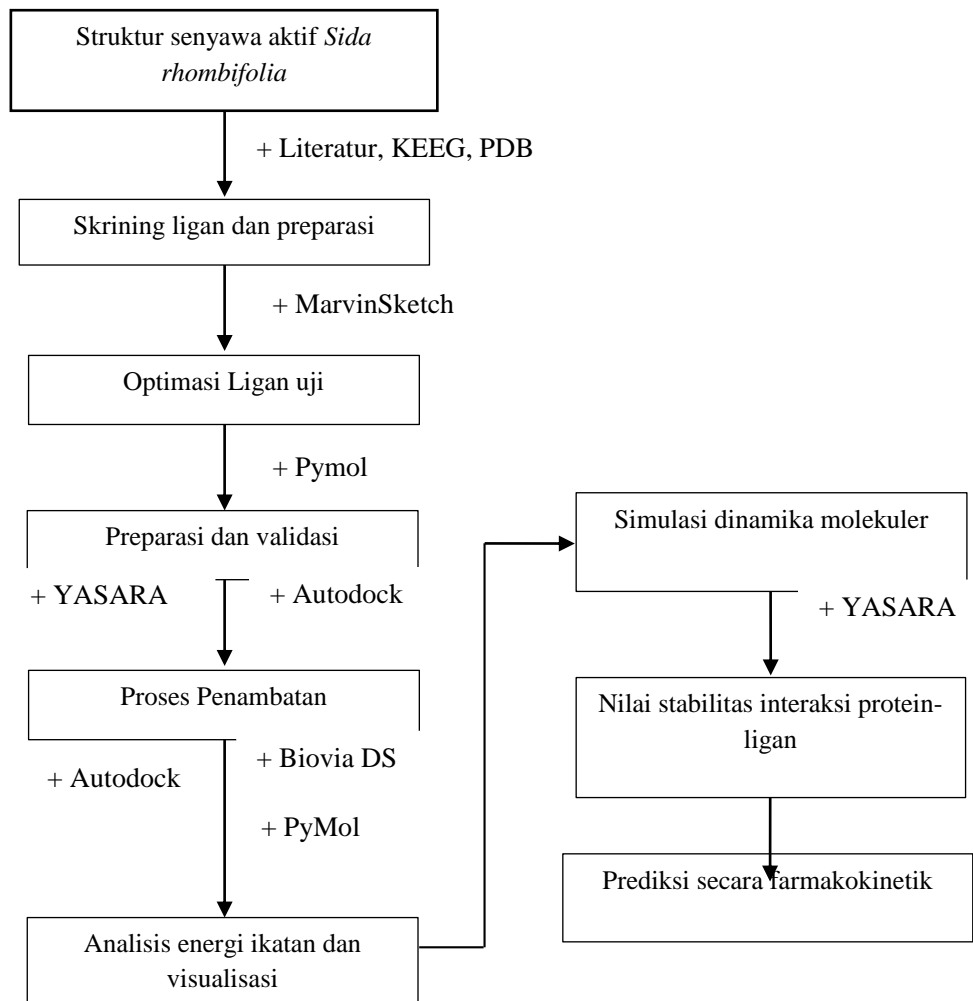
### **3. Interaksi reseptor-ligan**

Data interaksi reseptor-ligan divisualisasikan dengan menggunakan Biovia Discovery Studio untuk melihat interaksi yang terjadi antara ligan uji dan residu asam-asam amino protein target serta jenis ikatan antara reseptor-ligan. Baik atau tidaknya suatu ligan dapat ditentukan oleh kemiripan residu asam amino pada ligan uji terhadap natif ligan. Ligan mampu menempati dan berikatan dengan protein target apabila semakin tinggi kemiripan asam amino suatu ligan, maka semakin baik untuk dapat berikatan. Selain itu, asam amino pada protein berperan guna membentuk ikatan dengan suatu ligan (Sari *et al.*, 2024).

### **4. Stabilitas ikatan reseptor-ligan**

Pada proses ini akan dibandingkan kestabilan ikatan ligan alami-reseptor dan ligan uji-reseptor. Hasil perbandingan ini dinyatakan dengan nilai RMSD dan RMSF.





**Gambar 13. Skema Alur Penelitian**