

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif, untuk mengetahui aktivitas, pola interaksi, dan stabilitas senyawa tanaman bawang dayak sebagai kandidat obat antibakteri menggunakan penambatan dan simulasi dinamika molekuler

B. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini adalah senyawa tanaman bawang dayak yang diduga memiliki aktivitas sebagai kandidat obat antibiotik yang diperoleh berdasarkan studi penambatan dan simulasi dinamika molekuler yaitu 15 senyawa bawang dayak Hongoconin, Eleutherin, Eleuterol, Eleuterol A , Eleuterol B, Eleuterol C, Eleuthinones B, Eleuthinones C, Eleuthoside A, Eleuthoside B, Elecanacin, Eletherinone, Isoeleutherin, Eleucanainones A, Eleucanainones B.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

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

2. Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah senyawa tanaman bawang dayak yang diduga memiliki aktivitas sebagai kandidat obat antibakteri.

D. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variable utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah senyawa tanaman bawang dayak, makromolekul protein target MRSA (SSCMec, Mec1, BlaR1, Pbp2a) dan 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 terkendali.

Variabel bebas yang dimaksud adalah variabel yang diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah senyawa tanaman bawang dayak yang diduga memiliki aktivitas sebagai kandidat obat Antibakteri dan makromolekul protein target MRSA (SSCMec. Mec, Pbp2a BlaR1).

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 ligan native 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 298K, 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 bawang dayak sebagai ligan uji adalah 15 struktur kimia yang terkandung dalam tanaman bawang dayak (Gambar 2).

Kedua, makromolekul adalah kompleks ligan native + protein yang berasal dari manusia (*Homo sapiens*) yang diunduh dari Protein Data Bank (RCSB PDB) dengan kode PDB, 4CJN (PBP2a) 2IWC (MecR1), 4FAK (SSCMec), dan 6O9W (BlaR1).

Ketiga, 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 native ligan.

Keempat, 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 native ligan.

Keempat, 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, Alat dan Hewan Uji)

1. Bahan

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

Struktur tiga dimensi makromolekul. Struktur tiga dimensi makromolekul yaitu 4CJN (PBP2a) 2IWC (MecR1), 4FAK (SCCMec), dan 6O9W (BlaR1) yang diunduh dari Protein Data Bank (RCSB PDB).

2. Alat

2.1 Perangkat keras. Asus VivoBook S13 X330FA_S3330FA, Windows 11 Pro 64-bit (10.0, Bulid 22621) dengan spesifikasi Processor Intel(R) Core(TM) i3-8145U CPU @ 2.10Ghz, Memory 4096 MB RAM, Direct Version : DirectX 12.

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

F. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan struktur tiga dimensi ligan uji

Struktur tiga dimensi ligan uji dibuat menggunakan aplikasi VEGA ZZ. Tahap pertama yang dilakukan yaitu dicopykan Canonical SMILES ligan uji dari PubChem kemudian pastekan pada Vega ZZ dengan cara dipilih menu Edit > Build > SMILES. Kode SMILES yang diperoleh dari PubChem di-Paste pada kotak dialog yang muncul, lalu diklik Build. Setelah itu dipilih menu Calculate > Charge & Potential maka akan muncul kotak dialog. Pada bagian Force field dipilih “AUTODOCK” dan pada bagian Charges dipilih “Gasteiger” kemudian diklik “Fix”. Kemudian dilakukan minimisasi dengan cara dipilih menu Calculate > Ammp > Minimization > pada kotak Minimization steps diisikan 10.000 > Run . Struktur tiga dimensi yang diperoleh selanjutnya disimpan dengan format .pdb untuk penambatan molekuler, jika masih berbentuk struktur dua dimensi, diubah terlebih dahulu menjadi struktur tiga dimensi dengan cara klik Edit > Coordinates > Convert to 3D (Bahi, 2020).

2. Preparasi ligan uji

Preparasi struktur ligan uji dilakukan menggunakan AutoDockTools untuk menambahkan atom hidrogen dan muatan pada

ligan. Pertama-tama dibuka file struktur tiga dimensi ligan uji dengan dipilih menu File > Read molecule, selanjutnya dipilih menu Edit > Hydrogens > Add. Setelah itu dipilih “All Hydrogens”, “noBondOrder” dan “yes” pada kotak dialog Add Hydrogens yang akan muncul. Kemudian dipilih lagi menu Edit > Charges > Compute Gasteiger. Langkah selanjutnya adalah membuat file ligan dengan format .pdbqt, dengan cara dipilih menu Ligand > Input > Choose, dipilih file ligan yang telah dipreparasi, lalu pilih “Select Molecule for AutoDock4”. Selanjutnya dipilih menu Ligand > Torsion tree > Detect root untuk mengidentifikasi root ligan. Setelah itu dipilih menu Ligand > Torsion tree > Choose Root, lalu dipilih menu Ligand > Torsion tree > Choose Torsions > Done untuk mengidentifikasi nomor ke torsi. Kemudian dipilih Ligand > Torsion tree > Set Number of Torsions > Dismiss. Selanjutnya dipilih menu Ligand > Output > Save as file dengan format .pdbqt (Huey *et al.*, 2012; Rizvi *et al.*, 2013).

3. Pengunduhan makromolekul

Struktur makromolekul 4CJN (PBP2a) 2IWC (MecR1), 4FAK (SCCMec) dan 6O9W (BlaR1) diunduh dari Protein Data Bank (RCSB PDB) dalam format .pdb (Rizvi *et al.*, 2013).

4. Preparasi makromolekul

Preparasi makromolekul dilakukan menggunakan Biovia Discovery Studio. Pertama-tama, dibuka file makromolekul dengan cara dipilih menu File > Open. Kemudian ditekan CTRL+H secara bersamaan sehingga muncul molekul-molekul dari protein. Diklik Water > Delete untuk menghilangkan molekul air. Langkah selanjutnya yaitu memisahkan kompleks makromolekul menjadi file individual protein (reseptor) dan ligan, dengan cara diklik Ligand Groups > pilih ligand native > Copy > Paste pada Molecule Window yang baru, lalu disimpan dengan nama (Nama ligan).pdb maka diperoleh file ligan yang sudah terpisah dari protein. Setelah itu kembali ke molecule window awal dipilih Ligand Group > Delete, untuk menghapus ligan alami. Kemudian dipilih Hetatm > Delete untuk menghilangkan residu lainnya (kalau masih ada) (Rizvi *et al.*, 2013). Selanjutnya file protein yang telah dipisahkan dari ligan alaminya ditambahkan hidrogen dan muatan menggunakan AutoDockTools, dengan cara dipilih menu File > Read Molecule > Edit > Hydrogens > Add. Setelah itu dipilih “Polar Only”, “noBondOrder” dan “yes” pada kotak dialog Add Hydrogens yang akan muncul. Kemudian dipilih lagi menu Edit > Charges > Add

Kollman Charges. Langkah selanjutnya adalah membuat file protein dengan format .pdbqt yang akan digunakan untuk menentukan parameter grid, dengan cara dipilih menu Grid > Macromolecule > Choose, dipilih file protein yang telah dipreparasi, lalu pilih “Ok” dan save as file dengan nama format .pdbqt (Huey et al., 2012; Rizvi et al., 2013). Selanjutnya Preparasi struktur ligan native pertama-tama dibuka file struktur tiga dimensi ligan native yang telah dipisahkan dari protein dengan cara dipilih menu File > Read molecule, selanjutnya dipilih menu Edit > Hydrogens > Add. Setelah itu dipilih “All Hydrogens”, “noBondOrder” dan “yes” pada kotak dialog Add Hydrogens yang akan muncul. Kemudian dipilih lagi menu Edit > Charges > Compute Gasteiger. Langkah selanjutnya adalah membuat file ligan dengan format .pdbqt, dengan cara dipilih menu Ligand > Input > Choose, dipilih file ligan yang telah dipreparasi, lalu pilih “Select Molecule for AutoDock4”. Kemudian dipilih menu Ligand > Torsion tree > Detect root untuk mengidentifikasi root ligan. Setelah itu dipilih menu Ligand > Torsion tree > Choose Root, lalu dipilih menu Ligand > Torsion tree > Choose Torsions > Done untuk mengidentifikasi nomor ke torsii. Kemudian dipilih Ligand > Torsion tree > Set Number of Torsions > Dismiss. Selanjutnya dipilih menu Ligand > Output > Save as file dengan format .pdbqt. File .pdbqt dari makromolekul dan ligan, file aplikasi autodock4.exe dan autogrid4.exe, serta file AD4.1_bound.dat (diperoleh dari <https://autodocksuite.scripps.edu/force-fields/>) ditempatkan dalam satu folder yang sama (Huey et al., 2012; Rizvi et al., 2013).

5. Validasi metode penambatan molekuler

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 \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 RMSD $\leq 2\text{\AA}$ (Mukherjee et al., 2010; S\'{a}ndor et al., 2010).

6. Proses penambatan molekuler

Proses docking molekuler dilakukan dengan menggunakan AutoDock4.0 (AD4.0) dan AutoDockTools (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 (ligan native 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).

7. Proses simulasi dinamika molekuler

Satu ligan uji terbaik dari setiap ke-5 protein yang memiliki nilai energi bebas ikatan terkecil dan residu asam amino yang sama dengan ligan native (Apabila suatu senyawa memiliki nilai energi bebas ikatan yang terbaik/terkecil tetapi tidak berinteraksi dengan residu asam amino yang sama dengan ligan native, 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 ligan native-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 AMBER14 (Parihar et al., 2022; Shree et al., 2022). Setelah itu 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; HudsonAlpha Institute for Biotechnology, 2019).

8. Skrining ligan uji

Diuji Drug-likeness dari senyawa tanaman bawang dayak (Gambar) untuk dijadikan sebagai ligan uji menggunakan SwissADME. Canonical SMILES dari senyawa tanaman bawang dayak didapatkan 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).

G. Analisis Data

1. Validasi

Pada proses validasi ini akan dibandingkan konformasi ligan alami terhadap reseptor pada struktur kristalografi eksperimental dengan konformasi ligan uji yang di-docking-kan terhadap reseptornya. Hasil perbandingan ini dinyatakan dengan nilai RMSD

2. Energi Ikatan

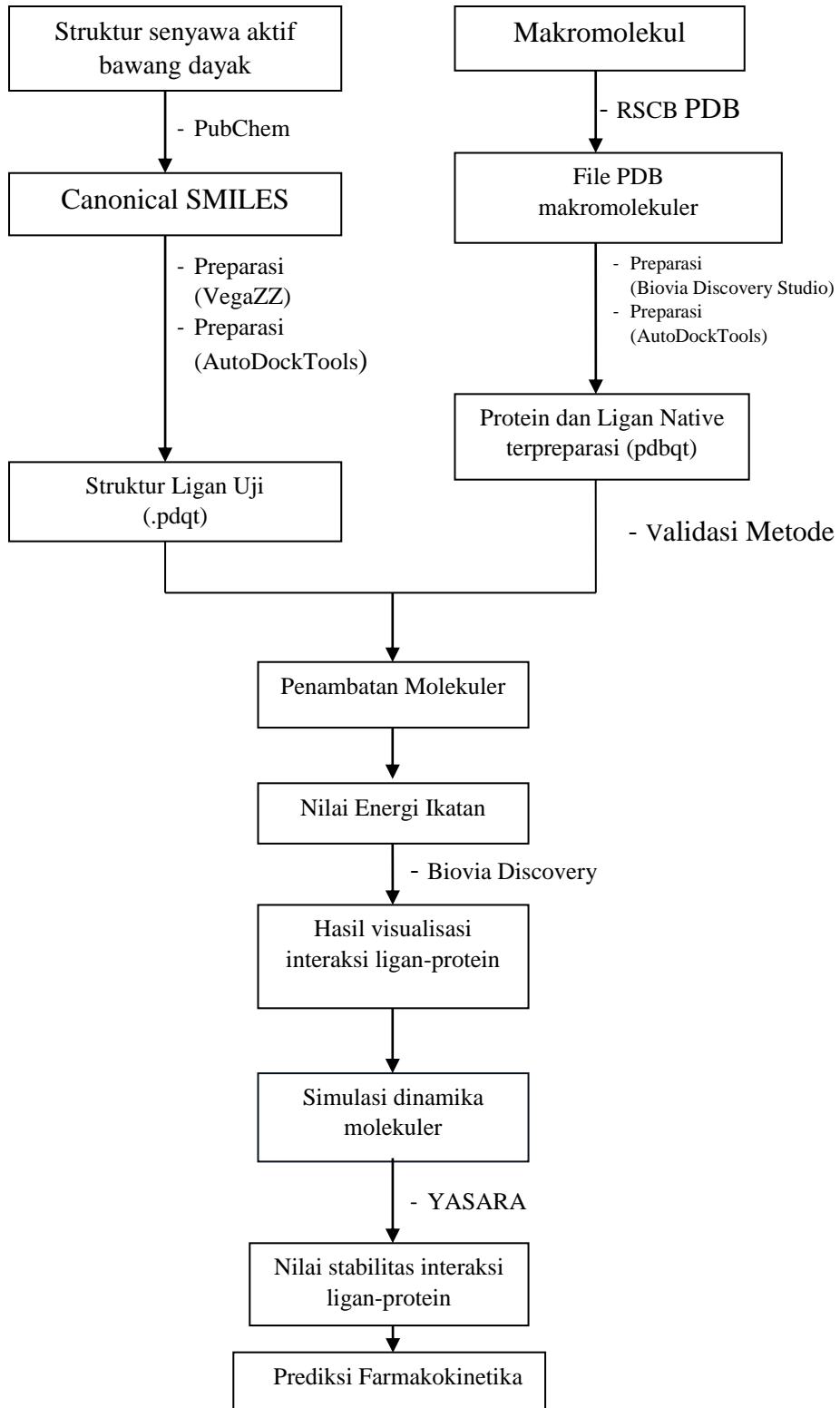
Nilai energi ikatan reseptor-ligan uji yang diperoleh ditabulasikan dalam tabel dan dibandingkan dengan nilai energi ikatan reseptor-ligan alami. Jika energi ikatan semakin kecil maka ikatan antara ligan dan reseptor kuat. Semakin kuat ikatan yang terbentuk maka dapat diprediksi interaksi ligan terhadap 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 secara dua dimensi dan tiga dimensi. Apabila suatu senyawa memiliki nilai energi bebas ikatan yang terbaik/terkecil tetapi tidak berinteraksi dengan residu asam amino yang sama dengan ligan native, maka senyawa tersebut tidak memiliki pola interaksi yang terbaik dan belum bisa dikatakan memiliki aktivitas yang sama dengan ligan alami.

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 15. Skema Alur Penelitian**