

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksploratif dengan metode *in silico* senyawa *marker* dari ensiklopedi tanaman obat Indonesia (Farmakope Herbal Indonesia) terhadap *Sirtuin-3* (4BVB) menggunakan aplikasi *molecular docking* PLANTS.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat

Penelitian ini dilakukan di laboratorium komputer Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

2. Waktu

Penelitian dilakukan pada bulan Juni 2014 – Agustus 2014

C. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

In silico Molecular Docking PLANTS

Variabel Bebas : Bentuk konformasi optimal senyawa *marker*
tanaman obat

Variabel Tergantung : Skor penambatan

Variabel Terkendali : Perangkat keras dan lunak komputer, struktur
Sirtuin-3

2. Definisi Operasional

a. Senyawa *Marker*

Senyawa *marker* adalah senyawa alami yang terdapat pada tumbuhan tertentu dan biasanya memiliki konsentrasi yang tinggi dan tidak dapat ditemukan dalam tumbuhan lainnya.

b. Konformasi

Konformasi adalah bentuk perubahan rotasi pada atom-atom yang terdapat pada senyawa tertentu akibat perubahan energi.

c. Skor Penambatan

Skor penambatan adalah nilai ikatan energi suatu senyawa terhadap proteinnya yang semakin minimum nilainya dianggap semakin baik dan memiliki afinitas yang lebih tinggi.

D. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan berupa seperangkat *Personal Computer* (PC/Laptop) yang dilengkapi dengan perangkat lunak seperti sistem operasi dan aplikasi pendukung. Sistem operasi yang digunakan adalah Linux Mint 16 *Cinnamon* 32-bit dan *Windows 8 Pro* 32-bit, dan aplikasi pendukung yang digunakan adalah *Microsoft Office Excel 2013*, *ChemDraw 2010*, *Libre Office Calc 4.0*, *PLANTS 1.1* 32-bit, *Marvin Sketch*, *YASARA* dan *Visual Molecular Dynamics* (VMD).

2. Bahan Penelitian

Protein *Sirtuin-3* dalam bentuk berkas (*file*) yang diunduh dari situs resmi protein data bank (www.rcsb.org), kumpulan senyawa *marker* tumbuhan khas Indonesia dari Farmakope Herbal tahun 2008 dan 2011, dan senyawa Resveratrol dan Oroxylin A dalam bentuk berkas (*file*) untuk pembandingan.

E. Cara Kerja

1. Penyiapan Senyawa *Marker*

Senyawa *marker* tumbuhan obat dikoleksi dari Farmakope Herbal 2008 dan 2011. Senyawa *marker* dibuat dalam bentuk berkas (*file*) dengan menggunakan aplikasi *ChemDraw* 2010 pada system operasi *Windows*. Senyawa *marker* disimpan dengan format “.*cdx*”.

2. Penyiapan Protein Uji

Protein yang akan digunakan sebagai reseptor uji diunduh dari situs resmi *protein data bank* (www.rcsb.org) dalam format “.*pdb*”. Pada situs tersebut disediakan berbagai macam protein *Sirtuin* dalam bentuk *virtual*, sehingga dilakukan pengumpulan seluruh macam berkas protein *Sirtuin* kemudian dilakukan seleksi terhadap berkas-berkas protein tersebut.

3. Instalasi Sistem Operasi Linux dan Aplikasi Pendukung

Instalasi sistem operasi Linux dilakukan karena aplikasi yang dibutuhkan untuk melakukan penambatan molekul pada umumnya hanya dapat dioperasikan pada Linux. Sistem operasi yang diinstal adalah *Linux Mint 16 Cinnamon* 32-bit.

Setelah instalasi Linux, dilakukan instalasi aplikasi pendukung seperti YASARA untuk preparasi protein uji dan ligan asli, *Marvin Sketch* untuk preparasi ligan atau yang akan diuji, PLANTS untuk melakukan penambatan molekul dan VMD untuk visualisasi hasil penambatan (*docking*) dalam bentuk *virtual 3D*.

4. Seleksi dan Validasi Protein Berdasarkan RMSD

a. Preparasi Protein Uji dan Ligan Asli

Preparasi protein uji dan ligan asli menggunakan aplikasi YASARA. Protein uji dalam bentuk *virtual* dengan format “.*pdb*” dibuka, residu yang dianggap sebagai pengganggu seperti senyawa H₂O dihilangkan. Ligan asli dari protein dihilangkan, karena posisi dari ligan tersebut yang akan digunakan untuk tempat uji senyawa yang lain pada saat dilakukan proses penambatan molekul (*molecular docking*). Dilakukan penambahan atom hidrogen pada masing-masing residu pada protein tersebut dengan tujuan untuk optimasi nilai penambatan (*docking*) yang dihasilkan. Protein yang sudah dipreparasi disimpan dalam format “.*mol2*”, karena aplikasi PLANTS hanya dapat menjalankan berkas dengan format “.*mol2*”.

Preparasi ligan asli dari protein uji dilakukan dengan cara membuka berkas protein pada halaman YASARA yang baru. Setelah itu semua residu dihapus kecuali residu ligan aslinya. Atom hidrogen ditambahkan pada ligan asli tersebut. Berkas ligan asli disimpan dalam format “.*mol2*”.

b. Preparasi Ligan

Preparasi ligan menggunakan aplikasi *Marvin Sketch*. Pada uji validasi, berkas ligan yang akan dipreparasi adalah ligan asli yang telah dibuat dari YASARA. Berkas ligan dibuka kemudian diatur dalam bentuk 2D dengan cara menekan tombol “CTRL + 2” pada *Marvin Sketch*, tujuannya untuk konformasi ligan yang dipreparasi dapat mudah dibentuk secara optimal. Ligan yang sudah dibentuk dikondisikan pada pH 7,4 agar sesuai dengan kondisi pH cairan tubuh manusia dan disimpan dalam format “.mrv”.

Berkas “.mrv” yang sudah dibuat dibuka kembali pada halaman baru *Marvin Sketch*, setelah itu dilakukan pembuatan konformasi ligan yang akan diuji sebanyak 10 macam konformasi. Berkas konformasi ligan disimpan dalam format “.mol2”.

c. Menjalankan Proses Penambatan Molekul

Menjalankan aplikasi PLANTS harus menggunakan terminal pada Linux. Setelah berkas protein, ligan asli (*native ligand*) dan ligan yang akan diuji sudah disiapkan, dilakukan penyiapan berkas pendukung untuk PLANTS, yaitu berkas *plantsconfig*. Berkas *plantsconfig* ini digunakan sebagai wadah untuk menampung berkas protein, ligan asli dan ligan untuk dijalankan oleh aplikasi PLANTS.

Berkas-berkas tersebut dikumpulkan dalam 1 *folder*, terminal Linux dijalankan dengan cara menekan tombol “CTRL+ALT+T” dan memasukkan perintah seperti pada Gambar.9:

```

Cd Docking
Chmod u+x plants.bin
./plants.bin
./plants.bin -mode bind protein.mol2 5 ref_ligand.mol2
Grep -Ev "# binding site definition" plantsconfig > temp_conf
Grep -Ev "bindingsite_" temp_conf > temp_conf2
Cat temp_conf2 bindingsite.def > plantsconfig
./plants.bin -mode screen plantsconfig

```

Gambar 9. Perintah pada Terminal Linux untuk Menjalankan Aplikasi PLANTS

d. Proses Validasi Protein

Setelah didapatkan skor penambatan, berkas konformasi nilai ligan yang paling rendah diambil dari *folder Results*, berkas dengan nilai paling minimum yang dipilih karena menandakan konformasi tersebut membutuhkan energi paling minimum untuk berikatan pada reseptornya dengan afinitas yang paling baik. Setelah itu dilakukan validasi metode *molecular docking* dengan cara menghitung nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD). RMSD adalah parameter yang umumnya digunakan untuk mengevaluasi kemiripan dua buah struktur berdasarkan perbedaan jarak atom yang sejenis, secara matematis bisa diukur dengan persamaan :

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum_i d_i^2}{n}}$$

Dimana:

n : Nomor atom

d : jarak antara 2 atom i yang sesuai dalam 2 struktur

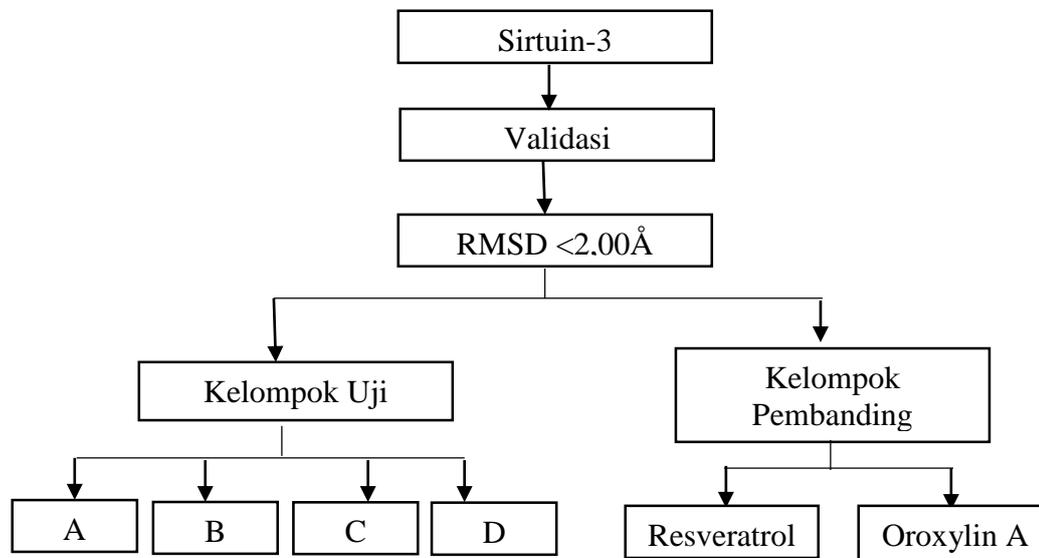
Untuk mengukur nilai RMSD, digunakan aplikasi YASARA. Cara mengukur RMSD dengan YASARA adalah dengan membuka berkas ligan asli kemudian ditindih dengan berkas konformasi terbaik dari hasil penambatan. Kemudian dengan menjalankan fungsi “*Analyze > RMSD of..*” pada YASARA bisa didapatkan nilai RMSD dari ikatan protein dengan ligan aslinya tersebut. Protein dengan nilai RMSD lebih dari 2,00Å dianggap tidak valid dan tidak bisa digunakan untuk melakukan penambatan dengan ligan lain, karena jarak ikatannya akan tidak optimal, protein dengan RMSD kurang dari 2,00Å yang akan digunakan sebagai protein uji untuk melakukan uji penambatan molekul (*molecular docking*) PLANTS.

e. Uji *In Silico* Senyawa Marker

Setelah didapatkan protein dengan nilai RMSD kurang dari 2,00Å, dapat dilakukan uji *in silico* pada senyawa-senyawa *marker*. Senyawa *marker* yang sudah dibuat dengan menggunakan *ChemDraw* 2010 pada system operasi *Windows* dipreparasi dengan menggunakan aplikasi *Marvin Sketch* pada system operasi *Linux Mint 16 Cinnamon*, dan tahap pengerjaannya sama seperti pengukuran RMSD.

Setelah semua senyawa *marker* diuji secara *in silico*, selanjutnya dilakukan *terhadap* senyawa pembandingnya yaitu Resveratrol dan Oroxylin A.

F. Skema Langkah Kerja



Gambar 10. Skema Langkah Kerja

Keterangan:

- A : Senyawa Golongan Alkaloid & Steroid
- B : Senyawa Golongan Flavonoid
- C : Senyawa Golongan Terpenoid
- D : Senyawa Golongan Fenolik

G. Analisis Data

1. Analisis Skor Penambatan Senyawa Uji dan Senyawa Pembanding

Data yang didapat dari uji *in silico* senyawa *marker* tumbuhan obat khas Indonesia dan senyawa pembanding yaitu Resveratrol dan Oroxylin A adalah skor penambatan masing-masing senyawa. Skor penambatan senyawa *marker* tumbuhan obat khas Indonesia dianggap lebih baik dan berpotensi sebagai

aktivator *Sirtuin-3* jika skor penambatannya lebih rendah dari senyawa pembanding (Resveratrol dan Oroxylin A).

2. Visualisasi Hasil Penambatan Molekul Secara *Virtual 3D*

Dilakukan analisis hasil penambatan (*docking*) senyawa *marker* tumbuhan obat khas Indonesia secara *virtual 3D* dengan menggunakan aplikasi *Visual Molecular Dynamics* (VMD). Hasil penambatan dianggap berhasil jika senyawa *marker* yang sudah diuji melekat pada residu target yang sesuai atau posisi ligan asli (*native ligand*) sebelumnya. Setelah posisi senyawa uji sesuai dengan target yaitu bagian dari residu penyusun protein uji (asam amino), dilakukan pengukuran jarak antara senyawa uji dengan residu target untuk memprediksi bentuk dan kekuatan ikatan (*binding site*) antara senyawa uji dengan residu target.