

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioinformatika Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Brawijaya, Malang pada bulan Maret – Juli 2017.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan secara *in silico* pada penelitian ini adalah 1 set *Personal Computer* (PC) dengan spesifikasi *processor* Intel Core Duo dengan RAM 2,00GB 1.8GHz dengan sistem operasi Windows 7 *Professional*, *web server* *Firedock/PatchDock*, *iGEMDock* dan *pyDock*, serta perangkat lunak *Discovery Studio 2017*, *LigPlot⁺* dan *pyMol*.

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan secara *in silico* antara lain molekul guanininoacetate methyltransferase (GAMT), methyltransferase protein like-10 (METTL-10), guanidinoacetate (GAA), dan Creatin.

3.3 Rancangan dan Tahapan Penelitian

Adapun tahapan penelitian yang dilakukan secara *in silico* adalah:

1. Persiapan makromolekul yaitu GAMT dan METTL-10 sebagai protein reseptor didapatkan dari *web server* <http://string-db.org> dan <https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
2. Persiapan ligan GAA serta pemisahan ligan dari makromolekul GAMT dan METTL20
3. Optimasi geometri dan minimisasi energi reseptor dan ligan dengan *pyMol*
4. Proses *docking* ligan terhadap makromolekul menggunakan *web server* *pyDock* dan *PatchDock*
5. Analisis *Molecular Docking*
 - Analisis energi bebas Gibbs dan konstanta inhibisi
 - Kontak residu dan ikatan hidrogen

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Persiapan makromolekul dan ligan

Makromolekul yang akan digunakan, reseptor GAMT dan METTL-10, serta ligan GAA, diunduh dari *web* RSCB Protein Data Bank pada alamat <https://www.rcsb.org>. Pada tampilan utama *web*, akan terdapat kolom pencarian *search* lalu dimasukkan kata kunci “GAMT atau METTL-10 dan GAA”. Lalu di klik tombol cari, maka akan muncul molekul – molekul yang berkenaan dengan kata kunci yang dimasukkan. Masing – masing molekul diunduh dalam bentuk protein data bank atau file (.pdb). Sebagian molekul akan dimodelkan dari bentuk FASTA pada UNIPROT (<http://www.uniprot.org/>). Sekuen data dalam bentuk FASTA di-copy seluruhnya, lalu di-*modelling* dengan SWISS Model. Hasil yang muncul pada Swiss Model diunduh dalam format (.pdb), yang selanjutnya akan di preparasi dan di optimasi.

3.4.2 Preparasi dan Optimasi Ligan

Pada penelitian ini, ligan yang digunakan adalah ligan yang diunduh dari *web* <https://www.rcsb.org> dalam bentuk format Protein Data Bank (.pdb). Ligan tersebut diunduh dalam bentuk 3D dan disimpan dengan format (.pdb). Hasil ligan yang diunduh dalam bentuk (.pdb) tersebut selanjutnya dioptimasi menggunakan perangkat lunak *Discovery Studio 2017*. Pada proses optimasi, dilakukan penghilangan molekul air pada masing – masing ligan dengan cara klik menu *Script*, lalu *Selection-select water*

molecul. Pada tampilan akan muncul warna berbeda menandakan terdapat molekul air, lalu di hapus dengan klik kanan dan *cut*, sehingga molekul air yang ada akan hilang. Cara yang sama dilakukan untuk menghilangkan ligan pengganggu dengan klik menu *Script*, lalu *Selection-select ligan* dan *cut* pada bagian yang terpilih sehingga didapatkan struktur geometri yang paling stabil. Setelah optimasi disimpan file yang baru dengan format (.pdb) yang selanjutnya akan dilakukan *docking*.

3.4.3 Persiapan Makromolekul

Makromolekul atau protein reseptor yang digunakan diunduh dari RCSB Protein Data Bank dan web <http://string-db.org>. Protein reseptor tersebut diunduh dengan bentuk 3D dan disimpan dalam format (.pdb). Hasil protein reseptor yang diunduh dalam format (.pdb) tersebut selanjutnya dioptimasi sehingga didapatkan struktur geometri yang paling stabil menggunakan perangkat lunak *Discovery Studio 2017*. Setelah optimasi disimpan kembali dengan format (.pdb) yang selanjutnya akan dilakukan *docking* dengan *webservice* yang tersedia.

3.4.4 Docking

Setelah dilakukan preparasi serta optimasi ligan dan protein reseptor yang akan digunakan, selanjutnya dilakukan *docking* menggunakan *web server PatchDock* dan *pyDock*. Protein reseptor GAMT dan METTL-10 di-*docking*-kan dengan ligan yang ada menggunakan *webservice PatchDock* pada alamat <https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/> maupun *pyDock* pada alamat <https://life.bsc.es/servlet/pydock/home/>. Pada halaman utama *web PatchDock*, terdapat kolom pengisian file (.pdb) pada reseptor dan ligannya, juga terdapat kolom RMSD dan alamat email tujuan hasil *docking*, lalu klik *submit form* untuk memproses. Web secara otomatis akan mengirimkan hasil *docking* tersebut ke email yang telah dimasukkan. Pada halaman utama *web pyDock*, dimasukkan file dengan format (.pdb) baik ligan dan reseptor yang akan di-*docking* beserta email institusi, sehingga hasil berupa *scoring energy, desolvation, energi Van der Waals* akan dikirim ke email tersebut. Hasil *docking* yang telah masuk ke email kemudian diunduh dalam bentuk .rar (.zip), sehingga hasilnya bisa diekstrak dan divisualisasi menggunakan *Discovery Studio 2017*.

3.5 Analisis Molekular Docking

Hasil penambatan molekular dilakukan beberapa analisis seperti analisis energi bebas Gibbs, konstanta inhibisi, ikatan hidrogen serta *binding-site* ligan interaksi molekularnya.

3.5.1 Analisis Energi Bebas Gibbs (ΔG^0) dan konstanta inhibisi (Ki)

Dari hasil molekular *docking* yang dilakukan, akan diketahui ΔG^0 masing – masing, sehingga dapat dihitung konstanta inhibisinya. Untuk menghitung Konstanta Inhibisi, digunakan formula:

$$Ki = e^{\frac{\Delta G}{RT}}$$

dengan:

Ki	: Konstanta Inhibisi
ΔG	: Energi bebas Gibbs (S) (kcal/mol)
R	: 1,978 kcal/mol.K
T	: 309 K (pada darah manusia)

3.5.2 Kontak Residu dan Ikatan Hidrogen

Kontak residu dan ikatan hidrogen yang dianalisis merupakan model *docking* yang terjadi antara kompleks protein-protein terbaik. Analisis dilakukan melalui data yang telah didapatkan dari *webservice*

docking. Berdasarkan data yang telah diperoleh, dilakukan analisis ikatan ligan yang berinteraksi dengan menganalisis *ligand 2D* dan *ligan interaction*, pada kompleks protein-protein.