

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Desain Penelitian

Metode penelitian ini berupa metode eksperimental untuk mengetahui hasil uji *in silico* senyawa *Quercetin* sebagai *3CLpro inhibitor*, *PLpro inhibitor* dan *NSP3 inhibitor* SARS-CoV-2 (antivirus Covid-19). Aktivitas senyawa *quercetin* sebagai model kandidat antivirus Covid-19 (SARS-CoV-2) dapat dievaluasi secara kimia komputasi dengan metode *molecular docking* menggunakan *software* PLANTS dan YASARA, selain itu metode ini dapat menggambarkan interaksi, ikatan, maupun afinitas suatu ligan (obat) dengan reseptornya.

#### B. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di bulan Juni 2021 – Agustus 2021 secara *online* menggunakan komputerisasi dan dapat dilakukan di rumah (*work from home*), hal ini dilakukan juga meminimalisir penyebaran virus Covid-19 dengan tetap di rumah saja sesuai protokol kesehatan.

#### C. Alat dan Bahan Penelitian

##### 1. Alat

Alat yang digunakan untuk melakukan penelitian ini adalah seperangkat laptop 32 bit, internet, *software* Co-PendriveLinux-KDE (<http://www.pendrivelinux.com/run-pendrivelinux-2009-in-windows/>), *software* PLANTS (<http://www.tcd.uni-konstanz.de/research/plants.php>),

aplikasi ChemAxon (<http://www.chemaxon.com/marvin/download-user.html>), dan software YASARA (<http://www.yasara.org/viewdl.html>).

## 2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam melakukan penelitian ini antara lain, struktur protein yang diunduh melalui *website* Protein Data Bank (<http://www.rcb.org/pdb>). Protein tersebut adalah Protein 3CLpro dengan kode PDB atau PDB ID : 5R7Y, protein PLpro dengan kode PDB atau PDB ID : 3E9S, dan protein NSP3 dengan kode PDB atau PDB ID : 6WOJ, dimana ketiganya diambil dari *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank* (RCSB PDB) dalam bentuk PDB format. Ligan uji yang digunakan adalah senyawa *Quercetin*, sedangkan ligan pembanding yang digunakan adalah ligan *native* yang sudah teruji sebagai inhibitor pada masing-masing protein SARS-CoV-2 tersebut (yakni ligan JFM pada 3CLpro, ligan TTT pada PLpro, dan ligan APR pada NSP3)..

## D. Definisi Operasional

Tabel 3.1. Defisini operasional variable

Variabel	Definisi	Metode	Skala	Satuan
<i>In Silico</i>	Metode kimia komputasi untuk memprediksi apakah kandungan senyawa aktif dalam suatu tanaman berpotensi memiliki efek farmakologi atau tidak, dan uji ini sebagai uji pendahuluan sebelum dilakukannya uji <i>in</i>	Menggunakan sebuah <i>software</i> yang mana cara pengukurannya adalah membandingkan skor senyawa tersebut dengan senyawa yang sudah terbukti efek farmakologinya.	-	-

Variabel	Definisi	Metode	Skala	Satuan
	<i>vitro</i> ataupun <i>in vivo</i> .			
<i>Quercetin</i>	Merupakan salah satu senyawa golongan flavonoid yang terdapat dalam berbagai tanaman.	Senyawa <i>Quercetin</i> dan ligan pembanding di- <i>docking</i> -kan dengan protein PLpro, 3CLpro dan NSP3 menggunakan sebuah <i>software</i> yakni YASARA dan PLANTS.	Nominal	<i>Docking score</i>
Protein 3CLpro	Merupakan protein yang berperan dalam proses perkembangan dan replikasi virus SARS-CoV-2 (Covid-19).	Protein 3CLpro di- <i>docking</i> -kan dengan senyawa kuersetin dan ligan pembanding menggunakan <i>software</i> yakni YASARA dan PLANTS.	Nominal	<i>Docking score</i>
Protein PLpro	Merupakan protein yang berperan dalam proses perkembangan, replikasi dan transkripsi virus SARS-CoV-2 (Covid-19).	Protein PLpro di- <i>docking</i> -kan dengan senyawa kuersetin dan ligan pembanding menggunakan <i>software</i> yakni YASARA dan PLANTS.	Nominal	<i>Docking score</i>
Protein NSP3	Merupakan protein yang berperan dalam proses perkembangan, replikasi maupun transkripsi virus SARS-CoV-2 (Covid-19).	Protein NSP3 di- <i>docking</i> -kan dengan senyawa kuersetin dan ligan pembanding menggunakan <i>software</i> yakni YASARA dan PLANTS.	Nominal	<i>Docking score</i>
Ligan <i>native</i>	Merupakan ligan alami yang terdapat pada masing-masing protein yang diujikan (yakni	Ligan <i>Native</i> dan senyawa kuersetin di- <i>docking</i> -kan dengan protein PLpro, 3CLpro	Nominal	<i>Docking score</i>

Variabel	Definisi	Metode	Skala	Satuan
	3CLpro, PLpro, dan NSP3) yaitu JFM pada 3CLpro, ligan TTT pada PLpro, dan ligan APR pada NSP3	dan NSP3 menggunakan sebuah <i>software</i> yakni YASARA dan PLANTS.		

## E. Prosedur

### 1. Validasi

Proses validasi dilakukan melalui tiga tahapan, yakni tahap pertama melakukan preparasi protein dan ref\_ligand, tahap kedua melakukan preparasi ligan, dan tahap ketiga melakukan *redocking*. Preparasi protein dan ref\_ligand dilakukan dengan cara mengunduh kode PDB (*Protein Data Bank*) melalui *website* Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>) dengan format .pdb. Selanjutnya, kode PDB yang telah diunduh kemudian dibuka pada aplikasi YASARA, pengoperasiannya yakni sebagai berikut YASARA | *File > Load > PDB file ...* cari tempat penyimpanan file tersebut, lalu klik “OK”. (Purnomo, 2013)

Hal pertama yang dilakukan setelah membuka kode PDB pada YASARA adalah menghapus molekul air, dimana pengoperasiannya sebagai berikut, *Edit > Delete > Water > OK*. Selanjutnya, hidrogen ditambahkan ke dalam sistem yakni dengan cara, *Edit > Add > Hydrogens to : all*, yang kemudian file disimpan sebagai YASARA *object* dengan nama file sesuai kode PDB, misalnya 5R7Y.yob, pengoperasiannya yakni sebagai berikut, *File > Save as > YASARA Object*. Selanjutnya, ligan asli dihapus sehingga hanya menyisakan protein target saja (*Edit > Delete > Residue ; pilih Sequence :*

OHT, *Name* : OHT, *Belongs to or has* : All, klik “OK”). Kemudian hasilnya disimpan sebagai protein.mol2, yakni pengoperasiannya sebagai berikut, *File > Save as > Other file format*; pilih *Object*: 6M71, *File format*: mol2, *Browse*: C:/docking\_plants, *Filename*: protein.mol2. (Purnomo, 2013)

Tahap terakhir untuk preparasi protein dan ref\_ligand adalah membuat file mol2 yang hanya berisi ligan asli (*File > New*, klik “Yes” | *File > Load > YASARA Object ...* cari file 5R7Y.yob yang telah disimpan sebelumnya | *Edit > Delete > Residue*; pilih *Name* : OHT, *Belongs to or has* : All, opsi “Negate Name” dicentang, klik “OK”). Kemudian hasilnya disimpan sebagai ref\_ligand.mol2. (Purnomo, 2013)

Tahap kedua untuk proses validasi adalah preparasi ligan yang dilakukan dengan cara membuka struktur senyawa ligan *nattive* di jendela MarvinSketch (*File > Open ...* ref\_ligand.mol2 | *Structure > Clean 2D > Clean in 2D*). Selanjutnya, protonasi dicek pada pH 7,4 (*Tools > Protonation > Major Microspecies*, klik “OK” pada jendela yang baru muncul). Setelah muncul jendela *major species*, file disimpan di C:/docking\_plants sebagai ligand\_2D.mrv (klik kanan, pilih “Save as...”). kemudian jendela MarvinSketch ditutup. (Purnomo, 2013)

Selanjutnya, file ligand\_2D.mrv dibuka di jendela MarvinSketch yang baru (*File > Open ...* ligand\_2D.mrv). Kemudian dilakukan pencarian konformasi dengan cara klik *Tools > Conformation > Conformers*, klik “OK”. Hasilnya disimpan sebagai ligand.mol2 di folder C:/docking\_plants (*File > Save as...*). (Purnomo, 2013)

Tahap ketiga untuk proses validasi adalah *redocking*. *Redocking* dilakukan melalui pendrivelinix. Pendrivelinix dijalankan dan file yang dibutuhkan di-*copy* ke pendrivelinix dengan cara mengetik berikut :

```
Pendrivelinix : ~# cp /mnt/win/docking_plants/*.mol2 .
```

```
Pendrivelinix : ~# cp /mnt/win/docking_plants/plantsconfig .
```

Selanjutnya, koordinat pusat tempat ikatan dan radiusnya ditampilkan dengan mengetik perintah sebaga berikut :

```
Pendrivelinix : ~# ./PLANTS -mode bind ref_ligand.mol2 5 protein.mol2
```

Setelah koordinat pusat tempat ikatan dan radusnya diketahui, maka dilanjutkan dengan mengetik perintah berikut :

```
Pendrivelinix : ~# cp /mnt/win/docking_plants/*.mol2 .
```

```
Pendrivelinix : ~# cp /mnt/win/docking_plants/plantsconfig .
```

Selanjutnya, file plantsconfig dibuka dengan perintah berikut :

```
Pendrivelinix : ~# kwrite plantsconfig
```

Proses *docking* menggunakan PLANTS dijalankan dan ditunggu hingga prosesnya selesai dengan mengetik perintah berikut :

```
Pendrivelinix : ~# ./PLANTS -mode screen plantsconfig. (Purnomo, 2013)
```

Selanjutnya, skor terendah dari hasil *docking* dicari dengan mengetik perintah berikut :

```
Pendrivelinix : ~# cd results/
```

```
Pendrivelinix : ~/results# more bestranking.csv
```

Konformasi yang memiliki skor terendah (misalnya : konformasi ke-6) di-*copy* ke folder C:/docking\_plants dengan mengetik perintah berikut :

Pendrivelinux : ~/results# cp \*\_entry\_00006\_conf\_01.mol2

/mnt/win/docking\_plants/

Pendrivelinux:~/results#

File ref\_ligand.mol2 dan file hasil *docking* yang telah di-copy di folder C:/docking\_plants dibuka di YASARA kemudian disimpan sebagai YASARA *scene* di folder C:/PLANTS dengan nama align.sce. (Purnomo, 2013)

Selanjutnya, atom hidrogen dihapus (*Edit > Delete > Hydrogens*) dan nilai RMSD hasil *docking* dihitung (*Analyze > RSMD of > Molecules ...*) akan muncul jendela baru dua kali. Saat muncul pertama pilih *sequence* dengan kolom 3 bernomor 1. Saat kemunculan kedua pilih *sequence* dengan kolom 3 bernomor 2. Sementara itu, opsi *Name* dan *Belongs to or has* dibiarkan apa adanya). Nilai RMSD akan muncul di kotak hitam yang terletak di bagian bawah YASARA. Kode PDB dikatakan valid dan dapat digunakan untuk proses *docking* tahap selanjutnya apabila nilai RMSD kurang dari 2.0 Å. (Purnomo, 2013)

## 2. *Molecular Docking* Senyawa Uji

Sebelum melakukan *docking*, protein.mol2 dan ref\_ligand.mol2 untuk masing-masing kode PDB dari hasil validasi sebelumnya disiapkan terlebih dahulu. Selanjutnya, senyawa *Quercetin* dipreparasi menggunakan MarvinSketch dengan prosedur seperti pada tahap preparasi ligan saat melakukan validasi. Kemudian, senyawa *Quercetin* di-*docking*-kan pada protein PLpro, 3CLpro dan protein NSP3 dengan prosedur seperti pada tahap

*re-docking*, tetapi tidak sampai menentukan nilai RMSD. (Purnomo, 2013). Skor *docking* antara ligan *native* dan senyawa *Quercetin* protein PLpro, 3CLpro dan protein NSP3 dibandingkan untuk melihat kompleks ikatan mana yang paling stabil dengan protein PLpro, 3CLpro dan protein NSP3. Semakin rendah skor *docking* menunjukkan kompleks ikatan yang semakin stabil.

### 3. Analisa Interaksi Molekular (visualisasi)

Visualisasi hasil *docking* dari masing-masing kode PDB menggunakan *software* YASARA yang dibantu oleh LigPlot+ dan PyMol untuk melihat interaksi 3D yang terjadi antara ligan *native* dan senyawa *Quercetin* pada protein 3CLpro, protein PLpro, dan protein NSP3 serta asam-asam amino yang berikatan (Purnomo, 2013).

### 4. Evaluasi Kekuatan Pengikatan

Evaluasi kekuatan pengikatan ligan *native* dan senyawa *Quercetin* dinyatakan sebagai skor *docking*. Skor *docking* antara ligan *native* dan senyawa *Quercetin* protein PLpro, 3CLpro dan protein NSP3 dibandingkan untuk melihat kompleks ikatan mana yang paling stabil.

Analisis hasil *docking* dilakukan dengan cara membandingkan skor *docking* yang diperoleh antara ligan *native* dan senyawa *Quercetin* dari kode PDB : 5R7Y, 3E9S, dan 6WOJ (kode protein target) menggunakan *software* PLANTS dan dibantu dengan *microsoft excel*. Semakin rendah skor *docking* menunjukkan kompleks ikatan antara protein dengan ligan yang semakin stabil (Adelina, 2014).



## **F. Analisis Data**

Analisis data yang dilakukan yakni, data skor *docking* antara ligan *native* dan *Quercetin* yang berikatan dengan protein-protein 3CLpro, PLpro dan NSP3 dilakukan uji menggunakan uji statistik *One Way Annova* atau Anova Satu Jalan, dimana kemudian data yang homogen dan normal dilanjutkan uji beda *Post Hoc*.