

## **BAB III**

### **TATA KERJA**

#### **3.1 Alat**

*Molecular docking* dilakukan menggunakan *hardware* komputer dengan spesifikasi yaitu *Operating System* Windows® 10 Home 64-bit, prosesor AMD Dual-Core A6-9220 APU *up to* 2,9 GHz, VGA AMD Radeon™ R4 Graphics, kapasitas RAM 4 GB DDR4-1866 SDRAM dan HDD 500 GB. Program dan situs *server* yang digunakan adalah Discovery Studio 3.5 Visualizer (*Accelrys Enterprise Platform*), MODELLER 9.21 (Sali Lab), AutoDock® 4.2 *with* AutoDock Tools (The Scripps Research Institute), *server* PROCHECK dan *server* PDB2PQR.

#### **3.2 Bahan**

Struktur makromolekul toksin difteri dengan kode 1SGK, dan struktur tiga dimensi ligan *Nicotinamide Adenine Dinucleotide* (NAD<sup>+</sup>) yang diunduh dari situs Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>).

#### **3.3 Metode Penelitian**

##### **3.3.1 Penyiapan Struktur Makromolekul Toksin Difteri dan Ligan**

Dilakukan pengunduhan struktur tiga dimensi toksin difteri beserta ligan NAD<sup>+</sup> dari situs Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/pdb/>) dengan kode 1SGK. Struktur tiga dimensi diunduh dalam format .pdb.

##### **3.3.2 *Molecular Docking* NAD<sup>+</sup> Terhadap Toksin Difteri Normal**

Struktur makromolekul 1SGK dikondisikan terlebih dahulu pada pH fisiologis (pH 7) menggunakan *server* PDB2PQR pada alamat situs [http://nbcr-222.ucsd.edu/pdb2pqr\\_2.0.0/](http://nbcr-222.ucsd.edu/pdb2pqr_2.0.0/). File PDB 1SGK diunggah ke *server* tersebut, kemudian hasilnya disimpan ke dalam format .pdb sehingga diperoleh struktur makromolekul 1SGK yang telah terprotonasi. Penambahan atom hidrogen serta penghilangan molekul air telah dilakukan secara otomatis oleh *server* PDB2PQR.

*Molecular docking* dilakukan menggunakan program AutoDock® 4.2 yang dilengkapi AutoDock Tools. Struktur makromolekul toksin difteri terprotonasi dan ligan NAD<sup>+</sup> disimpan dalam *folder* yang sama. Pertama, dilakukan

pengaturan jumlah torsi (*rotatable bonds*) yang ingin diaktifkan pada ligan NAD<sup>+</sup>. Hasilnya disimpan dengan format .pdbqt. Kemudian *file* makromolekul toksin difteri normal dimasukkan ke dalam layar kerja program AutoDock, dan hasilnya disimpan dengan format .pdbqt. *Grid Parameter File* disiapkan dengan mengatur ukuran *grid box* pada daerah pengikatan ligan NAD<sup>+</sup>, yaitu area yang memiliki sisi aktif CL2 *loop* (residu 38-49) berdasarkan penelitian Malito *et al.*, (2012).. Informasi terkait makromolekul serta ukuran *grid box* disimpan dalam *file* berformat .gpf. Selanjutnya, *Dock Parameter File* disiapkan dengan mengatur *run* pada jumlah 100 menggunakan fitur Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) yang terdapat dalam program AutoDock. Hasil pengaturan disimpan dalam *file* berformat .dpf. Setelah semua *file* dibuat, dilakukan proses kalkulasi *grid* menggunakan fitur AutoGrid terlebih dahulu, kemudian dilanjutkan dengan proses *molecular docking*. Informasi mengenai hasil *docking* disimpan secara otomatis ke dalam format .dlg. Dilakukan evaluasi meliputi interaksi yang terjadi antara toksin difteri normal dengan ligan, energi bebas ikatan, dan *Root Mean Square Deviation* (RMSD). Konformasi ligan dengan RMSD terendah disimpan dengan format .pdb. Hasil *docking* ini selanjutnya dijadikan sebagai kontrol.

### 3.3.3 Penentuan Asam Amino yang Dimutasi dan Pemodelan Mutan

Berdasarkan analisis interaksi yang terjadi, ditentukan residu asam amino yang akan diubah atau dimutasi. Pengubahan asam amino dilakukan melalui pemodelan homologi menggunakan program MODELLER 9.21, dengan memodifikasi kode asam amino pada *file* sekvens toksin difteri. Makromolekul PDB 1SGK digunakan sebagai template pencetakan. Struktur model dihasilkan sebanyak 5 buah setelah menjalankan *script* perintah pada program MODELLER 9.21. Model protein yang dipilih adalah yang memiliki nilai *Discrete Optimized Protein Energy* (DOPE) terendah. Kualitas model mutan kemudian dianalisis menggunakan *server* PROCHECK (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>) sehingga diperoleh data plot Ramachandran. Apabila persentase asam amino pada daerah yang diizinkan > 90% dan tidak ada asam amino pada daerah yang dilarang, maka kualitas model protein dinyatakan baik.

Struktur mutan toksin difteri yang pernah diteliti sebelumnya, yaitu CRM197 (Malito *et al.*, 2012) dan CRM197EK (Uthailak *et al.*, 2017) pun

dimodelkan pada program MODELLER 9.21 untuk digunakan sebagai pembanding terhadap mutan uji dengan mutasi asam amino baru.

### 3.3.4 Pengkondisian Makromolekul Mutan

Seluruh struktur mutan yang telah dimodelkan dikondisikan pada pH fisiologis menggunakan *server* PDB2PQR. *File* PQR yang diperoleh disimpan dengan format .pdb, sehingga dihasilkan struktur mutan dalam kondisi terprotonasi.

### 3.3.5 *Molecular Docking* NAD<sup>+</sup> Terhadap Mutan Toksin Difteri

Struktur mutan yang telah terprotonasi selanjutnya diuji *molecular docking*, yaitu CRM197, CRM197EK dan mutan dengan titik mutasi baru. *Molecular docking* dilakukan dengan cara yang sama seperti pada toksin difteri normal, yaitu menggunakan program AutoDock® 4.2 dengan menyiapkan *file* PDBQT ligan NAD<sup>+</sup> serta makromolekul mutan, *Grid Parameter File* dan *Dock Parameter File*.

### 3.3.6 Evaluasi Hasil *Molecular Docking* Mutan

Dilakukan evaluasi meliputi interaksi yang terjadi antara mutan toksin difteri dengan ligan, energi bebas ikatan, perbandingan nilai energinya terhadap mutan pembanding, dan jumlah ikatan hidrogen yang terbentuk. Hasil yang diharapkan adalah energi ikatan yang semakin tinggi.