

BAB III TATA KERJA

3.1 Alat

Molecular docking dilakukan dengan menggunakan komputer dengan spesifikasi *Operating System Windows*[®] Home 64-bit dengan prosesor Intel[®] Core[™] i7-7500U, up to 3,5GHz, RAM 8GB, VEGANVIDIA[®] GeForce[®] 940M dengan 2GB DDR3 VRAM dan HDD 1TB. *Software* yang digunakan adalah *Autodock*[®], *Notepad*⁺⁺, BIOVIA Discovery Studio 2019, dan ChemOffice2016.

Software BIOVIA Discovery Studio 2018 adalah sebuah *software* komputer yang bisa digunakan dalam permodelan kimia, penentuan afinitas suatu molekul, skrining *pharmacophore*, dan prediksi rasional *design* antibodi (Dassault Systemes, 2016).

3.2 Bahan

Repositori yang digunakan adalah RSCB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). Struktur kristalisasi enzim parasit diperoleh dari PDB dengan kode 1J31, 1J3J dan 4DP3. Senyawa kalkon yang digunakan adalah 2',4'-dihidroksi-3',6'-dimetoksikalkon dan 2'4'-dihidroksi-5',6'-dimetoksikalkon, akan didesain menggunakan ChemOffice 2016 kemudian dilakukan minimisasi energi menggunakan Biovia Discovery Studio. Struktur ligan *primetamin* akan digunakan sebagai pembanding, diperoleh dari PubChem.

3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan adalah metode eksperimental laboratorium kering (*dry lab/ in silico*) menggunakan komputasi untuk permodelan dan menguji aktifitas penghambatan terhadap protein target 1J3I, 1J3J dan 4DP3 meliputi persiapan ligan dan protein target (reseptor), validasi metode komputasi, dan interpretasi.

3.3.1 Penyiapan Makromolekul Enzim *PfDHFR*

Struktur makromolekul 1J3J, 1J3I dan 4DP3 dikondisikan pada pH 7 sesuai dengan pH pada saat proses eritrositik pada siklus hidup *Plasmodium* saat menginfeksi dalam tubuh manusia. Dimana untuk proses ini menggunakan server PDB2PQR, selanjutnya dipilih format pqr dan data yang ada dicopy kedalam Note++ dan disimpan dalam format pdb. Lalu format

pdb dicek Biovia Discovery *Studio* untuk memastikan formatnya telah benar. Optimasi makromolekul protein dilakukan dengan Autodock Tools pada program AutoDock[®] 4.2, meliputi penambahan atom hidrogen dan pengaturan grid box parameter. Hasilnya disimpan dalam format pdbqt.

3.3.2 Penyiapan Struktur Ligan

Ligan yang digunakan adalah senyawa *primetamine* yang diunduh dari situs PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) dengan format .sdf. Format kemudian diubah menjadi .pdb menggunakan OpenBabel. Struktur ligan dioptimasi dengan AutoDock Tools dan disimpan dalam format .pdbqt.

3.3.3 Validasi Program Penambatan Molekul

Validasi program harus dilakukan sebelum *virtual screening* terhadap senyawa uji untuk mengetahui kemampuan dan kelayakan program tersebut dalam menskrining senyawa, apakah telah memenuhi syarat validasi untuk pengujian molekul lainnya sehingga meminimalisir kesalahan.

Validasi program penambatan molekul (*docking*) dilakukan dengan *redocking* atau pambatan molekul kembali terhadap reseptornya. Koordinat yang digunakan dalam proses penambatan molekul disesuaikan dapat dilihat pada *file* PDB atau dilihat pada Discovery *Studio* dan berdasarkan pada acuan tersebut maka dilakukan optimasi kembali terhadap koordinat untuk menemukan daerah yang paling tepat pada sisi aktif. Parameter hasil *redocking* yang diamati adalah residu asam amino, ikatan hidrogen, dan nilai RSMD (*Root Mean Square Deviation*). Pengujian dikatakan berhasil bila pose dengan nilai terbaik atau *top-scoring pose* adalah nilai RMSD nya kurang dari 2.0 Å (Allen *et al.*, 2016).

3.3.4 *Molecular docking* Struktur Protein

Molecul docking dilakukan dengan menggunakan AutoDock Tools 1.5.6. Struktur makromolekul dan ligan yang telah dioptimasi secara terpisah disimpan dalam satu *folder* yang sama. Persiapan dilakukan melalui perangkat lunak AutoDock Tools terlebih dahulu dengan tahapan sebagai berikut:

- A. *File.pdbqt* makromolekul dan ligan dibuat dari *file* yang telah berisi makromolekul dan ligan dalam format pdb melalui AutoDock Tools.
- B. *File.pdbqt* dari makromolekul dan ligan digunakan sebagai *input* ke dalam AutoDock Tools.

- C. *Grid Parameter File* disiapkan dengan melalui tahapan penelitian pemilihan *map type* dengan memilih *ligand* dan penentuan *grid box* yaitu Batasan ruang penambatan molekul pada makromolekul. Penentuan *grid box* diatur pada koordinat (X,Y,Z) berbeda untuk setiap makromolekul dan ligan standarnya, juga volume kotak 40 x 40 x 40 titik dengan jarak tiap titik dalam satuan Å. Tahap ini kemudian disimpan dalam bentuk berkas.gpf (*grid parameter file*).
- D. *Docking Parameter File* disiapkan dengan melalui tahapan pemilihan parameter yang akan digunakan dalam menjalankan AutoDock Tools, dimana metode parameter dalam penelitian ini adalah *Lamarckian GA*. Tahap ini kemudian disimpan dalam bentuk berkas dpf (*docking parameter file*).

Parameter hasil *molecular docking* dianalisis terhadap parameter *docking* molekul yang telah ditentukan sebelumnya dengan menggunakan AutoDock Tools. Nilai energi bebas ikatan hasil *docking* dapat diamati dengan membuka file *.dlg* menggunakan aplikasi *Notepad++*.

3.3.5 Evaluasi Penilaian (*Scoring*) Hasil Penambatan Molekul

Hasil *docking* divisualisasi menggunakan *Discovery Studio*. Nilai ΔG_{bind} penambatan terbaik dan kluster terbaik dapat diamati pada berkas tersebut. Penentuan konformasi ligan yang memiliki energi ikatan yang paling rendah dapat diamati dalam visualisasi tersebut.