

BAB III

TATA KERJA

3.1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah perangkat keras komputer prosesor Intel(R) Celeron(R) CPU N3350 @ 1.10GHz (2 CPUs), memori Ram (*Random Access Memory*) 3072MB RAM, sistem operasi *windows 10 Home 64-bit (10.0, Build 17134)*, perangkat lunak *Biovia Discovery Studio*, server *Rosetta* pada situs <http://rosettaserver.graylab.jhu.edu/>, server IEDB (<http://tools.iedb.org/main/>), server Procheck pada situs <https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>, server Phyre2 pada situs <http://sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>, server PatchDock pada situs <https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>, server Firedock pada situs <http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/FireDock/php.php>.

3.2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kode struktur urutan asam amino Gen NS1 DENV-4 yang diunduh dari NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), antibodi monoklonal 8A6F2 dan 6D4B10.

3.3. Metode Penelitian

Metode penelitian dilakukan dengan komputasi melalui tahapan-tahapan sebagai berikut:

3.3.1. Pencarian Urutan Asam Amino Antigen NS1

Urutan asam amino antigen NS1, diperoleh dari situs NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) dengan kode sekuen GenBank NS1 DENV-4 yang diperoleh dari hasil isolat sekuen gen NS1 DENV Indonesia (Aryati dkk, 2013).

3.3.2. Penentuan *Template* Untuk Setiap Sekuen Gen NS1

Hasil urutan asam amino dari setiap kode sekuen GenBank pada halaman situs NCBI dilakukan BLAST dengan klik “*Run BLAST*” dengan opsi “*blastx*”, yang merupakan pilihan untuk menerjemahkan urutan nukleotida ke dalam urutan asam amino. Kemudian, dipilih *Protein Data Bank* (PDB) sebagai *database* pencarian. Hasil pencarian akan menampilkan beberapa struktur protein lain yang memiliki kesamaan residu asam amino.

Pencarian *template* dilakukan dengan mengakses situs Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) dan urutan asam amino yang diperoleh dari NCBI pada halaman awal. Kemudian klik “*phyre search*” hasil *running* akan dikirimkan melalui alamat *email*. Hasil pencarian yang diperoleh dari BLAST dan Phyre2 kemudian dipilih *template* terbaik berdasarkan parameter yang paling mirip dengan sekuen yang digunakan sebagai *template* dalam pemodelan.

3.3.3. Pembuatan Model dengan Perangkat Lunak *Modeller 9.22*

A. Persiapan *Input File*

Persiapan *input file* dalam satu *folder* yang berisi protein *template* yang di unduh dari (<http://www.rcsb.org/>) dengan format (*.pdb*), sekuen asam amino model dengan format (*.ali*), *script* untuk menyejajarkan model dan *template* (*align2d.py*), *script* untuk membuat model dengan satu *template* (*model_single.py*), *script* untuk mengevaluasi model (*evaluate_model.py*), *script* untuk mengoptimasi *loop* jika terdapat residu di daerah terlarang pada Plot Ramachandran (*loop.py*), *script* untuk mengevaluasi model hasil optimasi *loop* (*evaluate_loop.py*), *script* untuk mengevaluasi *template* (*evaluate_template.py*). Pada *template* yang akan digunakan, dilakukan modifikasi struktur dengan memotong bagian spesifik menggunakan perangkat lunak *Biovia Discovery Studio*.

B. Pemodelan menggunakan *Modeller 9.20*

Modeler 9.20 dijalankan dengan menggunakan *command prompt* (*cmd*) melalui perintah “*Run as administrator*”. Masuk ke dalam *folder* yang berisi *input file* yang telah disiapkan kemudian jalankan

perintah *script* menyejajarkan model dengan *template* (*align2d.py*) dan *script* untuk membuat model dengan satu *template* (*model_single.py*).

C. Evaluasi Hasil Modelling

Pada *script* evaluasi model (*evaluate_model.py*) kemudian dipilih model dengan nilai DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*) terendah. Model kemudian dievaluasi berdasarkan nilai Plot Ramachandran menggunakan server Procheck yang diakses melalui (<https://www.ebi.ac.uk/thorntonsrv/databases/pdbsum/Generate.html>).

Jika terdapat residu yang berada pada daerah terlarang (*disallowed regions*), dilakukan optimasi dengan perintah *script* untuk mengoptimasi *loop* (*loop.py*) hingga tidak terdapat residu pada daerah terlarang. Perintah *script* dijalankan untuk evaluasi model hasil optimasi *loop* (*evaluate_loop.py*), dan *script* untuk mengevaluasi *template* (*evaluate_template.py*).

Selain itu digunakan juga server ProSA yang diakses melalui (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) untuk mengevaluasi hasil pemodelan. ProSA mengevaluasi hasil pemodelan dengan menampilkan nilai dan plot energi yang berada dalam struktur protein.

D. Analisis Hasil

Profil DOPE antara model dan *template* dibandingkan dengan membuka *file* (*.profile*), kemudian data-data tersebut dimasukkan ke dalam *Microsoft Excel* dan dibuat grafik. Hasil perbandingan bentuk model dan *template* dilihat menggunakan perangkat lunak *Biovia Discovery Studio* 2017.

3.3.4. Pemodelan Antibodi 8A6F2 dan 6D4B10

Pemodelan antibodi dilakukan dengan mengakses server <http://rosettaserver.graylab.jhu.edu/> dengan protokol antibodi. Kemudian isikan dengan memasukkan alamat *email*, *job description*, dan urutan asam amino yang diperoleh dari penelitian Gelanew dan Hunsperger (2018).

3.3.5. Prediksi Epitop

Prediksi epitop antigen dilakukan dengan mengakses server IEDB (<http://tools.iedb.org/main/>) untuk mendapat prediksi epitop B-sel. Hasil analisis akan memberikan nilai energi pengikatan dari masing-masing asam amino.

3.3.6. *Docking* Antigen-Antibodi

Docking protein-protein antigen NS1 DENV-4, antibodi 6D4B10 dan 8A6F2 dilakukan dengan menggunakan server PatchDock dan dilanjutkan dengan Firedock untuk mengetahui daerah pengikatan antara antigen-antibodi. Daerah dengan jumlah pengikatan paling banyak ditandai sebagai sisi penempelan dari 8A6F2 dan 6D4B10 terhadap antigen NS1-Indonesia. Setiap posisi pengikatan kemudian dievaluasi sehingga diperoleh energi pengikatan terbesar.

3.3.7. Analisis *Docking*

A. Pemilihan Konformasi Hasil *Docking* Protein-Protein

Pemilihan konformasi hasil *docking* protein-protein dilakukan dengan menentukan konformasi protein-protein yang memiliki energi global terendah.

B. Analisis Ikatan

Analisis pada kompleks protein-protein dapat divisualisasi dengan *software Biovia Discovery Studio*

C. Energi Ikatan Bebas (skoring)

Semakin rendah nilai skoring (semakin negatif), semakin baik afinitasnya antara protein dan protein. Hal tersebut biasanya terjadi apabila protein memiliki jumlah torsi yang rendah dan interaksi sterik yang baik.