

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di tempat tinggal peneliti yaitu di Kota Sukabumi, Jawa Barat. Penelitian yang terkait dengan analisis menggunakan *webservice* dilakukan dalam jaringan (daring) maupun luar jaringan (luring) dengan memanfaatkan berbagai macam fitur pada perangkat lunak. Waktu penelitian dimulai pada Bulan Februari hingga Juni 2021.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah perangkat keras berupa *notebook* Dell Latitude dengan processor Intel (R) Core (TM) i5-22-520M, CPU 2,50 GHz, RAM sebesar 4 GB dan spesifikasi program yaitu Windows 10 Pro versi 20H2. *Webservice* yang digunakan meliputi BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>), PeptideRanker (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>), ToxinPred (<http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/>), AllerTOP v. 2.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>), dan SAS (*Sequence Annotated by Structure*; <https://www.ebi.ac.uk/-thornton-srv/databases/sas/>). Selain itu penelitian ini juga menggunakan beberapa perangkat lunak seperti Open Babel GUI 2.4.1, AutoDock Tools 1.5.6, AutoDock Vina 1.1.2, PyMOL 2.2.3 dan BIOVIA *Discovery Studio Visualizer* 2021.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi struktur enzim, rantai penyusun kolagen pada kulit ikan nila, peptida aktif dan kontrol positif inhibitor. Struktur enzim target DM tipe-2 yaitu α -amilase, α -glukosidase, dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV), dan glukosa-6-fosfat dehidrogenase (G6PD) yang diperoleh dari Protein Data Bank (PDB RCSB, <https://www.rcsb.org/>) dengan kode masing-masing yaitu 1XH0, 3L4V, 3KWF dan 2BHL. Kontrol positif inhibitor yang digunakan adalah akarbosa sebagai inhibitor α -amilase dan α -glukosidase, linagliptin sebagai inhibitor DPP-IV, dan polidatin sebagai inhibitor

G6PD yang strukturnya tersedia di PubChem dengan kode berturut-turut ID 41774, ID 10096344, dan ID 5281718. Berdasarkan hasil riset Song *et al.* (2019) bahwa kolagen pada kulit ikan nila berupa kolagen tipe-1 yang tersusun oleh rantai α -1 dan α -2. Struktur rantai tersebut diperoleh dari NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dengan kode BAL40987.1 untuk rantai α -1 dan BAL40988.1 untuk rantai α -2. Struktur peptida aktif dari hidrolisis rantai α -1 dan α -2 yang akan dijadikan ligan uji berasal dari PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dengan kode ID 96814 untuk AF (Ala-Phe), ID 6992930 untuk MG (Met-Gly), ID 6426709 untuk PG (Pro-Gly), ID 7408173 untuk PM (Pro-Met), ID 152199 untuk PPG (Pro-Pro-Gly), ID 7019989 untuk RM (Arg-Met), ID 7009598 untuk SF (Ser-Phe), ID 7010580 untuk TF (Thr-Phe), ID 6993120 untuk VF (Val-Phe), ID 168182 untuk VW (Val-Trp), ID 6426942 untuk WF (Trp-Phe), ID 97054 untuk WG (Trp-Gly), dan ID 88184 untuk WY (Trp-Tyr). Struktur bahan yang digunakan pada penelitian ini dirangkum pada **Tabel 3.1**.

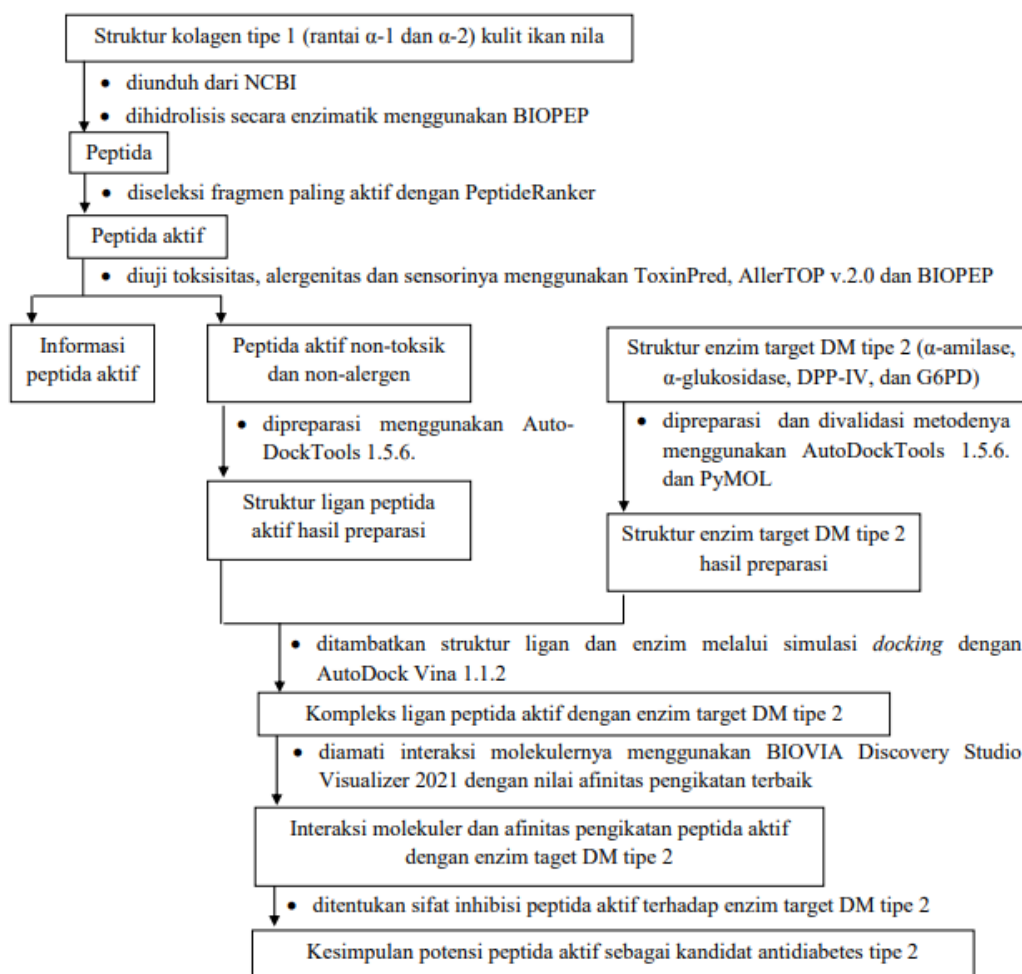
Tabel 3.1
Database dan kode struktur bahan yang digunakan

Enzim (Sumber: PDB RCSB)					
Nama	Kode	Nama Enzim		Kode	
α -Amilase	1XH0	Dipeptidil Peptidase-IV (DPP-IV)		3KWF	
α -Glukosidase	3L4V	Glukosa-6-Fosfat Dehidrogenase (G6PD)		2BHL	
Kolagen Tipe I (Sumber: NCBI)					
Nama	Kode	Nama	Kode		
Rantai α -1	BAL40987.1	Rantai α -2	BAL40988.1		
Kontrol Positif Inhibitor (Sumber: PubChem)					
Nama	Kode	Nama	Kode		
Akarbosa	ID 41774	Polidatin	ID 5281718		
Linagliptin	ID 10096344				
Peptida (Sumber: PubChem)					
Nama	Kode	Nama	Kode	Nama	Kode
AF	ID 96814	RM	ID 7019989	WF	ID 6426942
MG	ID 6992930	SF	ID 7009598	WG	ID 97054
PG	ID 6426709	TF	ID 7010580	WY	ID 88184
PM	ID 7408173	VF	ID 6993120		
PPG	ID 152199	VW	ID 168182		

3.3 Alur Penelitian

Penelitian yang dilakukan terdiri atas beberapa tahap yaitu (1) hidrolisis kolagen kulit ikan nila secara enzimatik menggunakan BIOPEP, (2) seleksi peptida aktif menggunakan PeptideRanker, (3) analisis toksisitas peptida aktif

menggunakan ToxinPred, (4) analisis alergenitas peptida aktif menggunakan AllerTOP v.2.0, (5) analisis sensori peptida aktif menggunakan BIOPEP, (6) preparasi ligan peptida aktif, (7) preparasi enzim target DM tipe-2, (8) validasi metode *docking*, (9) simulasi *docking*, (10) analisis interaksi molekuler dan afinitas pengikatan peptida aktif dengan enzim target DM tipe-2, dan (11) analisis sifat inhibisi peptida aktif dengan enzim target DM tipe-2. Bagan alir prosedur penelitian secara umum dapat dilihat pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1 Alur Penelitian

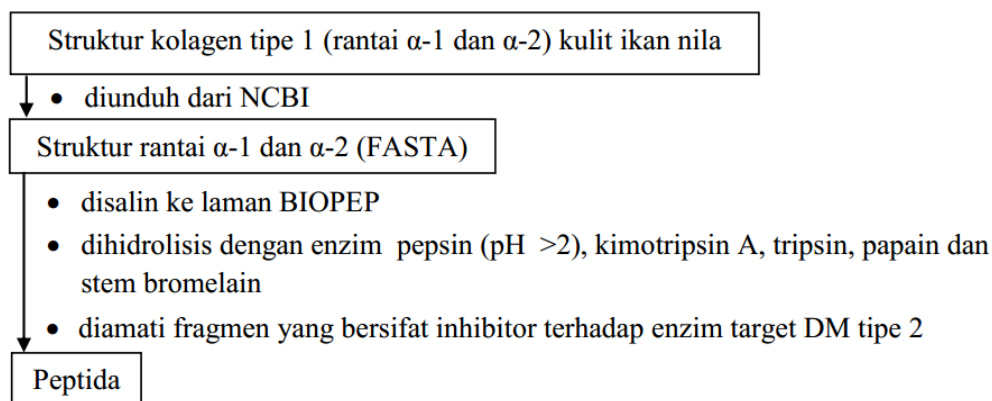
3.3.1 Hidrolisis Kolagen Kulit Ikan Nilu Secara Enzimatis Menggunakan BIOPEP

Kolagen pada kulit ikan nilu merupakan kolagen tipe-1 yang disusun oleh rantai α -1 dan α -2. Struktur rantai tersebut diperoleh dari NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dalam format FASTA yang selanjutnya disalin ke laman BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) pada tab

Jerlita Dea Berliana, 2021

KAJIAN POTENSI PEPTIDA AKTIF DARI KOLAGEN KULIT IKAN NILU (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) SEBAGAI KANDIDAT ANTIDIABETES TIPE-2 BERDASARKAN STUDI MOLECULAR DOCKING
UNIVERSITAS PENDIDIKAN INDONESIA | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

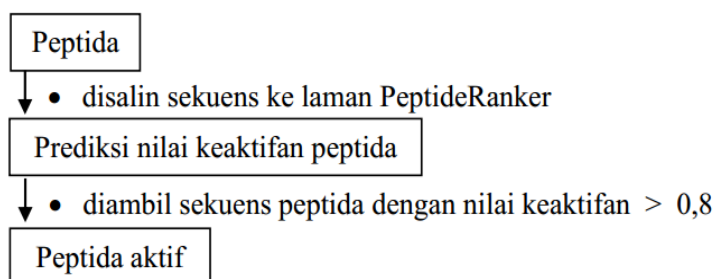
Enzyme(s) Action. Rantai tersebut dipotong menggunakan enzim pepsin ($\text{pH} > 2$), kimotripsin A, tripsin, papain dan stem bromelain kemudian dihasilkan beberapa peptida aktif yang bersifat inhibitor terhadap enzim α -glukosidase dan DPP-IV. Prosedur hidrolisis kolagen secara ringkas dapat dilihat pada **Gambar 3.2**.



Gambar 3.2 Bagan alir hidrolisis kolagen menggunakan BIOPEP

3.3.2 Seleksi Peptida Aktif Menggunakan PeptideRanker

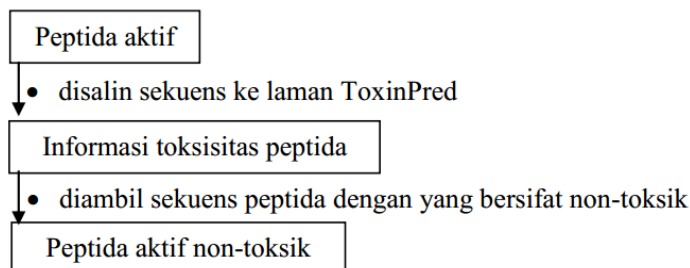
Hidrolisis kolagen pada tahap sebelumnya menghasilkan banyak fragmen yang diperkirakan berpotensi sebagai inhibitor terhadap enzim target DM tipe-2. Dari sekian banyak fragmen tersebut, tidak semua peptida yang dihasilkan bersifat aktif. Oleh karena itu untuk mengetahui prediksi keaktifannya, fragmen tersebut diinput ke laman PeptideRanker (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>) yang ditandai dengan nilai pada kisaran 0 hingga 1. Peptida yang memiliki nilai mendekati 1 menandakan bahwa peptida tersebut bersifat aktif. Peptida yang diambil merupakan peptida yang memiliki nilai diatas 0,8 agar mengurangi jumlah positif palsu (Ashraf *et al.*, 2021). **Gambar 3.3** menunjukkan tahapan singkat untuk seleksi peptida aktif.



Gambar 3.3 Bagan alir seleksi peptida aktif

3.3.3 Analisis Toksisitas Peptida Aktif Menggunakan ToxinPred

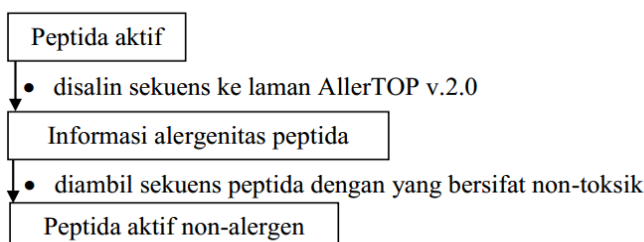
Informasi toksisitas peptida didapat melalui ToxinPred (<http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/>). Hal ini dilakukan dengan cara menyalin sekuens peptida aktif ke laman web tersebut sehingga dihasilkan prediksi peptida bersifat toksik atau tidak, seperti yang ditampilkan pada **Gambar 3.4**.



Gambar 3.4 Bagan alir seleksi analisis toksisitas peptida aktif

3.3.4 Analisis Alergenitas Peptida Aktif Menggunakan AllerTOP v.2.0

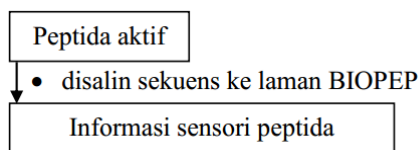
Karakteristik mengenai alergenitas peptida dapat diperoleh dari AllerTop v. 2.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>) dengan cara memasukkan sekuens laman tersebut. Informasi yang ditampilkan dari AllerTOP v.2.0 berupa prediksi peptida bersifat alergen atau non-alergen. Prosedur ini dapat dilihat pada **Gambar 3.5**.



Gambar 3.5 Bagan alir analisis alergenitas peptida aktif

3.3.5 Analisis Sensori Peptida Aktif Menggunakan BIOPEP

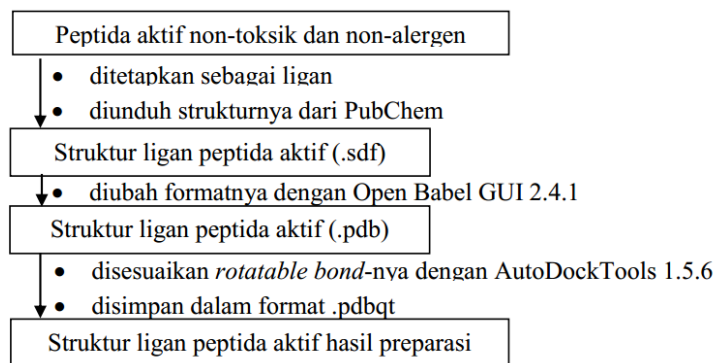
Prediksi sensori peptida dapat diketahui melalui BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>). Tahapan yang dilakukan yaitu membuka laman BIOPEP selanjutnya pilih tab sensory peptides and amino acids>analysis >profiles of sensory activity hingga tersedia pilihan untuk menginput sekuens peptida aktif. Hasil yang ditunjukkan berupa prediksi rasa dari peptida aktif. Prosedur ini ditunjukkan oleh **Gambar 3.6**.



Gambar 3.6 Bagan alir analisis sensori peptida aktif

3.3.6 Preparasi Ligan Peptida Aktif

Peptida aktif yang bersifat tidak beracun dan non-alergen kemudian dipreparasi untuk simulasi *docking*. Ligan yang digunakan yaitu peptida aktif dan kontrol positif inhibitor. Struktur keduanya diunduh dari PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dalam bentuk 3D dengan format *.sdf*. Selanjutnya struktur tersebut dikonversi ke dalam format *.pdb* menggunakan Open Babel GUI 2.4.1. Struktur ligan yang telah tersedia dalam *.pdb* selanjutnya disesuaikan rotasinya menggunakan AutoDock Tools 1.5.6. Langkah ini dijabarkan pada **Gambar 3.7**.

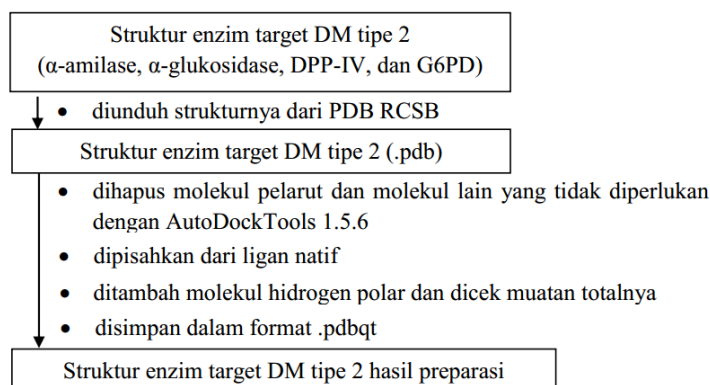


Gambar 3.7 Bagan alir preparasi ligan peptida aktif

3.3.7 Preparasi Enzim Target DM Tipe-2

Pada penelitian ini enzim α -amilase, α -glukosidase, DPP-IV, dan G6PD ditetapkan sebagai enzim target DM tipe-2. Struktur keempat enzim tersebut diperoleh dari Protein Data Bank (PDB) pada laman (<https://www.rcsb.org/>) dalam format *.pdb*. Struktur yang telah diunduh selanjutnya dipreparasi menggunakan AutoDock Tools 1.5.6 dengan cara menghapus molekul pelarut dan molekul lain yang tidak diperlukan pada simulasi, sehingga yang tersisa hanya rantai enzim yang murni untuk penambatan dengan ligan. Rantai protein tersebut kemudian ditambahkan molekul hidrogen polar dan ditentukan muatannya. Protein yang telah selesai dipreparasi kemudian disimpan dalam format *.pdbqt*.

Gambar 3.8 memberikan langkah sistematis untuk preparasi enzim.



Gambar 3.8 Bagan alir preparasi enzim target DM tipe-2

3.3.8 Validasi Metode Docking

Validasi metode *docking* dilakukan dengan cara melakukan *docking* ulang (*redocking*) ligan natif dengan sisi aktif enzim sebagai tempat pengikatan. Hal ini bertujuan untuk memverifikasi kebenaran dari simulasi yang digunakan, dimana RMSD yang dihasilkan harus kurang dari 2 (Hernández-Santoyo *et al.*, 2013).

Protein dan ligan yang telah dipisahkan dengan AutoDock Tools 1.5.6 selanjutnya di-*redocking* dengan cara mengatur ukuran *grid box*. Ukuran *grid box* disesuaikan dengan ukuran ligan natif pada tab *grid>grid box>center on ligand* kemudian diatur ukuran x, y, dan z nya pada jarak 1 Å. Jika sudah didapatkan ukuran yang tepat, selanjutnya simpan file dalam *grid.txt* pada tab *file>output grid dimension file*.

Validasi metode dilakukan dengan membuka ligan hasil *docking* menggunakan PyMOL lalu dicari nilai RMSD-nya. Apabila kurang dari 2, maka metode dinyatakan valid dan siap digunakan untuk ligan uji lainnya. Informasi *grid box* yang digunakan tertera pada **Tabel 3.2**.

Tabel 3.2
Koordinat *grid box* yang digunakan untuk simulasi *docking*

No.	Reseptor	Koordinat (Å)			Ukuran (Å)			RMSD (Å)
		X	Y	Z	X	Y	Z	
1.	α-Amilase	7,033	15,159	39,944	22	10	14	1,776
2.	α-Glukosidase	44,118	89,842	33,527	8	12	8	1,672
3.	Dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV)	46,499	51,555	34,033	10	6	16	0,455
4.	Glukosa-6-Fosfat Dehidrogenase (G6PD)	1,233	124,127	11,208	12	10	12	1,538

3.3.9 Simulasi *Docking*

Simulasi *docking* dilakukan dengan Autodock Vina 1.1.2. Program ini dijalankan melalui *command prompt* (Trott & Olson, 2009). Data yang diperlukan untuk simulasi meliputi file protein dan ligan dalam format .pdbqt dan ukuran *grid* ligan natif yang tersimpan dalam file conf.txt. Hasil dari simulasi ini yaitu sepuluh pose ligan dengan afinitas ikatan (*kcal/mol*) yang berbeda-beda. Kesepuluh struktur tersebut selanjutnya disimpan dalam format .pdbqt.

3.3.10 Analisis Interaksi Molekuler dan Afinitas Pengikatan Peptida Aktif dengan Enzim Target DM Tipe-2

Perangkat lunak Biovia *Discovery Studio Visualizer* 2021 digunakan untuk memvisualisasi hasil *docking*. Interaksi molekuler yang terbentuk antara kompleks ligan dengan enzim target diamati melalui Biovia *Discovery Studio Visualizer* 2021 dalam bentuk 2D dan 3D. Pose yang dipilih merupakan kompleks ligan-enzim target yang memiliki nilai afinitas terbaik.

3.3.11 Analisis Sifat Inhibisi Peptida Aktif dengan Enzim Target DM Tipe-2

Biovia *Discovery Studio Visualizer* 2021 juga dapat memberikan gambaran mengenai sisi pengikatan yang terbentuk antara ligan dengan enzim target. Penentuan sifat inhibisi peptida aktif diamati dengan melihat kesamaan pengikatan antara peptida aktif dengan pembandingnya terhadap enzim target. Selain itu, residu yang berikatan antara peptida aktif dengan enzim target DM tipe-2 juga dibandingkan dengan residu kontak ligan natif yang tersedia pada laman SAS (*Sequence Annotated by Structure*; <https://www.ebi.ac.uk/-thornton-srv/databases/sas/>).