

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah kandungan senyawa-senyawa kimia dalam kemenyan india dan rimpang kunyit serta protein-protein target yang terlibat pada patofisiologi osteoarthritis.

Sampel pada penelitian ini meliputi kandungan senyawa kimia yang terkandung dalam kemenyan india dan rimpang kunyit yang diidentifikasi dengan KNApSACK, *Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Database*, *PubChem*, dan literatur jurnal.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel

Variabel utama pada penelitian ini adalah protein target yang terlibat dalam patofisiologi osteoarthritis. Variabel kedua adalah kandungan senyawa-senyawa kimia yang terdapat dalam kemenyan india dan rimpang kunyit. Variable ketiga adalah profil *network pharmacology* kandungan senyawa kimia kemenyan india dan rimpang kunyit terhadap protein osteoarthritis. Variable keempat yakni interaksi antar protein target dalam pembentukan jejaring yang saling berkaitan satu sama lain.

2. Klasifikasi variabel

Penelitian ini menggunakan tiga variable yakni variable bebas, variable tergantung dan variable terikat.

2.1 Variabel bebas. Variable bebas yang digunakan adalah senyawa kimia kemenyan india dan rimpang kunyit yang diperoleh dari KNApSack, *Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Database*, dan jurnal literatur.

2.2 Variabel tergantung. Variable tergantung pada penelitian ini adalah protein target yang digunakan untuk mengetahui target kerja kandungan senyawa kimia kemenyan india dan rimpang kunyit terhadap protein target osteoarthritis.

2.3 Variabel terikat. Variable terikat yakni pengaturan pada *web server* dan perangkat lunak.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, protein target adalah protein yang terlibat dalam target kerja patofisiologi osteoarthritis dari senyawa kimia kemenyan india dan rimpang kunyit yang didapatkan dari jurnal penelitian.

Kedua, senyawa kimia adalah senyawa aktif yang terdapat pada kemenyan india dan rimpang kunyit yang dapat digunakan sebagai senyawa uji yang didapatkan dari KNApSack, *Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Database*, dan jurnal literatur.

Ketiga, aktivitas kandungan senyawa kimia merupakan aktivitas dari seluruh komponen yang terdapat dalam kemenyan india dan rimpang kunyit yang memiliki potensi berikatan dengan target kerja terhadap protein target yang datanya dapat dikenali dengan penelusuran jurnal literatur, *web server* dan perangkat lunak.

Keempat, profil *network pharmacology* merupakan hasil dari visualisasi yang memiliki keterikatan antar senyawa dengan protein target osteoarthritis sehingga dapat menggambarkan aktivitas dari penyakit osteoarthritis.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah seluruh data kandungan senyawa kimia dari kemenyan india dan rimpang kunyit dalam format CSV dan TSV.

2. Alat

2.1 Perangkat keras. Alat yang digunakan pada penelitian ini yakni menggunakan perangkat keras berupa laptop Lenovo ideapad dengan spesifikasi Intel(R) Celeron(R) N4020 CPU @ 1.10GHz 1.10 GHz Installed RAM 8,00 GB.

2.2 Web server dan perangkat lunak. KNApSack (http://www.knapssackfamily.com/KNApSack_Family/), KEGG Pathway (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), Swiss Target Prediction (<http://www.swisstergetprediction.ch>), Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), String (<https://string-db.org/>), Stitch (<http://stitch.embl.de/>), Google scholar (<https://scholar.google.com/>), NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dan Cytoscape (<http://www.cytoscape.org>).

D. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi interaksi protein target

Identifikasi diawali dengan memasukkan protein target yang telah didapat dalam *Pathway disease* dan *GeneCard* pada *web server Venny 2.1.0* (<https://bioinfo.gp.cnb.es/tools/venny/>). Protein dari *pathway disease* dimasukkan pada kolom *list 1* dan protein dari *GeneCard* dimasukkan pada kolom *list 2*, selanjutnya di klik pada diagram ven yang menunjukkan tumpang tindih antar protein. Kemudian protein hasil tumpang-tindih tersebut dimasukkan Kembali ke *excel*. Selanjutnya dilakukan identifikasi untuk mengetahui interaksi protein target dilakukan menggunakan *web server STRING* dengan membukan laman String melalui <https://string-db.org/>. Nama dari protein yang menjadi target dimasukkan dalam kolom pencarian “*Protein Name*” setelah itu dipilih menu “*Search*”. Halaman akan menampilkan protein yang berinteraksi langsung dengan protein target. Data yang diperoleh tersebut kemudian diunduh dengan menekan “*Exports*” dalam bentuk TSV kemudian ditabulasikan dalam *Microsoft Excell* yang selanjutnya akan dipilih data protein yang memiliki interaksi satu sama lain. Bukti ekspresi protein dikumpulkan melalui STRING dari berbagai sumber yang selanjutnya dinormalisasikan, dipangkas, dan dibandingkan profil ekspresinya dari berbagai macam kondisi. Pasangan protein yang menunjukkan kemiripan secara konsisten diberi skor asosiasi, Dimana sebagian besar data ekspresi berbasis RNA, namun dapat mengimpor data ekspresi proteome dari basis proteome HD (Szklarczyk *et al.*, 2021).

2. Validasi nama protein target

Hasil dari protein target yang diperoleh dalam jurnal penelitian dilanjutkan untuk memvalidasi nama protein target dengan menggunakan *web server Uniprot* (<https://www.uniprot.org/>). Setelah halaman terbuka, dilanjutkan dengan mengisi satu persatu nama dari protein target tujuan secara global pada kolom pencarian “*UniProtKB*”, kemudian menekan “*search*”. Pada laman tersebut akan muncul laman pilihan, lalu dipilih bagian “*human*”. Setelah itu, akan muncul halaman baru yang memperlihatkan informasi mengenai kode enter, nama protein target, dan organismenya.

3. Skrining zat aktif terhadap protein target

Skrining zat aktif senyawa kemenyan india dan rimpang kunyit dilakukan dengan menggunakan *web server “PubChem”*

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, kemudian memasukkan kandungan senyawa kimia kemenyan india dan rimpang kunyit yang diperoleh dari KNApSACk, *Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Database*, dan jurnal penelitian ke kolom pencarian. Pada laman tersebut akan muncul pilihan yang berhubungan dengan senyawa yang dicari, pada kolom *contents* juga terdapat beberapa pilihan, kemudian dipilih menu “*Biological Test Result*”. Aktivitas dari senyawa target akan muncul kemudian dapat diunduh dalam bentuk CSV. Dalam memudahkan penelusuran data CSV maka ditabulasikan dalam bentuk *Microsoft Excel*, selanjutnya dilakukan seleksi data protein target yang aktif dan data dengan aktivitas terhadap protein target hasil identifikasi.

4. Prediksi protein dari senyawa kemenyan india dan rimpang kunyit

Identifikasi protein target dari senyawa kemenyan india dan rimpang kunyit dilakukan menggunakan *web server Swiss Target Prediction*, *SEA* dan *super-PRED*.

4.1 *Swiss Target Prediction*. Dilakukan dengan membuka *Swiss Target Prediction* pada *web server* (<http://www.swisstargetprediction.ch/>). Selanjutnya mengisi *canonical SMILES* senyawa tanaman yang telah diperoleh dari *PubChem* pada kolom pencarian “*paste a SMILES in this box, or draw a molecule*”. Setelah itu, dipilih menu “*Predict Targets*” kemudian akan muncul halaman yang menampilkan data informasi target dengan gambar struktur. Data tersebut dapat diunduh dalam format file, yang kemudian ditabulasikan dalam *Microsoft excel* lalu dilakukan eliminasi. Pada protein yang memiliki skor gabungan lebih dari 0,5 memprediksi bahwa molekul yang cenderung berbagi target protein hasil sortir yang sama (Daina *et al.*, 2019)

4.2 *Similarity Ensemble Approach (SEA)*. Dilakukan dengan membuka *web server SEA* (<https://sea.bkslab.org/>). Selanjutnya, setelah laman terbuka, pada kolom “*paste SMILES or try the example below*” dimasukkan *canonical SMILES* dari senyawa aktif yang diperoleh dari *PubChem*. Dilanjutkan dengan memilih menu “*try SEA*”, setelah itu data yang diperoleh diunduh dengan format zip kemudian diekstrak menjadi file *excel* agar dapat ditabulasikan dalam *Microsoft excel* guna dilakukannya eliminasi pada protein hasil sortir dengan *Max TC* <0,7.

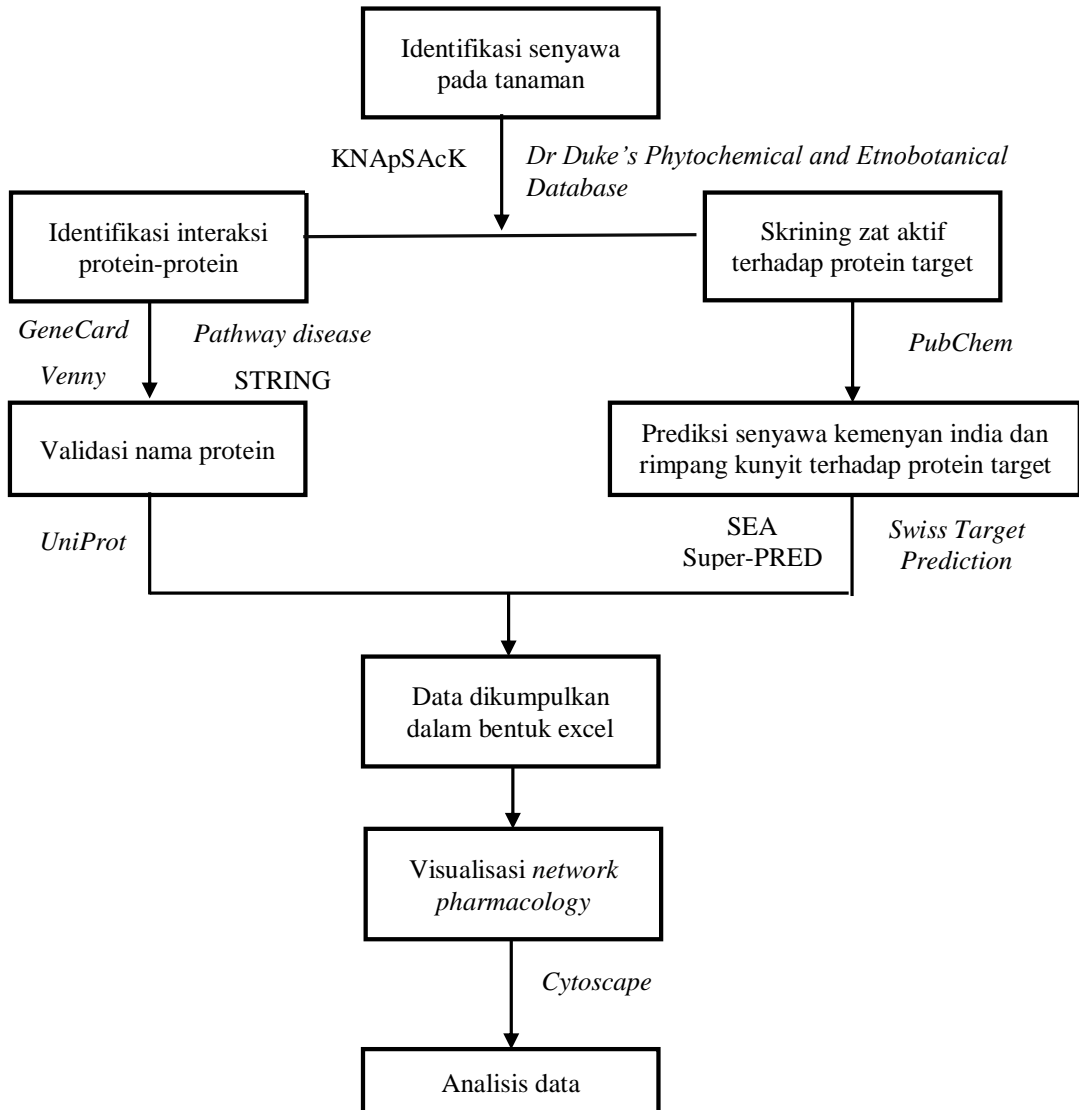
4.3 *Super-PRED*. Dilakukan dengan mengakses *Super-PRED* pada *web server* (<https://prediction.charite.de/>) kemudian menekan

bagian “*target prediction*”. Setelah itu *Pubchem-Name* dan *canonical SMILE* dari senyawa kemenyan india dan rimpang kunyit yang diperoleh dari *PubChem* dimasukkan ke kolom “*search*” dan “*start calculation*” selanjutnya akan muncul halaman baru. Hasil dari prediksi dari protein target akan muncul dalam tabel kemudian diunduh dalam bentuk file *excel*. File hasil prediksi dilakukan eliminasi pada protein yang memiliki skor *probability* serta model akurasi kurang dari 85%. Skor tersebut menghasilkan prediksi ATC yang lebih akurat.

5. Visualisasi *network pharmacology*

Dari data yang diperoleh, hasil interaksi protein-protein serta hasil interaksi protein-senyawa yang telah diunduh ke dalam bentuk TSV dari string yang ditabulasikan, dilakukan visualisasi *network pharmacology* menggunakan *web server Cytoscape* <http://www.cytoscape.org>. Dari tabulasi CSV yang diperoleh dari kandungan senyawa pada *PubChem* dengan hasil protein target yang telah ditabulasikan dalam bentuk TSV, data bioaktivitas dikumpulkan kemudian dilakukan pencocokan. Dari hasil tersebut, dilakukan analisis untuk melihat interaksi antara senyawa-senyawa dengan protein target dalam membentuk *network pharmacology*. *Cytoscape* memiliki *strukturViz* dan *CyToStruct* untuk melihat adanya interaksi protein pada ruang 3D dengan integrasi melalui sistem visualisasi molekuler (Lima *et al.*, 2021).

E. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 17. Skema jalannya penelitian