

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi adalah keseluruhan data yang menjadi sasaran dalam penelitian. Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah senyawa kimia yang terkandung pada daun inggu dan daun jambu mete dari data bank serta protein target dari patofisiologi kanker payudara.

Sampel adalah bagian dari populasi yang menjadi sasaran dalam penelitian. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah senyawa kimia yang terkandung pada daun inggu dan daun jambu mete yang sudah diidentifikasi melalui KNAPSAcK, PubChem, KEGG Pathway, dan literatur jurnal lain sebagai bahan pendukung.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Identifikasi variabel utama adalah langkah penetapan variabel-variabel utama dalam penelitian dan penentuan fungsinya masing-masing.

Variabel utama dalam penelitian ini adalah senyawa yang terkandung pada daun inggu dan daun jambu mete.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah protein target yang diperoleh dari *KEGG Pathway* kanker payudara.

Variabel utama ketiga yaitu profil *network pharmacology* senyawa kimia yang terdapat dalam daun inggu dan daun jambu mete terhadap protein target kanker payudara.

Variabel utama keempat yaitu perangkat lunak dan *web server* yang digunakan untuk memprediksi hubungan protein-protein dan senyawa kimia-protein, serta memberikan hasil analisis visualisasi profil *network pharmacology*.

##### **2. Klasifikasi variabel**

Pada penelitian ini memiliki tiga variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas adalah variabel yang diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kandungan senyawa kimia pada daun inggu dan

daun jambu mete yang diperoleh dari beberapa literatur jurnal dan KNApSACk.

Variabel tergantung adalah variabel yang dipengaruhi nilai akibat pengaruh variabel bebas. Variabel tergantung yang digunakan dalam penelitian ini yaitu protein target yang digunakan untuk mengetahui target kerja pada senyawa daun inggu dan daun jambu mete.

Variabel terkontrol adalah variabel yang dikendalikan agar tidak mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu ditentukan kualitasnya agar hasil yang diperoleh dapat diulang dalam penelitian lain secara tepat. Variabel terkontrol yang digunakan dalam penelitian ini berupa perangkat lunak dan beberapa *web server*.

### 3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, senyawa kimia adalah senyawa yang aktif terkandung dalam daun inggu dan daun jambu mete yang diperoleh dari KNApSACk dan jurnal/artikel ilmiah yang dapat digunakan sebagai senyawa uji.

Kedua, protein target adalah data biomolekul yang diperoleh dari KEGG *pathway*, GeneCards, dan jurnal/artikel ilmiah yang berhubungan erat dengan patofisiologi kanker payudara yaitu *P53 signaling pathway*, *MAPK signaling pathway*, *PI3K-Akt signaling pathway*, dan *estrogen signaling pathway*.

Ketiga, profil *network pharmacology* adalah profil visualisasi hubungan interaksi antara protein target dan senyawa kimia yang saling berikatan satu dengan lainnya yang dapat menimbulkan antikanker pada kanker payudara.

Keempat, perangkat lunak adalah suatu program komputer yang berfungsi sebagai sarana interaksi (penghubung) antara pengguna (*user*) dan perangkat keras (*hardware*). Perangkat lunak yang digunakan yaitu *cytoscape* (versi 3.10.2)

Kelima, *web server* adalah sebuah program komputer untuk melayani permintaan penggunaan melalui protokol HTTP atau HTTPS dalam bentuk halaman web dan berfungsi sebagai pusat penyimpanan data dan aplikasi yang berhubungan dengan *website* atau situs web. *Web server* yang digunakan yaitu *KNApSACk*, *KEGG Pathway*, *GeneCards*, *PubChem*, *UniProt*, *String*, *Stitch*, *SwissTargetPrediction*, *Similarity Ensemble Approach (SEA)*, dan *SuperPred*.

## C. Bahan dan Alat

### 1. Bahan

Data senyawa kimia yang terkandung pada daun inggu dan daun jambu mete, protein dan gen target pada *pathway disease* kanker payudara.

### 2. Alat

Perangkat keras terdiri atas laptop lenovo AMD A9-9420 Radeon R5, 5 COMPUTE CORES 2C, 3.00 GHz, Windows 10 Pro versi 22H2. Perangkat lunak berupa *web server KNApCAcK Family* ([http://www.KNApSAcKfamily.com/KNApSAcK\\_Family/](http://www.KNApSAcKfamily.com/KNApSAcK_Family/)), *KEGG Pathway* (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), *PubChem* (<https://PubChem.ncbi.nlm.nih.gov/>), *UniProt* (<https://www.uniprot.org/>), *Genecard* (<https://www.genecards.org/>), *String version 12.0* (<https://string-db.org/>), *SwissTargetPrediction* (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), *SEA* (<https://sea.bkslab.org/>), *Software cytoscape v.3.10.2*

## D. Jalannya Penelitian

### 1. Identifikasi protein dan gen target

Identifikasi protein yang berperan pada kanker payudara dapat diakses dengan *web server KEGG Pathway* (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) maupun literatur seperti jurnal. Pada saat laman terbuka terdapat kotak pencarian “*Enter keywords*”, mengisinya kotak dengan “*breast cancer*” dan memilihnya kotak “*go*” yang akan menghasilkan tampilan beberapa bentuk *pathway*. Laman hasil yang termuat tersebut dipilih “*Breast cancer*” dengan kode “map05224”, maka laman akan menghasilkan *breast cancer pathway*. Hasil *pathway* tersebut akan diketahui protein target yang berperan pada kanker payudara melalui beberapa jalur pensinyalan, seperti *Estrogen signaling pathway*, *MAPK signaling pathway*, *PI3K-Akt signaling pathway*, *P53 signaling pathway*, *Notch signaling pathway*, dan *Wnt signaling pathway*. Namun, pada saat melakukan penelitian jalur persinyalan yang digunakan hanya 4 jalur, yaitu *estrogen signaling pathway*, *MAPK signaling pathway*, *PI3K-Akt signaling pathway*, dan *P53 signaling pathway*. Hasil protein yang yang telah diperoleh selanjutnya dilakukan penyamaan antara *GeneCards* dan *KEGG pathway* dengan bantuan *web server Venny 2.1.0* (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

## 2. Identifikasi interaksi protein-protein target

Identifikasi interaksi protein-protein target dilakukan menggunakan hasil *web server STRING* dengan menggunakan kode protein yang telah diperoleh dengan membuka laman string melalui *web server* <https://string-db.org/>. Nama protein target yang telah divalidasi atau kode protein yang diperoleh dari pada kotak pencarian “*protein name*” diisi satu persatu. Pada kotak pencarian “*organism*” difilter dengan memilih “*homo sapiens*” lalu menekan tombol “*search*” dan “*continue*”, maka laman baru akan menampilkan hasil interaksi protein-protein yang terjadi. Hasil interaksi yang diperoleh disimpan dengan menekan menu “*exports*”, kemudian pilih “*download*” dalam format file TSV dan ditabulasikan ke dalam bentuk *Microsoft Excel* untuk dilakukan eliminasi pada data protein yang saling berinteraksi yang memiliki skor >0,900. Skor tersebut memiliki maksud untuk mengungkapkan fungsional yang benar dan semua bukti yang tersedia, serta menunjukkan korelasi antar protein.

## 3. Validasi nama gen

Protein target yang diperoleh dari KEGG *Pathway* dan jurnal/artikel penelitian dilakukan validasi nama gen dengan *web server UniProt* untuk mendapatkan nama-nama protein target yang telah disetujui secara global. Validasi dilakukan dengan membuka laman *web server Uniprot* (<https://www.uniprot.org/>). Nama protein target yang sudah diperoleh kemudian dimasukkan satu persatu kedalam kolom pencarian “*UniProtKB*” kemudian menekan “*search*”. Pada “*popular organisms*” dipilih bagian “*human*”, selanjutnya akan muncul laman baru yang menampilkan beberapa informasi mengenai kode *entry*, nama protein target, nama gen resmi disertai dengan organismnya.

## 4. Skrining zat aktif terhadap protein target

Skrining aktivitas biologi senyawa pada daun inggu dan daun jambu mete dilakukan dengan menggunakan *web server PubChem* (<https://PubChem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dengan cara memasukkan kandungan senyawa kimia daun inggu dan daun jambu mete yang diperoleh dari KNAPSAcK, dan jurnal-jurnal penelitian ke dalam kolom pencarian pada *PubChem* yang kemudian mengklik *search* yang disimbolkan dengan ikon lup (kaca pembesar). Pada saat laman baru terbuka pilih “*compound best match*” yang sesuai dengan senyawa yang akan dicari, kemudian akan muncul beberapa pilihan yang

berhubungan dengan senyawa yang dicari. Pada kolom “*content*” memilih “*biological test results*”. Aktivitas senyawa-senyawa akan muncul terdapat di bawah tulisan “*bioassay result*” kemudian klik “*download*” yang terletak di pojok kanan atas dan pilih format dokumen CSV. Untuk mempermudah dalam menelusuri data-data hasil aktivitas biologi yang terformat CSV maka ditabulasi ke dalam *Microsoft Excel* untuk dilakukan skrining dan eliminasi pada kolom “*activity*” yang memiliki aktivitas “*inactive*” dan “*unspecified*” dihilangkan. Pada kolom “*targetname*” dilakukan eliminasi yang bukan termasuk organisme “*human*”.

## **5. Prediksi protein target dari senyawa bioaktif**

Prediksi protein dan gen target dari senyawa bioaktif yang dilakukan untuk memperoleh protein target dan senyawa berdasarkan kemiripannya menggunakan web *Stitch*, *SwissTargetPrediction*, *SEA*, dan *SuperPred*.

**5.1. *Stitch*.** *Web server Stitch* (<http://stitch.embl.de/>) dibuka dengan cara memasukkan *link website* ke dalam kolom bar google dan setelah laman terbuka, dipilih bagian “*Chemical structure(s)*”. Pada kotak pencarian “*SMILE string(s)*” diisi dengan *canonical smile* senyawa bioaktif yang diperoleh dari *PubChem*. Pada kotak “*Organism*” dipilih “*homo sapiens*”, kemudian di klik menu “*search*”, maka akan berpindah ke laman baru. Langkah berikutnya diklik tombol “*continue*”, maka laman baru akan menampilkan hasil interaksi senyawa kimia-protein yang terjadi. Hasil interaksi yang diperoleh disimpan dengan cara menekan menu “*export*”, kemudian dipilih “*download*” dalam format file TSV dan ditabulasi ke *Microsoft Excel* untuk dilakukan eliminasi pada interaksi protein-protein yang memiliki skor <0,900.

**5.2. *SwissTargetPrediction*.** *Web server SwissTargetPrediction* (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) dibuka dengan cara memasukkan *link website*. *SMILE* dari senyawa bioaktif daun inggu dan daun jambu mete yang diperoleh dari *PubChem* dimasukkan pada kolom “*Paste a SMILES in this box, or draw a molecule*”, lalu menekan “*predict targets*”. Setelah itu akan muncul laman yang menampilkan data informasi target beserta dengan gambar struktur senyawa, kemudian mengunduh dalam format file *Microsoft Excel* (.xlsx), kemudian ditabulasikan ke dalam excel untuk melakukan eliminasi pada protein yang memiliki skor probability <0,75. Protein

target yang muncul pada *SwissTargetPrediction* memiliki keterangan berupa bar pada *probability* berwarna hijau yang menunjukkan semakin tinggi nilai *probability* maka semakin akurat prediksi protein target (Gfeller *et al.*, 2014).

**5.3. Similarity ensemble approach (SEA).** *Web server SEA* (<https://sea.bkslab.org/>) dibuka dengan cara memasukkan link website ke dalam kotak pencarian pada google kemudian enter. Setelah laman terbuka, pada kotak pencarian “*Paste SMILE or try the example below*” diisi dengan *canonical smile* senyawa bioaktif yang diperoleh dari *PubChem*, kemudian di klik “*try SEA*” Data yang diperoleh mengunduh dalam format file *zip*, kemudian diekstrak menjadi bentuk format file excel agar dapat ditabulasi ke dalam *Microsoft Excel* untuk dilakukan eliminasi pada protein yang memiliki *Max TC <0,7* karena menunjukkan kesamaan molekuler dari struktur kimia senyawa kueri yang dipresentasikan sebagai SMILE, dan telah melalui proses komputasi pada *web server* tersebut dengan protein target, sehingga adanya kesamaan molekuler tersebut dapat diprediksi bahwa senyawa kueri bekerja pada protein target hasil prediksi.

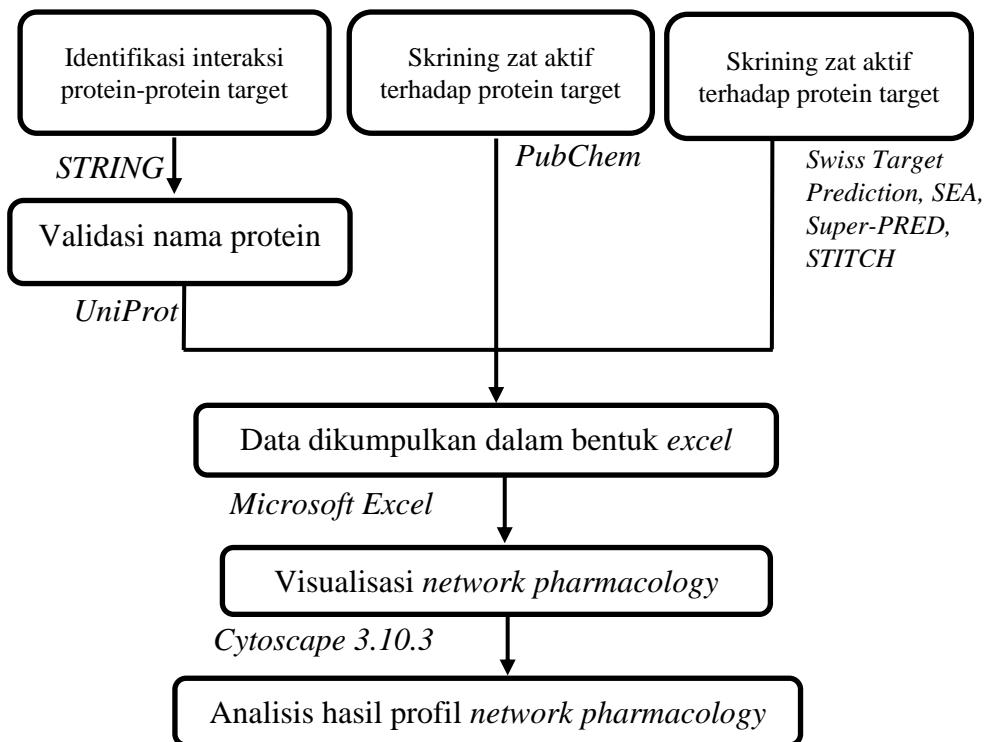
**5.4. Super-PRED.** *Web server SuperPred* (<https://prediction.charite.de/>) dibuka dengan cara memasukkan *link website* ke dalam kotak pencarian pada google. Setelah laman terbuka, dipilih “*target prediction*”, kemudian pada kotak pencarian “*PubChem-name*” diisi dengan nama senyawa bioaktif atau pada kotak pencarian “*smile*” diisi dengan *canonical smile* senyawa bioaktif yang diperoleh dari *PubChem*, kemudian di klik “*search*” sampai muncul gambar struktur dari senyawa bioaktif, kemudian di klik “*start calculation*”. Hasil prediksi target dapat dilihat pada tabel “*Additionally predicted targets*” dan mengunduh dalam bentuk format file excel untuk dilakukan eliminasi pada protein yang memiliki skor *probability* dan *model accuracy <85%*, karena skor kemiripan yang lebih tinggi dari 0,85 menghasilkan prediksi ATC yang akurat.

## 6. Visualisasi Network Pharmacology

Hasil analisis interaksi protein-protein dan interaksi senyawa-protein dilakukan visualisasi *network pharmacology* menggunakan perangkat lunak *Cytoscape versi 3.10.3*. Visualisasi ini dilakukan pada analisis interaksi senyawa-protein untuk membentuk profil *network pharmacology* dari tanaman daun inggu dan daun jambu mete berdasarkan identifikasi dan analisis yang telah dilakukan. Jika file

yang ditabulasi sudah berhasil, langkah selanjutnya membuka *software Cytoscape* kemudian menekan pilihan menu bertulisan “*file*”, lalu memilih “*import*” dan diklik menu “*network from file*” dan pastikan dokumen dalam format *text (txt.)* setelah muncul kotak dengan tulisan “*network file to load*” cari file, kemudian klik “*open*”. Setelah itu akan muncul kotak “*import network from table*”, pilih *node 1 “source node”* dan *node 2 “target node”* lalu di klik “*OK*” sehingga akan muncul profil *network pharmacology* yang dibangun. *Cytoscape* terdapat *nodes* yang menggambarkan molekul-molekul seperti protein dan senyawa, sedangkan *edges* atau garis penghubung menggambarkan interaksi antar molekul. *Network pharmacology* yang telah dibangun menggunakan perangkat lunak *cytoscape* dapat dilakukan perubahan warna pada *node* dengan di klik menu “*style*” kemudian pilih menu “*Node*”, dan dipilih “*Fill Color*”, selanjutnya pilih warna yang diinginkan pada kotak ”*Colors*” bagian “*Swatches*” dan klik “*OK*”. Profil network dapat juga dilakukan perubahan bentuk *node* pada menu “*Properties*”, pilih menu “*Node*” dan “*Shape*” kemudian pilih bentuk yang diinginkan pada kotak “*Node Shape*”, dan klik “*Apply*”. Profil *network* dapat juga dilakukan custom warna label *node* pada menu “*Properties*”, pilih menu “*Node*” dan “*Color Label*” kemudian pilih warna yang diinginkan pada kotak “*Colors*” bagian “*Swatches*” dan klik “*OK*”. Penyesuaian pada profil *network pharmacology* yang telah dibangun bertujuan sebagai penanda agar memudahkan dalam pembacaan hasil visualisasi.

### E. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 22. Skema Jalannya Penelitian