

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini meliputi kandungan senyawa kimia dari daun teh hijau serta seledri dan protein-protein target yang memiliki keterlibatan pada proses patofisiologi dislipidemia.

Sampel pada penelitian ini meliputi kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam daun teh hijau serta seledri yang diidentifikasi melalui KNApSAcK, IJAH *Analytics*, *Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Database*, PubChem, KEGG *Pathway*, serta literatur pada jurnal lain.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel

Variabel utama pada penelitian ini meliputi protein target yang terlibat pada proses patofisiologi dislipidemia. Variabel kedua meliputi kandungan senyawa kimia daun teh hijau serta seledri. Variabel ketiga meliputi profil *network pharmacology* kandungan senyawa kimia daun teh hijau serta seledri terhadap protein dislipidemia. Variabel keempat yaitu interaksi antar protein target dalam membentuk jejaringan yang saling berkaitan satu sama lain.

2. Klasifikasi Variabel

Penelitian ini memiliki tiga variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terikat.

2.1. Variabel bebas. Variabel bebas meliputi kandungan senyawa kimia daun teh hijau yang diperoleh dari KNApSAcK, IJAH *Analytics*, *Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Database*, Jurnal penelitian.

2.2. Variabel tergantung. Variabel tergantung meliputi protein target yang diprediksi menjadi target kerja dari senyawa daun teh hijau dan profil *network pharmacology* kandungan kimia buah mengkudu terhadap protein target dislipidemia.

2.3. Variabel terikat. Variabel terikat yang digunakan seperti *web server* dan perangkat lunak (*software*).

3. Definisi Operasional Variabel

Pertama, protein target merupakan suatu protein adalah terlibat dalam target kerja patofisiologi dislipidemia dari suatu senyawa kimia

daun teh hijau serta tanaman seledri yang didapatkan dari KEGG *Pathway* serta jurnal penelitian.

Kedua, senyawa kimia merupakan suatu senyawa aktif yang terkandung adalah daun teh hijau serta tanaman seledri yang didapatkan dari KNApSAcK, IJAH Analytics, *Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Database*, Jurnal penelitian.

Ketiga, aktivitas kandungan senyawa merupakan senyawa dari daun teh hijau serta seledri yang dapat berpotensi memiliki hubungan target kerja terhadap protein target dislipidemia yang didapatkan dari *web server* serta perangkat lunak dan jurnal-jurnal penelitian.

Keempat, interaksi dari protein-protein target adalah saling memiliki keterikatan satu sama lain dengan membentuk jejaringan farmakologi serta menimbulkan efek untuk pengobatan dislipidemia.

C. Bahan dan Peralatan

1. Bahan

Bahan yang akan digunakan pada penelitian ini meliputi semua data kandungan senyawa kimia daun teh hijau dan seledri serta protein target dengan dibuat tabulasi dalam format CSV dan TSV.

2. Alat

2.1. Perangkat Keras. Alat yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu menggunakan perangkat keras yang terdiri atas laptop ACER Aspire E 14 dengan spesifikasi Intel (R) Celeron N2830 (2.16 GHz, Dual Core) 4 GB DDR4 SDRAM. 14" HD. Intel UHD Graphics. 500GB SATA.

2.2. Software dan Web Server. KNApSAcK (http://www.knapsackfamily.com/KNApSAcK_Family/), IJAH Analytics (<http://ijah.apps.cs.ipb.ac.id/#/home>), *Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Database* (<https://phytochem.nal.usda.gov/>), KEGG *Pathway* (<https://www.kegg.jp>), PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), STRING (<https://string-db.org/>), UniProt (<https://www.uniprot.org/>), *Swiss Target Prediction* (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), DrugCentral (<http://drugcentral.org>), GeneCards (<https://www.genecards.org/>), dan SEA (<https://sea.bkslab.org/>).

D. Jalannya Penelitian

1. Validasi nama gen

Hasil dari protein target yang diperoleh KEGG Pathway dan jurnal-jurnal penelitian dilanjutkan untuk memvalidasi nama protein target dengan menggunakan webserver Uniprot (<https://www.uniprot.org/>). Setelah laman terbuka, pada kolom pencarian “UniProtKB” mengisi satu persatu nama dari protein target yang ingin dicari nama gen tersebut secara global, lalu tekan tombol “search”. Setelah itu, akan muncul laman pilihan, lalu pilih bagian “human”. Selanjutnya akan muncul laman baru yang menampilkan beberapa informasi mengenai kode entry, nama protein target, nama gen, dan organismenya.

2. Identifikasi interaksi protein-protein

Interaksi protein target dilakukan dengan menggunakan web server STRING dengan membuka laman String melalui web server <https://string-db.org/>. Nama dari protein target yang sudah divalidasi atau kode protein yang telah diperoleh dari uniprot dimasukkan pada kotak pencarian “Protein Name” selanjutnya pada kotak pencarian “Organism” pilih “Homo sapiens” lalu tekan tombol “Search”. Setelah itu laman akan menampilkan protein yang langsung berinteraksi dengan protein target. Data yang telah didapatkan dapat diunduh pada menu “Exports” pada bentuk TSV setelah itu ditabulasikan ke dalam bentuk *Microsoft Excell* untuk dipilih data protein yang saling berinteraksi satu sama lain. STRING mengumpulkan bukti dari ekspresi gen dari sejumlah sumber yang kemudian dinormalisasikan, dipangkas, dan profil ekspresi dari berbagai macam kondisi dibandingkan. Pasangan gen yang menunjukkan kesamaan secara konsisten diantara profil ekspresinya dengan diberi skor asosiasi, yang sebagian besar dari data ekspresi berbasis RNA, tetapi dapat mengimpor data ekspresi proteome dari basis data proteomeHD (Szklarczyk *et al.*, 2020).

3. Skrining zat aktif terhadap protein target

Setelah aktivitas senyawa daun teh hijau dan seledri sudah didapatkan, maka selanjutnya dilakukan skrining zat aktif terhadap protein target dengan menggunakan webserver PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) dengan memasukkan kandungan senyawa kimia yang diperoleh dari KNApSACk, IJAH Analytics, *Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Database*, dan dari jurnal-jurnal penelitian ke dalam PubChem. Ketik nama spesies dari

tanaman pada kolom pencarian kemudian klik “*Search*”. Setelah laman terbuka maka akan muncul laman “*Compound Best Match*” lalu klik senyawa kimia yang dipilih maka akan muncul laman baru, setelah itu pilih “*Biological Test Results*”. Langkah selanjutnya pada “*BioAssay Results*” pilih “*Download*” kemudian pilih “*CSV*”. Selanjutnya hasil dari aktivitas biologi akan ditabulasikan ke dalam *microsoft excel*, setelah itu menyeleksi data protein target yang aktif serta memiliki aktivitas terhadap protein target. PubChem telah dikumpulkan dari ratusan sumber data yang disusun menjadi beberapa kumpulan data termasuk pada zat, senyawa, *BioAssay*, gen, protein, dan *pathway* (Kim Sunghwan, 2021).

4. Prediksi protein target dari senyawa bioaktif

Identifikasi protein target dari senyawa bioaktif dilakukan dengan menggunakan *web server* Swiss Target Prediction dan SEA.

4.1. Swiss Target Prediction. Membuka *web server* Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>). Setelah laman terbuka, pada kolom pencarian “*paste a SMILES in this box, or draw a molecule*” lakukan dengan mengisi *caconical SMILES* senyawa bioaktif yang telah diperoleh dari PubChem. Setelah itu, klik menu “*Pedict Targets*” lalu akan muncul laman yang menampilkan data informasi target beserta dengan gambar struktur. Dari data yang dihasilkan kemudian diunduh dalam format file, yang kemudian ditabulasikan ke dalam *microsoft excel* untuk dilakukan proses eliminasi. Pada protein yang memiliki skor gabungan yang lebih tinggi dari 0,5 memprediksi bahwa molekul yang cenderung berbagi target protein yang sama (Daina *et al.*, 2019).

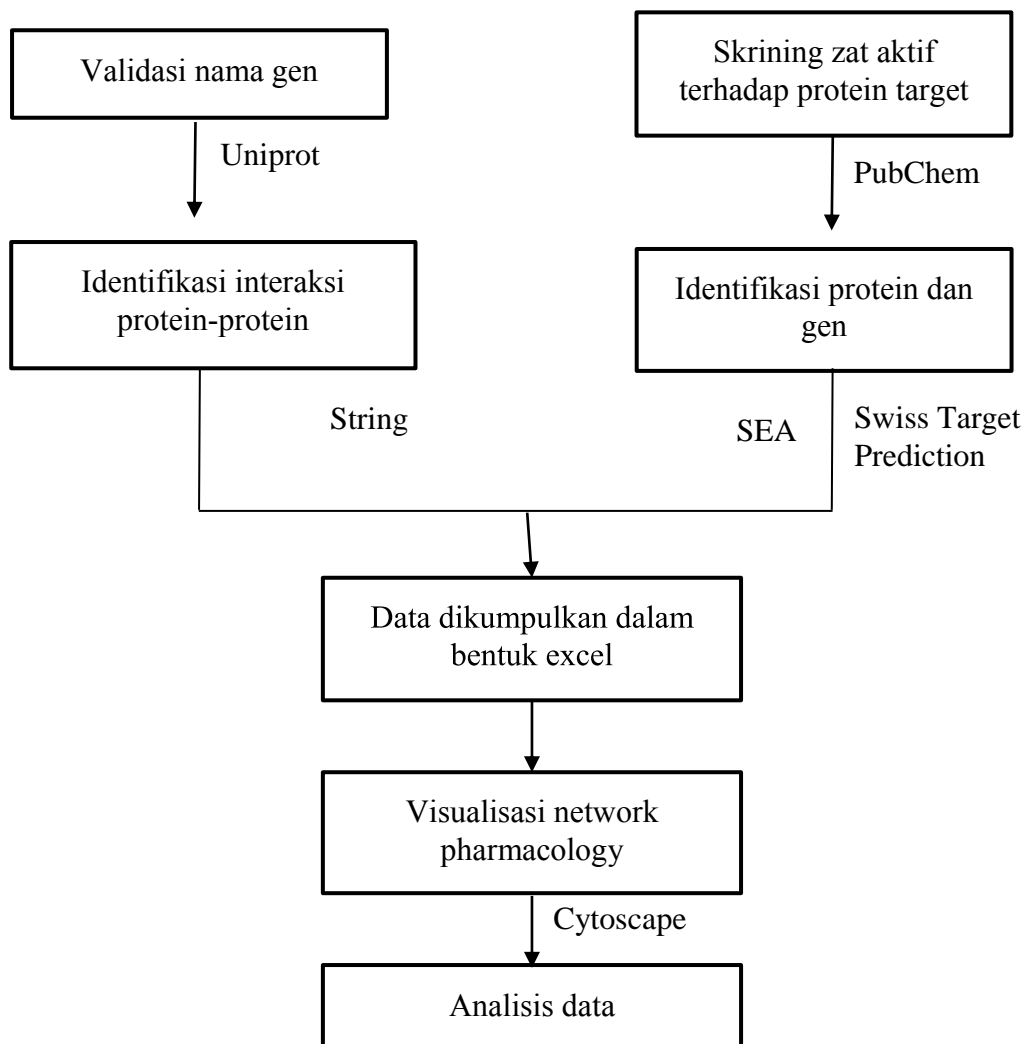
4.2. Similarity Ensemble Approach (SEA). Membuka *web server* SEA (<https://sea.bkslab.org/>). Setelah laman terbuka, pada kolom pencarian “*paste SMILES or try the example below*” diisi dengan *cannonical SMILES* dari senyawa bioktif yang didapat dari PubChem, setelah itu klik “*try SEA*”. Data yang telah didapatkan, kemudian diunduh dengan format file zip, selanjutnya diekstrak menjadi bentuk format file *excel* supaya dapat bisa ditabulasikan ke dalam *microsoft excel* untuk dilakukan eliminasi pada protein yang memiliki *Max TC* <0,7.

5. Visualisasi network pharmacology

Dari data hasil interaksi protein-protein serta hasil interaksi senyawa-protein yang sudah diunduh dalam bentuk TSV dari *string* yang telah ditabulasikan dilakukan visualisasi *network pharmacology*

dengan menggunakan perangkat lunak *cytoscape* dengan mengakses URL <http://www.cytoscape.org>. Data bioaktivitas dikumpulkan lalu melakukan pencocokan hasil dari tabulasi CSV yang diperoleh dari kandungan senyawa pada PubChem dengan hasil protein target yang telah ditabulasi dalam bentuk TSV. Sehingga, dilakukan analisis untuk melihat interaksi antara senyawa dengan protein target dalam membentuk *network pharmacology*. *Cytoscape* memiliki *strukturViz* dan *CyToStruct* untuk meneliti interaksi protein pada ruang 3D dengan integrasi melalui sistem visualisasi molekuler (Lima *et al.*, 2021).

E. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 18. Jalannya Penelitian