

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah kandungan senyawa kimia pada kunyit putih dan akar manis dari bank data serta protein target dari penyakit hepatitis B.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah kandungan senyawa kimia dari kunyit putih dan akar manis yang sudah diidentifikasi melalui KNAPSAcK, PuChem, KEGG Pathway, dan literatur jurnal lain sebagai bahan pendukung.

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

##### **1. Identifikasi Variabel**

Variabel utama dalam penelitian ini adalah kandungan senyawa dari tanaman kunyit putih (*Curcuma zedoaria*) dan tanaman akar manis (*Glycyrrhiza glabra*). Variabel kedua dalam penelitian ini adalah protein target dari jalur *pathway* hepatitis B. Variabel ketiga adalah profil *network pharmacology* senyawa kimia yang terdapat pada kunyit putih dan akar manis terhadap protein. Variabel keempat adalah profil *network pharmacology* antara protein target dan senyawa yang saling berikatan membentuk jejaring kompleks dalam mengatasi hepatitis B.

##### **2. Klasifikasi Variabel**

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

**2.1 Variabel bebas.** Variabel bebas adalah variabel yang diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang digunakan yaitu kandungan senyawa kunyit putih dan akar manis yang diperoleh dari beberapa literatur jurnal dan KNAPSAcK.

**2.2 Variabel tergantung.** Variabel tergantung adalah variabel yang dipengaruhi nilainya akibat pengaruh variabel bebas. Variabel tergantung berupa

protein target yang digunakan untuk mengetahui target kerja pada senyawa kunyit putih dan akar manis.

**2.3 Variabel terkontrol.** Variabel terkontrol adalah variabel yang dikendalikan agar tidak mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu ditetapkan kualitasnya agar hasil yang diperoleh dapat diulang dalam penelitian lain secara tepat. Variabel terikat yang digunakan berupa *software* atau *web server*.

### 3. Definisi Operasional Variabel

Pertama, senyawa kimia adalah senyawa aktif yang terkandung dalam tanaman kunyit putih dan akar manis yang dapat digunakan sebagai senyawa uji.

Kedua, protein target adalah protein yang dijadikan target yang terlibat dalam *pathway hepatitis B* di KEGG *Pathway* melalui string.

Ketiga, aktivitas kandungan senyawa adalah aktivitas senyawa seluruh komponen kunyit putih dan akar manis yang berpotensi memiliki hubungan target kerja terhadap protein target yang datanya dapat diketahui melalui penelusuran jurnal literatur dan web server serta perangkat lunak.

Keempat, profil *network pharmacology* adalah profil visualisasi hubungan interaksi antara protein target dan senyawa yang saling berikatan satu sama lainnya yang dapat menimbulkan efek hepatoprotektor dan imunomodulator.

## C. Alat dan Bahan

### 1. Alat

**1.1 Perangkat keras.** Spesifikasi perangkat keras yang digunakan adalah laptop ASUS dengan spesifikasi processor Intel(R) Celeron(R) N4020, 1.10 GHz up to 2.80 GHz, RAM 4 GB, Memory 512 GB dan flashdisk ADATA C906 8 GB.

**1.2 Perangkat lunak.** Perangkat lunak yang digunakan adalah web server KNApSAcK Family (<http://www.knapsackfamily.com/KNApSAcK/>), PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), KEGG Pathway (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), String (<https://string-db.org/>), Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), SEA (<https://sea.bkslab.org/>), Cytoscape (<http://www.cytoscape.org>), Google scholar (<https://scholar.google.com/>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## 2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu semua data senyawa kimia dari kunyit putih dan akar manis, serta protein target penyakit hepatitis B yang diunduh dalam bentuk CSV dan TSV.

## D. Jalannya Penelitian

### 1. Identifikasi Interaksi Protein-Protein

Identifikasi interaksi protein-protein dilakukan menggunakan web server “String” (<https://stringdb.org/>). Setelah laman terbuka, pada kotak pencarian “protein name” diisi satu persatu nama protein target atau kode UniProt protein target yang ingin diketahui interaksi protein-proteininya. Pada kotak pencarian “organism” difilter dengan memilih “homo sapiens” lalu menekan tombol search. Langkah berikutnya menekan “continue”, maka laman baru akan menampilkan hasil interaksi proteinprotein yang terjadi. Hasil interaksi yang diperoleh disimpan dengan menekan menu “eksport”, kemudian dipilih “download” dalam format file TSV dan ditabulasikan ke microsoft excel untuk dilakukan eliminasi pada interaksi protein-protein yang memiliki skor antara 0,5 sampai di atas 0,9.

### 2. Validasi Nama Gen

Protein target yang diperoleh dari KEGG *Pathway* dan jurnal-jurnal penelitian dilakukan validasi nama gen dengan menggunakan webserver “UniProt” (<https://www.uniprot.org/>). Nama protein yang sudah didapat kemudian dimasukkan ke dalam bar pencarian kemudian klik “Search” dengan pilihan pencarian “UniProtKB” dan diisi satu persatu nama protein targetnya. Hasil yang muncul dipilih jenis “Organism” *Homo sapiens* kemudian pada tabel hasil “Entry” dipilih kode dari protein yang dicari, kemudian akan tertampil laman yang berisi nama protein target, nama gen secara global, dan organisme.

### 3. Skrining Aktivitas Biologi Senyawa

Skrining aktivitas biologi senyawa pada kunyit putih dan akar manis dilakukan menggunakan web server “PubChem” (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dengan memasukkan kandungan senyawa kimia buah mengkudu yang diperoleh dari KNApSAcK, dan jurnal-jurnal penelitian ke dalam PubChem. Aktivitas biologi senyawa dapat dicari pada kotak pencarian dengan mengisi nama senyawa tanaman, kemudian diklik “search” yang disimbolkan dengan ikon lup atau ikon kaca pembesar. Setelah laman terbuka, dipilih “compound best

match” maka akan muncul laman baru, kemudian dipilih “biological test results”. Langkah berikutnya pada “bioAssay results” diklik “download” yang terletak di pojok kanan atas, kemudian diklik “CSV”, selanjutnya hasil aktivitas biologi ditabulasikan ke dalam microsoft excel untuk dilakukan skrining dan eliminasi pada kolom “activity” yang memiliki aktivitas “inactive” dan “unspecified” dihilangkan.

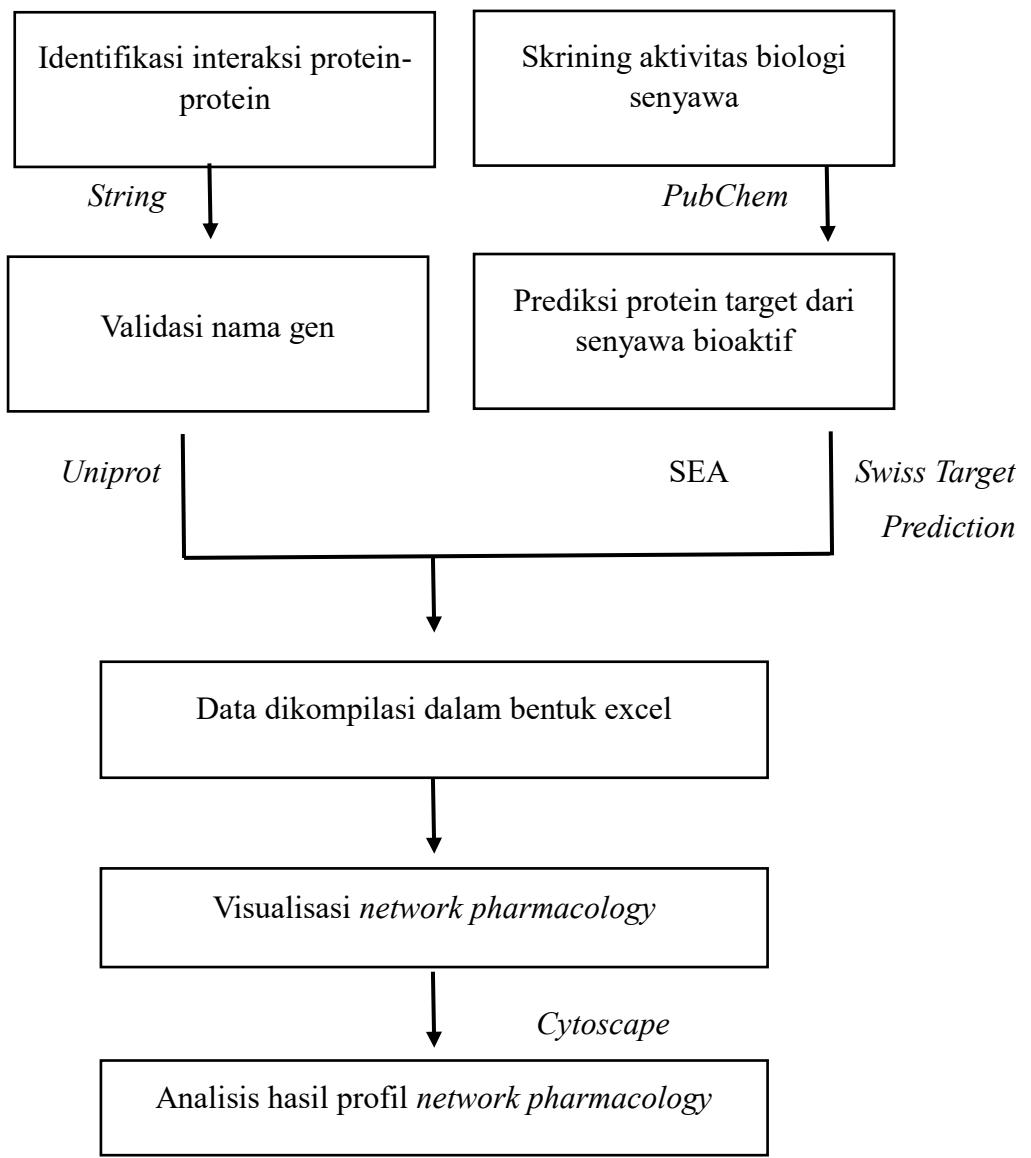
#### 4. Prediksi Protein Target dari Senyawa Bioaktif

Prediksi protein target dari senyawa bioaktif dilakukan menggunakan web server *Swiss Target Prediction* (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) dengan memasukkan canonical SMILES senyawa bioaktif yang diperoleh dari PubChem pada kotak pencarian “paste a SMILES in this box, or draw a molecule”, kemudian diklik menu “predict targets”. Data yang dihasilkan diunduh dalam format file .xlsx, kemudian ditabulasikan ke dalam microsoft excel untuk dilakukan eliminasi pada protein yang memiliki skor probability di atas 0,5. Pada web server SEA (<https://sea.bkslab.org/>) dilakukan dengan mengisi canonical SMILES senyawa bioaktif dari PubChem pada kotak pencarian “paste SMILES or try the example below”, kemudian diklik “try SEA”. Data yang diperoleh diunduh dalam format file zip, kemudian diekstrak menjadi bentuk format file excel agar dapat ditabulasikan ke dalam microsoft excel untuk dilakukan eliminasi pada protein yang memiliki Max TC di atas 0,5.

#### 5. Visualisasi *Network Pharmacology*

Data hasil interaksi protein-protein dan hasil interaksi senyawa-protein yang sudah ditabulasikan dalam bentuk excel kemudian dilakukan visualisasi network pharmacology menggunakan *software Cytoscape* (<http://www.cytoscape.org>) versi 3.9.1 dengan membuka file yang telah ditabulasikan, kemudian menekan menu “file”, lalu mengklik “import” dan diklik menu “network from file”, selanjutnya pada “network file to load” dicari file tabulasinya, kemudian diklik “open”. Setelah itu akan muncul kotak “import network from table” lalu diklik “ok”, sehingga muncul profil *network pharmacology* yang dibangun.

### E. Skema Penelitian



Gambar 13. Skema Penelitian