

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah kandungan senyawa kimia yang terdapat pada anggur dan jeruk nipis, serta protein-protein target yang terlibat dalam patofisiologi Parkinson yang didapat melalui KNAPSAcK, KEGG Pathway dan jurnal literatur.

Sampel pada penelitian ini adalah 30 kandungan senyawa kimia anggur golongan polifenol, asam amino, dihidroksibenzena dan 20 senyawa kandungan senyawa kimia jeruk nipis golongan terpenoid, flavonoid, asam fenolik, amino serta protein-protein target telah diidentifikasi melalui KEGG Pathway, KNAPSAcK, PubChem, dan jurnal literatur lain sebagai bahan pendukung.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah protein target yang terlibat pada patofisiologi penyakit Parkinson. Variabel kedua adalah kandungan senyawa kimia yang terdapat pada anggur dan jeruk nipis. Variabel ketiga adalah profil *network pharmacology* antara kandungan senyawa kimia anggur dan jeruk nipis terhadap protein target Parkinson serta analisis hasil visualisasi *network pharmacology*. Variabel keempat adalah *web server* dan *software* yang digunakan untuk prediksi hubungan antar protein dan senyawa dengan protein.

2. Klasifikasi Variabel Utama

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

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas adalah variabel yang diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandungan kimia anggur dan jeruk nipis yang diperoleh dari KNAPSAcK, PubChem, dan jurnal literatur.

2.2 Variabel terikat. Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi nilainya akibat pengaruh variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah protein target yang digunakan untuk mengetahui target kerja pada senyawa anggur dan jeruk nipis dan profil *network pharmacology*.

2.3 Variabel terkontrol. Variabel terkontrol adalah variabel yang dikendalikan agar tidak memengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu ditetapkan kualitasnya agar hasil yang diperoleh dapat diulang dalam penelitian lain secara tepat. Variabel terkontrol yang digunakan pada penelitian ini adalah *web server* dan *software*.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, protein target adalah protein yang terlibat pada jalur *Parkinson disease* di KEGG *Pathway* yang didapatkan juga melalui STRING.

Kedua, kandungan senyawa kimia anggur dan jeruk nipis yang diperoleh dari KNAPSAcK dan jurnal literatur seperti yang ditunjukkan pada gambar 2 sampai gambar 17.

Ketiga, aktivitas kandungan senyawa seluruh komponen anggur dan jeruk nipis yang berpotensi memiliki hubungan target kerja terhadap protein target yang datanya dapat diketahui melalui penelusuran jurnal literatur dan *web server* serta *software*.

Keempat, profil *network pharmacology* adalah hasil visualisasi *network pharmacology* yang menunjukkan hubungan antara senyawa dengan protein target penyakit Parkinson sehingga dapat menggambarkan aktivitas antiparkinson.

Kelima, *web server* dan *software* adalah perangkat lunak (*software*) dalam server yang berfungsi untuk menerima permintaan (*request*) berupa halaman web melalui protokol HTTP dan atau HTTPS, kemudian mengirimkan kembali hasil permintaan tersebut ke dalam bentuk halaman-halaman web.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah data kandungan senyawa kimia anggur dan jeruk nipis, protein target yang ditabulasikan dalam format CSV dan TSV serta protein dan gen target pada jalur patofisiologi Parkinson.

2. Alat

2.1 Perangkat Keras. Perangkat keras yang digunakan pada penelitian ini adalah laptop HP dengan spesifikasi *processor* 11th Gen Intel(R) Core (TM) i5-1135G7 @ 2.40GHz, RAM 8.00 GB, Windows 11 dengan 64-bit *operating system*, x64-based *processor*.

2.2 Software dan Web server. *Cytoscape* versi 3.9.0., *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), KEGG Pathway

(<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), STRING (<https://string-db.org/>), Super-PRED (<https://prediction.charite.de/>), KNApSACk (<http://www.knapsackfamily.com/KNApSACk/>), Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), SEA (<https://sea.bkslab.org/>), Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), dan DrugCentral (<https://drugcentral.org/>).

D. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi Interaksi Protein-Protein Target

Identifikasi interaksi protein-protein target dilakukan menggunakan *web server* “STRING” dengan membuka laman *web server* <https://string-db.org/>. Setelah laman terbuka, pada kotak pencarian “protein name” diisi satu persatu. Pada kotak pencarian “organism” difilter dengan memilih “homo sapiens” lalu menekan tombol “search”. Langkah selanjutnya tekan “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 diatas 0,900. Skor tersebut dimaksudkan untuk mengungkapkan perkiraan kepercayaan pada skala nol hingga satu dari asosiasi protein fungsional yang benar dan semua bukti yang tersedia, serta menunjukkan korelasi antar protein.

2. Validasi Nama Gen

Hasil protein target yang diperoleh dari KEGG *pathway* dan jurnal-jurnal penelitian dilakukan validasi nama gen dengan menggunakan *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.

3. Skrining Zat Aktif terhadap Protein Target

Skrining aktivitas biologi senyawa pada anggur dan jeruk nipis dilakukan dengan membuka *web server* “PubChem”

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, lalu memasukkan kandungan senyawa kimia anggur dan jeruk nipis yang diperoleh dari KNAPSAcK, dan jurnal-jurnal penelitian ke dalam kolom pencarian. Lalu, akan muncul beberapa pilihan yang berhubungan dengan senyawa yang dicari, setelah itu pada kolom *contents* ada beberapa pilihan, memilih menu “*Biological Test Result*”. Aktivitas senyawa-senyawa akan muncul kemudian memilih menu download dalam bentuk file CSV. Untuk memudahkan dalam menelusuri data-data pada file CSV maka ditabulasikan dalam bentuk *Microsoft Excel*, lalu menyeleksi data protein target yang *activity activ* dan data yang memiliki aktivitas terhadap protein target.

4. Prediksi Protein dan Gen dari Senyawa Bioaktif

Prediksi protein target dan gen dilakukan untuk memperoleh protein target dan senyawa berdasarkan kemiripannya. Prediksi ini menggunakan 3 *web server* yaitu *Swiss Target Prediction*, SEA, Super-PRED.

4.1 Swiss Target Prediction. Mengakses laman <http://www.swisstargetprediction.ch/>. Canonical SMILE dari senyawa bioaktif anggur dan jeruk nipis 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 diunduh dalam format file xlxs, yang kemudian ditabulasikan ke dalam *Microsoft Excel* untuk dilakukan proses eliminasi. Memilih nilai pada *Swiss Target Prediction* pada nilai ambang batasnya yaitu diatas 0,7. Pada *Swiss Target Prediction* protein target terdapat keterangan berwarna hijau berupa bar *probability* yang menunjukkan semakin tinggi nilai *probability* maka semakin akurat prediksi protein target (Saharani *et al.*, 2021).

4.2 SEA. Prediksi protein target juga dapat diidentifikasi menggunakan SEA (*Similarity Ensemble Approach*) dengan mengakses laman <https://sea.bkslab.org/>. Data canonical SMILE yang didapat dari *PubChem* dimasukkan kedalam kolom pencarian. Hasil prediksi protein target menggunakan SEA dibagi menjadi tiga klaster yaitu biru, hijau dan putih. Lakukan seleksi protein yang berwarna biru dan hijau karena klaster tersebut menunjukkan ikatan yang paling kuat dengan senyawa bioaktif, sedangkan kluster yang putih ikatannya paling rendah. Selanjutnya eliminasi senyawa dengan nilai *Max TC* lebih

tinggi dari 0,7 karena menunjukkan kesamaan molekuler dari struktur kimia senyawa kueri yang dipresentasikan sebagai SMILES, 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.

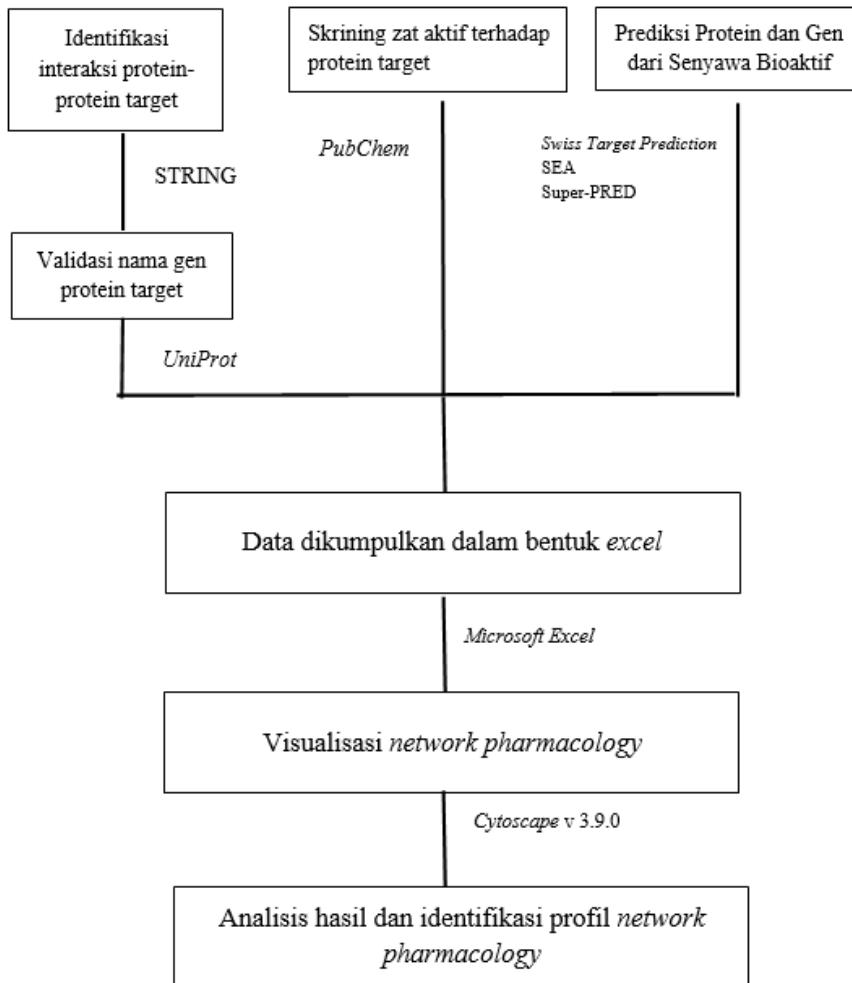
4.3 Super-PRED. Mengakses laman (<https://prediction.charite.de/>), lalu tekan “*target prediction*”. *Pubchem-Name* dan *canonical SMILE* dari senyawa bioaktif anggur dan jeruk nipis yang diperoleh dari *PubChem* dimasukkan pada kolom tekan “*search*” dan “*start calculation*” lalu muncul laman baru. Hasil prediksi target dapat dilihat pada tabel kemudian diunduh dalam bentuk file *excel*. Buka file dan lakukan eliminasi pada protein yang memiliki skor *probability* dan *model accuracy* kurang dari 85%. Skor tersebut cenderung menghasilkan prediksi ATC yang lebih akurat.

5. Visualisasi *Network Pharmacology*

Hasil analisis interaksi antarprotein target, kemudian dilakukan visualisasi *network pharmacology* menggunakan *software Cytoscape* versi 3.9.0 atau mengunduh *software Cytoscape* yang dapat diakses melalui <http://www.cytoscape.org>. Visualisasi juga dilakukan pada hasil analisis interaksi senyawa-protein untuk membentuk profil *network pharmacology* dari tanaman anggur dan jeruk nipis berdasarkan identifikasi dan analisis yang telah dilakukan. File yang telah ditabulasi, kemudian dibuka pada *software Cytoscape*, tekan menu “*file*”, lalu pilih “*import*” dan dipilih menu “*network form file*”, setelah muncul kotak “*network file to load*” dicari file tabulasinya, kemudian dipilih “*open*”. Setelah itu akan muncul kotak “*import network form table*”, pilih *node 1 “source node”* dan *node 2 “target node”* lalu pilih “*OK*” sehingga muncul profil *network pharmacology* yang dibangun. Profil *network pharmacology* dapat dilakukan *custom* dengan dipilih menu “*Style*”, kemudian dapat diganti dari “*default*” ke *custom* pilihan. Profil *network* dapat juga dilakukan *custom* warna *node* pada menu “*Properties*”, kemudian dipilih menu “*Node*”, dan dipilih “*Fill Color*”, selanjutnya dipilih warna yang diinginkan pada kotak “*Colors*” bagian “*Swatches*”, dan dipilih “*OK*”. Profil network dapat juga dilakukan custom bentuk node pada menu “*Properties*”, kemudian dipilih menu “*Node*”, dan dipilih “*Shape*”, selanjutnya dipilih bentuk yang diinginkan pada kotak “*Node Shape*”, dan dipilih “*Apply*”. Profil network dapat juga dilakukan custom warna label node pada menu

“Properties”, kemudian dipilih menu “Node”, dan dipilih “Label Color”, selanjutnya dipilih warna yang diinginkan pada kotak “Colors” bagian “Swatches”, dan dipilih “OK”.

E. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 23. Skema Jalannya Penelitian