

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Populasi adalah seluruh objek bagian yang menjadi sasaran dalam penelitian. Populasi dalam penelitian ini yaitu senyawa-senyawa kimia yang terkandung dalam tanaman pala dan peterseli dan protein target pada manusia.

Sampel adalah bagian dari populasi yang yang digunakan dalam penelitian. Sampel dalam penelitian ini yaitu senyawa-senyawa kimia yang terkandung dalam pala dan peterseli yang diprediksi berinteraksi dengan protein target penyakit depresi (Tabel 1).

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

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

Identifikasi variabel utama dalam penelitian ini adalah senyawa yang terkandung pada tanaman pala dan peterseli, variabel utama kedua yaitu protein target yang diperoleh dari *KEGG pathway* dopaminergic synapse dan serotonergic synapse, variabel utama ketiga yaitu profil *network pharmacology* yang didapatkan, variabel utama keempat berupa 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 Utama**

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu variabel yang dicari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kandungan senyawa kimia tanaman pala dan peterseli serta protein target depresi.

Variabel tergantung yang digunakan dalam penelitian ini yaitu protein target yang digunakan untuk mengetahui target kerja senyawa kimia tanaman pala dan parsley dan profil *network pharmacology* yang terbentuk.

Variabel terkendali yang digunakan dalam penelitian ini yaitu variabel yang dapat memberikan pengaruh terhadap kedua variabel sebelumnya yaitu interaksi senyawa kimia dengan protein target yang diperoleh membentuk profil *network pharmacology* menggunakan perangkat lunak dan beberapa web server.

### 3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, senyawa kimia adalah senyawa yang terkandung pada tanaman pala dan peterseli yang diperoleh dari *KNapSACk* dan artikel ilmiah digunakan sebagai senyawa uji.

Kedua, protein target adalah data biomolekul yang diperoleh dari *KEGG pathway*, *DisGeNET*, dan artikel ilmiah yang terlibat dalam patofisiologi terjadinya depresi (Tabel 1).

Ketiga, profil *network pharmacology* adalah profil visualisasi hubungan interaksi antara protein target dan senyawa yang saling berikatan satu dengan lainnya yang dapat menimbulkan efek antidepresan.

Keempat, perangkat lunak adalah program komputer yang berfungsi sebagai sarana interaksi (penghubung) antara pengguna (*user*) dan perangkat keras (*hardware*). Perangkat lunak yang digunakan yaitu *Cytoscape* (versi 3.9.1).

Kelima, web server adalah sebuah program komputer untuk melayani permintaan pengguna 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*, *DisGeNET*, *GeneCards*, *PubChem*, *UniProt*, *String*, *SwissTargetPrediction*, *Similarity Ensemble Approach (SEA)*, dan *SuperPred*.

## C. Bahan dan Alat

### 1. Bahan

Data senyawa kimia yang terkandung dalam tanaman pala dan peterseli, protein target pada *pathway disease* depresi (Tabel 1).

### 2. Alat

Perangkat Keras: Laptop Lenovo dengan spesifikasi 11th Gen Intel(R) Core (TM) i5-1135G7 @ 2.40GHz 2.42 GHz ram 8GB SSD 198 GB Perangkat lunak dan web server: *Cytoscape* (versi 3.9.1), *KNapSACk*, *KEGG pathway*, *DisGeNET*, *GeneCards*, *PubChem*, *UniProt*, *String*, *SwissTargetPrediction*, *Similarity Ensemble Approach (SEA)*, dan *SuperPred*.

## D. Jalannya Penelitian

### 1. Identifikasi Protein Target

Identifikasi protein yang berperan pada depresi dapat diakses dengan web server *KEGG pathway* (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Setelah laman terbuka, pada kotak pencarian “*enter keyword*” diisi “*dopaminergic synapse*”, dan pilih menu “*go*”, kemudian akan memuat laman hasil. Laman hasil yang termuat dipilih “*dopaminergic synapse*” dengan diklik “*map04728*”, maka akan dihasilkan laman “*dopaminergic synapse*”. Hasil *pathway* tersebut akan diketahui protein target yang berperan pada penyakit depresi melalui beberapa jalur pensinyalan.

Pathway serotonergic synapse didapatkan dengan cara yang sama dengan dopaminergic synapse. web server *KEGG pathway* dibuka, setelah laman terbuka, pada kotak pencarian “*enter keyword*” diisi “*serotonergic synapse*”, dan pilih menu “*go*”, kemudian akan memuat laman hasil. Laman hasil yang termuat dipilih “*serotonergic synapse*” dengan diklik “*map04726*”, maka akan dihasilkan laman “*serotonergic synapse*”. Hasil *pathway* tersebut akan diketahui protein target yang berperan pada penyakit depresi melalui beberapa jalur pensinyalan.

### 2. Identifikasi Interaksi Protein-Protein

Protein target yang telah diidentifikasi sebagai protein pada depresi, selanjutnya dilakukan identifikasi interaksi protein-protein lain yang memiliki interaksi atau dapat mempengaruhi protein target utama dari depresi menggunakan web server *String* (<https://string-db.org/>). Setelah lama terbuka, pada kotak pencarian “*protein name*” diisi satupersatu nama protein target atau kode uniprot protein target yang ingin diketahui interaksi protein-proteininya. Pada kotak pencarian “*organism*” difilter dengan memilih “*homo sapiens*” lalu diklik tombol “*search*”. Langkah berikutnya diklik tombol “*continue*”, maka laman baru akan menampilkan hasil interaksi protein-protein yang terjadi. Hasil interaksi yang diperoleh disimpan dengan cara menekan menu “*eksport*”, kemudian dipilih “*download*” dalam format file TSV dan ditabulasi ke *Microsoft excel* untuk dilakukan eliminasi pada interaksi protein-protein yang memiliki skor <0,9 dan dieliminasi protein *Cytocrome P450*.

### 3. Validasi Nama Protein

Protein-protein yang sudah diperoleh dilakukan validasi dengan web server *UniProt* (<https://www.uniprot.org/>). Setelah laman terbuka pada kotak pencarian “*UniprotKB*” diisi satu persatu nama protein target yang akan dicari nama protein target secara internasional, lalu diklik tombol “*search*”. Kolom “*Popular organisms*” pilih “*Human*”, selanjutnya pada tombol “*entri*” dipilih kode dari nama protein target yang dicari, kemudian akan memuat laman yang berisi nama protein target, nama protein secara internasional, dan organismenya.

### 4. Skrining Zat Aktif terhadap Protein Target

Skrining aktivitas biologi senyawa pada tanaman pala dan peterseli dilakukan dengan menggunakan web server *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dengan memasukan kandungan senyawa kimia pala dan peterseli yang diperoleh dari *KNapSACk*, dan artikel-artikel penelitian ke dalam *PubChem*. Aktivitas biologi tanaman pala dan peterseli dapat dicari pada kotak pencarian dengan mengisi nama senyawa tanaman, kemudian diklik *search* yang disimbolkan dengan ikon *lup* (kaca pembesar). Setelah laman terbuka, dipilih “*compound best match*” maka akan muncul laman baru, kemudian dipilih “*biological test results*”. Langkah berikutnya pada “*bioassay*” result diklik “*download*” yang terletak di pojok kanan atas, kemudian diklik SCV, selanjutnya hasil aktivitas biologi ditabulasi ke dalam *Microsoft excel* untuk dilakukan skrining dan eliminasi pada kolom “*activity*” yang memiliki aktivitas “*inactive*” dan “*unspecified*” dihilangkan.

### 5. Prediksi Protein Target dari Senyawa Bioaktif

Prediksi protein target dari senyawa bioaktif dilakukan menggunakan web server *SwissTargetPrediction*, *SEA*, dan *SuperPred*.

**5.1. SwissTargetPrediction.** Membuka web server *SwissTargetPrediction* (<http://www.swisstargetprediction.ch/>). Setelah laman terbuka, pada kotak pencarian “*Paste a SMILES in this box, or draw a molecule*” diisi dengan *canonical smile* senyawa pala dan peterseli yang diperoleh dari *KNapSACk*, kemudian diklik menu “*predict targets*”. Data yang dihasilkan diunduh dalam format file .xlsx, kemudian ditabulasikan ke dalam *excel* untuk melakukan eliminasi pada protein yang memiliki skor *probability* <0,7.

**5.2. Similarity ensemble approach (SEA).** Membuka web server *SEA* (<https://sea.bkslab.org/>). Setelah laman terbuka, pada kotak

pencarian “*Paste SMILE or try the example below*” diisi dengan *canonical smile* senyawa pala dan peterseli yang diperoleh dari *KNapSACk*, kemudian diklik “*try SEA*” Data yang diperoleh diunduh 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 <0,8.

**5.3. SuperPred.** Membuka web server *SuperPred* (<https://prediction.charite.de/>). Setelah laman terbuka, dipilih “*target prediction*”, kemudian pada kotak pencarian “*pubchem-name*” diisi dengan nama senyawa atau pada kotak pencarian “*smile*” diisi dengan *canonical smile* senyawa pala dan perteseli yang diperoleh dari *KNapSACk*, kemudian diklik “*search*” sampai muncul gambar struktur dari senyawa bioaktif, kemudian diklik “*start calculation*”. Hasil prediksi target dapat dilihat pada table “*Additionally predicted targets*” dan diunduh dalam bentuk format file *excel* untuk dilakukan eliminasi pada protein yang memiliki skor *probability* dan model *accuracy* <90%, karena skor kemiripan yang lebih tinggi atau sama dengan 90% 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 3.9.1 dengan membuka file yang telah ditabulasi, 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*”. Profil *network pharmacology* yang dibangun akan muncul. *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 penyesuaian pada titik, garis, dan jejaring dengan diklik menu “*style*”. Penyesuaian pada profil *network pharmacology* yang telah dibangun bertujuan sebagai penanda agar memudahkan dalam pembacaan hasil visualisasi.

### E. Jadwal Penelitian

