

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah kandungan senyawa kimia pada tanaman biji jintan hitam (*Nigella sativa* L.) dan rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Rosc. var. *rubrum*) serta protein-protein target yang diidentifikasi melalui KNApSAcK, Pubchem, KEGG Pathway, String, dan jurnal sebagai referensi pendukung.

Sampe penelitian ini adalah kandungan kimia pada tanaman biji jintan hitam (*Nigella sativa* L.) seperti *thymoquinone*, *quercetin*, *carvacol*, *oleic acid*, *myristicin*, *m-thymol*, dan sebagainya serta kandungan kimia tanaman rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Rosc. var. *rubrum*) seperti *8-shogaol*, *6-gingerol*, *alpha terpinolene* dan sebagainya.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel

Variabel utama dalam penelitian ini yaitu kandungan senyawa kimia yang ada pada tanaman biji jintan hitam dan rimpang jahe merah. Variabel kedua yaitu protein target yang terlibat di semua *pathway* penyakit asma. Variabel ketiga yaitu profil *network pharmacology* senyawa kimia pada tanaman jintan hitam dan jahe merah terhadap protein target. Variabel keempat yaitu interaksi yang terjadi antara protein target tersebut dengan senyawa kimia yang membentuk jejaring farmakologi dan dapat mengatasi asma.

2. Klasifikasi Variabel

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

2.1. Variabel bebas. Variabel bebas pada penelitian ini adalah kandungan senyawa kimia pada tanaman biji jintan hitam dan rimpang jahe merah yang dapat diakses pada *webserver* seperti IJAH *Analytics*, KNApSAcK, dan jurnal literatur.

2.2. Variabel terikat. Variabel terikat pada penelitian ini adalah protein target yang digunakan untuk mengetahui profil farmakologi dan target kerja pada senyawa tanaman biji jintan hitam dan rimpang jahe merah.

2.3. Variabel terkontrol. Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah pengaturan sistem pada *software* dan *webserver* yang digunakan.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, senyawa kimia aktif pada tanaman biji jintan hitam dan jahe merah adalah senyawa uji yang diperoleh dari database *webserver* *KNApSAcK*, *IJAHA Analytics*, dan jurnal literatur yang telah diskriminasi.

Kedua, protein target adalah semua protein yang terdapat pada jalur *pathway* asma dan diperoleh dari *webserver* *Drugcentral* kemudian diidentifikasi interaksinya menggunakan *webserver* *String*.

Ketiga, aktivitas kandungan senyawa pada tanaman pada jintan hitam dan jahe merah adalah yang memiliki potensi dan memiliki hubungan terhadap protein target. Data tersebut dapat diperoleh dengan penelusuran melalui jurnal literatur, *webserver*, serta *software*.

Keempat, kemampuan interaksi protein target adalah kemampuannya dalam berinteraksi dengan senyawa yang ada pada tanaman biji jintan hitam dan rimpang jahe merah yang dapat menimbulkan efek dan membentuk jejaring farmakologi dalam mengatasi asma.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

1.1. Perangkat keras. Perangkat keras yang digunakan adalah laptop DELL dengan spesifikasi prosesor AMD Ryzen 5 3450U with Radeon Vega Mobile Gfx 2.10 GHz, RAM 8.00 GB, Memory 512 GB, dan operating system Windows 11 version 22H2 type 64-bit (OS build 22621.1848).

1.2. Software dan Webserver. *IJAHA Analytics* (<http://ijah.apps.cs.ipb.ac.id/>), *KNApSAcK* (http://www.Knapsackfamily.com/knapsack_core/top.php), *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), *DrugCentral* (<https://drugcentral.org/>), *KEGG Pathway* (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), *Google Scholar* (<https://scholar.google.com/>), *NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), *String* (<https://string-db.org/>), *Uniprot* (<https://www.uniprot.org/>), *Swiss Target Prediction* (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), *SEA* (<https://sea.bkslab.org/>), *Cytoscape* (<https://cytoscape.org/>).

2. Bahan

Data senyawa kimia pada tanaman jintan hitam dan jahe merah, protein target, dan aktivitas biologi pada tanaman yang ada pada *Pubchem* diunduh dalam bentuk CSV dan TSV agar dapat diakses pada *Microsoft excel*.

D. Cara Kerja

1. Pengumpulan Data Kandungan Senyawa Kimia

Pengumpulan data kandungan senyawa kimia tanaman jintan hitam dan jahe menggunakan webserver IJAH *Analytics* dengan cara mengakses laman tersebut pada URL <http://ijah.apps.cs.ipb.ac.id/> kemudian mengisi kolom “*plants*” dengan *keyword* “*Nigella sativa*” atau “jinten hitam” lalu menekan “*search*”. Hal yang sama dilakukan ketika mencari kandungan tanaman rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Rosc. var. *rubrum*.). Akan terbuka laman yang berisi grafik tentang informasi kandungan senyawa tanaman, prediksi interaksi senyawa dengan protein target, dan penyakit yang berkaitan dengan interaksi tersebut. Selain itu, data kandungan senyawa kimia tanaman dapat dicari menggunakan webserver KNApSAcK dengan mengakses laman URL <http://www.knapsackfamily.com/KNApSAcK/> kemudian memilih menu *KNApSAcK Keyword Search* lalu memasukkan nama latin tanaman, kemudian menekan “*list*”. Akan terbuka laman dengan berbagai jenis metabolit tanaman tersebut. Selain menggunakan webserver, data tanaman dapat dicari pada jurnal penelitian sebelumnya, jurnal tersebut dapat diakses melalui *Google Scholar* dengan mengunjungi laman <https://scholar.google.com/> kemudian memasukkan kata kunci seperti “compound of *nigella sativa* in asthma”, “*Nigella sativa*”, “*antiasthma*” pada kolom pencarian kemudian menekan tombol *search* sehingga muncul banyak jurnal penelitian terkait tanaman tersebut. Hal ini juga sama dilakukan untuk tanaman jahe merah.

2. Pengumpulan Data Aktivitas Biologi

Setelah data senyawa kimia tanaman diperoleh maka untuk melihat aktivitas senyawa tanaman tersebut dapat menggunakan webserver *Pubchem* dengan mengakses laman <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> kemudian memasukkan nama – nama senyawa yang diperoleh ke dalam pencarian lalu tekan tombol *search*. Akan muncul banyak informasi terkait senyawa tersebut, menelusuri senyawa yang dicari pada menu *compounds*. Akan muncul laman baru,

pada kolom *contents* menyediakan berbagai pilihan, kemudian memilih menu “*Biological Test Result*”. Mengunduh aktivitas senyawa tersebut dalam bentuk CSV. File CSV (*Comma Separated Values*) adalah format file yang menggunakan karakter pemisah berupa tanda koma (,) atau titik koma (;). Kemudian data file CSV dikompilasikan ke dalam *Microsoft excel* untuk *diskrinning* yang memiliki aktivitas terhadap protein target dengan melihat kolom *activity* untuk melihat bioaktivitas senyawa.

3. Identifikasi Protein Target

Identifikasi protein target menggunakan webserver *DrugCentral* dengan membukan laman <https://drugcentral.org/> kemudian memasukkan *keyword* “asthma” dalam kolom pencarian dan menekan tombol *search*. Akan muncul obat-obat untuk asma yang digunakan secara internasional. Kemudian menekan obat yang akan diidentifikasi protein targetnya lalu memilih menu *Orange BK* pada laman atas. Laman tersebut berisi bioaktivitas obat, kemudian memilih protein target yang sudah tercentang *mechanism action* nya. Selain itu, identifikasi protein target juga bisa menggunakan webserver *KEGG pathway* dengan mengakses laman <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html> kemudian memasukkan *keyword* “asthma” lalu menekan *go*. Akan muncul laman berisi *entry, thumbnail image, name, description, object, legend*. Kemudian memilih menu *thumbnail image* sehingga akan muncul *pathway* asma beserta protein targetnya yang apabila menekan salah satu protein target tersebut akan muncul informasi *orthology* nya.

4. Validasi Nama Gen Protein Target

Setelah diperoleh nama-nama protein target pada penyakit asma, perlu memvalidasi nama-nama protein target tersebut menggunakan webserver *Uniprot* dengan mengakses laman <https://www.uniprot.org/> kemudian memasukkan nama protein target tersebut pada bar pencarian kemudian menekan *search*. Akan terdapat laman yang menampilkan data *entry, entry name, protein names, gene names*. Pada bagian *popular organism* memilih *human* sehingga diperoleh nama protein pada manusia. Tujuan validasi nama gen ini untuk memperoleh nama protein target yang telah disetujui secara internasional.

5. Identifikasi Interaksi Protein-Protein Target

Identifikasi protein-protein target menggunakan webserver *String* dengan mengakses laman <https://string-db.org/> kemudian pada menu memilih *protein by name*, lalu memasukkan nama protein dan memilih organisme yaitu *homo sapiens*. Kemudian menekan *search*

sehingga akan menampilkan informasi lebih lanjut terkait interaksi protein tersebut. Data yang diperoleh diunduh melalui menu “*export*” dalam bentuk TSV dan ditabulasikan ke Microsoft excel untuk diidentifikasi protein yang saling berinteraksi. File TSV (Tab-Separated Values) adalah format file yang menggunakan separator berupa tab pada antar kolomnya. Pada *webservice String* juga dilengkapi dengan skor yang menggambarkan tingkat keakuratan dimana semakin besar maka tingkat keakuratan semakin tinggi untuk setiap interaksi protein-protein (Szkarczyk, D., *et al.* 2020).

6. Prediksi Protein Target

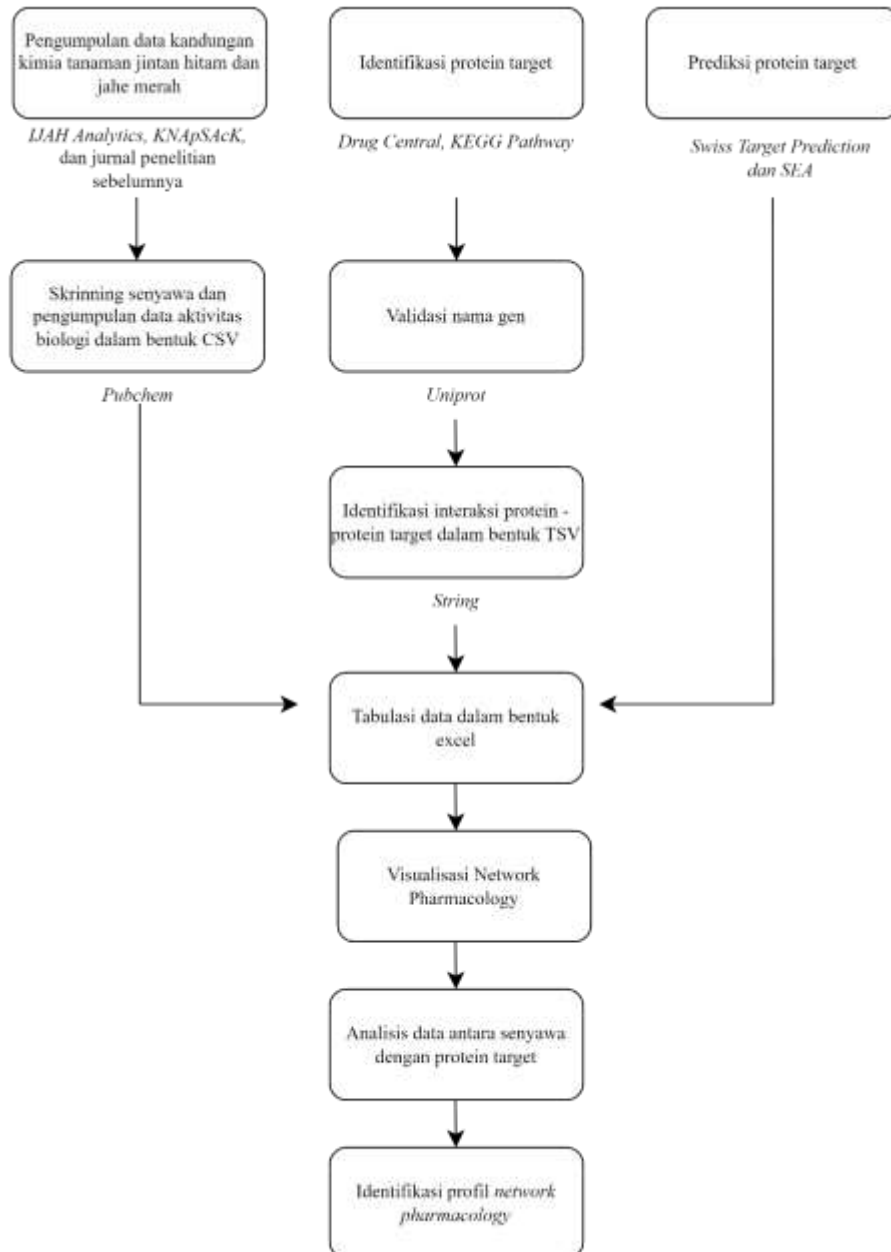
Prediksi protein target menggunakan webservice *Swiss Target Prediction* dengan mengakses laman URL <http://www.swisstargetprediction.ch/> kemudian memasukkan SMILE senyawa bioaktif tanaman jinten hitam dan jahe. Memilih nilai lebih dari 0,5 pada *Swiss Target Prediction*. Protein target paling mirip disajikan pada urutan teratas, semakin tinggi probabilitas maka semakin akurat prediksi protein target (Saharani *et al.*, 2021). Protein target yang diambil yaitu yang memiliki *probability* $\geq 50\%$ kemudian data tersebut diunduh dalam format CSV dan ditabulasikan ke dalam Microsoft Excel.

Prediksi protein target juga dilakukan dengan webservice *SEA* dengan mengakses laman URL <https://sea.bkslab.org/>. Data *canonical SMILE* yang terdapat pada data tanaman bioaktif di *Pubchem* dimasukkan ke kolom pencarian laman *SEA* kemudian diunduh data dan menyortir data protein Target yang memiliki nilai Max Tc dibawah 0,7 karena menunjukkan korelasi yang tinggi (Saharani *et al.*, 2021).

7. Visualisasi Network Pharmacology

Data interaksi protein target yang diperoleh pada webservice *String* dan ditabulasikan dalam Microsoft excel. Hasil tabulasi divisualisasi ke dalam *software* yaitu *cytoscape* dengan mengakses URL <http://www.cytoscape.org> kemudian mengunduhnya. Mengumpulkan data bioaktivitas dilakukan dengan mencocokkan hasil tabulasi CSV dari aktivitas kandungan senyawa pada PubChem dengan protein target hasil tabulasi dari TSV. Kemudian menganalisa data tersebut menggunakan *cytoscape* untuk melihat interaksi senyawa dengan protein target yang membentuk jejaring farmakologi.

E. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 9. Skema jalannya penelitian