

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah keseluruhan dari suatu objek penelitian yang akan diteliti. Populasi pada penelitian ini adalah senyawa-senyawa kimia yang terkandung dalam seledri dan lada hitam serta protein-protein yang terlibat pada patofisiologi artritis reumatoid.

Sampel adalah bagian dari keseluruhan dan karakteristik yang di miliki oleh populasi tersebut. Sampel dalam penelitian ini adalah senyawa-senyawa kimia yang terkandung dalam seledri dan lada hitam yang diidentifikasi melalui KNApSAcK, *KEGG Pathway*, *Pubchem* dan jurnal literatur.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pada penelitian ini adalah senyawa-senyawa kimia yang terkandung dalam seledri dan lada hitam. Variabel utama kedua adalah protein target yang didapatkan melalui *KEGG pathway* artritis reumatoid. Variabel utama ketiga adalah profil *network pharmacology* atau farmakologi jejaring. Variabel utama keempat yaitu *web server* dan perangkat lunak yang digunakan untuk memprediksi interaksi protein-protein dan protein-senyawa serta hasil dalam visualisasi jejaringan yang saling berhubungan.

2. Klasifikasi Variabel Utama

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

2.1. Variabel bebas. Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu kandungan senyawa kimia seledri dan lada hitam yang diidentifikasi dan didapatkan dari jurnal literatur, *Pubchem* dan KNApSAcK.

2.2. Variabel tergantung. Variabel tergantung berupa protein target yang digunakan untuk mengetahui target kerja pada kandungan senyawa kimia seledri dan lada hitam serta profil *network pharmacology* yang telah terbentuk.

2.3. Variabel terkendali. Variabel terkendali yang digunakan dalam penelitian ini yaitu berupa pengaturan pada perangkat lunak dan *web server*.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, protein target merupakan protein yang menjadi target kerja patofisiologi artritis reumatoid yang di dapatkan melalui *KEGG Pathway* dan jurnal literatur.

Kedua, protein gen merupakan protein yang berinteraksi dengan protein target utama yang menjadi target kerja patofisiologi artritis reumatoid di dapatkan melalui *web server String*.

Ketiga, senyawa tanaman merupakan suatu senyawa aktif yang terkandung di dalam tanaman seledri dan lada hitam yang dapat digunakan sebagai senyawa uji yang diperoleh dari jurnal literatur dan *KNApSAcK*.

Keempat, aktivitas biologi senyawa merupakan senyawa yang memiliki aktivitas terhadap patofisiologi artritis reumatoid yang di dapatkan melalui *web server PubChem*.

Kelima, prediksi protein target dan gen merupakan protein target dan protein gen yang berpotensi mempunyai interaksi dengan target kerja senyawa tanaman seledri dan lada hitam terhadap patofisiologi artritis reumatoid yang di dapatkan melalui *web server Swiss Target Prediction, SEA, dan Super Pred*.

Keenam, visualisasi *network pharmacology* merupakan profil visualisasi hubungan interaksi antara protein target dan protein gen artritis reumatoid yang saling berinteraksi dengan senyawa tanaman seledri dan lada hitam yang membentuk jejaringan farmakologi melalui *software cytoscape*.

C. Bahan dan Alat

1. Alat

1.1. Perangkat Keras. Perangkat keras yang digunakan adalah laptop HP dengan spesifikasi prosesor Intel(R) Core(TM) i3-10110U CPU @ 2.10GHz 2.50 GHz, RAM 8,00 GB, Hardisk 127 GB, dan sistem operasi *Windows 11 64-bit*.

1.2. Software dan web server. *Cytoscape (v3.10.1), KNApSAcK, KEGG Pathway, Pubchem, String, Uniprot, Swiss Target Prediction, Similarity Ensemble Approach (SEA), dan SuperPred*.

2. Bahan

Senyawa tanaman yang akan digunakan yaitu senyawa tanaman seledri (*Apium graveolens L.*) dan senyawa kimia lada hitam (*Piper nigrum L.*) serta protein dan gen target pada jalur patofisiologi artritis reumatoid.

D. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi Interaksi Protein Target dan Protein Gen

Mengakses alamat *web server* STRING (<https://string-db.org/>) untuk menganalisis interaksi antar protein target, informasi pada protein-protein target di cari dengan cara mengisi pada bagian kotak *protein name* dengan nama protein target dan berdasarkan *single protein by name*, pada bagian kotak *organism* di isi *human (Homo sapiens)*, kemudian klik *search* dan klik *continue* untuk melihat hasil analisis interaksi protein target dan protein gen.

2. Validasi Nama Gen Protein Target

Hasil dari protein target yang didapatkan melalui *KEGG Pathway* dan jurnal literatur di lanjutkan untuk memvalidasi nama-nama gen dari protein target artritis reumatoid yang telah di verifikasi secara global dengan mengakses alamat *web server* Uniprot (<https://www.uniprot.org/>). Informasi pada validasi nama gen protein target artritis reumatoid ditelusuri dengan pilihan *UniProtKB* pada bagian *search* diisi protein target artritis reumatoid, kemudian klik *search*. Hasil yang ditampilkan, pilih jenis *organism human (Homo sapiens)*.

3. Skrining Aktivitas Biologi Senyawa

Data kandungan senyawa pada tanaman seledri dan lada hitam yang diperoleh dilanjutkan skrining aktivitas biologi senyawa yang dilakukan menggunakan *web server Pubchem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dengan memasukkan nama senyawa kimia pada kolom *search* dan klik lambang kaca pembesar. Setelah laman terbuka pilih senyawa pada kolom *Best Match* kemudian pilih *BioAssay Result* dan *download* file dalam bentuk CSV. Data bio assay yang telah di download dikonversikan dan dibuka melalui *Microsoft excel* untuk dilakukan skrining berdasarkan *activity* dan interaksi pada *human*, sedangkan *inactive* dan *unspecified* dihilangkan.

4. Prediksi Protein Target Dan Gen Dari Senyawa Aktivitas Biologi

Prediksi protein target dari senyawa bioaktif dilakukan menggunakan *web server Swiss Target Prediction, Stitch, SEA, dan SuperPred*.

4.1. Swiss Target Prediction. Mengakses alamat *web server Swiss Target Prediction* (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) untuk memperoleh protein target dan senyawa berdasarkan kesamaannya.

Informasi dalam prediksi protein target dilakukan dengan cara memasukkan canonical SMILE senyawa bioaktif yang ada pada seledri dan lada hitam. Hasil yang ditampilkan dipilih berdasarkan nilai pada *Swiss Target Prediction* dengan skor diatas 0,7. Semakin tinggi nilai probability maka semakin akurat prediksi protein target yang di tunjukkan dengan keterangan berwarna hijau pada bagian bar probability (Saharani *et al.*, 2021).

4.2. SEA. Mengakses *web server* SEA di (<https://sea.bkslab.org/>) pada kotak pencarian *paste SMILE or try the example below*, masukkan *Canonical Smile* senyawa bioaktif yang telah didapatkan dari *Pubchem* dan klik *try* SEA. Hasil yang ditampilkan di *download* dalam format file zip. File zip yang diperoleh diekstrak ke format file *excel*. File yang sudah diekstrak dibuka menggunakan *microsoft excel* dan lakukan eliminasi pada protein yang memiliki Max TC kurang dari 0,7.

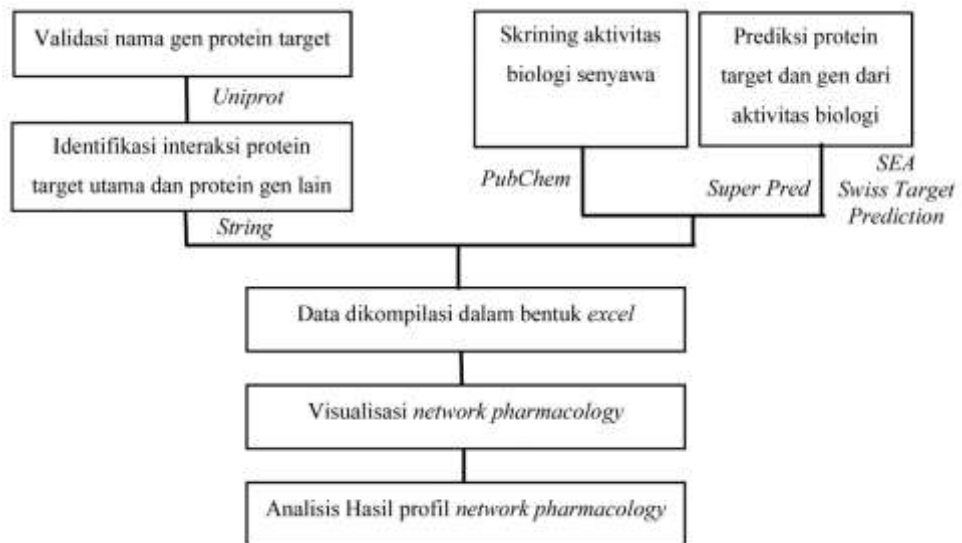
4.3. Super Pred. Mengakses *webservice* (<https://prediction.charite.de/>) pada kotak pencarian *Pubchem-Name*, masukkan nama senyawa bioaktif atau pada kotak pencarian *SMILES*, masukkan *Canonical Smile* senyawa bioaktif yang telah didapatkan dari *PubChem*. Kemudian klik *Search* dan klik *start calculation* akan beralih pada lama baru, Hasil prediksi target dapat dilihat pada tabel *Additionally predicted targets* dan di *download* dalam format file excel. Buka file dan lakukan eliminasi pada protein yang memiliki skor *Probability* dan *Model Accuracy* kurang dari 85% bertujuan untuk mendapatkan skor kesamaan yang lebih tinggi dari 0,85. Skor tersebut cenderung menghasilkan prediksi *Anatomical Therapeutic Chemical* (ATC) yang lebih akurat.

5. Visualisasi *Network Pharmacology*

Perangkat lunak yang digunakan yaitu Cytoscape v.3.10.0 untuk membentuk profil *network pharmacology* dari tanaman seledri (*Apium graveolens* L.) dan tanaman lada hitam (*Piper nigrum* L.) berdasarkan data identifikasi dan analisis yang telah dilakukan. Data interaksi antar protein diperoleh dari data protein yang telah diunduh dalam format TSV dari *String*. Kemudian, data tersebut ditabulasikan dalam format Excel untuk memudahkan visualisasi. Visualisasi interaksi antara protein dilakukan menggunakan perangkat lunak Cytoscape, yang dapat diakses melalui lama (<http://www.cytoscape.org>). Data aktivitas biologi senyawa di kumpulkan dengan mencocokkan hasil tabulasi

CSV yang berisi aktivitas biologi senyawa dari *PubChem* dengan hasil tabulasi TSV yang berisi protein target. Hasil tabulasi data CSV dan TSV ini kemudian dianalisis menggunakan Cytoscape untuk melihat interaksi antara senyawa dan protein target dalam konteks *network pharmacology*. Cytoscape menyediakan berbagai cara untuk berinteraksi, memvisualisasikan, dan menganalisis jaringan String, termasuk integrasi data (Szkarczyk *et al.*, 2020).

E. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 15. Skema Penelitian