

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandungan kimia cengkeh (*Syzygium aromaticum L.*), kandungan kimia Sambiloto (*Andrographis Paniculata*), dan protein target.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandungan kimia tanaman cengkeh, dan kandungan kimia tanaman sambiloto yang diidentifikasi melalui KNApSAcK, IJAH Analytics, Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Database, PubChem, KEGG Pathway, serta literatur pada jurnal lain.

B. Variabel penelitian

1. Identifikasi variabel

Variabel utama pada penelitian ini meliputi protein target yang terlibat pada proses patofisiologi dislipidemia. Variabel kedua meliputi kandungan senyawa kimia daun teh hijau serta seledri. Variabel ketiga meliputi profil *network pharmacology* kandungan senyawa kimia daun teh hijau serta seledri terhadap protein dislipidemia. Variabel keempat yaitu interaksi antar protein target dalam membentuk jejaringan yang saling berkaitan satu sama lain. Klasifikasi variabel utama

2. Klasifikasi Variabel

Penelitian ini memiliki tiga variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terikat.

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas meliputi kandungan senyawa kimia cengkeh dan sambiloto yang diperoleh dari KNApSAcK, IJAH *Analytics*, Dr. Duke's *Phytochemical and Ethnobotanical Database*, Jurnal penelitian.

2.2 Variabel tergantung. Variabel tergantung meliputi protein target yang diprediksi menjadi target kerja dari senyawa cengkeh, sambiloto dan profil jejaring farmakologi kandungan kimia buah mengkudu terhadap protein target malaria.

2.3 Variabel terikat. Variabel terikat yang digunakan seperti *web server* dan perangkat lunak.

3. Definisi Operasional Variabel

Pertama, protein target merupakan suatu protein yang terlibat dalam target kerja patofisiologi dislipidemia dari suatu senyawa kimia

cengkeh dan sambiloto yang didapatkan dari KEGG *Pathway* serta jurnal penelitian.

Kedua, senyawa kimia merupakan suatu senyawa aktif yang terkandung di dalam daun teh hijau serta tanaman seledri yang didapatkan dari KNApSAcK, IJAH Analytics, *Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Database*, Jurnal penelitian.

Ketiga, interaksi senyawa dengan protein target molekuler malaria yang baik adalah senyawa yang memiliki interaksi terhadap protein target hasil dari analisis protein-protein, dan sesuai dengan protein target molekuler malaria.

Keempat, hasil visualisasi jejaring farmakologi adalah hasil dari identifikasi protein target malaria, dan analisis interaksi protein-protein dengan analisis interaksi senyawa-protein yang menunjukkan hubungan antara senyawa dengan protein target malaria sehingga dapat menggambarkan aktivitas antiplasmodial berdasarkan jejaring farmakologi.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

1.1 Perangkat Keras. Perangkat keras yang digunakan adalah laptop ASUS dengan spesifikasi processor Intel(R) Core(TM) i3-1005G1 CPU @ 1.20GHz 1.20 GHz , RAM 4.00 GB, Memory 3,75 GB RAM, dan *operating system Windows 11 (10.0, Build 19044)*

1.2 Software dan Web server. IJAH Analytics (<http://ijah.apps.cs.ipb.ac.id/>), KNApSAcK (http://www.knapsackfamily.com/knapsack_core/top.php000), PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), DrugCentral (<https://drugcentral.org/>), KEGGPathway (<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

Senyawa yang akan dilakukan prediksi target molekuler adalah senyawa kimia cengkeh dan senyawa kimia Sambiloto serta protein target dengan dibuat tabulasi dalam format CSV dan TSV.

D. Metode Percobaan

1. Pengumpulan data kandungan kimia.

Mengakses alamat *web server* KNApSack (http://www.knapsackfamily.com/knapsack_core/top.php) untuk mencari kandungan kimia yang terdapat pada tanaman cengkeh dan tanaman Sambiloto, informasi tentang kandungan kimia dicari berdasarkan “*organism*” kemudian diisi nama latin tanaman pada bagian kotak *search*, dan klik “*list*”, akan memunculkan data kandungan kimia tanaman yang dicari.

Setelah data senyawa kimia pada tanaman sudah didapat maka untuk melihat aktivitas senyawanya menggunakan *web server Pubchem* dengan mengakses lama <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Setelah laman *Pubchem* berhasil dibuka kemudian memasukkan nama-nama senyawa yang sudah didapat ke kolom pencarian. Lalu akan muncul beberapa pilihan yang berhubungan dengan senyawa yang dicari, setelah itu menelusuri senyawa yang memiliki informasi yang sama dengan senyawa yang sedang dicari pada menu *compounds*. Lalu jika sudah akan muncul laman baru pada kolom *contents* yang menyediakan beberapa pilihan, memilih menu “*Biological Test Result*”. Aktivitas senyawasenyawa 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 aktif dan data yang memiliki aktivitas terhadap protein target. *PubChem* terdiri tiga database yaitu zat, senyawa, dan uji biologis yang saling berkaitan (Kurniasari, 2021).

2. Identifikasi protein target

Mengakses alamat *web server SuperTarget* (<http://insilico.charite.de/supertarget>) untuk mengidentifikasi protein target dari malaria, informasi tentang identifikasi protein target dicari dengan menu pilihan “*Targets*”, kemudian mengisi pada kotak yang telah disediakan berupa “*Target name*”, “*EC-Number*”, “*Uniprot name*”, “*Accession Number*”, “*PDB ID*”, “*Kegg Target ID*”, dan klik “*Search*”.

Identifikasi interaksi antar protein-protein target dilakukan menggunakan *web server String*. Identifikasi dengan membuka laman *String* melalui *web server* <https://string-db.org/>. Nama protein target yang telah divalidasi atau kode protein yang diperoleh dari uniprot dimasukkan pada kolom “*Protein Name*” di *String* dan filter kolom

“*Organism*” dengan memilih *Homo sapiens* lalu memilih menu *search*. Laman baru yang terbuka akan menampilkan protein yang langsung berinteraksi dengan protein target. Data yang diperoleh dapat diunduh melalui menu “*Export*” dalam bentuk TSV dan di tabulasikan ke dalam bentuk Microsoft excel untuk dipilih data protein yang saling berinteraksi. *String* akan melakukan pemetaan pengenalan pada data yang dimasukkan dan menampilkan cakupan jaringan protein yang telah terpetakan beserta interkoneksinya. Dalam *String* juga dilengkapi dengan skor yang menggambarkan tingkat keakuratan dimana semakin besar maka tingkat keakuratan semakin tinggi untuk setiap interaksi protein-protein (Szklarczyk *et al.*, 2020). Oleh karena itu, memilih nilai pada *String* yang menunjukkan skor diatas 0.9

3. Validasi nama gen

Mengakses alamat *web server UniProt* (<https://www.uniprot.org/>) untuk memvalidasi nama gen dari protein target malaria, informasi terkait validasi nama gen dari protein target dicari dengan mengisi menu “*Search*” dengan pilihan pencarian “*UniProtKB*”, dan diisi protein target malaria, kemudian klik “*Search*”. Pada hasil yang muncul, dipilih jenis “*Organism*” *Homo sapiens* (Human).

4. Interaksi senyawa-protein

Mengakses alamat *web server STRING* (<http://stitch.embl.de/>) untuk menganalisis interaksi antara senyawa kimia pada tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum L.*), dan tanaman Sambiloto (*Andrographis Paniculata*) dengan protein target yang telah dianalisis pada interaksi protein-protein. Informasi terkait interaksi senyawa-protein dicari dengan memilih menu pencarian berdasarkan nama senyawa “*Item by name*”, kemudian mengisi nama senyawa pada bagian *SEARCH*, dan klik “*SEARCH*”. Pada pilihan hasil dipilih jenis “*organism*” *Homo sapiens*, dan klik “*CONTINUE*” untuk melihat hasil analisis interaksi senyawa-protein.

5. Prediksi Protein Target

Memprediksi penghambat malaria dilakukan dengan mengakses URL <https://www.ebi.ac.uk/chembl/maip/> . Memasukan *Canonical SMILE* senyawa bioaktif yang ada pada cengkeh dalam format CSV yang berisi maksimal 1 juta senyawa. Hasil berupa file CSV yang berisi informasi dari file yang dimasukkan dan dua kolom tambahan berisikan

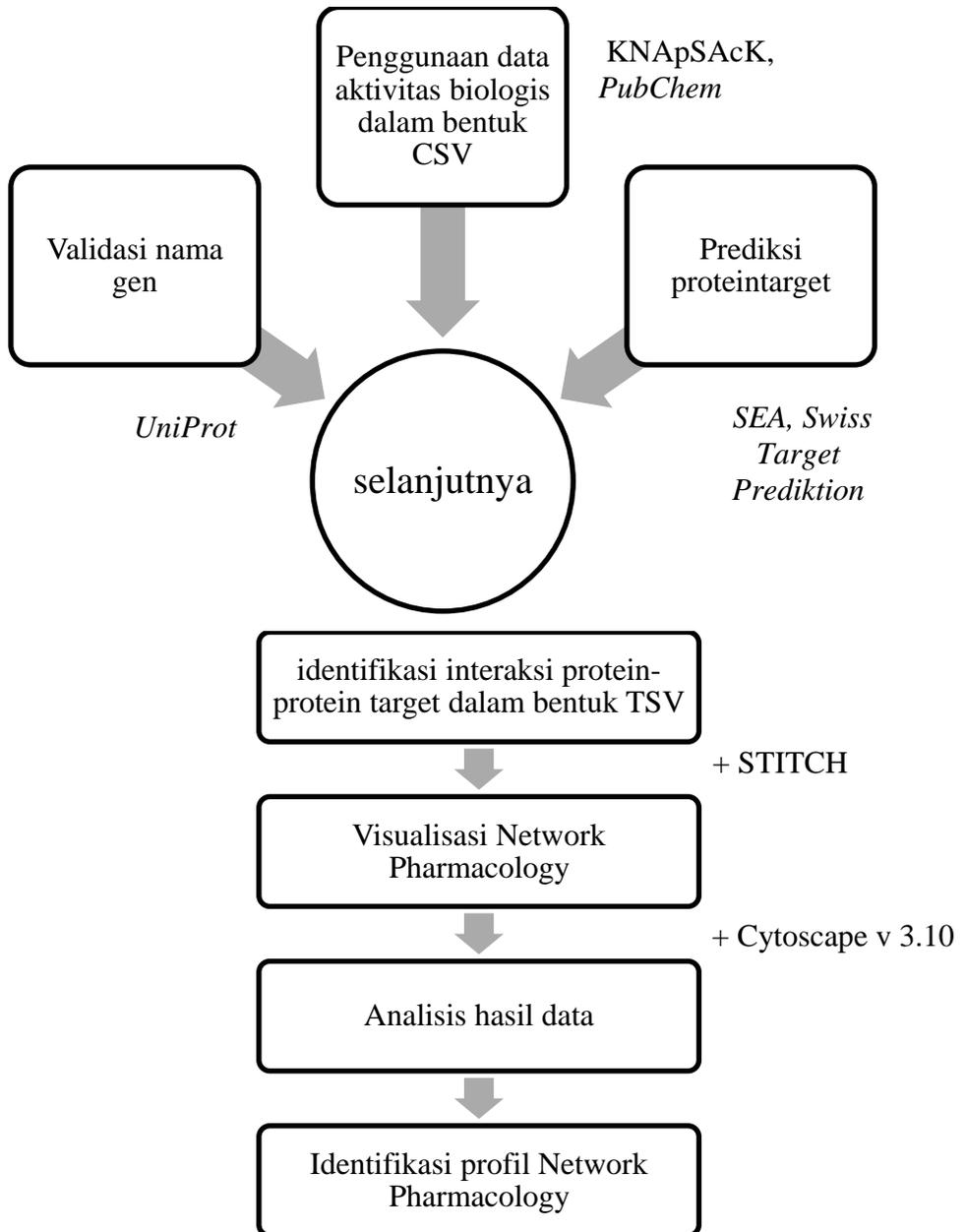
satnadar *SMILE* dan model skor, semakin tinggi skor maka semakin besar kemungkinan senyawa tersebut diprediksi aktif.

Memprediksi protein target dilakukan untuk memperoleh protein target dan senyawa berdasarkan kemiripannya. Prediksi ini menggunakan *web server Swiss Target Prediction* dengan mengakses URL <http://www.swisstargetprediction.ch/> . Memasukkan *Canonical SMILE* senyawa bioaktif yang ada pada cengkeh. Memilih nilai pada *Swiss Target* pada skor di atas 0,7. Hal ini berkaitan dengan tingginya nilai kemiripan protein target dengan senyawa. 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).

Prediksi protein target juga dapat diidentifikasi menggunakan SEA (*Similarity Ensemble Approach*) dengan mengakses URL <https://sea.bkslab.org/> . Data *cannomial SMILE* yang didapat dari *PubChem* dimasukkan kedalam kolom pencarian. Menyeleksi protein berdasarkan angka MaxTc di atas 0,7 dengan organisme homo sapiens, hal ini berkaitan dengan tingginya kemiripan antara protein dengan senyawa (Saharani *et al.*, 2021).

6. Visualisasi profil *Network Pharmacology*

Menggunakan perangkat lunak *Cytoscape v.3.8.2* untuk membentuk profil jejaring farmakologi dari tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum L.*), dan tanaman Sambiloto (*Andrographis Paniculata*) berdasarkan identifikasi, dan analisis yang telah dilakukan. Data interaksi antar protein diperoleh dari data protein yang telah diunduh dalam bentuk TSV dari string yang kemudian ditabulasikan dalam bentuk excel. Hasil tabulasi pada excel divisualisasi untuk melihat bagaimana interaksi antara protein dengan menggunakan perangkat lunak *Cytoscape* dengan mengakses URL <http://www.Cytoscape.org> . Mengumpulkan data bioaktivitas dilakukan dengan mencocokkan hasil tabulasi CSV dari aktivitas kandungan senyawa pada *PubChem* dengan protein target hasil tabulasi dari TSV. Hasil tabulasi data CSV dan TSV ini dianalisis menggunakan *Cytoscape* untuk melihat interaksi antara senyawa dengan protein target dalam membentuk jejaring farmakologi. *Cytoscape* menyediakan cara untuk menginteraksikan, memvisualisasikan, dan menganalisis jaringan *String* termasuk mengintegrasikan data (Szklarczyk *et al.*, 2020).

E. Skema Penelitian**Gambar 22. Jalannya Penelitian**