

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah kandungan senyawa kimia yang terdapat pada daun pulai, serta protein-protein target yang terlibat dalam patofisiologi asma.

Sampel pada penelitian ini adalah kandungan senyawa kimia dari daun pulai seperti alkaloid, terpenoid, flavonoid, serta protein-protein target yang telah diidentifikasi melalui KNApSAcK, PubChem, KEGG *Pathway* dan literatur jurnal lain sebagai bahan pendukung.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama adalah variabel yang terdiri dari variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel utama penelitian ini adalah protein target yang terlibat pada jalur patofisiologi asma.

Variabel kedua penelitian ini adalah protein target yang diprediksi menjadi target kerja senyawa tanaman daun pulai sebagai antiasma.

Variabel ketiga yaitu aktivitas kandungan senyawa pada daun pulai yang berpotensi berikatan dengan protein target asma.

Variabel keempat yaitu profil *network pharmacology* senyawa kimia yang terdapat dalam daun pulai terhadap protein target asma.

2. Klasifikasi Variabel Utama

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

Variabel bebas dari penelitian ini adalah kandungan senyawa daun pulai yang diperoleh dari KNApSAcK dan jurnal-jurnal penelitian.

Variabel terikat dari penelitian ini adalah protein target yang digunakan untuk mengetahui target kerja pada senyawa daun pulai.

Variabel terkendali dari penelitian ini adalah *software* dan *webservice*.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, protein target adalah protein yang dijadikan target kerja senyawa yang terlibat dalam *pathway* asma di KEGG *Pathway*.

Kedua, senyawa kimia adalah senyawa yang terkandung dalam daun pulai yang dapat digunakan sebagai senyawa uji.

Ketiga, aktivitas kandungan senyawa adalah senyawa pada daun pulai yang memiliki aktivitas pada target kerja pada protein target asma.

Keempat, profil *network pharmacology* adalah profil visualisasi hubungan interaksi antara senyawa dan protein target saling berikatan membentuk jejaring *pharmacology* yang memberikan efek antiasma.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah data kandungan senyawa kimia daun pulai serta protein target yang ditabulasikan dalam format CSV dan TSV.

2. Alat

Perangkat keras yang digunakan pada penelitian ini adalah laptop Lenovo ideapad D330-10IGL dengan spesifikasi processor *intel(R) Celeron(R) N4020 CPU@ 1.10GHz*, RAM 8192 MB, Windows 11 pro 64-bit. Perangkat lunak berupa *webservice PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), KEGG *Pathway* (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), KNApSAcK (<http://www.knapsackfamily.com/KNApSAcK/>), *Swiss Target Prediction* (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), STRING (<https://string-db.org/>), SEA (<https://sea.bkslab.org/>), Super-PRED (<https://prediction.charite.de/>), Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), dan *software Cytoscape* versi 3.10.0.

D. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi Interaksi Protein-Protein Target

Analisis protein target menggunakan Venny 2.1.0 (<http://bioinfogp.cnb.csic.e/tools/venny>). Memasukkan protein target yang didapat dari KEGG *Pathway* pada kolom *list 1*, dan protein yang didapat dari *Genecard* dimasukkan dalam *list 2*, selanjutnya klik pada diagram ven yang menunjukkan ketimpang tindihan protein. Memasukkan hasil protein yang tumpang tindih pada excel, protein target yang diperoleh dari venny dilakukan Identifikasi interaksi protein-protein target menggunakan *webservice "String"* dengan membuka laman *webservice* (<https://string-db.org/>). Setelah laman terbuka, pada kotak pencarian "*protein name*" diisi satu persatu. Pada kotak pencarian "*organisms*" 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 memiliki skor diatas 0,9.

2. Validasi Nama Protein Target

Hasil protein target yang diperoleh dari KEGG pathway dan jurnal-jurnal penelitian dilakukan validasi nama protein target dengan menggunakan *webservice* “*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 yang sudah diperoleh kemudian dimasukkan satu persatu kedalam kolom pencarian “*UniProtKB*”, menu UniProtKB berfungsi sebagai kumpulan data biologi molekuler yang menyediakan informasi tentang sekuens protein, kemudian menekan “*search*”. Pada “*popular organisms*” dipilih bagian “*human*”, tujuan dari menu human untuk memfilter bagian protein pada manusia, selanjutnya muncul laman baru yang menampilkan beberapa informasi mengenai kode *entry*, nama protein target, kode protein resmi disertai dengan organismenya.

3. Skrining Zat Aktif terhadap Protein Target

Skrining aktivitas biologi senyawa pada daun pulai dilakukan dengan membuka *webservice* “*PubChem*” (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), lalu masukkan kandungan senyawa kimia daun pulai yang diperoleh dari KNAPSAck, dan jurnal-jurnal penelitian ke dalam kolom pencarian. Selanjutnya, 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 aktif dan data yang memiliki aktivitas terhadap protein target.

4. Prediksi Protein Target dari Senyawa Tanaman

4.1. Prediksi dengan *Swiss Target Prediction*. Prediksi protein target dilakukan untuk memperoleh protein target dan senyawa berdasarkan kemiripannya. Prediksi ini menggunakan *webservice* “*Swiss Target*

Prediction” dengan mengakses laman (<http://www.swisstargetprediction.ch/>). *Canonical SMILE* dari senyawa daun pulai yang diperoleh dari *PubChem* dimasukkan pada kolom “*Paste a SMILES In the 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 *xlsx*, yang kemudian ditabulasikan ke dalam *Microsoft Excel* untuk dilakukan proses eliminasi. Memilih nilai pada *Swiss Target Prediction* pada nilai ambang batasnya yaitu 0,65 untuk kemiripan struktur 2D dan 0,85 untuk kemiripan pada struktur 3D. 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 (Susanti *et al.*, 2021).

4.2. Prediksi dengan *Similarity Ensemble Approach* (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 ke dalam kolom pencarian. Menyeleksi protein berdasarkan angka *MaxTc* di atas 0,7 dengan 40 organisme homo sapiens, hal ini berkaitan dengan tingginya kemiripan antara protein dengan senyawa (Susanti *et al.*, 2021). Mengakses *webserver* pada kotak pencarian “*PubChem-Name*”, masukkan nama senyawa atau pada kotak pencarian “*SMILES*”. Lalu masukkan *canonical SMILE* senyawa bioaktif yang telah didapatkan dari *PubChem*.

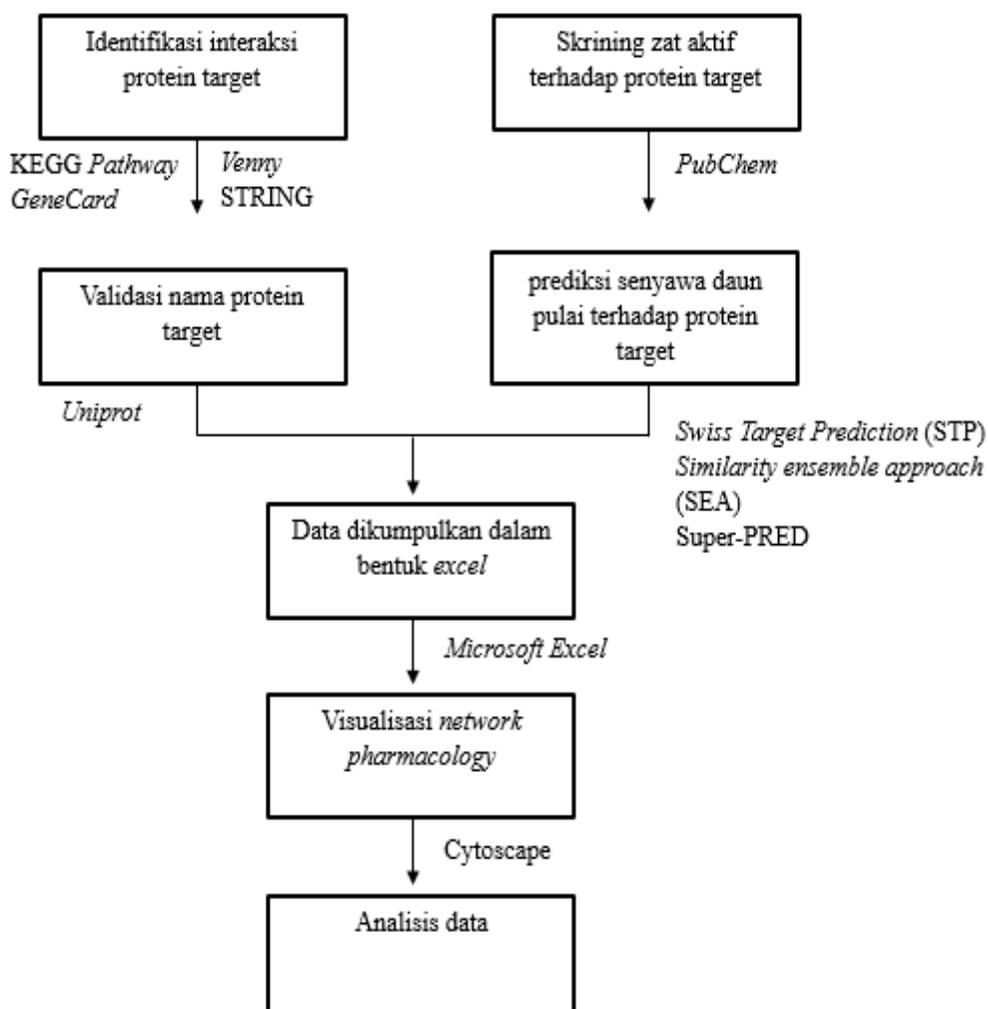
4.3. Prediksi dengan Super-PRED. Prediksi protein dari senyawa dapat juga menggunakan *webserver* Super-PRED, dengan mengakses laman (https://prediction.charite.de/subpages/target_prediction.php), lalu tekan “*target prediction*”. *PubChem-Name* dan *canonical SMILE* dari senyawa daun pulai yang diperoleh 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 protein-protein dan interaksi senyawa-protein dilakukan visualisasi *network pharmacology* dengan

menggunakan *software Cytoscape* versi 3.10.0 atau alamat *software Cytoscape* diakses melalui (<http://www.cytoscape.org>), lalu membuka file yang telah ditabulasi, kemudian tekan menu “*file*”, lalu klik “*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*”, sehingga muncul profil *network pharmacology* yang dibangun. *Cytoscape* menyediakan cara untuk menginteraksikan, memvisualisasikan, dan menganalisis jaringan STRING termasuk mengintegrasikan data (Szkarczyk *et al.*, 2017).

E. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 13. Jalannya penelitian