

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Populasi dan sampel**

Populasi penelitian ini meliputi kandungan senyawa kimia yang terdapat pada rimpang kunyit, serta protein-protein target yang memiliki keterlibatan pada proses patofisiologi *ulserative colitis*.

Sampel pada penelitian ini adalah kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam rimpang kunyit yang telah diidentifikasi melalui KNApSAcK, PubChem, IJAH Analytics, KEGG Pathway, Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Database, dan literatur dari jurnal lain sebagai pendukung.

### **B. Variabel Penelitian**

#### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama dalam penelitian ini meliputi protein target yang terlibat pada patofisiologi penyakit *ulserative colitis*. Variabel kedua meliputi kandungan senyawa kimia dari rimpang kunyit. Variabel ketiga meliputi profil *network pharmacology* kandungan senyawa kimia rimpang kunyit terhadap protein *ulserative colitis*. Variabel keempat yaitu *web server* dan *software* yang digunakan dalam memprediksi hubungan antara protein target dan senyawa dengan protein.

#### **2. Klasifikasi variabel utama**

Penelitian ini memiliki tiga variabel meliputi variabel bebas, variabel terikat, dan variabel kontrol.

**2.1 Variabel bebas.** Variabel bebas meliputi variabel yang diteliti dampaknya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang dipakai dalam penelitian ini adalah kandungan senyawa kimia rimpang kunyit yang diperoleh dari KNApSAcK, Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Database, dan jurnal literatur lain.

**2.2 Variabel terikat.** Variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi nilainya akibat dampak dari variabel bebas. Variabel terikat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi protein target yang digunakan untuk mendapatkan target kerja dari senyawa rimpang kunyit dan mendapatkan profil *network pharmacology*.

**2.3 Variabel terkontrol.** Variabel terkontrol merupakan variabel yang dioperasikan agar tidak mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu dipastikan kualitasnya agar hasil yang didapat

bisa diulang dalam penelitian lain secara akurat. Variabel terkontrol yang dipakai dalam penelitian ini meliputi *web server* dan *software*.

### 3. Definisi operasional variabel

Pertama, protein target merupakan protein yang terlibat pada target kerja patofisiologi *ulserative colitis* dari suatu senyawa kimia rimpang kunyit yang diperoleh dari KEGG *Pathway* dan jurnal-jurnal penelitian yang didapatkan melalui STRING.

Kedua, kandungan senyawa kimia yang terkandung dalam rimpang kunyit yang diperoleh dari KNApSAcK, IJAH *Analytics*, *Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Database*, dan jurnal-jurnal penelitian.

Ketiga, aktivitas kandungan seluruh senyawa rimpang kunyit yang dapat berpotensi memiliki hubungan target kerja terhadap protein target *ulserative colitis* yang diperoleh dari *web server*, *software* dan jurnal-jurnal penelitian.

Keempat, profil *network pharmacology* merupakan hasil visualiasi yang memiliki keterikatan antar senyawa dengan protein target penyakit *ulserative colitis* sehingga dapat menggambarkan aktivitas dari penyakit *ulserative colitis*.

## C. Bahan dan Alat

### 1. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu semua data kandungan senyawa kimia rimpang kunyit, protein target yang dibuat tabulasi dalam format CSV dan TSV serta protein dan gen target pada jalur patofisiologi *ulserative colitis*.

### 2. Alat

**2.1 Perangkat keras.** Perangkat keras yang dipakai pada penelitian ini yaitu terdiri atas laptop Asus X515JP dengan spesifikasi Intel(R) Core (TM) i3-1005G1 (3.4 GHz, Dual Cores) 4 GB DDR4 SSD 512GB, Windows 11 dengan 64-bit operating system.

**2.2 Software dan web server.** KNApSAcK ([http://www.knapsack\\_family.com/KNApSAcK\\_Family/](http://www.knapsack_family.com/KNApSAcK_Family/)), *Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Database* (<https://phytochemical.usda.gov/>), *IJAH Analytics* (<http://ijah.apps.cs.ipb.ac.id/home>), *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), *KEGG Pathway* (<https://www.kegg.jp>), *Uniport Prediction* (<https://www.uniport.org>), *GenCards* (<https://www.gencards.org/>), *STRING* (<https://string-db.org/>),

super-PRED (<https://prediction.charite.de/>), *Swiss Target Prediction* (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), SEA (<https://sea.bkslab.org/>), dan *DrugCentral* (<http://drugcentral.org/>).

#### D. Jalannya Penelitian

##### 1. Identifikasi interaksi protein target penyakit

Analisis protein target menggunakan venny 2.1.0 <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>. Dengan memasukkan protein target yang diperoleh dari KEGG *pathway* pada kolom list 1, dan protein yang didapat dari *Gencard* dimasukkan pada list 2, selanjutnya klik pada diagram ven yang menunjukkan ketumpang tindihan protein, dan memasukkan hasil protein yang tumpang tindih pada excel, protein target yang diperoleh dari venny dilakukan identifikasi interaksi protein target dilakukan dengan menggunakan *web server* STRING dengan membuka laman web server string <https://string-db.org/>. Setelah laman terbuka, pada kotak pencarian "*protein name*" diisi satu persatu pada kotak pencarian "*Organism*" dipilih "*Homo sapiens*" lalu tekan tombol "*Search*". Kemudian tekan "*Continue*", maka laman akan menampilkan hasil interaksi protein dengan protein target. Data yang diperoleh disimpan dan diunduh pada menu "*Exports*" kemudian pilih "*download*" pada bentuk file TSV dan ditabulasikan ke dalam bentuk *Microsoft Excell* untuk dilakukan eliminasi pada protein yang berinteraksi dengan protein target yang memiliki 0,900 skor. Skor tersebut ditujukan untuk melihat kepercayaan perkiraan pada skala nol sehingga skor asosiasi protein fungsional dan menunjukkan kesesuaian antar protein.

##### 2. Validasi nama protein

Hasil protein target yang didapatkan dari KEGG *Pathway* dan jurnal-jurnal literatur dilakukan validasi nama protein dengan menggunakan *webserver* *Uniport* (<https://www.uniprot.org/>). Untuk memperoleh protein target yang diizinkan secara global. Langkah selanjutnya setelah lama terbuka masukkan protein target pada kolom pencarian "*UniPortKB*" tekan "*Search*" pada bagian "*Popular organisms*" pilih bagian "*human*" selanjutnya akan muncul laman baru yang menampilkan beberapa informasi mengenai kode *entry*, nama protein target, dan organismenya.

##### 3. Skrining zat aktif terhadap protein target

Setelah aktivitas senyawa rimpang kunyit diperoleh, selanjutnya dilakukan skrining aktivitas biologi dengan menggunakan *web server*

“PubChem” pada laman (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). Masukkan kandungan senyawa kimia yang didapatkan dari IJAH *Analytics*, KNAPSAcK, *Dr. Dukes’s Phytochemical and Ethnobotanical Database*, dan jurnal-jurnal literatur kedalam *PubChem*. Ketik nama spesies dari tanaman pada kolom pencarian kemudian klik “search” Setelah laman terbuka klik “Compound Best Match” klik senyawa kimia yang dipilih klik “Biological Test results” kemudian pilih “download” dalam bentuk file CSV. Untuk memudahkan dalam analisis hasil dari aktivitas ditabulasikan kedalam *microsoft excel*, lalu seleksi data protein target yang aktif serta memiliki aktivitas terhadap protein target hasil identifikasi.

#### 4. Prediksi protein target dari senyawa rimpang kunyit

Identifikasi protein target dari senyawa prediksi dengan menggunakan *web server Swiss Target Prediction* dan *Similarity Ensemble Approach*.

**4.1 Swiss target prediction.** Membuka *web server Swiss Target Prediction* pada laman (<http://www.swistargetprediction.ch/>). Setelah laman terbuka masukkan *canonical SMILE* dari senyawa bioaktif rimpang kunyit yang didapatkan dari *PubChem* tambahkan pada kolom “Paste a SMILES in this box, or draw a molecule” klik menu “predict targets”. Laman akan muncul memberikan data informasi target beserta dengan gambar struktur, kemudian format file diunduh dalam bentuk *xlsx* yang kemudian ditabulasikan ke dalam *microsoft excel* untuk dilakukan proses eliminasi. Pilih nilai *Swiss Target Prediction* pada nilai 0,65 untuk kemiripan pada struktur 2D dan 0,85 untuk kemiripan pada struktur 3D. Pada *Swiss Target Prediction* terdapat keterangan berwarna hijau berupa bar *probability* yang memperlihatkan semakin tinggi nilai *probability* maka prediksi protein target semakin tepat (Gfeller *et al.*, 2014).

**4.2 Similarity ensemble approach (SEA).** Prediksi protein menggunakan SEA dengan membuka laman (<https://sea.bkslab.org/>). Data *Canonical SMILE* yang diperoleh dari *PubChem* dimasukkan dalam kolom pencarian “paste SMILES or try the example below” kemudian klik “try SEA”. Data yang diperoleh diunduh dengan format file *zip*, selanjutnya ekstrak dalam file *excel* dan ditabulasikan menggunakan *microsoft excel* kemudian seleksi dengan cara eliminasi protein yang memiliki nilai *MaxTc* diatas 0,7 karena memperlihatkan kesamaan molekuler dari struktur kimia senyawa kueri yang ditampilkan sebagai SMILES, dan telah melalui proses komputasi pada *web server*

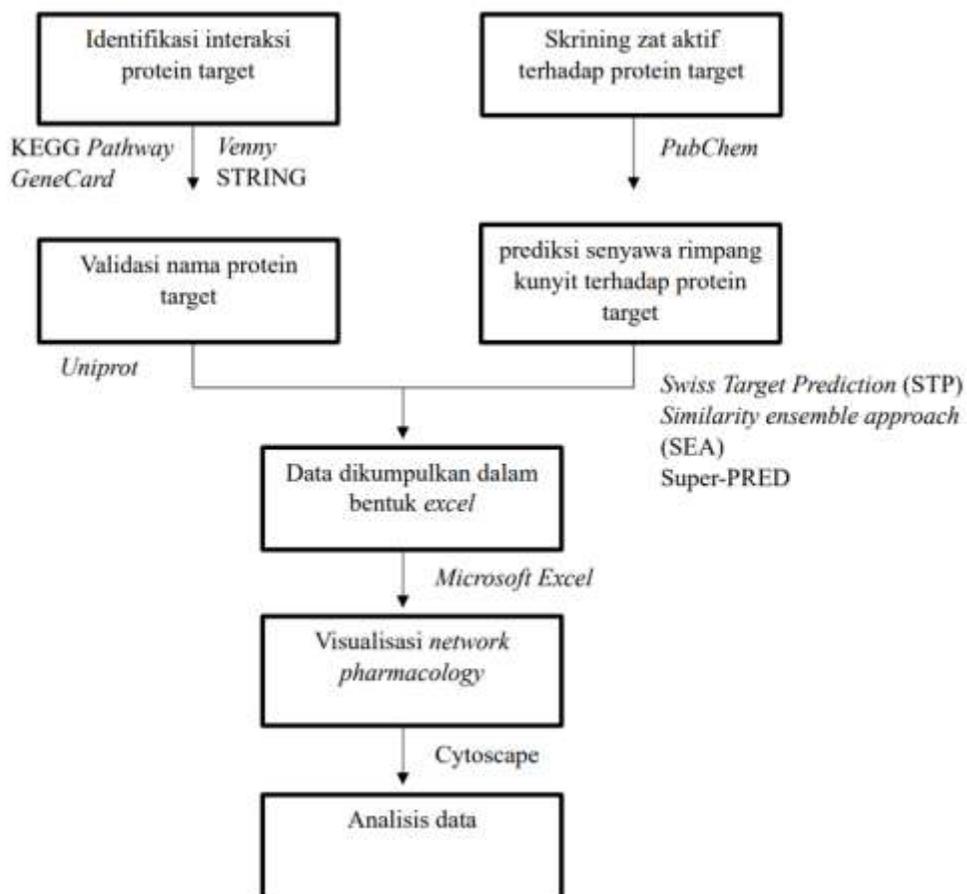
dengan protein target, sehingga kesamaan molekuler dapat diperkirakan bahwa senyawa kueri bekerja pada protein target hasil perkiraan.

**4.3 Super-PRED.** Prediksi protein dari senyawa rimpang kunyit dapat juga menggunakan web server Super-PRED, dengan mengakses pada laman (<https://prediction.charite.de/>), lalu tekan “target prediction”. Pubchem-Name dan canonical SMILE dari senyawa bioaktif rimpang kunyit 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***

Dari data hasil analisis interaksi protein-protein dan hasil interaksi senyawa yang sudah diunduh dalam bentuk TSV dari string yang telah ditabulasi dilakukan visualisasi *network pharmacology* melalui software *Cytoscape* versi 3.9.0 pada laman (<http://www.cytoscape.org>). Hasil yang diperoleh dilakukan analisis interaksi senyawa protein untuk membentuk profil *network pharmacology* dari rimpang kunyit. File yang sudah ditabulasi dianalisis menggunakan software *Cytoscape* dengan cara menekan menu *file* kemudian *import* dan memilih menu “*network from file*” cari file tabulasi kemudian klik “*open*” dan “*import network from table*” klik node 1 “*source node*” dan node 2 “*target node*” klik “*OK*” dan profil *network pharmacology* dapat dilakukan *custom* klik menu “*style*” ganti dari “*default*” ke *custom* pilihan. Profil *network* dapat juga dilakukan dengan *custom* warna *node* pada bagian “*properties*” kemudian klik *node* dan klik “*fill color*” dipilih warna yang diinginkan pada kolom “*Colors*” pada bagian “*swatches*” dan dipilih “*OK*”.

### E. Skema jalannya penelitian



Gambar 11. Skema jalannya penelitian