

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah keseluruhan unit atau individu dalam ruang lingkup yang ingin diteliti. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandungan senyawa kimia yang terdapat pada tanaman seledri dan buah mengkudu serta protein-protein target yang terlibat dalam patofisiologi hipertensi.

Sampel adalah bagian dari populasi yang ingin diteliti, yang ciri-ciri dan keberadaan diharapkan mampu mewakili keberadaan populasi yang sebenarnya. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah kandungan kimia dari tanaman seledri dan buah mengkudu yang diperoleh dari KNApSAcK, *PubChem*, dan jurnal-jurnal penelitian yang berpotensi sebagai antihipertensi.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

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

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

Variabel kedua penelitian ini adalah protein target yang diprediksi menjadi target kerja senyawa senyawa tanaman seledri dan buah mengkudu sebagai antihipertensi.

Variabel ketiga yaitu aktivitas kandungan senyawa pada tanaman seledri dan buah mengkudu yang berpotensi berikatan dengan protein target hipertensi.

Variabel keempat yaitu profil *network pharmacology* senyawa kimia yang terdapat dalam tanaman seledri dan buah mengkudu terhadap protein target hipertensi.

2. Klasifikasi variabel utama

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

Variabel bebas dari penelitian ini adalah kandungan senyawa tanaman seledri dan buah mengkudu yang diperoleh dari KNApSAcK dan jurnal-jurnal penelitian.

Variabel terikat dari penelitian ini adalah protein target yang digunakan untuk mengetahui target kerja pada senyawa tanaman seledri dan buah mengkudu.

Variabel terkendali dari penelitian ini adalah *software* atrau *webserver*.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

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

Kedua, senyawa kimia adalah senyawa yang terkandung dalam tanaman seledri dan buah mengkudu yang dapat digunakan sebagai senyawa uji.

Ketiga, aktivitas kandungan senyawa adalah senyawa pada tanaman seledri dan buah mengkudu yang memiliki aktivitas pada target kerja pada protein target hipertensi.

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

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Perangkat keras terdiri atas laptop ASUS AMD Ryzen 3 3250U with Radeon Graphics 2.60 GHz, RAM 8,00 GB, Windows 11 Home Single Language versi 22H2. Perangkat lunak berupa *web server* KNApCAcK Family (http://www.knapsackfamily.com/knapsack_core/top.php), KEGG *Pathway* (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), IJAH Analytics (<http://ijah.apps.cs.ipb.ac.id/#/home>), UniProt (<https://www.uniprot.org/>), Genecard (<https://www.genecards.org/>), String (<https://string-db.org/>), Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), SEA (<http://sea.docking.org/>), Software Cytoscape v.3.9.1.

2. Bahan

Kandungan senyawa kimia pada tanaman seledri dan buah mengkudu dan protein target yang disajikan dalam format CSV dan TSV.

D. Jalannya Penelitian

1. Validasi nama gen

Protien target yang diperoleh dari KEGG *Pathway* dan jurnal-jurnal penelitian divalidasi nama gen dengan *webserever* “UniProt” (<https://www.uniprot.org/>). Buka laman pada google, setelah laman terbuka masukkan nama protein target pada kolom “UniProtKB”, selanjutnya tekan “search”. Pada kolom “popular organism” dipilih “human” selanjutnya pada tabel “entery” dipilih kode dari nama protein target yang dicari (Dhafir, 2020). Selain UniProt juga divalidasi menggunakan *webserver* Genecard (<https://www.genecards.org/>). Buka laman pada google, setelah laman terbuka masukkan penyakit pada kolom “explore gen”, download hasil pencarian protein dalam bentuk excel.

2. Skrining data aktivitas biologi

Senyawa kimia yang sudah didapatkan dari KNApSACk dan jurnal-jurnal penelitian dilakukan skrining aktivitas senyawa menggunakan *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Buka laman *PubChem*, setelah laman terbuka memasukkan nama senyawa ke kolom pencarian. Selanjutnya dipilih “compound” maka akan muncul laman baru, kemudian dipilih “biological test result”. Kemudian pada “bioAssay result” pada pojok kanan atas diklik “download” pilih format file dalam bentuk “CSV”, selanjutnya hasil aktivitas biologi ditabulasikan dalam bentuk Microsoft Exel. Selanjutnya, menyeleksi dengan memilih yang memiliki aktivitas “activity” (RD *et al.*, 2021).

3. Identifikasi interaksi protein-protein

Identifikasi interaksi antar protein-protein target menggunakan *webserver* “String” (<https://string-db.org/>). Membuka laman, setelah laman terbuka masukkan nama protein atau kode *UniProt* pada kolom “protein name”. Pada kotak pencarian “organism” dipilih “homosapiens” lalu klik “search”. Menekan “continue” laman baru akan muncul menampilkan protein yang berinteraksi dengan protein target. Data yang diperoleh disimpan dengan menekan menu “eksport” dipilih “download” dalam bentuk “TSV”.

4. Prediksi protein target

Memprediksi protein taget dari senyawa bioaktif dilakukan menggunakan *webserver* *Swiss Target Prediction* (STP), membuka *webserver* *Swiss Target Prediction* (<http://www.swisstargetprediction.ch/>). Memasukkan SMILE yang

diperoleh dari PubChem senyawa bioaktif pada kolom “*paste a SMILE in this box, or draw a molecule*” diklik menu “*predict targets*”. Data yang diperoleh diunduh dalam bentuk .xlsx untuk dilakukan eliminasi protein yang memiliki skor probability diatas 0,65 pada struktur 2D dan 0,85 pada struktur 3D. Hal ini berkaitan dengan nilai kemiripan protein target dengan senyawa, semakin tinggi nilai *probability* maka semakin akurat prediksi protein target (L *et al.*, 2021).

Prediksi protein target juga diidentifikasi menggunakan *Similarity Ensemble Approach* (SEA). Membuka webserver SEA (<https://sea.bkslab.org/>) . Memasukkan SMILE yang diperoleh dari PubChem pada kolom “*paste SMILES or try the example below*”. Dilakukan seleksi protein berdasarkan angka MaxTc lebih dari 0,7. Semakin tinggi nilai MaxTc maka semakin tinggi kemiripan antara protein dan senyawa.

Selain STP dan SEA prediksi protein target juga dapat dilakukan menggunakan *webserver* Super-PRED. Membuka laman Super-PRED

(https://prediction.charite.de/subpages/target_prediction.php) .

Memasukkan nama senyawa yang diperoleh dari *PubChem* pada kolom *Pubchem-Name* dan data SMILE yang diperoleh dari Pubchem dimasukkan pada kolom SMILE, kemudian klik “*Start Calculation* “. Mengunduh hasil prediksi dalam bentuk excel, lakukan eliminasi pada skor *probability* dan model *accuracy* kurang dari 85%.

4. Analisis protein source dan protein target

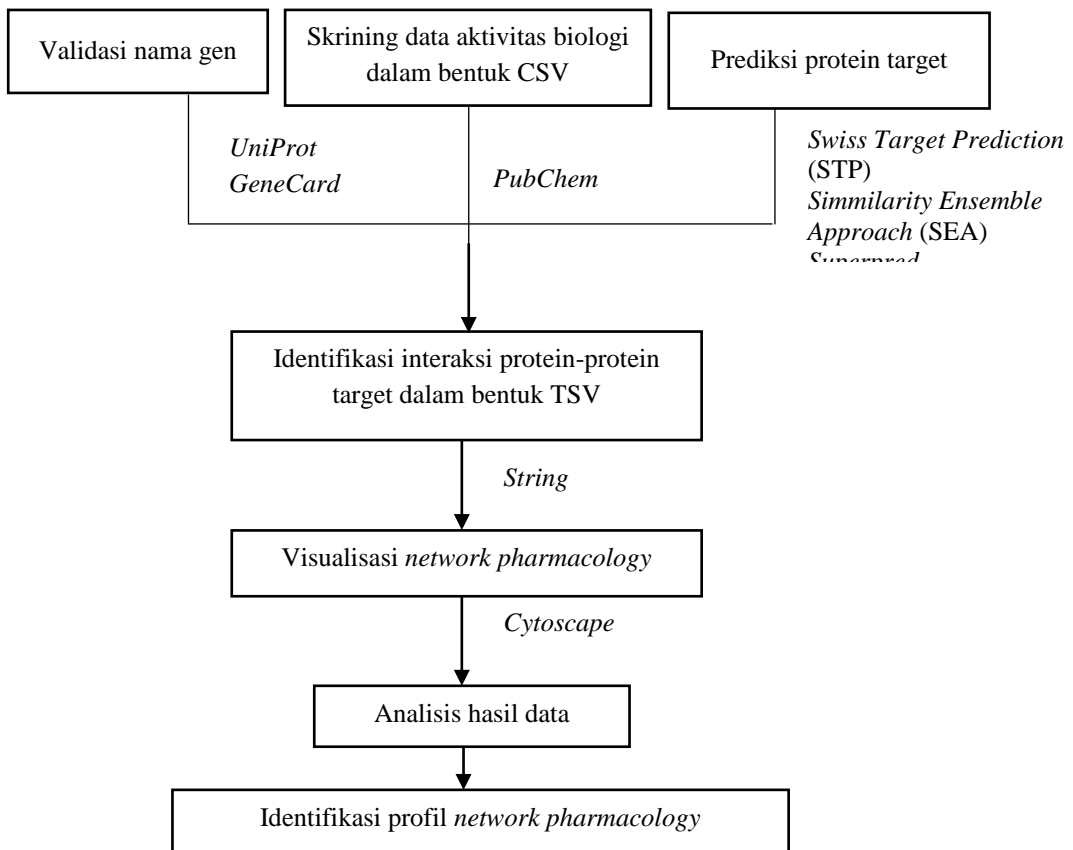
Analisis protein source dan protein target menggunakan Venny 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>). Memasukkan protein target yang didapat dari KEGG *Pathway* pada kolom *list 1*, dan protein yang didapat dari *Genecard* atau *Pubchem* dimasukkan dalam *list 2*, selanjutnya klik pada diagram ven yang menunjukkan ketumpang tindihan protein. Memasukkan hasil protein yang tumpang tindih pada excel.

5. Visualisasi network pharmacology

Hasil interaksi protein-protein dan interaksi senyawa-protein divisualisasikan menggunakan *soft ware cytoscape* versi 3.9.1. File yang ditabulasikan menjadi excel di “*import*” dan mengklik “*network from file*”, selanjutnya pada “*network file to load* ” selanjutnya klik “*open*”. Selanjutnya laman menampilkan kotak “*import network from table*” lalu klik “*ok*”, sehingga muncul profil *network pharmacology*.

Nodes pada *cytoscape* menggambarkan molekul seperti senyawa dan protein, sedangkan *edges* menggambarkan interaksi antar molekul.

E. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 18. Jalannya penelitian