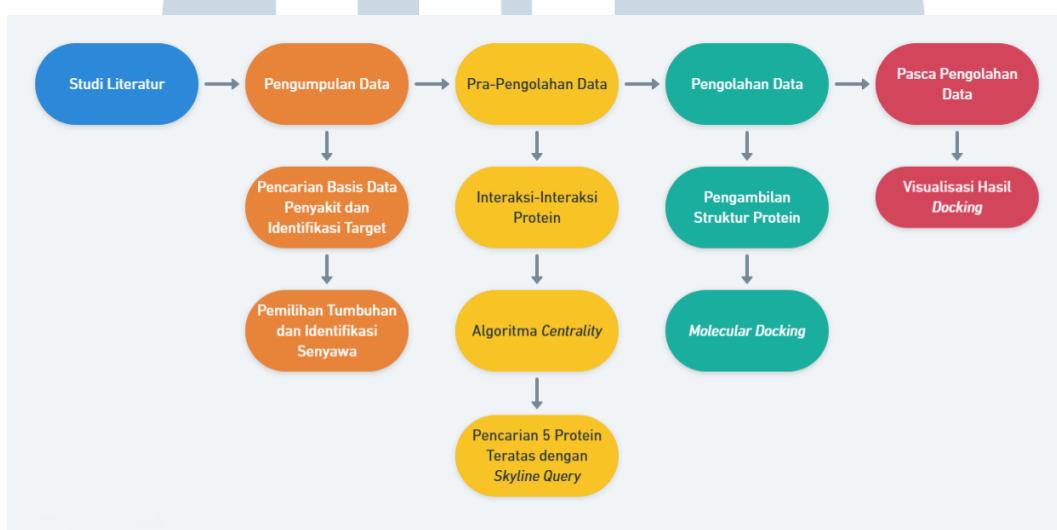


## BAB 3

### METODOLOGI PENELITIAN

Pada bab ini menjelaskan metode penelitian yang digunakan secara sistematis dalam penelitian ini, dengan penjelasan secara berurutan mulai dari pengumpulan data awal hingga pembuatan dokumen akhir. Metode ini mengikuti proses yang teratur untuk mengidentifikasi penyakit yang dituju serta melakukan analisis senyawa yang berasal dari tumbuhan.



Gambar 3.1. Alur Metodologi Penelitian.

Gambar 3.1 menjelaskan langkah-langkah dalam proses penelitian yang dimulai dengan tinjauan literatur untuk membentuk dasar teori. Selanjutnya, masuk ke tahap pengumpulan data yang mencakup pencarian sumber informasi mengenai penyakit serta pemilihan jenis tumbuhan. Pada fase pra-pengolahan data, dilakukan pemurnian data melalui analisis interaksi protein dan penerapan metode algoritma centrality, serta menggunakan algoritma skyline query untuk memperoleh lima kandidat target utama. Pada tahap pengolahan data utama, dilakukan pengambilan struktur protein dan pelaksanaan simulasi docking molekuler untuk mengevaluasi interaksi antara senyawa dan protein. Sebagai tahap akhir, dilakukan proses pasca-pengolahan data berupa visualisasi hasil untuk memudahkan pemahaman, penyampaian, serta dokumentasi secara sistematis.

### 3.1 Studi Literatur

Studi literatur ini menjelaskan jurnal utama yang digunakan sebagai acuan dalam menyusun metode penelitian. Penelitian "*Unveiling the anti-obesity potential of Kemuning*" menerapkan pendekatan farmakologi jaringan yang terintegrasi dengan teknik *molecular docking* untuk mengidentifikasi mekanisme anti-obesitas dari tanaman *Murraya paniculata*[13]. Dengan menggunakan teknik *skyline query* (BNL), penelitian tersebut menentukan target utama seperti EP300 dan PPARG (serta PPARGC1A), lalu memverifikasi hasilnya melalui simulasi dinamika molekuler dan uji *in vitro*[13]. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kompleks protein-ligan yang dipilih dapat dievaluasi dalam hal stabilitas dengan bantuan dinamika molekuler, sedangkan validasi *in vitro* menunjukkan penurunan ekspresi gen target (misalnya PPARG dan EP300) pada model sel yang digunakan, sehingga memberikan dasar ilmiah untuk temuan mekanistik yang diajukan[13].

Di sisi lain, penelitian "*Network Pharmacology and Molecular Mechanism of Traditional Indonesian Medicine in Hypertension Treatment*" menjelaskan mekanisme farmakologis dari formulasi herbal Indonesia dalam pengobatan hipertensi dengan menganalisis farmakologi jaringan, termasuk penyaringan senyawa berdasarkan parameter bioavailabilitas oral dan kemiripan obat (*drug similarity/drug-likeness*)[3]. Penelitian ini melaporkan bahwa 44 senyawa yang teridentifikasi memenuhi kriteria bioavailabilitas dan kemiripan obat[3].



Tabel 3.1. Ringkasan Studi Literatur *Network Pharmacology*.

JUDUL (TAHUN)	PENULIS	HASIL PENELITIAN	GAP PENELITIAN
Unveiling the anti-obesity potential of Kemuning ( <i>Murraya paniculata</i> ): A network pharmacology approach (2024)	R. Fatriani, F. A. K. Pratiwi, A. Annisa, <i>et al.</i>	Penelitian ini menetapkan bahwa <i>Murraya paniculata</i> memiliki potensi anti-obesitas yang signifikan dengan menargetkan protein EP300 dan PPARG untuk mengganggu pematangan adiposit dan metabolisme lipid intraseluler. Metode yang digunakan adalah <i>Skyline Query (BNL)</i> , <i>Docking &amp; Molecular Dynamics</i> , <i>In Vitro (Cell Culture)</i>	Meskipun penelitian ini telah memberikan validasi struktural dan <i>in vitro</i> yang cukup mendalam, penelitian ini memiliki keterbatasan dalam fokusnya yang hanya terbatas pada satu spesies tumbuhan dan kondisi obesitas yang terisolasi. Penelitian yang sedang berlangsung sebaiknya menekankan pada pengembangan pipeline validasi yang lebih luas, termasuk dinamika molekuler dan metode konsensus, untuk menguji bagaimana target metabolik ini berfungsi dalam formulasi herbal yang menggunakan beberapa bahan, serta dampaknya secara menyeluruh terhadap kondisi kesehatan tertentu.

Berlanjut di halaman berikutnya

**Tabel 3.1 Lanjutan**

JUDUL (TAHUN)	PENULIS	HASIL PENELITIAN	GAP PENELITIAN
Network Pharmacology and Molecular Mechanism of Traditional Indonesian Medicine in Hypertension Treatment (2024)	L. A. Setiani, F. C. Saputri, A. Yanuar, <i>et al.</i>	Studi ini menemukan bahwa formula herbal tradisional Indonesia dapat mengobati hipertensi dengan memanfaatkan 44 senyawa bioaktif untuk mengatur jalur pensinyalan HIF-1, relaxin, PI3K, dan MAPK. Metode yang digunakan meliputi analisis Bioavailabilitas Oral/DL, Network	Pathway Analysis, serta Database Enrichment (KEGG). Penelitian ini berhasil mengidentifikasi jalur sinyal yang luas dalam formula herbal kompleks, meskipun masih terbatas karena kurangnya validasi struktural, seperti docking molekuler atau simulasi dinamika, untuk memastikan ikatan antara ligan dan protein secara nyata. Penelitian di masa depan perlu fokus pada pengisian celah ini dengan menerapkan analisis struktural berkekuatan tinggi dan algoritma peringkat konsensus untuk memverifikasi stabilitas fisik serta interaksi dari 44 senyawa bioaktif yang diprediksi terhadap protein targetnya.

Integrasi pengobatan tradisional Indonesia ke dalam kerangka terapeutik modern semakin kuat berkat pendekatan farmakologi jaringan, seperti yang ditunjukkan dalam studi Fatriani dkk.(2024) dan Setiani dkk.(2024)[13][3]. Kedua

penelitian tersebut menunjukkan perkembangan metodologis yang konsisten, yaitu berkembang dari konstruksi jaringan skala besar menuju validasi yang lebih akurat pada tingkat struktur dan fungsional molekuler[13][3]. Setiani dkk. menekankan pemetaan target dan analisis jalur untuk menjelaskan mekanisme kerja formulasi herbal, sedangkan Fatriani dkk. memperluas *pipeline* komputasional dengan menambahkan *molecular docking*, dinamika molekuler, serta uji *in vitro* untuk memvalidasi hipotesis mekanistik[13][3]. Secara keseluruhan, transisi ini menunjukkan pentingnya strategi penyaringan dan prioritas target yang ketat untuk menghubungkan pengetahuan etnobotani dengan kedokteran molekuler berbasis bukti, serta menjadi dasar rasional bagi penerapan seleksi multi-kriteria berbasis ukuran topologi jaringan dalam penelitian ini[13][3].

### **3.2 Data Gathering**

Proses *data gathering* melibatkan pengumpulan data tentang senyawa, gen penyakit/target, dan interaksi protein yang relevan untuk membentuk dasar analisis jaringan. Data senyawa dari Temu Lawak, Kayu Putih, dan Bawang Merah diperoleh dari dua basis data fitokimia/metabolit yaitu *IJAH Analytics* dan *KNAPSAcK*. Hasil utama adalah identifikasi senyawa, nama senyawa, representasi struktural (misalnya *SMILES* atau struktur 2D–3D), dan ID basis data, yang digunakan sebagai masukan untuk fase prediksi target. Selain itu, data tentang gen/target yang terkait dengan *diabetes mellitus* dikumpulkan dari beberapa basis data referensi seperti *GeneCards*, *OMIM*, *MalaCards*, dan *UniProt*. Untuk membangun jaringan *protein-protein interaction* (PPI), gen atau protein yang dipilih akan dipetakan dan dianalisis menggunakan *STRING*, yang menyediakan jaringan hubungan protein-protein dan mendukung analisis fungsional tambahan[14].

#### **3.2.1 Pengumpulan Data**

Fase pertama pengumpulan data mencakup penelitian menyeluruh terhadap basis data penyakit dengan mengacu pada sumber-sumber yang diakui secara resmi, yaitu:

##### **A. Pencarian Target Penyakit Utama**

Akses basis data *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM), UniProt, MalaCards, dan GeneCards untuk mengidentifikasi penyakit target dan memperoleh informasi penyakit yang relevan.

## **B. Validasi Perbandingan Penyakit dan Identifikasi Target Protein**

Gunakan basis data IJAH dengan memasukkan OMIM-ID yang diperoleh dari langkah sebelumnya untuk memvalidasi informasi penyakit. Akses basis data OMIM[15], UniProt[16], MalaCard[17], dan GeneCards[18], setelah itu masukkan informasi penyakit target untuk mengidentifikasi target protein yang terkait.

### **3.2.2 Pemilihan Tumbuhan dan Identifikasi Senyawa**

#### **A. Pemilihan Tumbuhan Herbal**

Tahap berikutnya dimulai dengan membuka basis data IJAH. Setelah itu, informasi mengenai penyakit yang telah dikenali digunakan sebagai parameter pencarian untuk menemukan hubungan antara penyakit tersebut dengan kandidat tumbuhan herbal. Dari hasil pencarian, dipilih tumbuhan herbal yang menunjukkan kemungkinan manfaat terapeutik terhadap penyakit yang dituju, sebagai dasar dalam pengumpulan data senyawa dan analisis lebih lanjut.

#### **B. Pengumpulan Data Senyawa Tumbuhan**

Fase ini bertindak sebagai dasar penelitian dengan membentuk dataset yang menghubungkan pengobatan herbal tradisional dan biologi molekuler modern melalui dua pendekatan utama, yaitu

- (a) Identifikasi dan validasi target biologis yang terkait dengan penyakit yang diteliti.
- (b) Pemilihan tumbuhan obat serta metabolit aktifnya secara sistematis.

Pada tahap ini, integrasi data dari berbagai basis data bioinformatika memastikan bahwa konstruksi jaringan selanjutnya didasarkan pada senyawa yang memiliki bioavailabilitas tinggi serta didukung oleh informasi interaksi protein yang telah tervalidasi. Senyawa aktif dari tumbuhan herbal, yaitu temu lawak, kayu putih, dan bawang merah, beserta protein terkait dikumpulkan untuk masing-masing tanaman dari basis data *IJAH Analytics*[19] dan *KNAPSAcK*[20] dengan menggunakan nama ilmiah sebagai kata kunci pencarian (*Curcuma xanthorrhiza*, *Allium ascalonicum*, dan *Melaleuca cajuputi*). *IJAH Analytics* menyediakan data tanaman obat Indonesia,

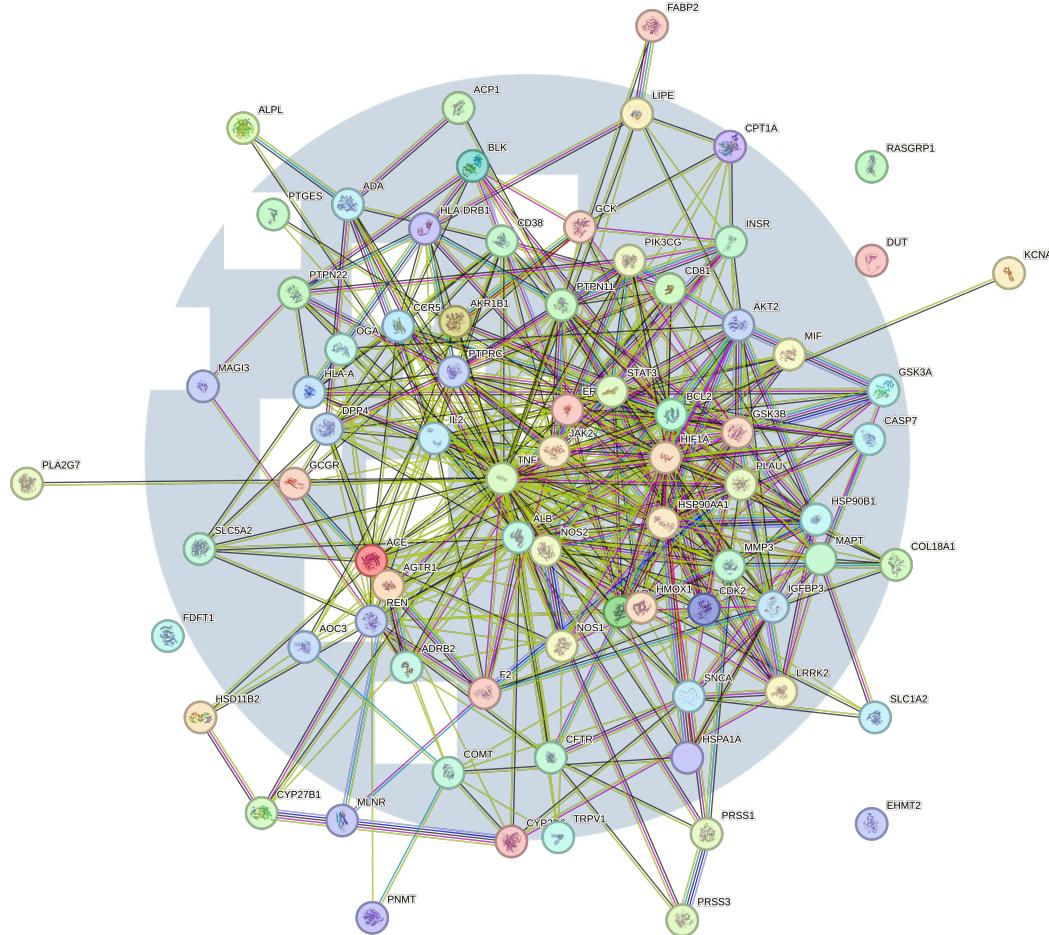
sedangkan *KNApSAcK* menyediakan informasi senyawa yang diperoleh secara global. Setelah daftar senyawa selesai dikumpulkan, senyawa yang duplikat dilakukan *remove-duplicate* menggunakan *Venny*[21], yaitu alat berbasis web yang membantu pembuatan diagram Venn serta verifikasi irisan himpunan data.

### 3.3 Pra-Pengolahan dan Pengolahan Data

Fase pra-pengolahan dan pengolahan data dilakukan untuk memastikan konsistensi, jejak, dan kualitas data sebelum analisis jaringan. Data senyawa, bersama dengan data gen dan protein yang dikumpulkan dari berbagai sumber data, digabungkan dan distandarisasi, termasuk penggunaan simbol gen yang sama dan anotasi identitas protein menggunakan ID UniProt, sambil menghilangkan data yang tidak valid[22]. Duplikasi diperiksa, dihapus, dan verifikasi persimpangan nya antara himpunan dilakukan menggunakan diagram Venn untuk memeriksa konsistensi antara target senyawa dan gen atau protein diabetes dan untuk mendapatkan kandidat persimpangan yang relevan[3].

#### 3.3.1 Protein-Protein Interaction

Langkah berikutnya, kandidat senyawa disortir berdasarkan skor bioavailabilitas dan kemiripan obat untuk menentukan senyawa dengan potensi yang lebih besar, evaluasi ini dilakukan menggunakan *SwissADME*[23] dan *Molsoft*[24], dengan menggunakan batas standar yang umum digunakan yaitu *Oral-Bioavailability* (OB)  $\geq 0.5$  dan *Drug-Likeness* (DL)  $> 0$ , Senyawa yang memenuhi kriteria kemudian digunakan sebagai input dalam format *SMILES* ke *SwissTargetPrediction*[link swisstarget] untuk memprediksi target protein manusia (*Homo sapiens*) dengan membandingkan kesamaan dan menggunakan metode *reverse screening*. Target yang dihasilkan kemudian dipetakan kembali ke *UniProt* untuk menstandarkan identitasnya. Selain itu, target protein yang diprediksi akan dibandingkan dengan kumpulan gen atau protein yang terkait dengan diabetes, dan dari kedua kumpulan tersebut diidentifikasi sebagai kandidat target potensial untuk konstruksi jaringan dan analisis topologi.



Gambar 3.2. Interaksi-Interaksi Protein

Data interaksi protein–protein (PPI) pada gambar 3.2 adalah hasil perpotongan antara target senyawa dan gen/protein diabetes yang digunakan untuk membuat jaringan interaksi protein-protein (PPI) menggunakan basis data *STRING*[link string], dengan parameter *confidence score* diatur pada tingkat *medium confidence* (0.400).

### 3.3.2 Konstruksi Jaringan dan Algoritma *Centrality*

Setelah jaringan PPI terbentuk, analisis topologi dilakukan menggunakan *Python*. Dalam analisis ini, beberapa metrik seperti *degree*, *betweenness*, *closeness*, dan *eigenvector centrality* akan dihitung. Beberapa metrik sentralitas digunakan karena definisi “*important nodes*” dalam suatu jaringan dapat bervariasi tergantung pada metrik yang digunakan dan struktur jaringannya. Hal ini memungkinkan pemilihan *important nodes* yang lebih komprehensif dan akurat[7]. Tahap ini

bertujuan untuk mencari *degree*, *betweenness*, *closeness*, dan *eigenvector* dengan menggunakan algoritma *centrality*:

```
1 # Baca adjacency matrix
2 df = pd.read_excel("adjacency_matrix.xlsx", index_col=0)
3
4 print("Adjacency matrix loaded successfully!")
5 print(df.head())
6
7 # Buat graph dari adjacency matrix
8 G = nx.from_pandas_adjacency(df)
9 print(f"Graph created: {G.number_of_nodes()} nodes, {G.
    number_of_edges()} edges")
10
11 # Hitung semua centrality
12 degree_centrality = nx.degree_centrality(G)
13 betweenness_centrality = nx.betweenness_centrality(G)
14 closeness_centrality = nx.closeness_centrality(G)
15 eigenvector_centrality = nx.eigenvector_centrality(G, max_iter
    =1000)
16
17 # Gabungkan hasil ke satu DataFrame
18 centrality_df = pd.DataFrame({
19     'Degree Centrality': degree_centrality,
20     'Betweenness Centrality': betweenness_centrality,
21     'Closeness Centrality': closeness_centrality,
22     'Eigenvector Centrality': eigenvector_centrality
23 })
24
25 print("\n==== CENTRALITY RESULTS ====")
26 print(centrality_df.sort_values(by='Degree Centrality', ascending=
    False).head(10))
```

Kode 3.1: Implementasi Algoritma Centrality

### 3.3.3 Algoritma *Skyline Query*

Berdasarkan nilai *centrality* yang diperoleh, pemilihan kandidat target utama dilakukan menggunakan *skyline query* untuk menentukan *node* yang tidak dikalahkan oleh kandidat lain dalam semua metrik secara bersamaan. Pendekatan ini memungkinkan pemilihan berdasarkan *multiple criteria* tanpa memberikan bobot tunggal untuk menggabungkan semua metrik, dan sering digunakan dalam

pemrosesan data multidimensi untuk mengidentifikasi kandidat terbaik[11]. Hasil akhir dari langkah ini adalah 5 protein teratas menggunakan algoritma *skyline query* dipilih sebagai prioritas untuk tahap validasi berikutnya.

```
1 import pandas as pd
2
3 # Dataset centrality
4 data = {
5     "Display_Name": [
6         "TNF", "ALB", "BCL2", "STAT3", "HIF1A", "HSP90AA1", "IL2", "ERBB2
7         ", "ACE", "GSK3B",
8         "PTPRC", "REN", "JAK2", "DPP4", "HMOX1", "AGTR1", "PTPN11", "
9         HSP90B1", "AR", "IGFBP3",
10        "SNCA", "CCR5", "CDK2", "MMP3", "NOS2", "NOS1", "MAPT", "PIK3CG
11        ", "AKT2", "CD38",
12        "PLAU", "HLA-A", "INSR", "ADRB2", "F2", "CD81", "HLA-DRB1", "
13        LRRK2", "COMT", "GCK",
14        "CASP7", "PTPN22", "CFTR", "AKR1B1", "ADA", "MIF", "GSK3A", "LIPE
15        ", "BLK", "SLC5A2",
16        "HSPA1A", "GCGR", "CYP2D6", "CPT1A", "COL18A1", "CYP27B1", "OGA
17        ", "AOC3", "PRSS1",
18        "SLC1A2", "HSD11B2", "TRPV1", "PRSS3", "PTGES", "PNMT", "MLNR", "
19        MAGI3", "ACP1",
20        "FABP2", "ALPL", "PLA2G7", "KCNA3"
21    ],
22    "Degree_Centrality": [...],
23    "Betweenness_Centrality": [...],
24    "Closeness_Centrality": [...],
25    "Eigenvector_Centrality": [...]
26 }
27
28 df = pd.DataFrame(data)
29
30 # Fungsi dominance (Skyline - BNL)
31 def dominates(a, b):
32     return all(x >= y for x, y in zip(a, b)) and any(x > y for x,
33             y in zip(a, b))
34
35 def skyline_query(df, criteria_cols):
36     skyline = []
37     for _, row in df.iterrows():
38         point = row[criteria_cols].values
39         dominated = False
```

```

32     to_remove = []
33
34     for s in skyline:
35         if dominates(s[criteria_cols].values, point):
36             dominated = True
37             break
38         elif dominates(point, s[criteria_cols].values):
39             to_remove.append(s)
40
41     if not dominated:
42         for r in to_remove:
43             skyline.remove(r)
44         skyline.append(row)
45
46     return pd.DataFrame(skyline).reset_index(drop=True)
47
48 # Kriteria centrality
49 criteria = [
50     "Degree_Centrality",
51     "Betweenness_Centrality",
52     "Closeness_Centrality",
53     "Eigenvector_Centrality"
54 ]
55
56 # Hasil skyline
57 skyline_result = skyline_query(df, criteria)
58
59 # Top-5 berdasarkan multi-kriteria
60 top5 = df.sort_values(by=criteria, ascending=False).head(5)
61 print(top5[["Display_Name"] + criteria])

```

Kode 3.2: Skyline-based multi-centrality analysis

### 3.4 Pengolahan Data

Tahap pengolahan data ini mengutamakan pelaksanaan analisis *molecular docking* berdasarkan protein-protein yang paling dominan, yang telah diidentifikasi pada tahap sebelumnya.

### 3.4.1 Pengambilan Struktur Protein

*Molecular docking* dilakukan untuk mensimulasikan interaksi potensial antara ligan dan protein target utama. Struktur 3D protein target (reseptor) diperoleh dari *RCSB Protein Data Bank* (PDB)[25]. Sementara itu, struktur ligan yang diusulkan diperoleh dari *PubChem*[26]. Reseptor dan ligan dipilih berdasarkan hasil *skyline query*, di mana target protein dengan peringkat terbaik diidentifikasi.

### 3.4.2 Molecular Docking

Ligand yang ada pada reseptor dicari untuk membantu menentukan lokasi *binding site*, yang dapat dilakukan menggunakan *ProteinsPlus*[27] sebagai alat analisis antarmuka protein-ligand[28]. Setelah itu, format file dikonversi dari SDF ke PDB/PDBQT menggunakan *OpenBabel*[29], dan persiapan reseptor-ligan dilakukan menggunakan *AutoDockTools*[30] untuk pembersihan struktur, penambahan hidrogen, penentuan muatan parsial, dan penentuan area grid di dalam kantong ikatan sebelum simulasi docking dimulai.

#### A. Pengaturan Grid pada Molecular Docking

Penentuan kotak grid dilakukan menggunakan *AutoDockTools* melalui menu *Grid > GridBox*. Titik pusat kotak grid ditentukan dengan memilih opsi *Center > Center on Ligand* sehingga koordinat pusat sesuai dengan posisi ligan dalam struktur kompleks. Parameter *spacing* kemudian disetel menjadi 1.000. Ukuran kotak *grid* selanjutnya diatur agar seluruh ligan berada dalam batas kotak secara proporsional, dengan menjaga ukuran yang tidak terlalu besar maupun terlalu kecil agar proses pencarian ruang ikat tetap efisien dan relevan. Setelah pengaturan selesai, konfigurasi *grid* disimpan dalam berkas berformat .txt yang berisi semua parameter yang diperlukan untuk tahap *docking*.

```
1 center_x = (nilai_koordinat_X)
2 center_x = (nilai_koordinat_Y)
3 center_x = (nilai_koordinat_Z)
4
5 size_x = (nilai_besar_box_X)
6 size_x = (nilai_besar_box_Y)
7 size_x = (nilai_besar_box_Z)
8
9 spacing = 1.000
```

Kode 3.3: File Format .txt

## B. Proses *Molecular Docking*

Dalam tahap persiapan *molecular docking*, Proses *docking* dilakukan menggunakan *AutoDock Vina* (misalnya, versi 1.2)[31] untuk memprediksi posisi ikatan dan menghasilkan skor energi. Dalam konteks *docking*, *binding affinity* merujuk pada energi bebas ikatan yang dihitung dan dihasilkan oleh fungsi skor (biasanya dalam *kcal/mol*), di mana nilai yang lebih negatif menunjukkan ikatan yang lebih stabil dan kuat antara ligan dan reseptor, dan digunakan sebagai dasar untuk mengurutkan kandidat dalam penyaringan virtual [32]. Proses menjalankan *docking* di *AutoDock Vina* adalah sebagai berikut:

- Buka CMD (*command prompt*)
- Navigasikan ke direktori Vina
- Jalankan perintah dibawah ini di CMD :

```
vina.exe --receptor (nama_receptor).pdbqt --ligand (nama_ligand).pdbqt --config (nama_konfigurasi).txt --exhaustiveness (berkelipatan 8 dimulai dari 8) --out (hasil_docking).pdbqt
```

Kode 3.4: Command Vina

## C. Pengumpulan Hasil

Hasil output dari docking menggunakan AutoDock Vina 1.2.7 dapat disimpan ke dalam file .txt dari CMD.

## D. Hasil dari *Molecular Docking*

Setelah proses *molecular docking* selesai dilakukan, pilih 3 ligan terbaik berdasarkan nilai *binding affinity* (semakin negatif hasilnya, berarti keterikatannya semakin kuat) pada setiap reseptor.

### **3.5 Pasca Pengolahan Data**

Langkah berikutnya setelah memperoleh hasil 3 ligan terbaik untuk setiap reseptor adalah proses visualisasi interaksi ikatan yang terjadi pada protein tersebut.

#### **3.5.1 Visualisasi Hasil Docking**

Pada fase visualisasi ini, *PyMOL* [33] digunakan untuk visualisasi struktur tiga dimensi, dan *LigPlot+* [34] digunakan untuk visualisasi interaksi dua dimensi. Visualisasi kompleks sebaiknya dilakukan dalam 3D menggunakan *PyMOL* dan dalam 2D menggunakan *LigPlot+* untuk mengamati pola interaksi (misalnya, ikatan hidrogen dan kontak hidrofobik) antara ligan dan residu di dalam kantong ikatan.

