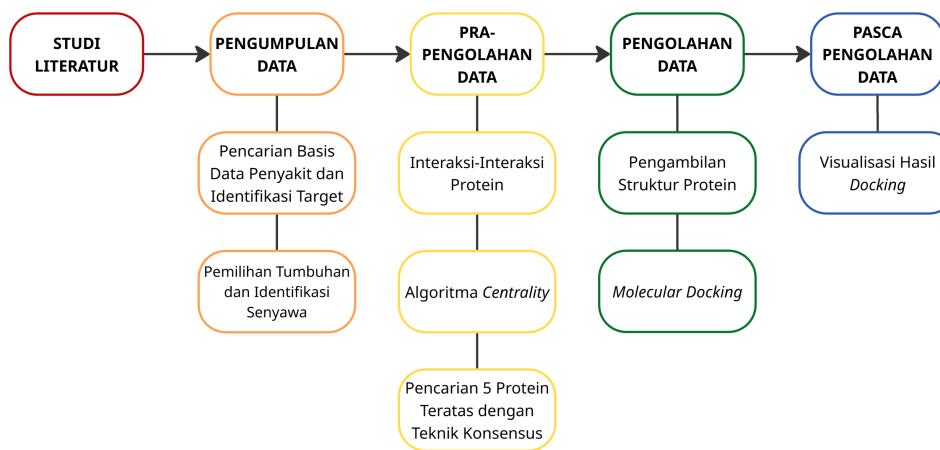


BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

Bab ini menjelaskan metodologi penelitian sistematis yang digunakan dalam studi ini, dengan rincian langkah demi langkah mulai dari pengumpulan data awal hingga dokumentasi akhir. Metodologi ini mengikuti proses terstruktur untuk identifikasi target penyakit dan analisis senyawa berbasis tumbuhan.



miro

Gambar 3.1. Flowchart Metodologi Penelitian.

Gambar 3.1 menjelaskan mengenai alur kerja penelitian, dimulai dengan tinjauan literatur untuk membangun landasan teoritis. Kemudian mengarah ke fase pengumpulan data yang beragam dengan melibatkan pencarian basis data penyakit, dan pemilihan tumbuhan. Selama pra-pengolahan, data disempurnakan melalui analisis interaksi protein dan algoritma *centrality*, menggunakan teknik konsensus untuk memperoleh lima kandidat target teratas. Tahap pengolahan data inti melibatkan pengambilan struktur protein dan pelaksanaan simulasi *molecular docking* untuk mengevaluasi interaksi senyawa-protein. Akhirnya, proses diakhiri dengan pasca-pengolahan data, yang berfokus pada visualisasi hasil untuk memfasilitasi interpretasi dan pelaporan yang jelas dan dokumentasi sistematis.

3.1 Studi Literatur

Studi Literatur ini akan menjelaskan mengenai jurnal utama yang menjadi acuan dalam melakukan penelitian ini. Penelitian *Unveiling the anti-obesity potential of Kemuning* menggunakan pendekatan farmakologi jaringan terintegrasi dan *molecular docking* untuk mengidentifikasi mekanisme anti-obesitas *Murraya paniculata*. Dengan teknik *Skyline query*, para peneliti mengidentifikasi EP300 dan PPARG sebagai target utama, yang kemudian diverifikasi melalui simulasi dinamika molekuler dan uji *in vitro*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metabolit aktif tumbuhan tersebut secara efektif mengganggu maturasi adiposit dan metabolisme lipid, memberikan dasar ilmiah yang kuat untuk penggunaannya dalam pengobatan obesitas [46]. Sedangkan penelitian *Network Pharmacology and Molecular Mechanism of Traditional Indonesian Medicine in Hypertension Treatment* berhasil mengungkap mekanisme farmakologis dari formulasi herbal Indonesia yang digunakan untuk hipertensi. Melalui analisis farmakologi jaringan, mengidentifikasi 44 senyawa aktif yang berinteraksi dengan jalur sinyal kunci, termasuk PI3K/MAPK dan HIF-1. Studi ini menyoroti bahwa efektivitas ramuan tradisional ini terletak pada kemampuannya untuk menargetkan multiple jalur molekuler secara bersamaan, terutama yang terkait dengan kesehatan endotel vaskular, memberikan dasar ilmiah untuk penggunaan klinis jamu dalam terapi kardiovaskular [47].



Tabel 3.1. Ringkasan Studi Literatur *Network Pharmacology*.

JUDUL (TAHUN)	PENULIS	HASIL PENELITIAN	GAP PENELITIAN
<i>Unveiling the anti-obesity potential of Kemuning (Murraya paniculata): A network pharmacology approach</i> (2024)	R. Fatriani, F. A. K. Pratiwi, A. Annisa, et al.	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), Docking & Molecular Dynamics, In Vitro (Cell Culture)</i>	Meskipun penelitian ini memberikan validasi struktural dan in vitro yang mendalam, penelitian ini dibatasi oleh fokusnya yang sempit pada satu spesies tumbuhan dan kondisi obesitas yang terisolasi. Penelitian saat ini seharusnya berfokus pada perluasan pipeline validasi yang ketat ini—termasuk dinamika molekuler dan teknik konsensus—untuk mengeksplorasi bagaimana target metabolik ini berperilaku dalam formulasi multi-herbal yang kompleks dan dampaknya secara sistemik pada kondisi terkait.

Berlanjut di halaman berikutnya

Tabel 3.1 Ringkasan Studi Literatur *Network Pharmacology* (Lanjutan).

JUDUL (TAHUN)	PENULIS	HASIL PENELITIAN	GAP PENELITIAN
<i>Network Pharmacology and Molecular Mechanism of Traditional Indonesian Medicine in Hypertension Treatment</i> (2024)	L. A. Setiani, F. C. Saputri, A. Yanuar, et al.	Studi ini mengungkapkan bahwa formulasi herbal tradisional Indonesia mengobati hipertensi dengan memanfaatkan 44 senyawa bioaktif untuk mengatur jalur pensinyalan HIF-1, relaxin, PI3K, dan MAPK. Metode yang digunakan adalah <i>Oral Bioavailability/DL, Network & Pathway Analysis, Database Enrichment</i> (KEGG)	Studi ini berhasil memetakan jalur sinyal yang luas untuk formula herbal kompleks, namun terbatas oleh kurangnya validasi struktural, seperti <i>molecular docking</i> atau simulasi dinamika, untuk mengonfirmasi ikatan ligan-reseptor yang sebenarnya. Penelitian di masa depan harus berfokus pada mengisi celah ini dengan menerapkan analisis struktural presisi tinggi dan algoritma peringkat konsensus untuk memverifikasi stabilitas fisik dan interaksi dari 44 senyawa bioaktif yang diprediksi dalam protein targetnya.

Tabel 3.1 memaparkan ringkasan studi literatur *network pharmacology*. Integrasi pengobatan tradisional Indonesia ke dalam kerangka kerja terapeutik modern semakin didukung oleh farmakologi jaringan, seperti yang ditunjukkan dalam penelitian Setiani dkk. (2024) dan Fatriani dkk. (2024). Sementara Setiani dkk. menjelaskan mekanisme *multi-target* jamu dalam hipertensi melalui analisis jalur (HIF-1, PI3K), Fatriani dkk. memperluas alur kerja komputasional ini dengan menerapkan dinamika molekuler dan uji *in vitro* untuk memvalidasi potensi anti-

obesitas *Murraya paniculata*. Secara keseluruhan, studi-studi ini menunjukkan evolusi metodologis yang konsisten: berpindah dari konstruksi jaringan yang luas ke validasi struktural yang presisi. Transisi ini membenarkan penggunaan teknik penyaringan yang ketat, seperti Algoritma Konsensus yang digunakan dalam penelitian ini, untuk menjembatani kesenjangan antara pengetahuan etnobotani dan kedokteran molekuler berbasis bukti [47] [46].

3.2 Pengumpulan Data

Fase pengumpulan data menjadi landasan bagi studi penemuan obat komputasional ini melalui pengumpulan dan validasi sistematis informasi biologis dan kimia dari basis data yang terpercaya. Proses ini dibagi menjadi dua komponen utama: pertama, identifikasi dan validasi target penyakit, termasuk pencarian target penyakit utama, validasi lintas basis data, dan identifikasi target protein; dan kedua, pemilihan tumbuhan obat dengan potensi terapeutik dan pengumpulan data senyawa bioaktifnya. Pendekatan ganda ini mengintegrasikan pengetahuan obat tradisional dengan sumber daya bioinformatika modern, memastikan karakterisasi komprehensif baik target biologis maupun senyawa produk alami sebelum analisis komputasional.

3.2.1 Pengumpulan Data

Fase pertama melibatkan eksplorasi komprehensif basis data penyakit menggunakan sumber-sumber otoritatif:

A Pencarian Target Penyakit Utama

Akses basis data *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) di www.omim.org/ untuk mengidentifikasi penyakit target dan memperoleh informasi penyakit yang relevan

B Validasi dan Perbandingan Penyakit

Gunakan basis data IJAH di <https://ijah.apps.cs.ipb.ac.id/#/home> dengan memasukkan OMIM-ID yang diperoleh dari langkah sebelumnya untuk memvalidasi informasi penyakit

C Identifikasi Target Protein

Akses basis data OMIM, UniProt (<https://www.uniprot.org/>), dan MalaCards (malacards.org) dan masukkan informasi penyakit target untuk mengidentifikasi target protein yang terkait.

3.2.2 Pemilihan Tumbuhan dan Identifikasi Senyawa

Fase kedua berfokus pada identifikasi tumbuhan obat yang sesuai dan senyawa bioaktifnya:

A Pemilihan Spesies tumbuhan

- Akses basis data IJAH
- Masukkan informasi penyakit yang telah diidentifikasi
- Pilih tumbuhan obat yang menunjukkan potensi terapeutik untuk penyakit target

B Pengumpulan Data Senyawa Tumbuhan

Fase Pengumpulan Data berfungsi sebagai landasan penelitian ini, yang berfokus pada pembentukan dataset yang menjembatani kesenjangan antara pengobatan herbal tradisional dan biologi molekuler modern. Fase ini mengikuti pendekatan dua jalur: pertama, identifikasi dan validasi target biologis yang terkait dengan penyakit target, dan kedua, pemilihan sistematis tumbuhan obat dan metabolit aktifnya. Dengan mengintegrasikan data dari berbagai basis data bioinformatika dan profil metabolit, bagian ini memastikan bahwa konstruksi jaringan selanjutnya didasarkan pada senyawa dengan bioavailabilitas tinggi dan interaksi protein yang tervalidasi.

- Akses basis data KNAPSACK pada laman www.knapsackfamily.com/knapsack_core/top.php
- Masukkan nama ilmiah/latin dari tumbuhan yang ingin dicari
- Salin semua hasil yang keluar
- Akses basis data PubChem di <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

- Masukkan senyawa ligan yang diidentifikasi dari tumbuhan yang dipilih
- Unduh data struktur senyawa dalam format SDF (*Structure Data File*) untuk analisis lebih lanjut

3.3 Pra-Pengolahan Data

Fase prapengolahan secara sistematis menganalisis dan menyempurnakan data biologis yang dikumpulkan untuk mengidentifikasi target protein yang paling relevan untuk studi docking molekuler. Hal ini melibatkan tiga komponen utama: analisis interaksi protein termasuk prediksi target dan persimpangan protein penyakit-tumbuhan, implementasi algoritma *centrality* untuk menilai pentingnya jaringan protein, dan teknik konsensus untuk memilih lima target protein paling menjanjikan. Pendekatan komputasional ini memastikan eksperimen docking selanjutnya berfokus pada target yang paling relevan secara biologis, mengoptimalkan efisiensi penelitian, dan meningkatkan potensi penemuan obat.

3.3.1 Interaksi-Interaksi Protein

Fase ini bertujuan untuk mengidentifikasi target protein dari senyawa tumbuhan yang memenuhi kriteria bioavailabilitas tertentu. Proses terperinci:

A Penyaringan Senyawa

Pertama, saring senyawa berdasarkan kriteria:

- Skor bioavailabilitas $\geq 0,5$, menggunakan SwissAdme (<http://www.swissadme.ch/>)
- Kemiripan obat (*drug-likeness*) > 0 menggunakan MolSoft (<https://molsoft.com/mprop/>)

B Prediksi Target

- Akses platform Swiss Target Prediction di <https://www.swisstargetprediction.ch/>
- Masukkan notasi SMILES (*Simplified Molecular input Line Entry System*) dari senyawa yang telah disaring sesuai kriteria

- Jalankan algoritma prediksi
- Hapus kembali duplikat yang ada menggunakan Venny (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)

C Irisan Protein Penyakit dan Tumbuhan

- Mencari irisan protein pada penyakit dan protein pada tumbuhan menggunakan Venny
- Kemudian lanjut interaksi protein-protein menggunakan String-DB di <https://string-db.org/>, dengan *medium confidence* (0.400). Eksport hasil menjadi TSV
- Buat *adjacency matrix* berdasarkan hasil eksport interaksi protein-protein pada String-DB.

3.3.2 Algoritma *Centrality*

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

```

1 # Hitung semua centrality
2 degree_centrality = nx.degree_centrality(G)
3 betweenness_centrality = nx.betweenness_centrality(G)
4 closeness_centrality = nx.closeness_centrality(G)
5 eigenvector_centrality = nx.eigenvector_centrality(G, max_iter
   =1000)
6
7 # Gabungkan hasil ke satu DataFrame
8 centrality_df = pd.DataFrame({
9     'Degree Centrality': degree_centrality,
10    'Betweenness Centrality': betweenness_centrality,
11    'Closeness Centrality': closeness_centrality,
12    'Eigenvector Centrality': eigenvector_centrality
13 })
14
15 print("\n==== CENTRALITY RESULTS ===")
16 print(centrality_df.sort_values(by='Degree Centrality', ascending=
   False).head(10))

```

Kode 3.1: Implementasi Perhitungan Centrality Menggunakan NetworkX.

3.3.3 Pencarian 5 Protein Teratas dengan Teknik Konsensus

Pencarian daftar 5 protein teratas menggunakan teknik konsensus, berfungsi sebagai tahan penyaringan akhir pada fase pra-pengolahan data. Tahap ini tidak mengandalkan satu ukuran *centrality* (seperti *degree*, *betweenness*, *closeness*, atau *eigen-vector*), yang mungkin hanya menonjolkan satu aspek penting pada protein, melainkan menggabungkan beberapa metrik untuk mengidentifikasi target yang paling signifikan secara biologis menggunakan algoritma konsensus. Proses ini melibatkan tiga langkah:

1. **Peringkat Ganda:** protein diurutkan secara independen berdasarkan beberapa algoritma *centrality*.
2. **Penggabungan:** peringkat digabungkan untuk meminimalkan bias dari metode tunggal. Dalam penelitian ini, melihat rata-rata protein algoritma *centrality*.
3. **Pemilihan:** Lima protein dengan skor kumulatif tertinggi dipilih. Kelima protein ini mewakili simpul yang paling stabil dan berpengaruh dalam jaringan, menjadikannya kandidat paling menjanjikan untuk tahap *Molecular Docking* pada sub-bab 3.4.

3.4 Pengolahan Data

Strategi pengolahan data ini berfokus pada pelaksanaan analisis *molecular docking* menggunakan protein-protein teratas yang diidentifikasi dari langkah sebelumnya.

3.4.1 Pengambilan Struktur Protein

Dari daftar 5 protein teratas yang telah diidentifikasi, langkah selanjutnya melibatkan pencarian senyawa tumbuhan yang mengandung atau berinteraksi dengan protein-protein spesifik ini. selanjutnya adalah melakukan pengambilan struktur protein, dengan cara:

- Akses *Protein Data Bank* (PDB) di <https://www.rcsb.org/>
- Unduh struktur protein dengan ekstensi .pdb

- Masukkan ligan yang telah diperoleh <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> dan unduh dengan ekstensi SDF.
- Akses OpenBabel untuk melakukan konversi file ligan .sdf menjadi file ligan .pdb
- Akses AutoDockTools untuk melakukan konversi file reseptor dan ligan dengan ekstensi .pdb, menjadi file berekstensi .pdbqt

3.4.2 *Molecular Docking*

A Pengaturan Konfigurasi Grid

Lakukan *grid* menggunakan AutoDockTools dan simpan hasil *grid* ke dalam berkas konfigurasi berformat .txt.

1. Lakukan *grid-box* menggunakan AutoDockTools.
 - Buka pengaturan "Grid > Grid Box"
 - Atur *center* menjadi *center* pada ligan "Center > Center on Ligand"
 - Atur *spacing* menjadi 1.000
 - Sesuaikan *box* agar ligan berada di dalam *box*, jangan terlalu besar dan jangan terlalu kecil.
2. Simpan hasil *grid* ke dalam berkas konfigurasi berformat .txt, dengan berisikan:

```
1     center_x = (nilai_koordinat_X)
2     center_y = (nilai_koordinat_y)
3     center_z = (nilai_koordinat_z)

4
5     size_x = (nilai_besar_box_sumbu_x)
6     size_y = (nilai_besar_box_sumbu_y)
7     size_z = (nilai_besar_box_sumbu_z)

8
9     spacing = 1.000
```

B Pelaksanaan *Molecular Docking*

Proses *docking* atau pengkaitan melibatkan penggunaan perangkat lunak AutoDock Vina melalui antarmuka baris perintah. Struktur Perintah:

- Buka CMD (*Command Prompt*)
- Navigasikan ke direktori Vina
- Jalankan perintah:

```
vina.exe --receptor (nama_reseptor).pdbqt --ligand (nama_ligan).pdbqt --config (nama_konfigurasi).txt --exhaustiveness 32 --out (hasil_docking).pdbqt
```

C Pengumpulan Hasil Pengaitan

- Tunggu hingga proses *docking* selesai
- Kumpulkan hasil termasuk:
 - Nilai afinitas ikatan
 - RMSD I.b (batas bawah)
 - RMSD U.b (batas atas)
- Pindahkan semua hasil ke berkas teks untuk analisis lebih lanjut

Langkah ini mewakili fase analisis komputasi inti di mana interaksi molekuler antara senyawa tumbuhan dan protein target disimulasikan dan diukur.

D Pemilihan Hasil *Molecular Docking*

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

3.5 Pasca Pengolahan Data

Tahap berikutnya setelah mendapatkan hasil 3 ligan terbaik dari setiap reseptor ialah visualisasi ikatan-ikatan yang terjadi pada protein.

3.5.1 Visualisasi Hasil Docking

Fase visualisasi menyediakan analisis komprehensif interaksi protein-ligan melalui pengolahan data sistematis dan platform visualisasi yang beragam. Hal ini mencakup pengolahan data berkelompok untuk mengorganisir hasil docking, visualisasi struktur 3D menggunakan PyMOL, pemetaan interaksi 2D melalui LigPlot untuk mengidentifikasi kontak ikatan, serta dokumentasi sistematis untuk memastikan reproduktibilitas. Teknik visualisasi ini memfasilitasi analisis rinci mengenai mode ikatan dan pola interaksi yang esensial untuk memahami hubungan antara senyawa dan target.

A Pengolahan Berkelompok

Proses visualisasi dilakukan dengan memasangkan reseptor dan ligan. Dalam proses ini, reseptor dan ligan tidak boleh dipisahkan untuk memastikan kekomprehensifan dari hasil *molecular docking*.

B Visualisasi 3D Menggunakan PyMol

1. Buka *file* reseptor di perangkat lunak PyMOL
 - Buka perangkat lunak PyMOL
 - Buka menu "File" dan pilih "Open"
 - Pilih dan muat berkas reseptor dalam format .pdbqt
2. Masukkan *file* ligan
 - Dalam sesi PyMOL yang sama, klik menu "File" dan pilih "Open"
 - Pilih dan muat berkas ligan dalam format .pdbqt
3. Ekspor Berkas
 - Setelah memuat berkas reseptor dan ligan, klik menu "File"
 - Pilih opsi "Eksport Molecule"
 - Simpan struktur gabungan dengan ekstensi .pdb

C Visualisasi 2D menggunakan LigPlot

Langkah visualisasi ke dalam 2D perlu dilakukan agar memudahkan dalam melihat hasil visualisasi protein. Langkah-langkahnya ialah sebagai berikut:

1. Masukkan *file* hasil visualisasi 3d
2. Jalankan *file* yang sudah dipilih, visualisasi akan keluar dengan sendirinya.
3. Kemudian simpan hasil visualisasi 2D kedalam ekstensi gambar (JPEG, PNG, dll)

