

BAB 3

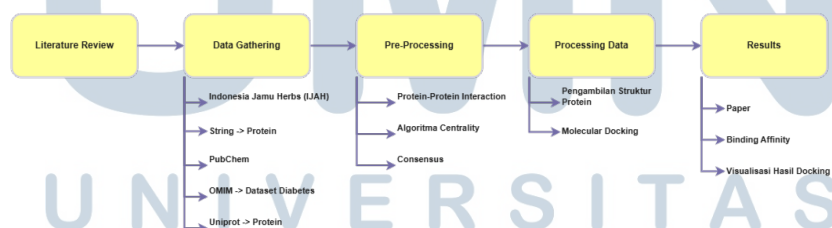
METODOLOGI PENELITIAN

Pada penelitian ini digunakan metode *in silico* dengan mengintegrasikan analisis jaringan farmakologi (network pharmacology) dan molecular docking menggunakan AutoDock. Pendekatan jaringan farmakologi digunakan untuk menganalisis hubungan antara senyawa bioaktif, protein target, dan penyakit diabetes mellitus secara sistemik, sedangkan molecular docking digunakan untuk mengevaluasi binding affinity antara senyawa aktif dengan protein target utama.

Metode ini memungkinkan identifikasi mekanisme kerja senyawa pare (*Momordica charantia*) dan kelabat (*Trigonella foenum-graecum*) terhadap diabetes mellitus tipe 1 melalui pendekatan multi-senyawa dan multi-target, sehingga dapat memberikan gambaran yang lebih baik dibandingkan pendekatan konvensional.

3.1 Alur Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan sistematis yang digambarkan dalam diagram pada Gambar 4.18. Tahapan penelitian meliputi: (1) Pengumpulan data protein target terkait DMT1 dan senyawa bioaktif dari tumbuhan herbal; (2) penyaringan data senyawa bioaktif tumbuhan dengan Bioavailability dan Drug Likeness; (3) konstruksi dan analisis jaringan interaksi protein-protein (protein-protein interaction/PPI); (4) analisis centrality untuk identifikasi target protein utama; (5) molecular docking;



Gambar 3.1. Diagram Alur Penelitian

3.2 Pengumpulan Data

3.2.1 Identifikasi Protein Target Terkait Diabetes Melitus Tipe 1

Protein target yang berhubungan dengan diabetes melitus tipe 1 dicari dan dikumpulkan dari beberapa database publik, meliputi:

- OMIM
- UniProt
- GeneCards
- MalaCards

Kata kunci yang digunakan dalam pencarian adalah "Type 1 Diabetes Mellitus", "T1DM", dan "Insulin-Dependent Diabetes Mellitus". Protein target yang diperoleh dari masing-masing database dicatat di Microsoft Excel dan duplikat dihilangkan menggunakan Venny 2.1.

3.2.2 Identifikasi Senyawa Bioaktif dari *Momordica charantia* dan *Trigonella foenum-graecum*

Senyawa bioaktif dari Pare dan Kelabat dikumpulkan dari:

- IJAH Analytics
- KNApSAcK Family

Kata kunci pencarian yang digunakan adalah "Momordica charantia" dan "Trigonella foenum-graecum". Duplikasi data dihilangkan menggunakan Venny 2.1.

3.2.3 Drug-Likeness dan ADME Prediction

Compound yang didapat sebelumnya dari Pare dan Kelabat dicari Bioavailability Score dan Drug Likenessnya dan diseleksi dengan parameter Bioavailability Score ≥ 0.5 dan Drug Likeness > 0 . Setelah itu compound yang memenuhi parameter, diprediksi protein target yang berinteraksi dengan senyawa bioaktif menggunakan SwissTargetPrediction. Struktur 2D senyawa dalam format

SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) atau struktur kimia diinput ke dalam platform, dengan spesies dipilih sebagai Homo sapiens. Hasil prediksi berupa daftar protein target dengan nilai probabilitas interaksi. Duplikasi data dihilangkan menggunakan Venny 2.1.

3.2.4 Identifikasi Target yang Beririsan

Data protein target DMT1 dan hasil protein target senyawa bioaktif SwissTargetPrediction dari Pare dan Kelabat yang telah dikumpulkan, dianalisis untuk mencari irisan menggunakan Venny 2.1. Protein yang merupakan hasil irisan akan dianalisis lebih lanjut dalam jaringan PPI.

3.3 Konstruksi dan Analisis Jaringan Interaksi Protein-Protein (PPI)

Protein target yang beririsan dari tahap sebelumnya digunakan untuk mengkonstruksi jaringan interaksi protein-protein menggunakan STRING database. Parameter yang digunakan adalah:

- **Organism:** Homo sapiens
- **Network type:** Full STRING network
- **Confidence score:** Medium confidence (0.400)

Jaringan PPI yang dihasilkan menunjukkan interaksi node antar protein. Data jaringan di-*export* dalam format TSV (Tab-Separated Values) untuk dibuat adjacency matrix dan analisis centrality menggunakan Python.

3.4 Analisis Centrality

Analisis centrality dilakukan untuk mengidentifikasi protein kunci yang memiliki peran penting dalam jaringan PPI. File TSV dari STRING database dikonversi menjadi adjacency matrix dan dianalisis menggunakan Python dengan library NetworkX.

3.4.1 Parameter Centrality yang Dianalisis

Empat parameter centrality dihitung untuk setiap protein dalam jaringan:

1. **Degree Centrality (DC):** Mengukur jumlah koneksi langsung yang dimiliki oleh suatu protein.

$$DC(v) = \frac{\deg(v)}{n-1} \quad (3.1)$$

di mana $\deg(v)$ adalah jumlah koneksi protein v , dan n adalah jumlah total protein dalam jaringan.

2. **Betweenness Centrality (BC):** Mengukur frekuensi suatu protein muncul dalam jalur terpendek (*shortest path*) antara dua protein lain dalam jaringan.

$$BC(v) = \sum_{s \neq v \neq t} \frac{\sigma_{st}(v)}{\sigma_{st}} \quad (3.2)$$

di mana σ_{st} adalah jumlah jalur terpendek dari protein s ke t , dan $\sigma_{st}(v)$ adalah jumlah jalur terpendek yang melewati protein v .

3. **Closeness Centrality (CC):** Mengukur kedekatan rata-rata suatu protein terhadap seluruh protein lain dalam jaringan.

$$CC(v) = \frac{n-1}{\sum_{u \neq v} d(v, u)} \quad (3.3)$$

di mana $d(v, u)$ adalah jarak terpendek antara protein v dan protein u , serta n merupakan jumlah total protein dalam jaringan.

4. **Eigenvector Centrality (EC):** Mengukur pengaruh suatu protein berdasarkan kualitas koneksinya. Protein yang terhubung dengan protein penting lainnya akan memiliki EC tinggi.

3.4.2 Implementasi Analisis Centrality

Analisis centrality diimplementasikan menggunakan bahasa pemrograman Python dengan library NetworkX, sebagaimana ditunjukkan pada Kode 3.1.

```
1 import pandas as pd
2 import networkx as nx
3
4 # Membaca adjacency matrix dari file Excel
5 df = pd.read_excel("adjacency_matrix.xlsx", index_col=0)
6
7 # Membuat graph dari adjacency matrix
8 G = nx.from_pandas_adjacency(df)
```

```

9
10 # Menghitung nilai centrality
11 degree centrality = nx.degree centrality (G)
12 betweenness centrality = nx.betweenness centrality (G)
13 closeness centrality = nx.closeness centrality (G)
14 eigenvector centrality = nx.eigenvector centrality (G, max_iter
    =1000)
15
16 # Menggabungkan hasil centrality ke dalam DataFrame
17 centrality_df = pd.DataFrame({
18     'Degree Centrality': degree centrality ,
19     'Betweenness Centrality': betweenness centrality ,
20     'Closeness Centrality': closeness centrality ,
21     'Eigenvector Centrality': eigenvector centrality
22 })
23
24 # Menampilkan 10 node dengan Degree Centrality tertinggi
25 print ( centrality_df . sort_values (by='Degree Centrality' , ascending=
    False ) . head (10) )

```

Kode 3.1: Script Python untuk Analisis Centrality Jaringan Protein menggunakan NetworkX

3.5 Metode Konsensus untuk Pemilihan Protein Kunci

Untuk mengidentifikasi protein kunci yang paling berperan, digunakan metode konsensus yang mengintegrasikan hasil dari keempat parameter centrality. Tahapan metode konsesus:

1. **Filtering berdasarkan keempat kriteria:** Protein yang muncul di keempat parameter *centrality* (DC,CC,BC,EC) dipilih.
2. **Perhitungan rata-rata:** Protein yang terpilih dihitung nilai rata-ratanya dari keempat parameter *centrality*
3. **Penentuan Top 5:** Lima protein dengan nilai rata-rata tertinggi dipilih menjadi protein kunci utama untuk selanjutnya dilakukan analisis molecular docking.

3.6 Molecular Docking

Molecular docking dilakukan untuk memprediksi *binding affinity* dan mode interaksi antara senyawa bioaktif dengan protein target.

3.6.1 Preparasi Struktur Protein (Receptor)

1. **Struktur 3D Protein:** Struktur receptor dapat diunduh dari RCSB Protein Data Bank dalam format PDB. Kriteria pemilihan struktur:
 - Resolusi struktur $\leq 2.5 \text{ \AA}$
 - Percentile Ranks condong ke warna biru sebelah kanan
 - Organisme asal protein adalah *Homo sapiens*.
2. **Preparasi receptor menggunakan AutoDockTools:**
 - Hapus molekul air
 - Hapus ligan bawaan (jika ada), identifikasi menggunakan ProteinsPlus
 - Tambahkan atom hidrogen (Add Hydrogens - Polar Only)
 - Tambahkan muatan Kollman (Kollman Charges)
 - Simpan sebagai file PDBQT.
3. **Penentuan Top 5:** Lima protein dengan nilai rata-rata tertinggi dipilih menjadi protein kunci utama untuk selanjutnya dilakukan analisis molecular docking.

3.6.2 Preparasi Struktur Ligand

1. **Struktur 3D ligan:** Struktur senyawa bioaktif diunduh dari PubChem dalam format SDF
2. **Convert SDF ke PDB:** Menggunakan OpenBabel ubah file SDF ligan menjadi PDB
3. **Preparasi ligan menggunakan AutoDockTools:**
 - Import file PDB ligan
 - Simpan output sebagai file PDBQT

3.6.3 Penentuan Grid Box

Pada AutoDockTools, pilih Macromolecules dan pilih Receptor, setelah itu pilih Set Map Types dan pilih Ligand. Setelah semua siap, pilih Grid Box dengan parameter *grid box* di AutoDockTools:

- **Center:** Koordinat x, y, z dari pusat ligan (center on ligand)
- **Size:** Disesuaikan hingga mencakup seluruh ligan (umumnya $20 \times 20 \times 20$ Å)
- **Spacing:** 1.0 Å

3.6.4 Molecular Docking dengan AutoDock Vina

Molecular docking dilakukan menggunakan AutoDock Vina 1.2.7 dengan parameter:

- **Exhaustiveness:** 32
- **CPU:** 4

```
1 vina.exe --receptor 7X7X.pdbqt \
2           --ligand 115758_72_0.pdbqt \
3           --config conf.txt \
4           --exhaustiveness 32 \
5           --out hasil_docking_115758_res.pdbqt \
6           --cpu 4
```

Kode 3.2: Contoh Perintah AutoDock Vina melalui Command Prompt

Proses docking menghasilkan beberapa binding affinity, nilai binding affinity terendah dipilih sebagai konformasi terbaik.

U N I V E R S I T A S
M U L T I M E D I A
N U S A N T A R A