

BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Data Penelitian

Penelitian ini menggunakan berbagai jenis data yang diperoleh dari basis data bioinformatika dan kimia komputasi. Data tersebut meliputi protein terkait hipertensi, senyawa bioaktif dari jahe dan seledri, serta interaksi antar protein untuk analisis jaringan protein. Data protein target hipertensi diperoleh dari basis data seperti *GeneCards*, *MalaCards*, dan *UniProt* menggunakan kata kunci relevan dengan hipertensi. Data yang dikumpulkan mencakup identitas protein dan informasi biologis terkait yang akan digunakan sebagai representasi protein penyakit dalam penelitian. Data senyawa bioaktif dari jahe dan seledri diperoleh dari basis data senyawa alami seperti *KNAPSAcK Family Database*. Data ini mencakup struktur kimia senyawa yang akan digunakan dalam prediksi target protein dan simulasi molecular docking. Data interaksi protein diperoleh dari basis data STRING untuk membangun dan menganalisis jaringan interaksi protein. Struktur 3 dimensi untuk reseptor didapat dari *Protein Data Bank (PDB)* dan struktur 3 dimensi ligan diperoleh dari *PubChem*. Data struktur 3 dimensi tersebut digunakan untuk tahap *molecular docking*.

3.2 Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas perangkat keras dan perangkat lunak yang mendukung seluruh tahapan penelitian, mulai dari pengumpulan data, pengolahan data, analisis jaringan protein, hingga simulasi molecular docking.

3.2.1 Perangkat Keras

Perangkat keras yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebuah komputer pribadi dengan spesifikasi sebagai berikut:

- Device name: LAPTOP-5450RLRA
- Processor: Intel Core i5-10210U CPU @ 1.60GHz
- Installed RAM: 8.00 GB

3.2.2 Perangkat Lunak

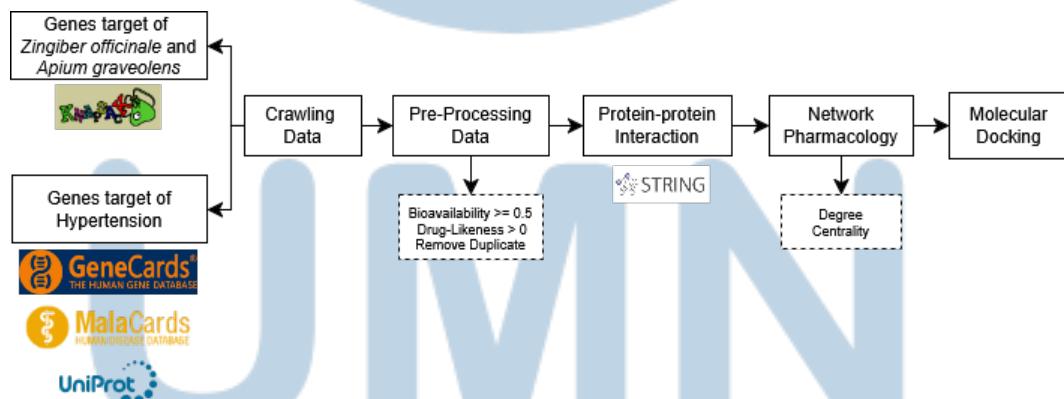
Perangkat lunak yang digunakan dalam penelitian ini disusun berdasarkan urutan tahapan penelitian yang dilakukan, sebagai berikut:

1. GeneCards, MalaCards dan UniProt: Digunakan untuk memperoleh data protein yang berkaitan dengan penyakit hipertensi.
2. KNAPSAcK Family Database: Digunakan untuk memperoleh data senyawa aktif tumbuhan.
3. SwissADME: Digunakan untuk analisis parameter farmakokinetik senyawa.
4. MolSoft: Digunakan untuk analisis *drug-likeness* senyawa.
5. SwissTargetPrediction: Digunakan untuk memprediksi target protein dari senyawa aktif.
6. Venny: Digunakan untuk mengidentifikasi irisan antara protein penyakit dan protein hasil prediksi senyawa.
7. STRING Database: Digunakan untuk memperoleh data interaksi antar protein.
8. RCSB Protein Data Bank: Digunakan untuk memperoleh struktur tiga dimensi protein target.
9. PubChem: Digunakan untuk memperoleh struktur tiga dimensi senyawa aktif.
10. ProteinPlus: Digunakan sebagai pendukung analisis struktur protein untuk mengetahui ligan bawaan dari sebuah protein.
11. AutoDockTools: Digunakan untuk persiapan struktur protein dan ligan sebelum proses docking.
12. OpenBabel GUI: Digunakan untuk konversi format file struktur molekul senyawa.
13. AutoDock Vina 1.2.7: Digunakan untuk melakukan simulasi molecular docking.

14. PyMOL: Digunakan untuk visualisasi struktur tiga dimensi protein dan hasil docking.
15. LigPlot+: Digunakan untuk visualisasi struktur dua dimensi protein dan hasil docking
16. Google Spreadsheet: Digunakan untuk penyimpanan, pengelolaan dan praproses data secara manual sebelum dan sesudah analisis komputasi.
17. Python: Digunakan untuk otomatisasi pengambilan data, pengolahan data, serta pembuatan *adjacency matrix* dan perhitungan *degree centrality*.

3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini menggunakan pendekatan *in silico* molecular docking untuk mengidentifikasi potensi senyawa aktif dari tanaman jahe dan seledri sebagai kandidat terapi hipertensi melalui interaksi dengan protein target terkait penyakit tersebut.



Gambar 3.1. Diagram alur metodologi penelitian

Diagram di atas menggambarkan alur kerja penelitian, dimulai dari pengumpulan data target gen melalui *database* seperti *GeneCards*, *MalaCards*, dan *UniProt*. Data tersebut diambil dan diproses awal, kemudian dianalisis **PPI** menggunakan *STRING* untuk membangun jaringan, penerapan *network pharmacology* dengan perhitungan *degree centrality* untuk seleksi target kunci, sebelum divalidasi melalui *molecular docking*.

Alur ini mengintegrasikan pendekatan komputasional berbasis data publik untuk memprediksi target potensial secara efisien, sesuai dengan studi *network pharmacology* terkini.

3.3.1 Studi Literatur

Tahap studi literatur dilakukan untuk mengidentifikasi penelitian terdahulu yang menggunakan *degree centrality* dalam analisis *network pharmacology*, khususnya untuk seleksi hubungan target pada jaringan **PPI**. Literatur diambil dari database jurnal ilmiah (*Scopus, PubMed, Google Scholar*) tahun 2020-2025 dengan kata kunci *"degree centrality"*, *"molecular docking"* dan *"network pharmacology"*. Hasilnya dirangkum dalam Tabel 2.2 yang menunjukkan pola penggunaan *degree centrality* untuk ranking target prioritas.

3.3.2 Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan dalam tiga sub-tahap paralel:

Pencarian Basis Data Penyakit dan Identifikasi Target: Protein terkait hipertensi diidentifikasi menggunakan GeneCards, MalaCards dan UniProt untuk mendapatkan daftar gen/protein patofisiologi hipertensi (sistem renin-angiotensin, endotel disfungsi). Data divalidasi melalui UniProt untuk ID unik, fungsi biologis dan status drug target.

Pemilihan Tumbuhan dan Identifikasi Senyawa: Senyawa bioaktif jahe dan seledri diambil dari KNAPSACK Family Database (*gingerol, shogaol, zingerone, apiol, limonene, phthalides*).

3.3.3 Pra-Pengolahan Data

Analisis awal SwissADME untuk parameter ADME dan MolSoft untuk *drug-likeness* (Lipinski's Rule of Five).

Prediksi Target Protein dari Senyawa Tumbuhan: SwissTargetPrediction memprediksi target protein senyawa aktif berdasarkan kemiripan struktur 3D dengan ligan *known*. Probabilitas ≥ 0.5 digunakan sebagai ambang batas untuk keandalan prediksi.

Interaksi-Interaksi Protein: STRING Database memetakan jaringan **PPI** untuk *common targets* (irisan protein hipertensi dan target prediksi senyawa) digunakan untuk konstruksi dan visualisasi jaringan dengan *confidence score* ≥ 0.5 .

Degree Centrality: Python digunakan untuk menganalisis topologi jaringan dengan metrik *degree centrality*.

3.3.4 Pengolahan Data

Pengambilan Struktur Tiga Dimensi: Struktur 3D protein *hub targets* diunduh dari RCSB Protein Data Bank (PDB) format .pdb (resolusi $\leq 2.5\text{\AA}$). *Binding site* dianalisis dengan ProteinPlus. Struktur ligan dari PubChem (.sdf/.mol2).

Molecular Docking: AutoDockTools mempersiapkan receptor (hapus air, tambah *polar hydrogens*, *Gasteiger charge*) dan ligan (.pdbqt via OpenBabel). AutoDock Vina 1.2.7 dengan *exhaustiveness* 32 menghasilkan 9-10 *binding poses* per ligan. *Binding affinity* dinilai dari docking score (kcal/mol).

3.3.5 Pasca Pengolahan Data

Visualisasi Hasil Docking: PyMOL dan LigPlot+ memvisualisasikan kompleks protein-ligan terbaik, mengidentifikasi *hydrogen bonds*, *hydrophobic interactions*, *-interactions* dan *salt bridges*. Kontrol positif menggunakan obat antihipertensi standar.

Proses Dokumentasi: *Google Spreadsheet* sebagai pusat penyimpanan data untuk metadata struktur, *docking score*, *centrality measures* dan interaksi molekuler. Python untuk *web scraping STRING*, *data cleaning*, *adjacency matrix* dan *network analysis* otomatis.

3.4 Molecular Docking

Molecular docking adalah metode komputasional yang digunakan untuk memprediksi cara suatu ligan berinteraksi dan berikatan dengan reseptor target pada tingkat atomik [42]. Pendekatan ini memungkinkan pemodelan posisi, orientasi, dan konformasi ligan di dalam situs pengikatan protein, serta estimasi kekuatan ikatan yang dinyatakan sebagai energi bebas pengikatan (*binding affinity*) [43]. Secara umum, proses *docking* terdiri dari dua langkah utama, yaitu pencarian *pose* ligand di dalam situs pengikatan dan penilaian energi kompleks ligan–reseptor menggunakan fungsi skor tertentu [44].

Metode *molecular docking* banyak digunakan dalam desain obat berbasis struktur karena mampu menyaring banyak kandidat senyawa secara efisien sebelum dilakukan uji *in vitro* maupun *in vivo* [42]. Dalam konteks fitofarmaka, *docking* membantu memprediksi senyawa herbal mana yang berpotensi berinteraksi kuat

dengan protein yang berperan dalam patofisiologi penyakit, termasuk hipertensi [45].

3.4.1 Ligan

Ligan adalah molekul yang mampu berikatan secara spesifik dengan reseptor untuk memicu atau menghambat respons biologis tertentu [46]. Ligan dapat berupa hormon, neurotransmitter, obat sintetik, maupun senyawa alam seperti metabolit dari tanaman obat. Pada studi ini, ligan yang digunakan merupakan senyawa bioaktif yang diidentifikasi dari jahe dan seledri, yang kemudian disimulasikan interaksinya terhadap protein target hipertensi melalui *molecular docking*.

3.4.2 Reseptor

Reseptor merupakan makromolekul, umumnya protein, yang berfungsi mengenali dan merespons keberadaan ligan melalui ikatan spesifik [46]. Ikatan ligan–reseptor dapat memicu perubahan konformasi yang menyalakan atau memodulasi jalur pensinyalan intraseluler. Dalam desain obat, reseptor berperan sebagai target terapeutik; ligan dengan afinitas dan selektivitas tinggi terhadap reseptor diharapkan mampu menghasilkan efek farmakologis yang diinginkan dengan efek samping minimal [47].

3.4.3 *Binding Affinity* dan *Scoring Function*

Binding affinity adalah ukuran kekuatan interaksi antara ligan dan protein target dan biasanya direpresentasikan sebagai energi bebas pengikatan dalam satuan kkal/mol [43]. Nilai energi ini umumnya negatif karena proses pengikatan yang spontan dan termodinamis menguntungkan akan menurunkan energi bebas sistem [48]. Dalam konteks *molecular docking*, fungsi skor (*scoring function*) digunakan untuk memperkirakan nilai *binding affinity* dan melakukan pemeringkatan kandidat ligan [42].

Secara praktis, semakin negatif nilai *binding affinity* yang dihasilkan, semakin kuat dan stabil interaksi ligan–reseptor yang diprediksi, sehingga ligan tersebut dianggap lebih potensial sebagai kandidat obat [49]. Beberapa studi *in silico* pada senyawa alami juga menggunakan kriteria serupa, yaitu memilih senyawa dengan energi pengikatan paling rendah sebagai kandidat utama untuk uji lanjutan [45].

3.5 Kriteria Evaluasi Hasil Molecular Docking

3.5.1 Interpretasi Nilai Binding Affinity

Nilai *binding affinity* dari hasil *molecular docking* diinterpretasikan sebagai berikut [50]:

1. Nilai energi yang **negatif** menunjukkan bahwa proses pengikatan ligan–reseptor bersifat spontan dan menguntungkan secara termodynamik; semakin negatif nilainya, semakin kuat ikatan yang diprediksi.
2. Nilai energi yang **mendekati nol** atau **positif** mengindikasikan interaksi yang lemah atau tidak stabil sehingga ligan tersebut umumnya tidak diprioritaskan sebagai kandidat obat.
3. Dalam studi penyaringan virtual, senyawa dengan nilai *binding affinity* paling negatif untuk suatu target biasanya dipilih sebagai kandidat utama untuk dianalisis lebih lanjut, terutama bila nilainya lebih baik atau sebanding dengan ligan native atau obat pembanding [45].

3.5.2 Rentang Nilai Binding Affinity

Berdasarkan beberapa studi *in silico*, rentang nilai *binding affinity* dapat dikategorikan secara umum seperti pada Tabel 3.1 [50].

Tabel 3.1. Interpretasi umum nilai *binding affinity* dalam studi *molecular docking*.

Rentang Nilai (kkal/mol)	Interpretasi
< -9.0	Afinitas sangat kuat
-7.0 s.d. -9.0	Afinitas kuat
-5.0 s.d. -7.0	Afinitas sedang
-3.0 s.d. -5.0	Afinitas lemah
> -3.0	Afinitas sangat lemah/tidak relevan

Dalam penelitian ini, indikator utama pemilihan senyawa terbaik adalah nilai *binding affinity* yang paling negatif terhadap protein target hipertensi, dengan dukungan pola interaksi yang relevan pada visualisasi dua dan tiga dimensi.