

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Alat yang digunakan dalam pengujian *in vitro* adalah neraca analitik Mettler Toledo ME204; *rotary evaporator* Buchi R3; ultrasonik probe sonikator ; *Fourier-transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) Shimadzu 8400; Spektrofotometer UV-Vis (UV mini 1240, Shimadzu); *freeze dryer*; *autoclave*; incubator; dan *hotplate*.

Adapun alat yang digunakan untuk penelitian secara *in silico* diantaranya perangkat keras untuk sistem operasi berupa laptop dengan spesifikasi sebagai berikut: Prosesor 11th Gen Intel® Core™; AutoDock Tools 1.5.7; AutoDock Vina 1.1.2; OpenBabel GUI 2.3.1; PyMOL 2.5.2; dan BIOVIA Discovery Studio Visualizer.

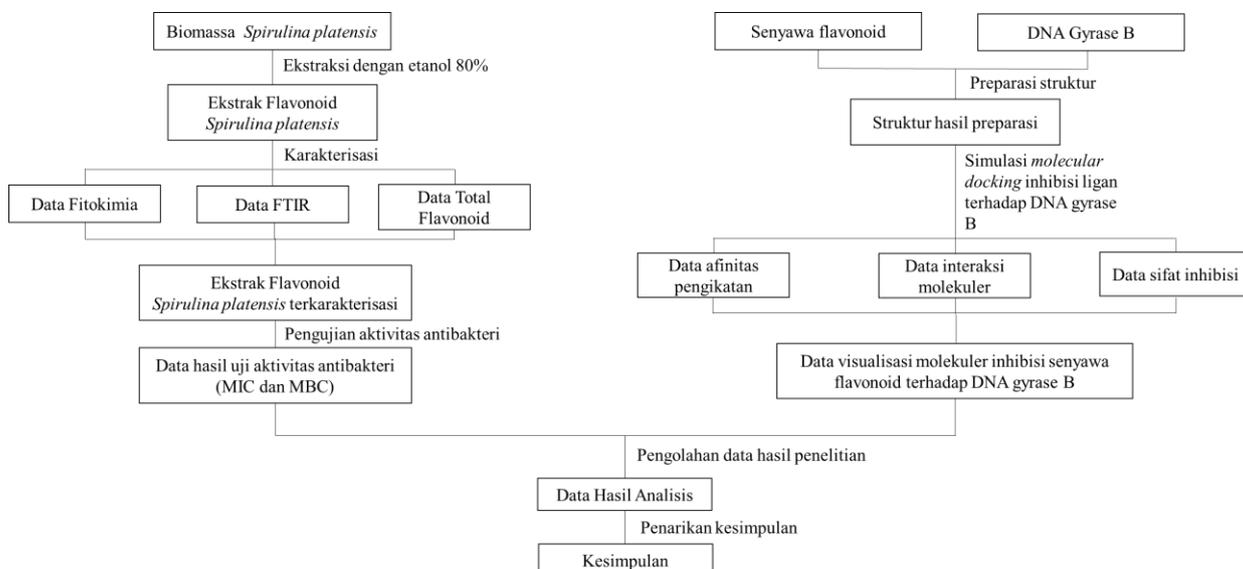
3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan untuk pengujian *in vitro* adalah *Spirulina platensis* dari PT. Alga Bioteknologi Indonesia; etanol 96% teknis yang diencerkan menjadi 80%; etanol 96% (pro analis, Merck); kertas saring Whatman No.1 (ukuran pori 11 µm); pereaksi Meyer; kloroform (pro analis, Merck); asetat anhidrat (pro analis, Merck); asam sulfat pekat (pro analis, Merck); FeCl₃ (pro analis, Merck); asam klorida pekat (pro analis, Merck); natrium hidroksida (pro analis, Merck); kalium bromida (KBr); quercetin (Sigma); aluminium klorida (AlCl₃) (pro analis, Merck); bakteri *P. acnes* ATCC 11827, *S. aureus* ATCC 12228, dan *S. epidermidis* ATCC 6538; *Mueller Hinton Agar* (MHA); *Mueller Hinton Broth* (MHB); kertas cakram; dimetil sulfoksida (DMSO) dan aquades.

Adapun bahan yang digunakan dalam *in silico*, yaitu ciprofloxacin (CID: 2764) sebagai kontrol positif dari enzim, serta ligan uji yang digunakan antara lain apigenin (CID: 5280443); katekin (CID 73160); kaempferol (CID: 5280863); naringin (CID: 442428); naringenin (CID: 439246); quercetin (CID: 5280343); dan rutin (CID: 5280805) yang didapat dari laman <https://pubchem.ncbi.gov/>. Reseptor menggunakan enzim DNA gyrase B dengan kode 4URO yang didapat dari laman <https://www.rcsb.org/>.

3.2 Prosedur Penelitian

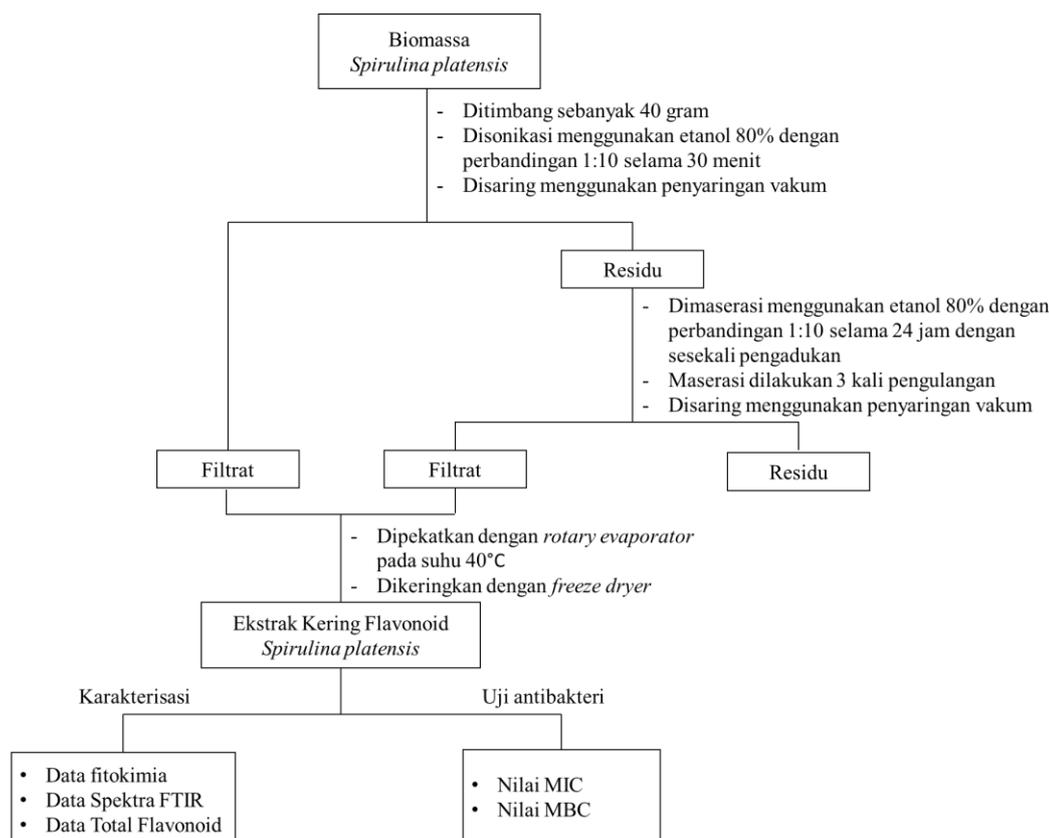
Penelitian ini dilakukan menggunakan dua jenis metode penelitian, yaitu *in vitro* dan *in silico*. Karakteristik awal ekstrak flavonoid dilakukan untuk melihat jumlah senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak *Spirulina platensis*. Penelitian secara *in vitro* dilakukan untuk menguji apakah ekstrak flavonoid yang terkandung dalam *Spirulina platensis* dapat digunakan sebagai agen anti jerawat dilihat dari aktivitas antibakteri sehingga akan didapatkan nilai *minimum inhibitory concentration* (MIC) dan *minimum bactericidal concentration* MBC. Penelitian secara *in silico* dilakukan dengan molekuler docking melihat interaksi protein uji dan ligan target sehingga didapatkan interaksi molekuler, energi afinitas, dan sisi pengikatan. Secara sistematis keseluruhan pengujian digambarkan dalam bagan alir pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1 Diagram Alir Keseluruhan

3.2.1 Studi *In Vitro*

Pada studi *in vitro* terdapat beberapa tahapan yang meliputi ekstraksi sampel *Spirulina platensis* menggunakan metode sonikasi dan maserasi. Ekstrak yang didapat dilakukan pengujian fitokimia, karakterisasi menggunakan FTIR, dan kuantifikasi total kandungan flavonoid. Adapun pengujian bioaktivitas dari ekstrak dengan uji antibakteri untuk melihat nilai MIC dan nilai MBC. Secara sistematis pengujian *in vitro* yang dilakukan digambarkan dalam bagan alir pada **Gambar 3.2**.



Gambar 3.2 Diagram Alir Pengujian *In vitro*

3.2.1.1 Ekstraksi *Spirulina platensis*

Senyawa flavonoid dalam *Spirulina platensis* diekstraksi dengan maserasi berdasarkan metode Mapoung *et al.* (2020) dengan modifikasi. *Spirulina platensis* kering sebanyak 40 gram disonifikasi dalam 400 mL etanol 80% menggunakan sonikator selama 30 menit untuk membantu memecahkan dinding sel sampel. Setelah 30 menit, sampel disaring kemudian dimaserasi dengan merendam residu dalam etanol 80% sebanyak 400 mL selama 24 jam pada suhu ruang. Maserasi dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Ekstrak dikumpulkan dan pelarutnya diuapkan pada suhu 40°C menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak dalam bentuk pasta dikeringkan menggunakan *freeze dryer* dan disimpan pada suhu 4°C untuk pengujian.

3.2.1.2 Analisis Fitokimia Ekstrak *Spirulina platensis*

Analisis fitokimia pada ekstrak *Spirulina Platensis* dilakukan berdasarkan metode Harborne (1998) dan Sofowara (1993), yaitu meliputi pengujian alkaloid, terpenoid, steroid, saponin, tanin, fenol, flavonoid, dan kumarin.

3.2.1.2.1 Uji Alkaloid

Identifikasi senyawa alkaloid dilakukan dengan menambahkan 2 mL HCl pekat ke dalam 2 mL ekstrak *Spirulina platensis* kemudian diuji dengan pereaksi Meyer. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan putih kekuningan.

3.2.1.2.2 Uji Terpenoid

Identifikasi terpenoid dapat dilakukan dengan melarutkan 1 mL ekstrak *Spirulina platensis* dalam kloroform kemudian ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrida dan 2 mL asam sulfat pekat. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya larutan berwarna merah, jingga, atau ungu.

3.2.1.2.3 Uji Steroid

Identifikasi steroid dapat dilakukan dengan melarutkan 1 mL ekstrak *Spirulina platensis* dalam kloroform kemudian ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrida dan 2 mL asam sulfat pekat. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya larutan berwarna biru.

3.2.1.2.4 Uji Saponin

Identifikasi saponin dapat dilakukan dengan menambahkan 2 mL aquades ke dalam 2 mL ekstrak *Spirulina platensis* kemudian dikocok kuat secara vertikal selama 5 menit. Pembentukan busa yang stabil diambil sebagai indikasi adanya saponin.

3.2.1.2.5 Uji Tanin

Identifikasi tanin dapat dilakukan dengan menambahkan 2 mL FeCl_3 10% ke dalam 2 mL ekstrak *Spirulina platensis*. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi biru kehitaman atau hijau kecoklatan.

3.3.1.2.6 Uji Fenol

Identifikasi fenol dapat dilakukan dengan melarutkan ekstrak *Spirulina platensis* ke dalam 2 mL aquades kemudian ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 5%. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi hijau, merah, ungu, biru, atau hitam yang kuat.

3.2.1.2.7 Uji Flavonoid

Identifikasi flavonoid dapat dilakukan dengan menambahkan 1 mL larutan NaOH 2% ke dalam 2 mL ekstrak *Spirulina platensis*. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi kuning.

3.2.1.2.8 Uji Kumarin

Identifikasi senyawa kumarin dapat dilakukan dengan menambahkan 2 mL NaOH 10% ke dalam 2 mL ekstrak *Spirulina platensis*. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi kuning.

3.2.1.3 Karakterisasi FTIR Ekstrak *Spirulina platensis*

Karakterisasi menggunakan FTIR dilakukan untuk melihat gugus-gugus fungsi dari ekstrak *Spirulina platensis* yang dilakukan berdasarkan metode dari Moreno *et al.* (2012). Ekstrak *Spirulina platensis* sebanyak 2 mg digerus dengan 200 mg KBr kemudian dipadatkan hingga membentuk pelet menggunakan alat press. Sampel dipindai pada panjang gelombang 4000-400 cm^{-1} . Pemindaian dilakukan sebanyak 16 kali dan hasilnya merupakan rata-rata dari 16 kali pemindaian.

3.2.1.4 Kuantifikasi Kandungan Flavonoid Total dalam Ekstrak *Spirulina platensis*

Kandungan flavonoid total dari ekstrak *Spirulina platensis* dihitung dengan metode yang dilakukan oleh Chang *et al.* (2002) menggunakan metode kolorimetri dengan modifikasi. Ekstrak *Spirulina platensis* sebanyak 10 mg diencerkan dengan 10 mL etanol pro analis (p.a) 96%. Larutan standar dibuat dengan mengencerkan quercetin dalam etanol p.a 96% dengan konsentrasi 20; 40; 60; 80; 100; 120 $\mu\text{g/mL}$. Larutan ekstrak dan larutan standar masing masing diambil sebanyak 0,5 mL dan dicampurkan dengan 1,5 mL etanol p.a 96%; 0,1 mL aluminium klorida 10% (b/v); 0,5 mL natrium asetat 1M; dan 2,8 mL aquades. Campuran diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Jumlah aluminium klorida 10% diganti dengan jumlah air suling yang sama dalam blanko. Absorbansi dari ekstrak dan larutan standar diukur pada panjang gelombang 415 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Total kandungan flavonoid dinyatakan dalam mg quercetin ekuivalen per gram ekstrak *Spirulina platensis* (mg QE/g).

3.2.1.5 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak *Spirulina platensis*

Uji aktivitas antibakteri dilakukan terhadap bakteri penyebab jerawat, yaitu *P. acnes*, *S. epidermidis*, dan *S. aureus* dengan dilakukan dua pengujian, yaitu MIC dan MBC dari ekstrak *Spirulina platensis*.

3.2.1.5.1 *Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Ekstrak Spirulina platensis*

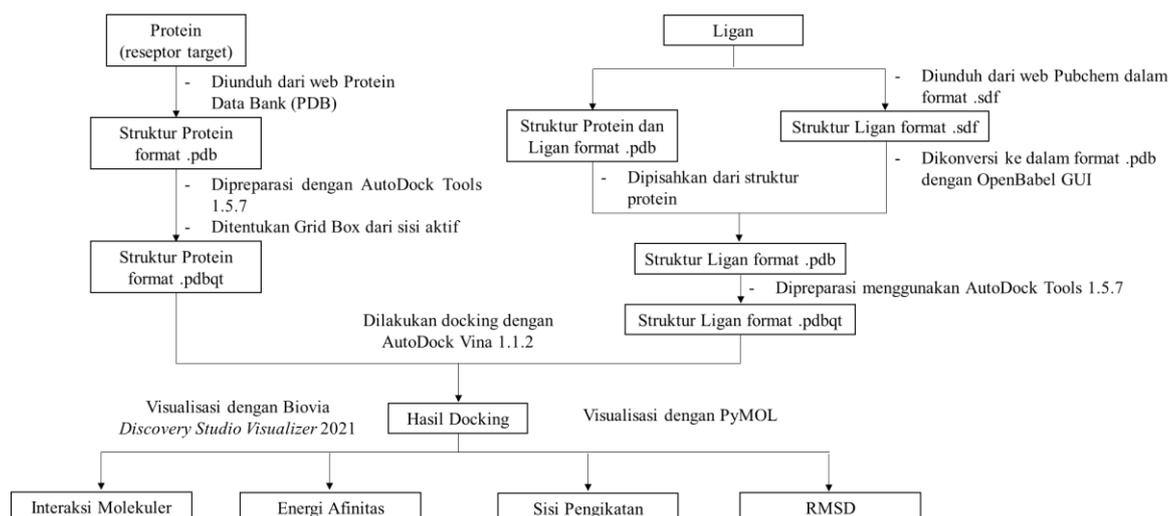
MIC adalah konsentrasi terendah dari senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme setelah masa inkubasi. Pengujian MIC dari ekstrak *Spirulina platensis* ditentukan menggunakan metode mikrodilusi menggunakan *96-well microtiter plate* yang dilakukan oleh Kim *et al.* (2018) dengan modifikasi. Tahapan ini diawali dengan memasukkan media 100 μL MHB ke dalam *microplate* kemudian ekstrak yang telah dilarutkan dalam DMSO untuk mendapatkan konsentrasi 4000 $\mu\text{g/mL}$ dan diencerkan secara serial hingga didapat pengenceran konsentrasi 4000; 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 $\mu\text{g/mL}$ dalam media MHB. Media MHB yang berisi ekstrak kemudian ditambahkan 10 μL suspensi bakteri uji. *96-well microtiter plate* yang berisi campuran diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Media yang berisi MHB saja digunakan sebagai kontrol negatif dan media yang berisi inokulum bakteri digunakan sebagai kontrol positif.

3.2.1.5.3 *Minimum Bactericidal Concentration (MBC) Ekstrak Spirulina platensis*

MBC didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dari senyawa yang membunuh mikroorganisme yang ditandai dengan tidak adanya koloni pada media agar setelah dilakukan penggoresan dari tiap sumuran *microplate*. Metode ini mengikuti Wiegand *et al.* (2008). Sebanyak 10 μl suspensi dari setiap sumur *96-well microtiter plate* dipindahkan dan digoreskan pada pelat agar MHA yang kemudian diinkubasi selama 24 jam pada 37°C. Konsentrasi terendah dari ekstrak yang benar-benar membunuh bakteri ditentukan sebagai MBC.

3.2.2 Studi *In Silico*

Pada proses penelitian kajian *in silico* penghambatan aktivitas lipase oleh senyawa flavonoid dengan simulasi *molecular docking* dilakukan penelitian yang terdiri dari beberapa tahap, antara lain: (1) Preparasi protein; (2) Preparasi ligan; (3) *Docking* ligan-protein menggunakan AutoDock Vina 1.1.2; (4) Visualisasi sisi pengikatan dan validasi RMSD menggunakan Pymol; (5) Visualisasi interaksi molekuler dan energi afinitas *docking* menggunakan Discovery Studio Visualizer 2021. Dari hasil visualisasi *docking* yang telah dilakukan, digunakan untuk memprediksi interaksi antara protein dan ligan. Bagan alir dari penelitian yang dilakukan ditunjukkan pada **Gambar 3.3**.



Gambar 3.3 Diagram Alir Pengujian *In silico*

3.2.2.1 Preparasi Protein

Struktur kristal protein sebagai reseptor yang akan digunakan, yaitu DNA gyrase B dengan (PDB ID: 4URO) diunduh dengan format .pdb dari Protein Data Bank (PDB) yang terdapat pada laman <https://www.rcsb.org/>. Protein tersebut dipreparasi menggunakan Autodock Tools 1.5.7 dengan menghilangkan pelarut air dan residu lainnya melalui *Edit* → *Delete Water*. Penghilangan molekul air bertujuan agar tidak mengganggu keberlangsungan proses *docking* dan untuk memastikan bahwa yang benar-benar berinteraksi adalah ligan dan reseptor. Selanjutnya dipilih rantai protein dan molekul-molekul yang berikatan namun tidak dibutuhkan dalam proses *docking* dihilangkan terlebih dahulu, salah satunya ligan natif. Data protein yang telah disederhanakan kemudian disimpan dalam format .pdb yang akan dipreparasi lebih lanjut dengan menambahkan hidrogen dengan cara *Edit* → *Hydrogens* → *Add* → *Pollar Only* dan ditambahkan perhitungan muatan ‘Gaisteger’ dengan cara *Edit* → *Charges* → *Compute Gaisteger*. Berikutnya protein di save dengan format pdbqt melalui *Grid* → *Macromolecule* → *Choose* → *Select Molecule* → *Save as PDBQT*.

Digunakan ligan natif yang telah terpisah dari protein untuk penentuan grid box yang bertujuan untuk mengetahui titik koordinat x, y dan z pada sisi aktif dari protein dengan menggunakan software Autodock Tools 1.5.7 melalui *Grid* → *Grid Box* → *Center* → *Center on Ligand*. Koordinat grid box ditentukan berdasarkan koordinat ligan natif dari protein yang nantinya akan digunakan sebagai koordinat

ligan uji. Posisi grid box yang telah diatur sesuai dengan posisi dan ukuran ligan kemudian disimpan dalam note dengan format .txt untuk simulasi docking.

3.2.2.2 Preparasi Ligan

Ligan yang digunakan antara lain ciprofloxacin (CID: 2764) sebagai kontrol positif dari enzim, serta ligan uji yang digunakan antara lain apigenin (CID: 5280443); katekin (CID: 73160); kaempferol (CID: 5280863); naringin (CID: 442428); naringenin (CID: 439246); quercetin (CID: 5280343); dan rutin (CID: 5280805). Ligan diunduh dari laman <https://pubchem.ncbi.gov/> dengan format .sdf kemudian diubah formatnya kedalam bentuk .pdb menggunakan Open Babel GUI. Setelah ligan dalam format .pdb kemudian dipreparasi dengan menggunakan AutodockTools 1.5.7. Pada preparasi ligan dilihat titik rotasi dari ligan melalui *Ligand* → *Torsion Tree* → *Choose Torsion*, jumlah torsi aktif melalui *Ligand* → *Torsion Tree* → *Set Number of Torsions* dan kemudian hasil ligan disimpan berformat .pdbqt melalui *Ligand* → *Output* → *Save as PDBQT*. Penentuan jumlah torsi aktif dimaksudkan untuk mengetahui ikatan-ikatan aktif yang dapat berotasi selama proses docking. Semakin banyak torsi aktif yang dimiliki ligan, maka fleksibilitasnya akan semakin meningkat.

3.2.2.3 Proses Molekular Docking Protein-Ligan

Protein dan ligan hasil preparasi dilakukan *docking* ligan-protein menggunakan Autodock Vina 1.1.2. Proses *molecular docking* ligan-protein melibatkan *command prompt* dengan perintah `vina.exe --config nama file.txt --cpu jumlah core computer`. Perintah tersebut memproses perhitungan posisi grid box yang sebelumnya telah disimpan dalam note dengan format .txt. Parameter kestabilan yang dihitung adalah energi bebas Gibbs (ΔG) dan interaksi kimia yang terbentuk.

3.2.2.4 Visualisasi Sisi Pengikatan dan Validasi RMSD

Validasi dilakukan dengan cara memisahkan stuktur protein dari ligan natif yang sudah terikat dengan protein, kemudian dilakukan proses *docking* ulang untuk mengetahui nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*). Apabila RMSD berada pada nilai dibawah 2Å maka metode penambatan dapat dikatakan valid sehingga metode *docking* dapat digunakan untuk *docking* senyawa uji (Bajda *et al.*, 2013).

Validasi metode *docking* dianalisis menggunakan program PyMOL kemudian hasilnya divisualisasikan untuk melihat sisi pengikatan protein-ligan.

3.2.2.5 Visualisasi Molekuler dan Analisis Mekanisme Inhibisi

Visualisasi penting untuk mendalami dan memahami struktur suatu molekul atom pada ligan yang berikatan dengan reseptor (protein), dan melihat interaksi residu-residu asam amino antara ligan dengan reseptor (protein) (DeLano & Bromberg, 2004). Visualisasi dari ligan dan reseptor divisualisasikan menggunakan perangkat lunak BIOVIA Discovery Studio Visualization 2021. Hasil visualisasi akan memperlihatkan jenis ikatan, panjang ikatan hidrogen dengan klasifikasi jarak ikatan hidrogen (Guedes *et al.*, 2014) yang ditunjukkan pada **Tabel 3.1**.

Tabel 3.1 Klasifikasi Jarak Ikatan

Jarak (Å)	Keterangan
2,2-2,5	Kuat
2,5-3,2	Moderat dan elektrostatis
3,2-4,0	Lemah