

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan bulan Agustus 2023. Penelitian dilakukan di laboratorium riset Kimia Hayati Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia dan tempat tinggal peneliti di Kecamatan Ciparay, Kabupaten Bandung, Jawa Barat.

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1 Alat

Alat yang digunakan untuk uji *in vitro* adalah neraca analitik Mettler Toledo ME204, alat gelas, *vacuum rotary evaporator* Buchi R3, *freeze dryer*, spektrofotometer UV-Vis (UV mini 1240, Shimadzu), spektrofotometer FTIR (Simadzu 8400), cawan petri, kawat ose, pipet mikro, *vortex*, *autoklaf*, *hotplate* CIMAREC<sup>+</sup>.

Adapun alat yang digunakan dalam studi uji *in silico* simulasi *molecular docking* dalam penelitian ini adalah laptop dengan prosesor Intel(R) Celeron(R) N4000 Window 10 Pro 64-bit sebagai sistem operasi dan perangkat lunak yang terdiri dari AutoDock Tools, Open Babel GUI, AutoDock Vina, Pymol, dan BIOVIA *Discovery Studio Visualizer* 2021.

##### 3.2.2 Bahan

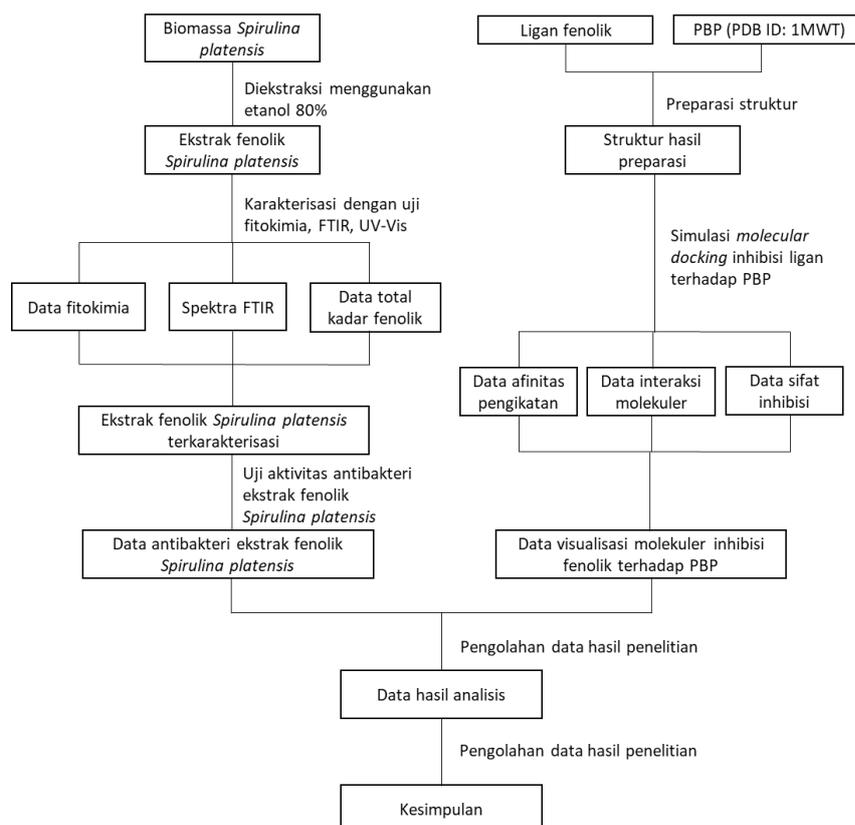
Bahan yang digunakan dalam penelitian *in vitro* adalah serbuk *Spirulina platensis* dari PT. Amorina Kirana Adiwarna, Etanol 80%, akuades, kertas saring Whatman No.1 (ukuran pori 11  $\mu$ ), besi (III) klorida ( $\text{FeCl}_3$ ) (pro analis, Merck), natrium hidroksida (NaOH) (Philip Harris), asam klorida (HCl) (pro analis, Merck), kloroform (pro analis, Merck), reagen Mayer, asam sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (pro analis, Merck), asam galat (pro analis, May & Maker), follin ciocalteu (Merck), natrium karbonat 20%, natrium klorida (NaCl) 0,85%, media Luria Bertani (LB) *broth*, media Luria Bertani (LB) agar, media *Brain-heart Infosion* (BHI) *broth*, media *Brain-heart Infosion* (BHI) agar, media *Mueller*

*Hinton Agar* (MHA), media *Mueller Hinton Broth* (MHB), standar Mc Farland, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Adapun bahan yang digunakan dalam studi *in silico molecular docking* adalah protein enzim PBP, ligan uji asam ferulat, asam galat, asam kafeat, asam klorogenat, asam p-kumarat, asam siringat, asam vanilat, dan ligan pembanding amoxicillin. Struktur protein enzim PBP dengan ligan natif beta laktam (1MWT) diperoleh dari database Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>) (Berman *et al.*, 2000) dengan format pdb. Adapun data struktur 3D dari senyawa ligan uji asam ferulat (CID 445858), asam galat (CID 370), asam kafeat (CID 689043), asam klorogenat (CID 1794427), asam p-kumarat (CID 637542), asam siringat (CID 10742), asam vanilat (CID 8468), amoxicillin (CID 33613) diperoleh dari database PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) (Kim *et al.*, 2016) dalam format sdf.

### 3.3 Prosedur Penelitian

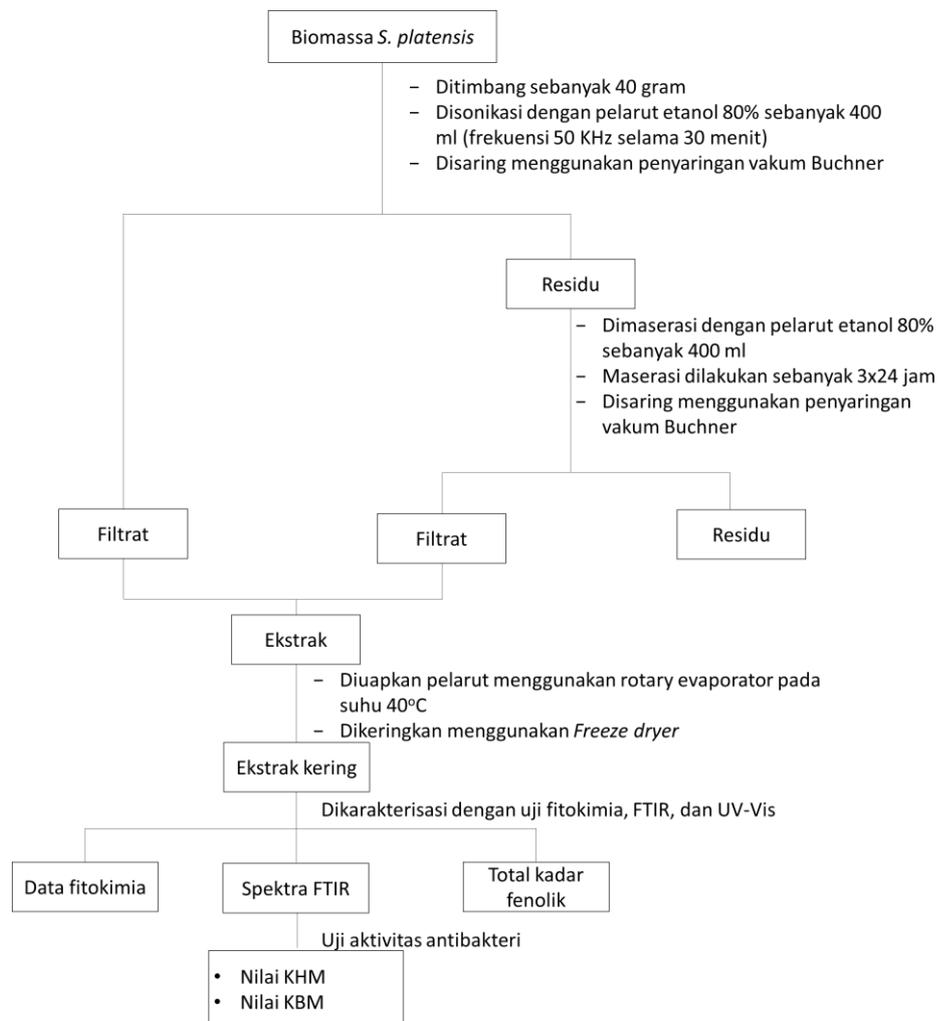
Alur keseluruhan pada penelitian ini ditunjukkan pada **Gambar 3.1**.



**Gambar 3.1** Diagram alir penelitian *in vitro* dan *in silico*

### 3.3.1 Studi In Vitro

Tahap penelitian *in vitro* ditunjukkan pada **Gambar 3.2**.



**Gambar 3.2** Tahap penelitian *in vitro*

#### 3.3.1.1 Preparasi Ekstrak Fenolik dari *Spirulina platensis*

Biomassa *Spirulina platensis* diekstraksi dengan maserasi berdasarkan metode Mapoung *et al.* (2020) dengan modifikasi. Preparasi dilakukan dengan metode sonikasi dan maserasi. Biomassa *Spirulina platensis* disonikasi sebanyak 40 gram dalam 400 mL etanol 80% menggunakan sonikator dengan frekuensi 50 KHz selama 30 menit untuk membantu memecahkan dinding sel sampel. Setelah dilakukan sonikasi 30 menit, sampel disaring menggunakan penyaringan vakum. Filtrat dikumpulkan, kemudian residu dimaserasi menggunakan pelarut etanol 80% sebanyak 400 mL selama 24 jam pada suhu ruang. Maserasi dilakukan

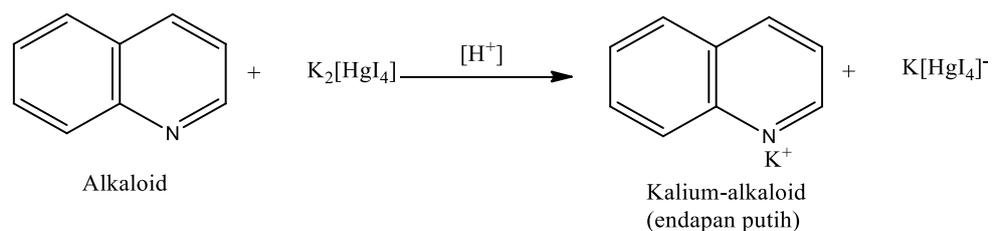
sebanyak 3 kali pengulangan. Filtrat dikumpulkan dan pelarutnya diuapkan pada suhu 40°C menggunakan *rotary evaporator* untuk memperoleh ekstrak pekat. Ekstrak dalam bentuk pasta disimpan pada suhu 4°C kemudian dikeringkan menggunakan *freeze-drying*.

### 3.3.2.1 Uji Fitokimia

Uji Fitokimia dilakukan berdasarkan metode Raaman (2006) dengan modifikasi. Uji fitokimia dilakukan untuk senyawa golongan alkaloid, terpenoid dan steroid, saponin, flavonoid, fenol, dan kumarin.

#### 3.3.2.1.1 Uji Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan menambahkan 2 mL HCl pekat ke dalam 2 mL ekstrak *Spirulina platensis*, dilanjutkan dengan penambahan reagen Mayer. Terbentuknya endapan putih mengindikasikan keberadaan alkaloid. Asam klorida bertindak sebagai katalis dalam reaksi alkaloid dengan reagen Mayer. Nitrogen pada alkaloid bereaksi dengan ion  $K^+$  (kalium tetraiodomerkurat (II)) menghasilkan senyawa kompleks kalium-alkaloid yang diindikasikan dengan pembentukan endapan putih. Persamaan reaksi pada uji alkaloid ditunjukkan pada **Gambar 3.3**.

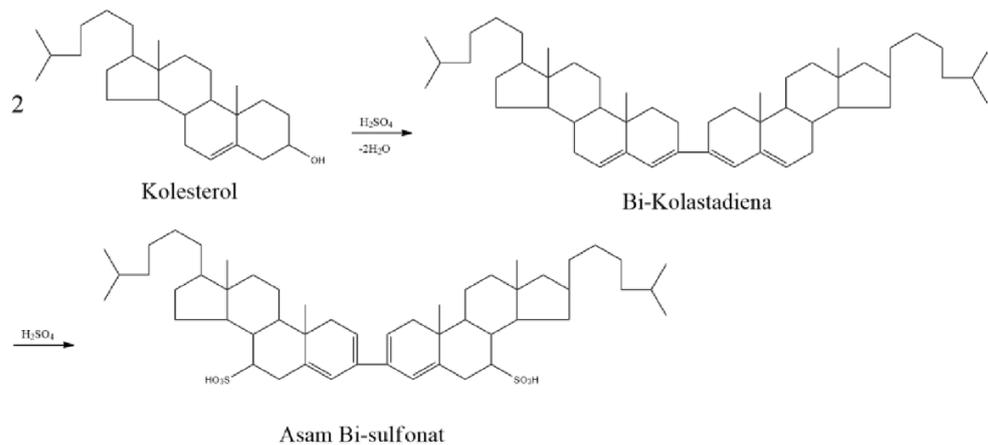


**Gambar 3.3** Persamaan reaksi uji alkaloid

#### 3.3.2.1.2 Uji Terpenoid dan Uji Steroid

Uji terpenoid dilakukan dengan melarutkan ekstrak dalam 1 mL kloroform, kemudian ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrida dan 2 mL asam sulfat pekat. Terbentuknya larutan berwarna merah, jingga, atau ungu menunjukkan keberadaan terpenoid. Uji steroid dilakukan dengan metode yang sama. Uji terpenoid dan steroid ini diuji dengan uji Salkowski. Golongan senyawa terpenoid merupakan analog dari terpen yang mengandung atom oksigen. Dikarenakan steroid merupakan derivat dari terpenoid, maka pengujian

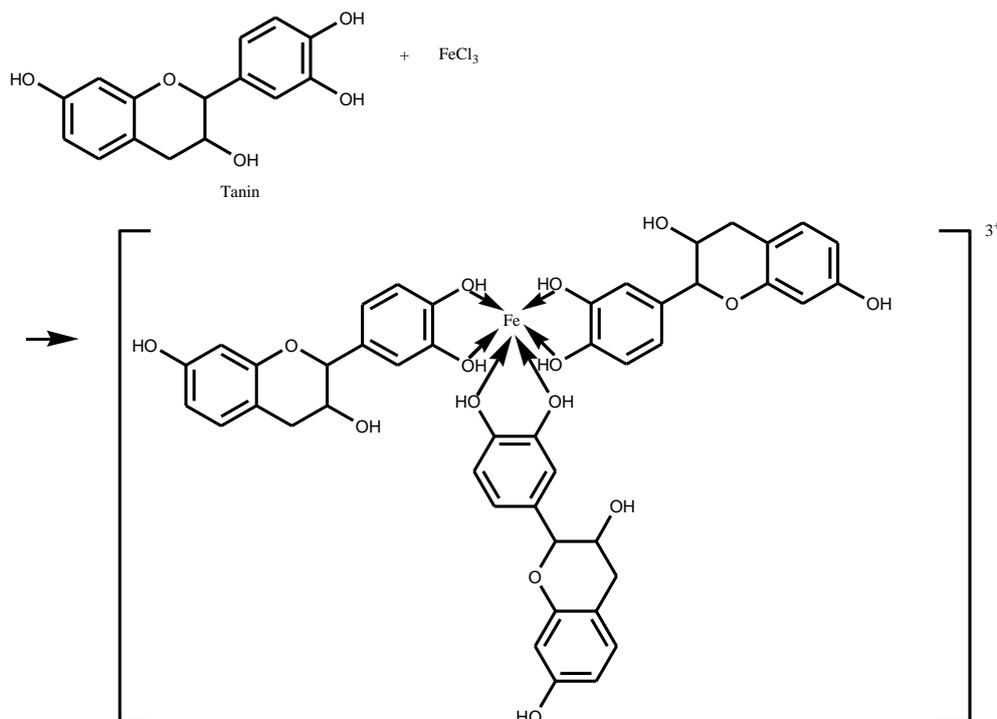
Salkowski dapat digunakan untuk identifikasi kedua golongan tersebut. Prinsip pengujian ini yaitu terbentuknya asam bi-sulfonat yang berwarna merah atau jingga, dari bi-kolestadiena hasil dihidrogenasi. Senyawa steroid dan terpenoid mengalami dehidrogenasi karena asam sulfat bersifat higroskopis. Selanjutnya reaksi sulfonasi secara spontan terjadi pada posisi 7 dan 7'. Persamaan reaksi uji Salkowski ditunjukkan oleh **Gambar 3.4**.



**Gambar 3.4** Persamaan reaksi Uji Salkowski

### 3.3.2.1.3 Uji Taninn

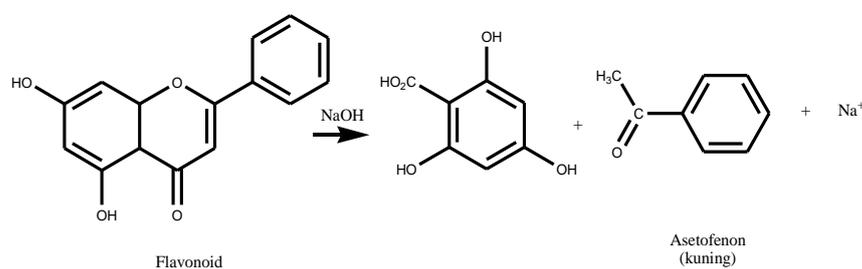
Uji tannin dilakukan dengan menambahkan 2 mL  $\text{FeCl}_3$  10% ke dalam 2 mL ekstrak *Spirulina platensis*. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi hijau kecoklatan. Persamaan reaksi uji tannin ditunjukkan pada **Gambar 3.5**.



**Gambar 3.5** persamaan reaksi uji tanin

#### 3.3.2.1.4 Uji Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan menambahkan 1 mL NaOH 2% ke dalam 2 mL ekstrak *Spirulina platensis*, perubahan warna larutan menjadi warna kuning menandakan adanya flavonoid. Persamaan reaksi uji flavonoid ditunjukkan pada **Gambar 3.6**.

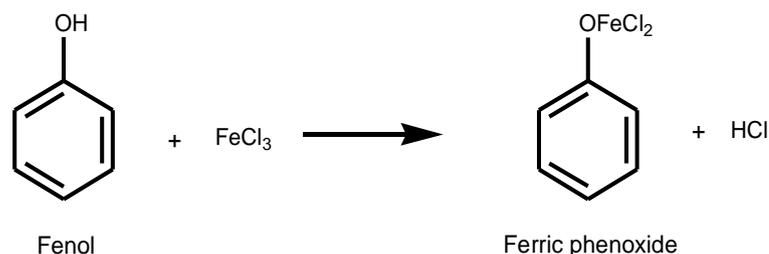


**Gambar 3.6** Persamaan reaksi uji flavonoid

#### 3.3.2.1.5 Uji Fenol

Uji fenol dilakukan dengan menambahkan 2 mL 5%  $\text{FeCl}_3$  ke dalam 2 mL ekstrak *Spirulina platensis*. Perubahan warna larutan menjadi biru atau hijau mengindikasikan keberadaan fenol. Gugus hidroksi pada fenol bereaksi dengan

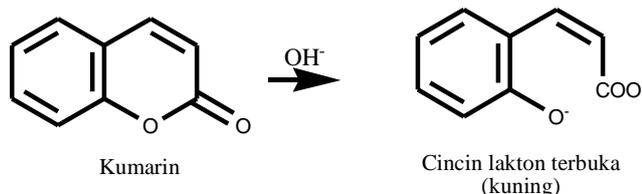
$\text{FeCl}_3$  membentuk senyawa kompleks berwarna biru atau hijau. Persamaan reaksi pada uji fenol ditunjukkan dari **Gambar 3.7**.



**Gambar 3. 7** persamaan reaksi uji fenol

### 3.3.2.1.6 Uji Kumarin

Uji kumarin dilakukan dengan menambahkan 2 mL NaOH 10% ke dalam 2 mL ekstrak *Spirulina platensis*. Perubahan warna menjadi warna kuning mengindikasikan keberadaan kumarin. Gugus hidroksi NaOH menyerang secara nukleofil cincin lakton pada kumarin, sehingga cincin lakton terbuka dan dihasilkan senyawa berwarna kuning. Persamaan reaksi uji kumarin ditunjukkan pada **Gambar 3.8**.



**Gambar 3.8** persamaan reaksi uji kumarin

### 3.3.2.1.8 Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan ditambahkan 2 mL akuades ke dalam 2 mL ekstrak kemudian dikocok selama 5 menit. Terbentuknya buih yang stabil menandakan adanya saponin.

## 3.3.3.1 Karakterisasi Ekstrak *Spirulina platensis*

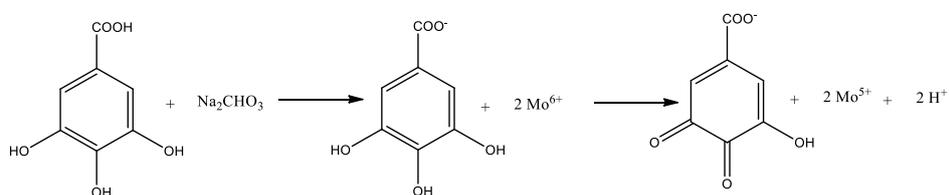
### 3.3.3.1.1 Karakterisasi menggunakan FTIR

Analisis FTIR ekstrak fenolik *Spirulina platensis* dilakukan berdasarkan metode Battaler & Capareda (2018) dengan modifikasi. Analisis FTIR

digunakan untuk melihat gugus-gugus fungsi dari ekstrak *Spirulina platensis*. Ekstrak *Spirulina* kering digerus dengan 200 mg KBr kemudian ditempa dengan tekanan 15.000 psi. Kemudian diukur menggunakan FTIR Shimadzu 8400 dengan rentang panjang gelombang 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.3.3.1.2 Kuantifikasi Total Kandungan Fenolik dalam Ekstrak *Spirulina platensis*

Kuantifikasi total kandungan fenolik ekstrak *Spirulina platensis* dilakukan berdasarkan metode Madaan *et.al* (2011) dengan modifikasi. Ekstrak *Spirulina platensis* ditimbang sebanyak 50 mg kemudian dilarutkan dalam 10 mL akuades, dengan demikian diperoleh konsentrasi ekstrak 5.000 ppm. Sebanyak 0,5 mL ekstrak ditambahkan 2,5 mL larutan folin ciocalteu 10% kemudian ditambahkan 2 mL larutan natrium karbonat (20% b/v). kemudian campuran diinkubasi selama 5 menit dalam *water bath* dengan suhu 50°C. Absorbansi kompleks berwarna biru diukur pada panjang gelombang 760 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Deret standar dibuat dengan melarutkan asam galat dalam akuades dan dibuat rentang konsentrasi 6,25; 12,5; 25; 50; dan 100 ppm. Akuades digunakan sebagai blanko. Total kandungan fenolik diekspresikan sebagai mg *gallic acid equivalent* (GAE) per gram ekstrak *Spirulina platensis*. Pengujian dilakukan sebanyak triplo. Persamaan reaksi asam galat dengan reagen folin-ciocalteu ditunjukkan pada **Gambar 3.9**.



**Gambar 3.9** persamaan reaksi asam galat dengan reagen *folin-ciocalteu*

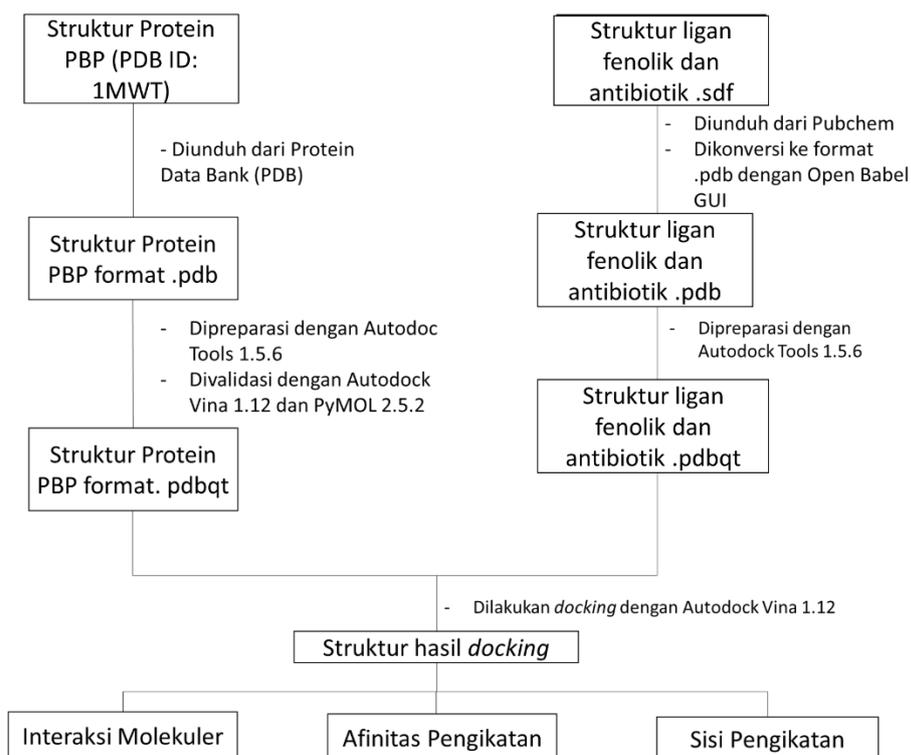
### 3.3.4.1 Uji Aktivitas Antibakteri

Aktivitas antibakteri ekstrak fenolik *Spirulina platensis* dieuji berdasarkan metode CLSI (2012). Aktivitas antibakteri ekstrak fenolik *Spirulina platensis* dievaluasi melalui nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC). Jumlah populasi bakteri uji *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Pseudomonas aeruginosa* yang

digunakan yaitu  $10^6$ cfu/mL. Dimasukan 100  $\mu$ L media Mueller Hinton Broth (MHB) steril ke dalam *microplate well* no 1-12. Kemudian larutan ekstrak *Spirulina platensis* diteteskan sebanyak 100  $\mu$ L ke dalam *well* no 12, dihomogenkan dengan menaik turunkan larutan pada tip mikropipet. Kemudian dari *well* no 12 diambil sebanyak 100  $\mu$ L dimasukan ke dalam *well* no 11, demikian seterusnya sampai dengan *well* no 3. Kemudian teteskan 10  $\mu$ L suspensi bakteri uji ke dalam *well* no 2 sampai no 12, dimana *well* no 1 sebagai kontrol media dan *well* no 2 sebagai kontrol tumbuh bakteri. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Diamati kekeruhan yang terjadi pada tiap *well* dan diperoleh nilai MIC. Setelah itu nilai MBC diperoleh dengan dilakukan penggoresan campuran pada tiap *well* dalam *microplate* ke dalam media agar. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Diamati ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri. Nilai MBC diperoleh jika tidak ada pertumbuhan bakteri. Pengujian dilakukan sebanyak triplo.

### 3.3.2 Studi *In silico*

Studi *in silico* dilakukan melalui metode simulasi *molecular docking*. Tahapan umum dari studi *molecular docking* ini meliputi preparasi protein dan ligan menggunakan perangkat lunak AutoDock Tools 1.5.6 Morris *et al.* (2009), simulasi *docking* menggunakan AutoDock Vina 1.1.2 (Trott & Olson, 2010) , validasi hasil perhitungan *molecular docking* menggunakan PyMOL 2.5.2, serta visualisasi sisi pengikatan dan interaksi molekuler menggunakan PyMOL 2.5.2 (Schrödinger, L. & DeLano, W., 2020) dan BIOVIA Discovery Studio Visualizer (Dassault Systèmes BIOVIA, 2021). Tahap penelitian *in silico* ditunjukkan pada **Gambar 3.10**.



**Gambar 3.10** Tahapan Penelitian In silico Molecular *docking*

### 3.3.2.1 Preparasi Protein (Reseptor)

Struktur protein PBP (PDB: 1MWT) diunduh dari basis data Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org>) (Berman *et al.*, 2000) dengan format pdb. Preparasi protein dilakukan menggunakan perangkat lunak AutoDock Tools 1.5.6 (Morris *et al.*, 2009) dengan cara menghilangkan molekul air, memisahkan ligan native, menambahkan atom hidrogen pada gugus polar, dan muatan parsial dengan compute gasteiger, lalu disimpan dalam format pdb. Setelah itu, diatur grid box untuk sisi pengikatan antara protein dengan ligan.

### 3.3.2.2 Preparasi Ligan

Struktur dari ligan uji fenolik dari *Spirulina platensis* serta struktur ligan pembanding amoxicillin diunduh dari database PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) (Kim *et al.*, 2016) dalam format sdf. Masing-masing struktur dikonversi ke dalam format pdb menggunakan OpenBabel GUI 2.3.1 (O'Boyle *et al.*, 2011) untuk menyesuaikan format dalam proses *molecular docking*. Masing-masing dipreparasi menggunakan perangkat lunak AutoDock Tools 1.5.6 (Morris *et al.*, 2009). Diatur torsi pada ligan dengan cara Ligand → Torsion Tree → Choose Torsion dan Ligand → Torsion Tree →

Set Number of Torsion, kemudian disimpan dalam format pdbqt dengan cara Ligand → Output → Save as PDBQT.

### 3.3.2.3 Perhitungan dan Validasi *Molecular docking*

Protein dan ligan yang telah dipreparasi dibuatkan file config untuk dilakukan simulasi *molecular docking* menggunakan perangkat lunak AutoDock Vina 1.1.2 (Trott & Olson, 2010) dengan bantuan command prompt. Validasi dan visualisasi hasil perhitungan dilakukan melalui perangkat lunak PyMOL 2.5.2 (Schrödinger, L. & DeLano, W., 2020). Validasi metode dilakukan dengan cara menghitung ulang protein dengan ligan natif. Hasil *docking* dapat dikatakan valid jika memenuhi nilai root mean square deviation (RMSD) kurang dari 2 Å.

**Tabel 3. 1** koordinat grid box dan nilai RMSD

Reseptor	Koordinat (Å)			Ukuran (Å)			RMSD (Å)
	X	Y	Z	X	Y	Z	
PBP	28.538	29.299	87.273	10	8	6	1,645

### 3.3.2.4 Visualisasi Hasil *Molecular docking*

Visualisasi struktur kompleks ligan dan protein dilakukan melalui perangkat lunak PyMOL 2.5.2 (Schrödinger, L. & DeLano, W., 2020) dan BIOVIA Discovery Studio Visualizer (Dassault Systèmes BIOVIA, 2021). PyMOL 2.5.2 (Schrödinger, L. & DeLano, W., 2020) digunakan untuk membuat kompleks ligan dengan protein, di mana protein divisualisasikan menggunakan struktur surface dan ligan melalui ball and stick. BIOVIA Discovery Studio Visualizer (Dassault Systèmes BIOVIA, 2021) digunakan untuk melihat struktur 3D dan 2D dari kompleks serta interaksi dengan residu asam amino yang terbentuk antara protein dengan ligan.