

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai Agustus 2023 di Laboratorium Riset Program Studi Kimia FPMIPA UPI dan di tempat tinggal peneliti yaitu Kecamatan Andir, Kota Bandung, Provinsi Jawa Barat melalui sistem dalam jaringan (daring) menggunakan simulasi *molecular docking*.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan untuk penelitian secara *in vitro* diantaranya neraca analitik, blender, *hot plate*, *magnetic stirrer*, sentrifugator, oven, pipet tetes, pipet volumetri, pipet ukur, mikropipet, buret, termometer, pH meter, *waterbath*, vortex, spektroskopi FTIR (Shimadzu 8400), dan spektrofotometer UV-Vis (UV mini 1240, Shimadzu). Alat yang digunakan untuk penelitian secara *in silico* diantaranya perangkat keras berupa laptop dengan prosesor Intel Celeron N4000 dengan sistem operasi Windows 10 64-bit, perangkat lunak Avogadro 1.2.0; AutoDock Tools 1.5.7; AutoDock Vina 1.1.2; Open Babel GUI 2.3.1; PyMOL 2.5.2; dan BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2021.

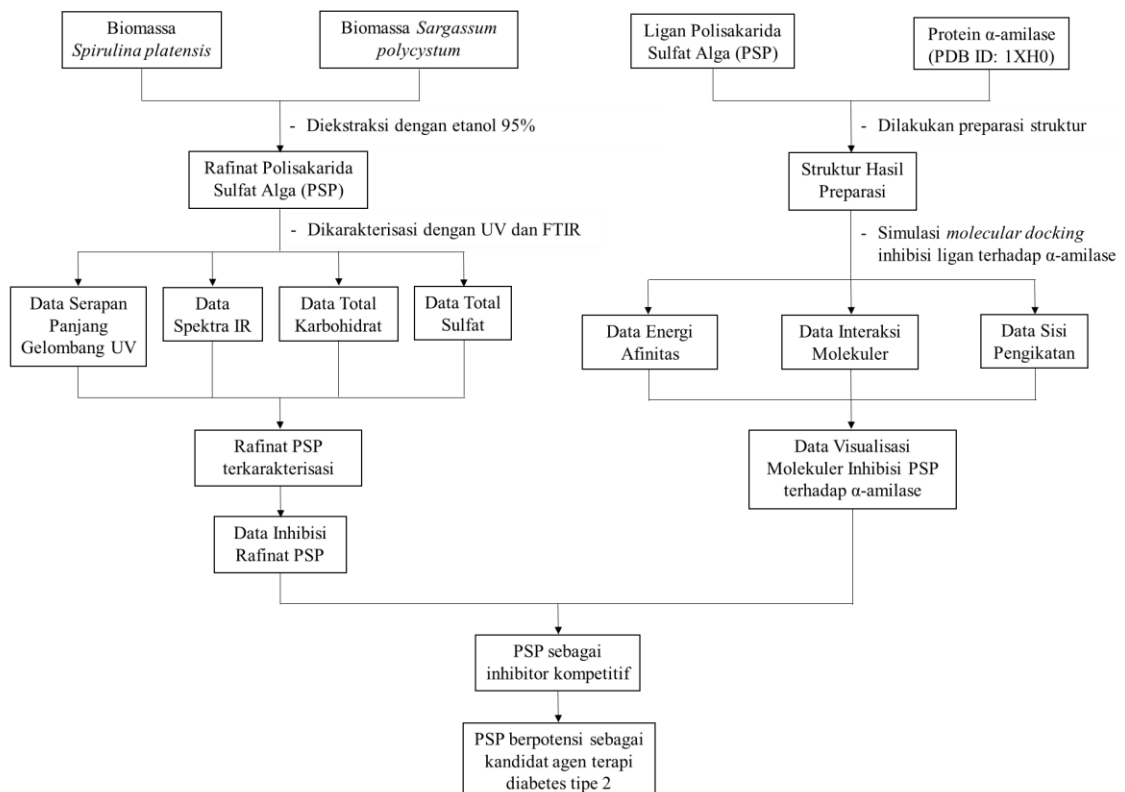
3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian secara *in vitro* yaitu biomassa *Spirulina platensis* dari PT. Alga Bioteknologi Indonesia; biomassa *Sargassum polycystum* dari PT. Alga Bioteknologi Indonesia; aquades; etanol 95% (teknis); asam trikloroasetat (TCA pro analis, Merck); asam klorida (HCl pro analis, Merck); natrium hidroksida (NaOH \geq 97%), kalsium klorida (CaCl₂ pro analis, Merck); kalium bromida (KBr); larutan α -amilase dari saliva non-diabetes melitus tipe 2 dan saliva penderita diabetes melitus tipe 2; buffer fosfat (pH 6,9), *starch soluble* (pro analis, Merck); asam 3,5-dinitrosalisilat (sigma); akarbosa; asam sulfat pekat (H₂SO₄ pro analis, Merck); fenol (pro analis, Merck); gelatin (sigma); D-glukosa (pro analis, Merck); maltosa (pro analis, Merck); barium klorida (BaCl₂ pro analis, Merck); dan kalium sulfat (K₂SO₄ pro analis, Merck).

Bahan yang digunakan untuk penelitian secara *in silico* menggunakan simulasi *molecular docking* yaitu data struktur kristal protein sebagai reseptor yang dapat diunduh dari website <https://www.rcsb.org/> dengan PDB ID 1XHO untuk enzim α -amilase. Adapun struktur 3D ligan polisakarida sulfat dari *Spirulina platensis* (PSP) dan *Sargassum polycystum* (fukoidan) yang telah dibuat dan dioptimasi menggunakan perangkat lunak Avogadro 1.2.0. Ligan akarbosa sebagai kontrol positif dengan ID 41774 dapat diunduh melalui <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

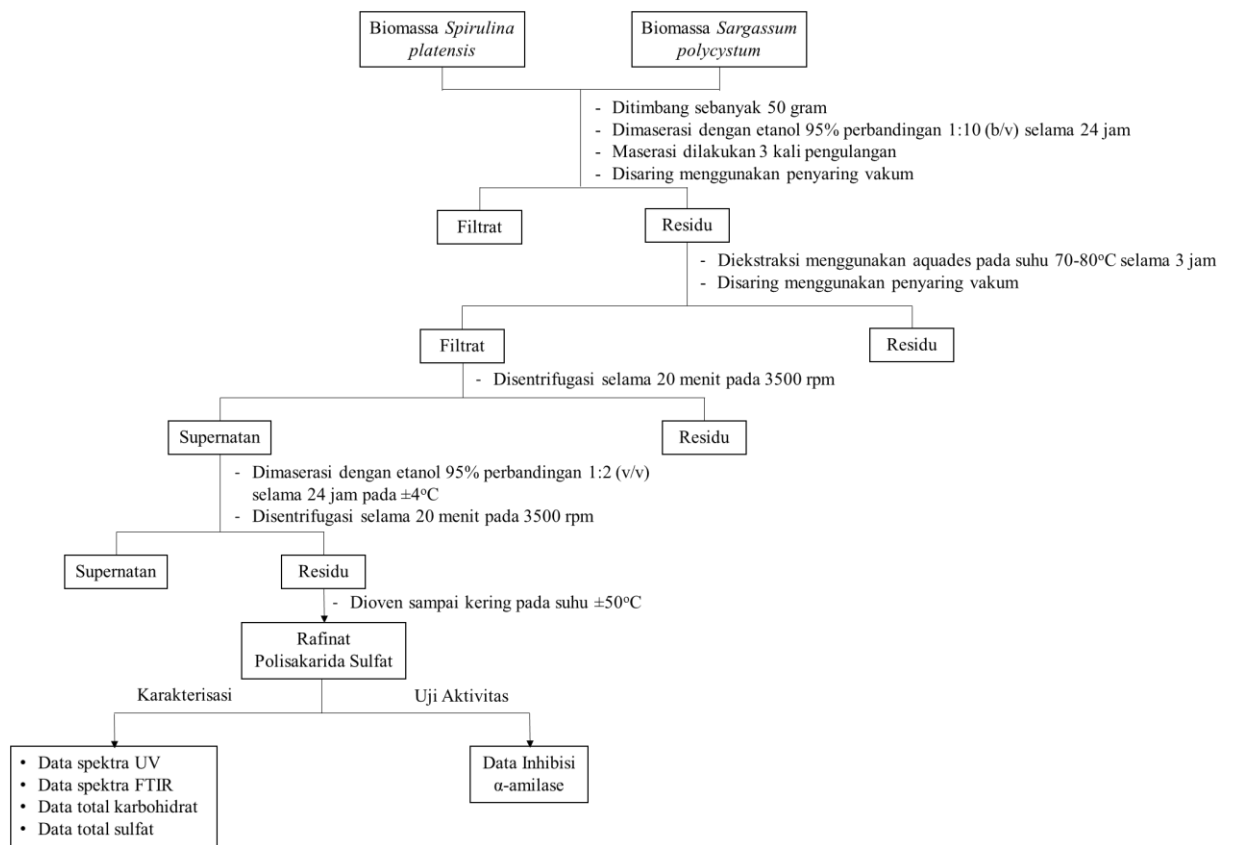
3.3 Diagram Penelitian

Penelitian penentuan potensi antidiabetes polisakarida sulfat dari *Spirulina platensis* (PSP) dan *Sargassum polycystum* (fukoidan) dapat dilakukan melalui tahapan ekstraksi polisakarida sulfat alga. Rafinat yang didapat kemudian dikarakterisasi menggunakan UV-Vis dan FTIR, dianalisis komposisi karbohidrat dan sulfat, serta evaluasi potensi polisakarida sulfat alga sebagai kandidat antidiabetes tipe 2 secara *in vitro* dan *in silico*. Diagram alir penelitian secara keseluruhan ditunjukkan pada **Gambar 3.1**.

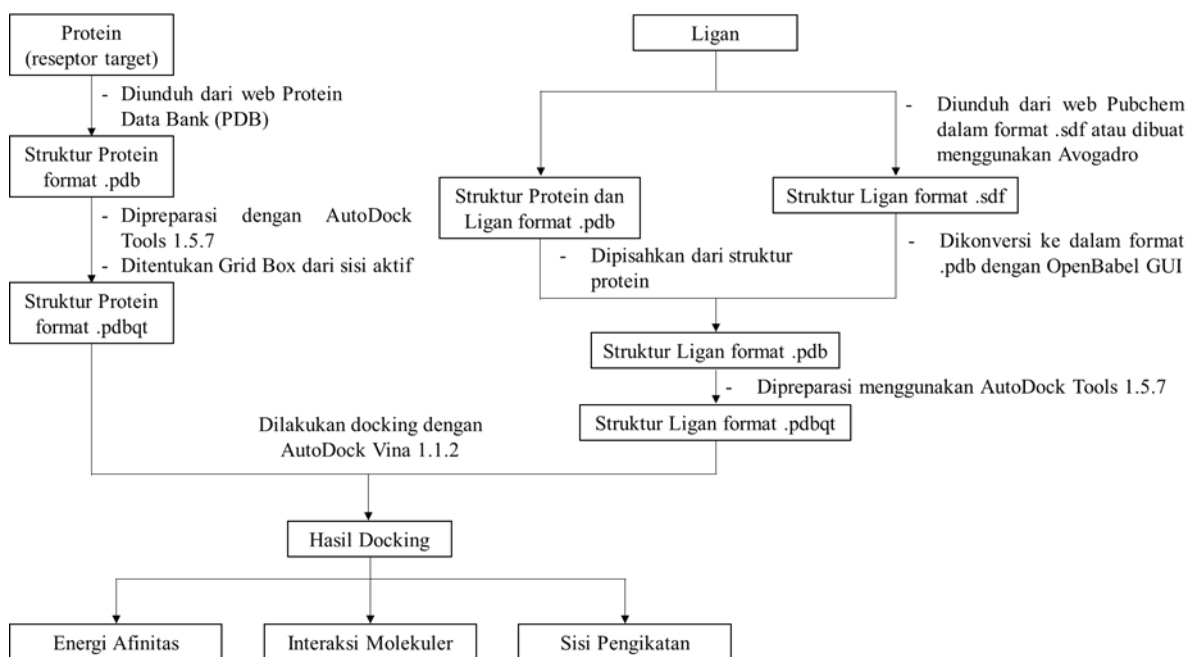


Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian *In vitro* dan *In silico*

Diagram alir untuk uji *in vitro* dan uji *in silico* masing-masing ditunjukkan pada **Gambar 3.2** dan **Gambar 3.3**.



Gambar 3.2 Diagram Alir Penelitian *In vitro*



Gambar 3.3 Diagram Alir Penelitian *In silico*

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Ekstraksi Polisakarida Sulfat Alga

Proses ekstraksi polisakarida sulfat dari *Spirulina platensis* (PSP) dilakukan berdasarkan metode (Rajasekar *et al.*, 2019) dengan modifikasi. Serbuk alga *Spirulina platensis* sebanyak 50 gram dimaserasi menggunakan 500 mL etanol 95% (1:10) selama 3x24 jam. Hasil maserasi kemudian difiltrasi menggunakan pompa vakum untuk memisahkan antara filtrat dan residu. Setelah itu, residu dikeringkan selama semalaman pada suhu ruang untuk menguapkan sisa etanol yang masih ada dalam residu. Residu hasil maserasi kemudian ditambahkan air untuk selanjutnya diekstraksi dalam *waterbath* selama 3 jam pada suhu 75-80°C sambil sesekali diaduk. Larutan kemudian difiltrasi kembali menggunakan pompa vakum dan disentrifugasi selama 20 menit pada 3.000 rpm, lalu supernatan dikumpulkan. Supernatan yang telah ditampung kemudian ditambahkan etanol 95% dengan rasio 1:2 dan didiamkan selama semalaman pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$. Selanjutnya campuran disentrifugasi selama 20 menit pada 3.000 rpm untuk memisahkan endapan berwarna putih keabuan yang diduga rafinat polisakarida sulfat. Endapan yang diperoleh kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ dan dihaluskan sehingga didapatkan rafinat PSP.

Proses ekstraksi polisakarida sulfat dari *Sargassum polycystum* (fukoidan) dilakukan berdasarkan metode (Palanisamy *et al.*, 2017) dengan modifikasi. Sebelum dilakukan ekstraksi, *Sargassum polycystum* dicuci terlebih dahulu dengan air mengalir sampai bersih dari pengotor dan garam lalu dikeringkan dibawah sinar matahari. *Sargassum polycystum* kemudian dihancurkan sampai menjadi serbuk menggunakan blender. Serbuk alga *Sargassum polycystum* sebanyak 50 gram dimaserasi menggunakan 500 mL etanol 95% (1:10) selama 3x24 jam. Hasil maserasi kemudian difiltrasi menggunakan pompa vakum untuk memisahkan antara filtrat dan residu. Setelah itu, residu dikeringkan selama semalaman pada suhu ruang untuk menguapkan sisa etanol yang masih ada dalam residu. Residu hasil maserasi kemudian ditambahkan air untuk selanjutnya diekstraksi dalam *waterbath* selama 3 jam pada suhu 75-80°C sambil sesekali diaduk. Larutan kemudian difiltrasi kembali menggunakan pompa vakum dan disentrifugasi selama 20 menit pada 3.000 rpm. Supernatan yang diperoleh

ditambahkan dengan larutan CaCl_2 1% dengan rasio 1:10, diaduk selama 10 menit pada suhu ruang, dan disentrifugasi kembali selama 10 menit pada 3.000 rpm. Supernatan yang telah ditampung kemudian ditambahkan etanol 95% dengan rasio 1:2 dan didiamkan selama semalaman pada suhu $\pm 4^\circ\text{C}$. Selanjutnya campuran disentrifugasi selama 20 menit pada 3.000 rpm untuk memisahkan endapan berwarna coklat yang diduga rafinat polisakarida sulfat. Endapan yang diperoleh kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu $\pm 50^\circ\text{C}$ dan dihaluskan sehingga didapatkan rafinat fukoidan.

3.4.2 Karakteristik Rafinat Polisakarida Sulfat Alga

3.4.2.1 Spektrofotometer UV-Vis

Karakterisasi menggunakan UV dari rafinat polisakarida sulfat alga dilakukan berdasarkan metode (Rajasekar *et al.*, 2019) dengan sedikit modifikasi. Sebanyak 25 mg masing-masing serbuk rafinat polisakarida sulfat alga dilarutkan dengan akuades dalam labu ukur 25 mL. Rafinat PSP dibuat pada konsentrasi 300 ppm sedangkan rafinat fukoidan dibuat pada konsentrasi 100 ppm, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 200-400 nm dengan spektrofotometer UV-Vis.

3.4.2.2 Spektroskopi FTIR

Karakterisasi menggunakan FTIR bertujuan untuk melihat gugus-gugus fungsi dari rafinat polisakarida sulfat alga yang dilakukan berdasarkan metode (Rajasekar *et al.*, 2019) dengan sedikit modifikasi. Rafinat polisakarida sulfat alga sebanyak 2 mg dimasukkan ke dalam mortar dan ditambahkan 200 mg kristal KBr. Campuran yang dihasilkan kemudian diukur menggunakan FTIR Shimadzu 8400 dalam kisaran bilangan gelombang 400-4000 cm^{-1} .

3.4.3 Karakteristik Komposisi Polisakarida Sulfat Alga

3.4.3.1 Kandungan Total Gula

Metode uji fenol-asam sulfat digunakan untuk mengukur kandungan total gula berdasarkan metode (Dubois *et al.*, 1956; Liu *et al.*, 2022) dengan sedikit modifikasi. Rafinat polisakarida sulfat alga dipreparasi terlebih dahulu dengan melarutkannya dalam aquades dan dibuat dalam konsentrasi 100 ppm. Reaksi dimulai ketika 1 mL sampel ditambahkan 5 mL asam sulfat (H_2SO_4) pekat, lalu diinkubasi selama 5 menit, dan diikuti penambahan 1 mL fenol 5%.

Larutan kemudian dihomogenkan menggunakan vortex dan diinkubasi kembali selama 20 menit. Warna yang terbentuk pada sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 490 nm. Standar yang digunakan adalah D-glukosa dengan konsentrasi 0, 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm. Ditentukan kadar total gula yang diperoleh menggunakan persamaan (1).

$$\% \text{ Total Gula} = \left(\frac{\text{konsentrasi analit (ppm)}}{\text{konsentrasi sampel (ppm)}} \right) \times 100 \quad (1)$$

3.4.3.2 Kandungan Total Sulfat

Metode uji barium klorida-gelatin (BaCl_2 -gelatin) digunakan untuk mengukur kandungan total sulfat berdasarkan metode (Dogson and Price., 1962; Liu *et al.*, 2022) dengan sedikit modifikasi. Rafinat polisakarida sulfat alga dipreparasi terlebih dahulu dengan melarutkannya dalam HCl 3,5 N dan dibuat dalam konsentrasi 1000 ppm. Pengujian ini dilakukan menggunakan rafinat polisakarida sulfat alga non-hidrolisis yang dilakukan tanpa pemanasan (0 jam) dan rafinat hidrolisis yang dipanaskan pada suhu 105-110°C dalam *waterbath* dengan variasi waktu 3 jam, 6 jam, dan 9 jam. Reaksi diawali dengan 400 μL masing-masing rafinat yang ditambahkan dengan asam trikloroasetat (TCA) 3% sebanyak 6 mL dan diikuti dengan penambahan BaCl_2 -gelatin sebanyak 2 mL, dihomogenkan menggunakan vortex, lalu diinkubasi selama 20 menit. Larutan sampel diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 360 nm. Standar yang digunakan adalah kalium sulfat (K_2SO_4) dengan konsentrasi 0, 1200, 1600, 2000, 2400, 2800, dan 3200 ppm. Ditentukan kadar total sulfat yang diperoleh menggunakan persamaan (2).

$$\% \text{ Total Sulfat (SO}_4) = \left(\frac{\left(\frac{\text{Mr SO}_4^{2-}}{\text{Mr BaSO}_4} \right) \times \text{kadar BaSO}_4 \text{ (ppm)}}{\text{Konsentrasi analit (ppm)}} \right) \times 100 \quad (2)$$

3.4.4 Analisis Inhibisi α -amilase secara *In vitro*

Polisakarida sulfat alga memiliki kemampuan untuk menghambat aktivitas α -amilase berdasarkan pada metode penelitian sebelumnya (K. Li *et al.*, 2018; Puspantari *et al.*, 2020) dengan sedikit modifikasi. Tahapan awal yaitu mempersiapkan buffer fosfat dengan konsentrasi 0,02 M dan pH 6,9. Selanjutnya disiapkan larutan α -amilase dari saliva non-diabetes dan saliva diabetes yang diencerkan dengan buffer fosfat sebanyak 10 kali pengenceran. Rafinat polisakarida sulfat non-hidrolisis disiapkan dengan melarutkannya dalam buffer

fosfat dan dibuat dengan konsentrasi 100, 200, dan 300 ppm. Adapun rafinat polisakarida sulfat terhidrolisis yang disiapkan dengan cara melarutkannya dalam HCl 3,5 N kemudian dipanaskan pada suhu 105-110°C selama 6 jam dengan penangas minyak (konsentrasi dibuat 100, 200, dan 300 ppm). Sebelum direaksikan, rafinat polisakarida sulfat terhidrolisis harus dinetralkan terlebih dahulu menggunakan NaOH. Reaksi penghambatan aktivitas α -amilase dimulai dengan memasukkan 250 μ L larutan α -amilase dan 500 μ L larutan rafinat polisakarida sulfat ke dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi selama 20 menit pada suhu 37°C dalam *waterbath*. Setelah itu ditambahkan sebanyak 250 μ L larutan pati 1% dan diinkubasi kembali selama 20 menit pada suhu 37°C dalam *waterbath*. Reaksi kemudian dihentikan melalui penambahan 1000 μ L pereaksi asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS), lalu diinkubasi selama 10 menit dalam air mendidih (*waterbath*) dan didinginkan pada suhu ruang. Campuran yang didinginkan kemudian diencerkan dengan penambahan 10 mL aquades dan dilakukan pengukuran absorbansi pada 540 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Akarbosa digunakan sebagai kontrol positif dan blanko disiapkan dengan cara yang sama namun tanpa penambahan sampel. Tingkat inhibisi aktivitas α -amilase dapat dihitung menggunakan persamaan (3).

$$\% \text{ Tingkat inhibisi} = \frac{(\text{Absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel})}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\% \quad (3)$$

3.4.5 Analisis Inhibisi α -amilase secara *In silico*

3.4.5.1 Preparasi Protein (Reseptor)

Struktur kristal protein sebagai reseptor yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu enzim α -amilase dengan ID IXH0. Reseptor dapat diunduh dengan format .pdb dari Protein Data Bank (PDB) yang terdapat pada laman <https://www.rcsb.org/> (Berman *et al.*, 1999). Reseptor tersebut dipreparasi terlebih dahulu menggunakan *software* Autodock Tools 1.5.7 yang bertujuan untuk menghilangkan pelarut air dan residu lainnya dengan cara 'Edit \rightarrow Delete Water'. Selanjutnya dipilih rantai reseptor, kemudian molekul-molekul yang berikatan namun tidak dibutuhkan dalam proses *docking* dihilangkan terlebih dahulu, salah satunya adalah ligan natif. Data reseptor 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. Selanjutnya protein di save dengan format .pdbqt melalui Grid → Macromolecule → Choose → Select Molecule → Save as PDBQT (Morris *et al.*, 2009).

Ligan natif yang telah terpisah dari protein digunakan 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 x, y, z berturut-turut yaitu 7,032 Å; 15,159 Å; dan 39,944 Å; *spacing* 1 Å, serta dimensi 22 Å x 16 Å x 18 Å. Posisi penambatan (*grid box*) yang telah diatur sesuai dengan posisi dan ukuran ligan kemudian disimpan dalam note dengan format .txt untuk simulasi *molecular docking*.

3.4.5.2 Preparasi Ligan

Ligan yang digunakan antara lain akarbosa dengan ID 41774 sebagai kontrol positif, struktur 3D ligan polisakarida sulfat dari *Spirulina platensis* (PSP), serta struktur 3D ligan polisakarida sulfat dari *Sargassum polycystum* (fukoidan). Ligan akarbosa dapat diunduh melalui laman <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> dengan format .sdf (Kim *et al.*, 2015), kemudian diubah formatnya ke dalam bentuk .pdb menggunakan Open Babel GUI 2.3.1 untuk menyesuaikan format dalam proses *molecular docking* (O’Boyle *et al.*, 2011). Ligan PSP dan fukoidan dapat dibuat dan dioptimasi menggunakan perangkat lunak Avogadro 1.2.0, kemudian diunduh dalam format .pdb. Setelah semua ligan sudah dalam format .pdb, selanjutnya dilakukan preparasi menggunakan AutodockTools 1.5.7. Pada proses preparasi ligan, titik rotasi dari ligan dapat dilihat melalui Ligand → Torsion Tree → Choose Torsion, jumlah torsi aktif dapat dilihat melalui Ligand → Torsion Tree → Set Number of Torsions, dan hasil ligan dapat disimpan dalam format .pdbqt melalui Ligand → Output → Save as PDBQT.

3.4.5.3 Proses *Molecular Docking* Protein-Ligan

Proses penambatan (*docking*) antara protein dan ligan yang sudah dipreparasi dilakukan menggunakan Autodock Vina 1.1.2 (Trott & Olson, 2009). Dalam prosesnya, *molecular docking* antara protein-ligan ini akan melibatkan *command prompt* dengan perintah `vina.exe --config nama file.txt --cpu jumlah core computer`. Perintah tersebut akan melakukan perhitungan posisi *grid box* yang sebelumnya telah disimpan dalam *note* dengan format `.txt`. Beberapa parameter kestabilan yang dapat dihitung dalam proses ini antara lain energi bebas Gibbs (ΔG) dan interaksi kimia yang terbentuk.

3.4.5.4 Visualisasi sisi pengikatan dan validasi RMSD

Validasi metode *molecular docking* diperlukan untuk melakukan verifikasi simulasi yang digunakan dengan cara melakukan *docking* ulang ligan natif dan visualisasi sisi pengikatan antara protein-ligan menggunakan perangkat lunak PyMOL 2.5.2 (DeLano & Bromberg, 2004; Seeliger & De Groot, 2010). Validasi dilakukan dengan cara memisahkan struktur protein dari ligan natif yang sudah terikat dengan protein, kemudian dilakukan proses *docking* ulang untuk mengetahui nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*). Apabila nilai RMSD berada dibawah 2\AA , maka metode penambatan dapat dikatakan valid sehingga metode dapat digunakan untuk *docking* senyawa uji (Bajda *et al.*, 2013).

3.4.5.5 Visualisasi Molekuler dan Analisis Mekanisme Inhibisi

Interaksi molekuler antara ligan dan protein dapat divisualisasikan menggunakan perangkat lunak BIOVIA Discovery Studio Visualization 2021. Hasil visualisasi dapat digunakan untuk melihat jenis ikatan, panjang ikatan hidrogen, atom pada ligan yang berikatan dengan reseptor (protein), dan melihat interaksi residu-residu asam amino antara ligan-reseptor dalam bentuk struktur 2D maupun 3D. Klasifikasi jarak ikatan hidrogen menurut (Guedes *et al.*, 2014) dapat dilihat pada **Tabel 3.1**.

Tabel 3.1 Klasifikasi Jarak Ikatan

No.	Jarak (\AA)	Keterangan
1.	2,2-2,5	Kuat
2.	2,5-3,2	Moderat dan elektrostatik
3.	3,2-4,0	Lemah