

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari hingga Juli 2025 di laboratorium riset Kimia Hayati dan laboratorium Kimia Instrumen Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam studi *in vitro* meliputi *chiller*, Difraktometer Sinar-X (XRD) MiniFlex, *freezer*, *freeze dryer*, sentrifugator (Eppendorf 5810 R, kecepatan maksimum 8000 rpm), sddkat SDS-PAGE, spektrofotometer FTIR (8400 Shimadzu), dan spektrofotometer UV-Vis (UV mini 1240, Shimadzu)

Alat yang digunakan dalam studi *in silico* menggunakan simulasi *molecular docking* ialah perangkat keras Victus15-RTX dengan spesifikasi prosesor AMD Ryzen 5 5600H *with Radeon Graphics* 3.30 GHz, RAM 16,0 GB, dengan system operasi Windows 11 *Home Single Language* 64-bit. Perangkat lunak yang digunakan ialah IBM SPSS Statistics 30.0.0.0, AutoDock Tools 1.5.7, AutoDock Vina 1.2.5, Avogadro 1.2.0, PyMOL 3.1.3, dan BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2024.

3.2.2 Bahan

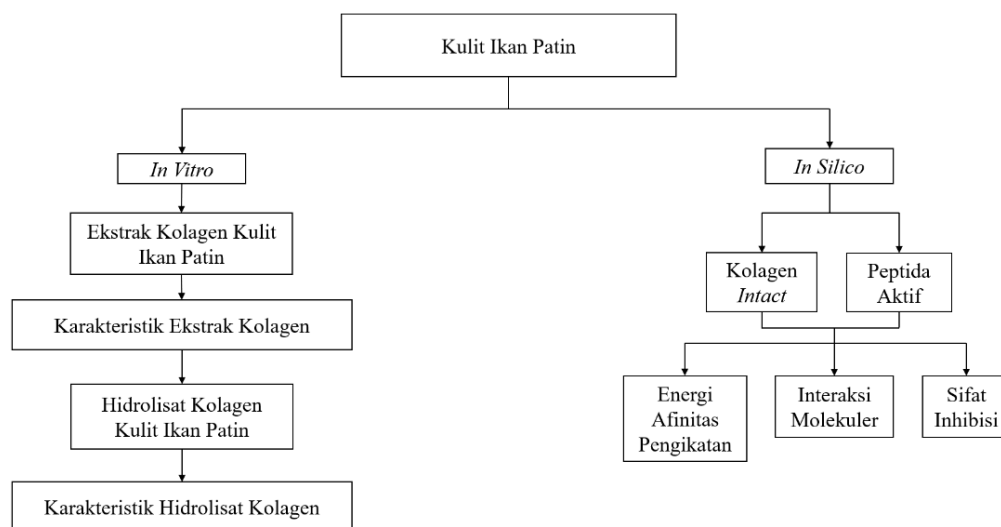
Bahan yang digunakan dalam studi *in vitro* meliputi kulit ikan patin dari Jawa Timur, akuades, natrium hidroksida ($\text{NaOH} \geq 97\%$), asam asetat (CH_3COOH) glasial (100%) dari merck millipore, HCl pa dari merck millipore, garam natrium klorida ($\text{NaCl} \geq 99,5\%$), enzim bromelin 300 TIU/mg dari biosynth, reagen biuret, pelet KBr, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH pro analisis), bufer fosfat pH 7, dan etanol teknis 96%.

Bahan yang digunakan dalam studi *in silico* menggunakan simulasi *molecular docking* ialah struktur reseptor pro angiogenesis yaitu *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2* (VEGFR2), *Matrix Metalloproteinase 2* (MMP2), *Kelch-like*

ECH-associated protein 1 (KEAP1), dan DNA Gyrase *Staphylococcus aureus* dengan kode 3WZE, 7XJO, 6TYP, dan 3G75 yang diperoleh dari *database Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>). Kontrol positif inhibitor yang digunakan ialah SSFSKGVQRAAF dari hidrolisat dedak padi, YGDEY dari hidrolisat gelatin kulit ikan nila, QDHKA dari hidrolisat ikan tuna, dan ACWWPH dari hidrolisat ikan teri yang berasal dari Avogadro 1.2.0. Struktur 3D dari senyawa peptida kolagen kulit ikan patin tipe I, rantai α -1a isoform X1 dengan kode XP_026772560.1 diperoleh dari *database PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), dan struktur peptida aktif dari hidrolisis rantai α -1a yang dijadikan ligan uji berasal dari *database PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) serta Avogadro 1.2.0.

3.3 Bagan Alir Penelitian

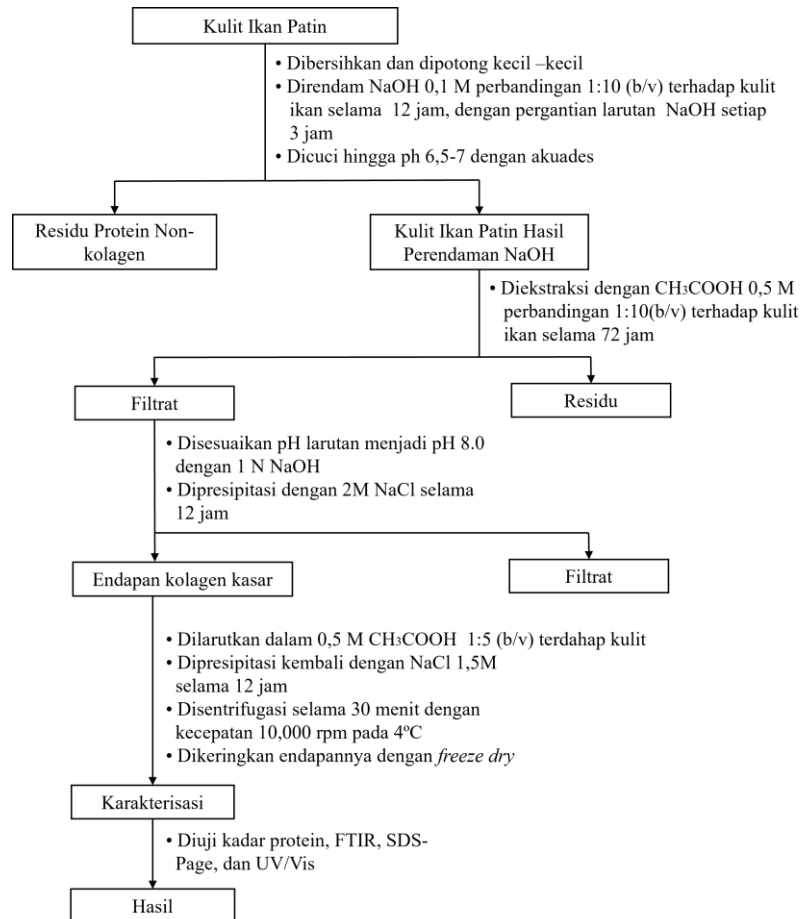
Tahapan penelitian secara keseluruhan dapat dilihat pada **Gambar 3. 1**.



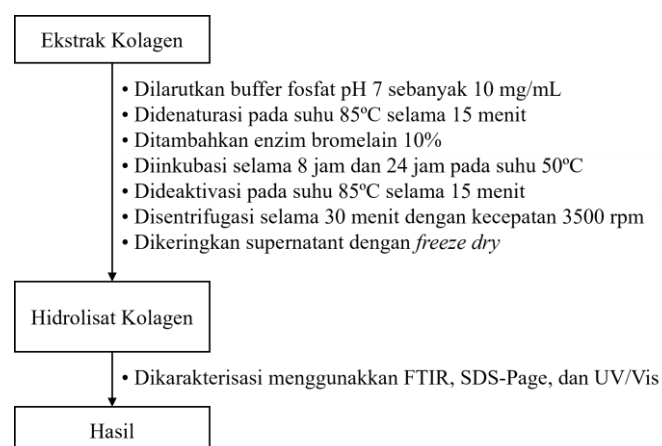
Gambar 3. 1 Bagan Alir Keseluruhan Penelitian

3.2.3 Studi In Vitro

Tahapan penelitian *in vitro* ditunjukkan pada **Gambar 3. 2** dan **Gambar 3. 3**



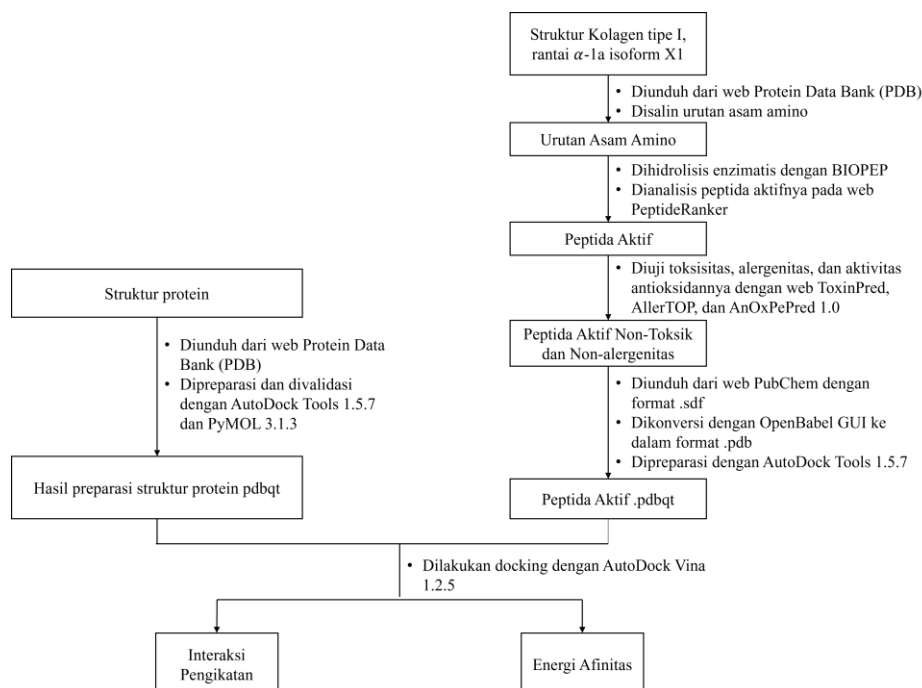
Gambar 3. 2 Bagan Alir Penelitian *In Vitro* Ekstraksi Kolagen Kulit Ikan Patin



Gambar 3. 3 Bagan Alir Penelitian *In Vitro* Hidrolisis Kolagen Kulit Ikan Patin

3.2.4 Studi *In Silico*

Tahapan penelitian *in silico* ditunjukkan pada **Gambar 3. 4**.



Gambar 3. 4 Bagan Alir Penelitian *In Silico Molecular Docking*

3.4 Metode Penelitian

3.2.5 Studi *In Vitro*

3.4.1.1 Ekstraksi Kolagen Kulit Ikan Patin

Sampel kulit ikan patin diperoleh dari PT. Kurnia Mitra Makmur, Purwakarta, Jawa Barat. Kulit ikan patin direndam pada air dingin sekaligus dicuci bersih menggunakan air mengalir untuk membersihkan daging yang masih menempel. Kemudian kulit dipotong kecil-kecil untuk memudahkan proses ekstraksi. Proses ekstraksi dilakukan berdasarkan metode (Abbas dkk., 2022; Hartina dkk., 2019; Khoiriah, 2022; Lara-Juache dkk., 2024) dengan modifikasi.

Kulit direndam ke dalam larutan NaOH 0,1 M dengan perbandingan 1:10 (b/v) pada suhu ruang selama 12 jam untuk menghilangkan protein non-kolagen. Larutan NaOH diganti dengan yang baru setiap 3 jam. Sampel kulit kemudian dicuci menggunakan air mengalir hingga netral pH 6,5-7. Sampel kulit ikan patin diekstraksi menggunakan larutan asam asetat (CH_3COOH) dengan konsentrasi 0,5

M dengan perbandingan 1:10 (b/v) pada suhu kamar selama 72 jam. Hasil ekstraksi disaring menggunakan kain blacu untuk memisahkan residu dengan supernatan. Supernatan disesuaikan pHnya hingga 8 menggunakan 1 M NaOH, di presipitasi menggunakan NaCl 2M selama 12 jam dan presipitatnya disaring menggunakan kain blacu. Presipitat dilarutkan kembali dengan 0,5 CH₃COOH 1:5, dipresipitasi kembali menggunakan NaCl 1,5 M selama 12 jam dan disaring menggunakan kain blacu. Endapan yang dihasilkan dikeringkan menggunakan *freeze dry*.

3.4.1.2 Hidrolisis Kolagen Kulit Ikan Patin

Metode hidrolisis enzimatik dilakukan berdasarkan (Afifah dkk., 2024; Devita dkk 2021). Ekstrak kolagen yang telah diperoleh sebelumnya dilarutkan bufer fosfat pH 7 sebanyak 10 mg/mL serta di denaturasi pada suhu 85°C selama 15 menit. Selanjutnya ditambahkan enzim bromelin 10% diinkubasi selama 8 jam dan 24 jam pada suhu 50°C. Campuran kemudian dideaktivasi pada suhu 85°C selama 15 menit. Setelah campuran mencapai suhu ruang, kemudian disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 3500 rpm lalu supernatan dikeringkan dengan *freeze dryer*.

3.4.1.2.1. Penentuan Derajat Hidrolisis

Penentuan derajat hidrolisis dilakukan berdasarkan metode kuantitatif ninhidrin dengan modifikasi (Gao dkk., 2020; Zatorski dkk., 2020). Sebanyak 4mL larutan standar glisin 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 50 ppm, dan 60 ppm dan 2mL hidrolisat bromelin pada hidrolisis 2, 4, 6, 8, dan 24 jam masing-masing diencerkan sampai 4 mL. Kemudian ditambahkan 1 mL larutan ninhidrin 2% dan ditutup menggunakan aluminium foil. Campuran dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit. Didinginkan sampai suhu ruang dan ditambahkan 1 mL etanol 100%. Diukur absorbansi larutan pada 568 nm. Penentuan derajat hidrolisis dapat dihitung dengan persamaan berikut:

$$DH = \frac{h}{h_{\text{total}}} \times 100\%$$

3.4.1.3 Karakterisasi Kolagen Kulit Ikan Patin

Penentuan kandungan protein dalam kolagen kulit ikan patin dilakukan menggunakan metode biuret mengikuti metode (Goshev & Nedkov, 1979; Laksmiwati dkk., 2024; Ramlan dkk., 2023) dengan kasein sebagai standar. Larutan standar kasein disiapkan pada konsentrasi 500, 3000, 4000, 5000, 6000, dan 9000. 2 mL larutan standar atau sampel ditambahkan dengan 8 mL reagen biuret. Campuran tersebut kemudian dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 15 menit, setelah itu absorbansi diukur pada panjang gelombang 543 nm.

Analisis UV sampel kolagen dilakukan menggunakan UV Mini 250, berdasarkan metode (Khoiriah 2022; Rodrigues dkk 2023) dengan modifikasi. Sebanyak 1 mg kolagen dilarutkan dalam 10 mL CH₃COOH 0,5 M. Pengukuran panjang gelombang maksimum dilakukan pada rentang 200–300 nm, dengan CH₃COOH 0,5 M sebagai blanko.

Analisis FTIR terhadap kolagen dilakukan mengikuti metode (Abbas dkk., 2022; Menezes dkk., 2020) dengan beberapa modifikasi. Sebanyak 2 mg kolagen kering digerus bersama 200 mg KBr, dicetak menjadi pellet KBr, lalu dianalisis menggunakan FTIR Shimadzu 8400 dalam rentang panjang gelombang 4000–400 cm⁻¹. Metode (Jaziri dkk., 2022; Reátegui-Pinedo dkk., 2022) digunakan untuk menganalisis XRD kolagen kulit ikan patin menggunakan XRD MiniFlex dengan radiasi CuKα (0,154 nm) pada 2θ 3°-60°.

Analisis *Sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dilakukan berdasarkan metode (Coscueta dkk. 2021; Vidal dkk. 2020) dengan beberapa modifikasi. Sampel dianalisis menggunakan gel SDS PAGE 8%. Sampel terlebih dahulu diinkubasi dengan bufer sampel dalam perbandingan 1:5, kemudian dipanaskan pada 95°C selama 5–10 menit dan segera didinginkan (*snap freeze*). Sebanyak 20 µL sampel dimasukkan ke dalam sumur dan dijalankan pada 80 V selama 30 menit hingga seluruh sampel terkumpul di batas bawah *stacking gel*. Tegangan kemudian dinaikkan 100 V selama 90 menit hingga sampel mencapai dasar gel. Setelah elektroforesis selesai, gel dicuci dengan akuades sebanyak tiga kali selama 5 menit. Pewarnaan dilakukan menggunakan 0,25%, b/v Coomassie

Blue selama 1 jam, sedangkan proses *destaining* dilakukan semalaman menggunakan SDS-PAGE Glisin Denaturing.

3.4.1 Studi *In Silico*

3.4.2.1 Preparasi Ligan Peptida

Struktur kolagen kulit ikan patin 2 isoform X1 dengan kode XP_026772560.1 diperoleh dari *database* PubChem (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dalam format FASTA, lalu dimasukkan ke dalam laman BIOPEP (<https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>) pada tab Enzyme(s) Action. Rantai protein kemudian dihidrolisis menggunakan enzim papain, pepsin (pH 1,3), kimotripsin A, tripsin, dan bromelin menghasilkan peptida aktif.

Proses hidrolisis kolagen sebelumnya menghasilkan berbagai fragmen peptida, beberapa di antaranya berpotensi sebagai inhibitor protein target. Namun, tidak semua peptida yang terbentuk bersifat aktif. Untuk memprediksi keaktifannya, fragmen tersebut dianalisis menggunakan PeptideRanker (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>), yang memberikan skor dalam rentang 0 hingga 1. Peptida dengan nilai mendekati 1 dianggap memiliki aktivitas lebih tinggi. Peptida yang dipilih adalah yang memiliki skor di atas 0,75 guna meminimalkan kemungkinan jumlah positif palsu (Escott dkk., 2021; Jyothi dkk., 2019).

Prediksi toksisitas peptida dilakukan menggunakan ToxinPred (<http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/>) dengan memasukkan sekuens peptida aktif untuk memprediksi apakah peptida bersifat toksik atau tidak. Prediksi alergenitas peptida dilakukan melalui ChAIPred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/chalpred/predict3.php>), di mana sekuens peptida aktif dimasukkan untuk mengidentifikasi apakah peptida tergolong alergen atau non-alergen. Sifat antioksidan peptida dianalisis menggunakan AnOxPePred - 1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/AnOxPePred-1.0/>), di mana sekuens peptida aktif dimasukkan untuk mengidentifikasi Aktivitas Penangkal Radikal Bebas dan Daya Kelat.

Peptida aktif yang telah dipastikan tidak beracun dan non-alergen selanjutnya dipersiapkan untuk *simulasi docking*. Ligan yang digunakan meliputi peptida aktif dan inhibitor kontrol positif, dengan struktur yang diperoleh dari PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dalam format 3D (.sdf). Struktur ini kemudian dikonversi ke format .pdb menggunakan Open Babel GUI 2.4.1, lalu disesuaikan rotasinya menggunakan AutoDock Tools 1.5.6 sebelum digunakan dalam simulasi *docking*.

3.4.1.4 Preparasi Protein (Enzim)

Dalam penelitian ini, *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2* (VEGFR2), *Matrix Metalloproteinase 2* (MMP2), *Kelch-like ECH-associated protein 1* (KEAP1), dan *DNA Gyrase Staphylococcus aureus* dengan kode 3WZE, 7XJO, 6TYP, dan 3G75 yang diperoleh dari *database Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>).

Struktur protein yang telah diunduh kemudian dipreparasi menggunakan AutoDock Tools 1.5.7 dengan menghapus molekul air, memisahkan ligan natif, serta menambahkan atom hidrogen polar dan muatan parsial menggunakan metode *Compute Gasteiger*, kemudian disimpan dalam format PDB.

Penghapusan molekul air bertujuan untuk mencegah gangguan selama *docking* dan mengoptimalkan pencarian konformasi ligan, sementara penambahan hidrogen polar memungkinkan terbentuknya ikatan hidrogen antar molekul, sehingga hanya tersisa rantai protein murni untuk proses docking dengan ligan. Protein yang telah dipreparasi kemudian disimpan dalam format.pdbqt. Selanjutnya, *grid box* diatur untuk menentukan situs pengikatan protein dengan ligan, lalu disimpan dalam format TXT.

3.4.1.5 Perhitungan dan Validasi Molecular Docking

Protein dan ligan yang telah dipreparasi disimpan dalam file .config untuk simulasi *docking molekuler* menggunakan AutoDock Vina 1.2.5 melalui command prompt. Metode divalidasi dengan mengulang perhitungan docking antara protein dan ligan natif, di mana hasilnya dianggap valid jika nilai RMSD kurang dari 2 Å (Raval & Ganatra, 2022). Struktur kompleks protein-ligan kemudian

divisualisasikan menggunakan PyMOL 3.1.3 dan BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2024; PyMOL menampilkan protein dalam mode *surface* dan ligan dengan model *ball-and-stick*, sedangkan BIOVIA menampilkan struktur 3D dan 2D beserta interaksi residu asam amino.