

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai Agustus 2019. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Riset Kimia Hayati dan Material serta Laboratorium Kimia Instrumen Departemen Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia.

3.2 Alat

Alat yang digunakan pada uji *in silico* antara lain Laptop ASUS E203NAH dengan prosesor Intel Celeron N3350 dual-core, perangkat lunak yaitu Autodock Tools, PyMol, Open Babel GUI, Autodock Vina, PRISM (*Protein Interactions By Structural Matching*). Website *Protein Data Bank* (PDB), PubChem, *Sequence Annotated by Struction* (SAS). Pada pengujian antioksidan secara *in vitro*, alat yang digunakan yaitu neraca analitik, kaca arloji, spatula, batang pengaduk, botol vial, labu takar, corong kaca dan spektrofotometer Shimadzu UV-Vis Mini 1240.

3.3 Bahan

Bahan yang digunakan pada uji *in silico* antara lain struktur kristal *Glutathione peroxide*, *Superoxide dismutase*, fikosianin dari *Spirulina platensis*, struktur senyawa karoten, klorofil dan asam askorbat. Pada pengujian antioksidan secara *in vitro*, bahan yang digunakan yaitu biomassa fikosianin, ekstrak karoten, ekstrak klorofil, pelarut buffer fosfat pH 7, reagen metanol p.a dari MERCK, padatan DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) dari Sigma Aldrich, .

3.4 Prosedur Penelitian

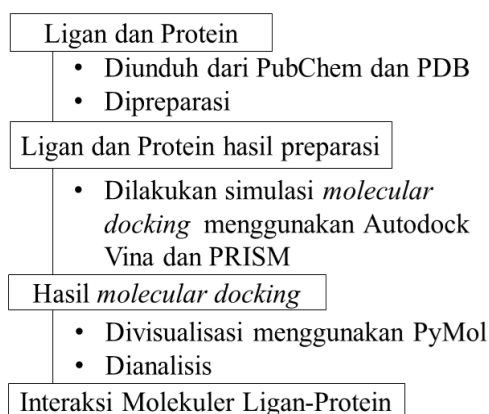
Prosedur penelitian ini memiliki dua tahap uji yang saling berkaitan yaitu uji *in silico* dan *in vitro*. Uji *in silico* pada penelitian ini menggunakan metode *molecular docking* sedangkan uji *in vitro* menggunakan metode DPPH. Uji *in silico* menghasilkan interaksi molekuler antara protein dan ligan sedangkan uji *in vitro* menghasilkan aktivitas antioksidan. Pada uji *in silico* menggunakan metode

Dea Rachmania Saprudin, 2019

UJI *IN SILICO* DAN *IN VITRO* PIGMEN WARNA *Spirulina platensis* SEBAGAI KANDIDAT ANTIOKSIDAN ALAMI

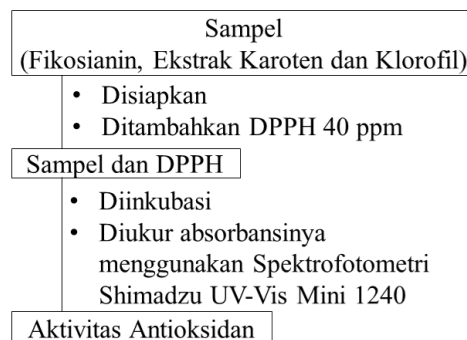
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

molecular docking, pigmen warna *Spirulina platensis* yaitu fikosianin, karoten dan klorofil berperan sebagai ligan sedangkan enzim *glutathione peroxide* dan *superoxide dismutase* berperan sebagai protein atau reseptor. Asam askorbat juga digunakan sebagai kontrol positif. Protein dan ligan tersebut diunduh dan dipreparasi yang kemudian langsung dilakukan simulasi menggunakan *molecular docking*. Hasil dari *molecular docking* lalu divisualisasi sehingga didapatkan interaksi molekuler yang selanjutnya dapat dianalisis. Tahapan umum uji *in silico* ditunjukkan pada **Gambar 3.1**



Gambar 3. 1 Tahapan umum uji *in silico*

Uji *in vitro* menggunakan metode DPPH menggunakan fikosianin, karoten dan klorofil sebagai sampel uji. Sampel uji disiapkan lalu ditambahkan DPPH kemudian diinkubasi selama 30 menit. Hasil inkubasi tersebut diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer Shimadzu UV-Vis Mini 1240. Absorbansi tersebut dilakukan suatu perhitungan sehingga didapatkan aktivitas antioksidannya. Tahapan umum uji *in vitro* ditunjukkan pada **Gambar 3.2.**

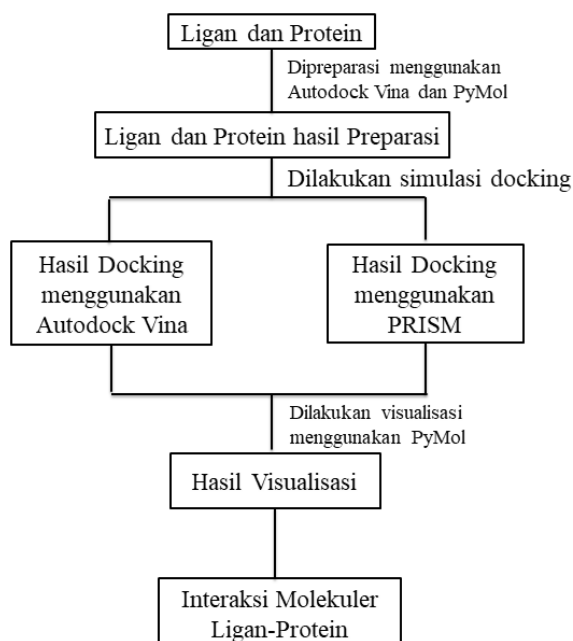


Gambar 3. 2 Tahapan umum uji *in vitro*

Interpretasi hasil dari uji *in silico* dan *in vitro* dilakukan dengan melihat hasil *molecular docking* pigmen warna *Spirulina platensis* terhadap enzim antioksidan yang dikaitkan dengan aktivitas antioksidannya melalui uji *in vitro*. *Molecular docking* menghasilkan energi yang digunakan dalam penarikan kesimpulan dari interpretasi hasil uji *in silico*. Jika energinya lebih rendah dibandingkan kontrol maka dikatakan memiliki suatu aktivitas antioksidan sama seperti pada uji *in vitro* menggunakan DPPH yang dapat menguatkan prediksi awal tersebut.

3.2.1 *Molecular Docking* Pigmen *Spirulina platensis* terhadap *Glutathione peroxidase* dan *Superoxide dismutase*

Secara umum, penelitian ini terdiri dari beberapa tahap yang terdiri dari preparasi ligan, protein, simulasi *molekular docking* menggunakan PRISM dan Autodock Vina, visualisasi dan analisis hasil *molecular docking*. Hasil visualisasi docking digunakan untuk memprediksi interaksi molekuler antara protein dan ligan. Tahapan umum uji *in silico* ditunjukkan pada **Gambar 3.3**.

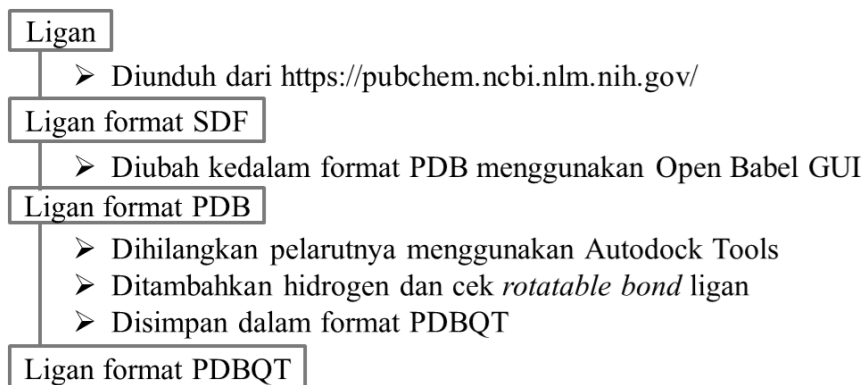


Gambar 3. 3 Tahapan Uji *In Silico* menggunakan *Molecular Docking*

3.2.1.1 Preparasi Ligan

Preparasi ligan dilakukan dengan menambahkan atom hidrogen dan mengecek ikatan yang dapat diputar (*rotatable bond*) menggunakan Autodock

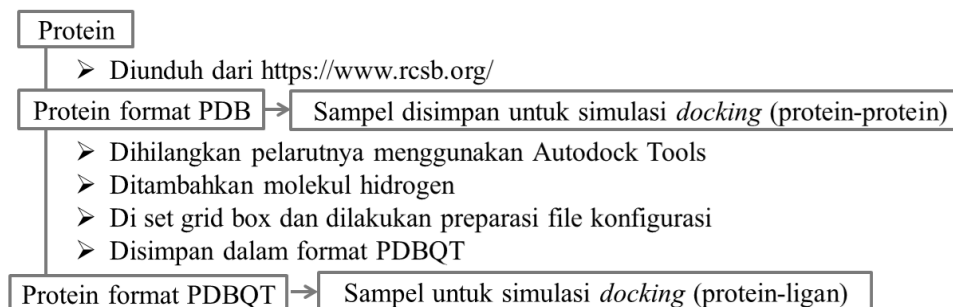
Tools (Huey *et al.*, 2012;Trott *et al.*, 2009). Sebelum ditambahkan atom hidrogen dan pengecekan ikatan yang dapat diputar, ligan yang diunduh diubah formatnya kedalam format pdb untuk menyesuaikan format yang diproses pada simulasi *molecular docking*. Ligan yang digunakan adalah karoten, klorofil dan asam askorbat sebagai kontrol. Tahapan preparasi ligan secara lengkap ditunjukkan pada **Gambar 3.4**.



Gambar 3. 4 Tahapan Preparasi Ligan

3.2.1.2 Preparasi Protein

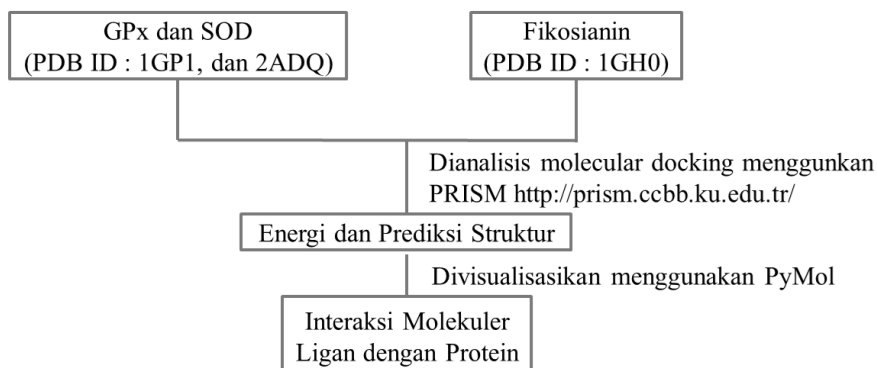
Preparasi protein dilakukan dengan membuang pelarut yang terdapat dalam struktur protein. Pada *molecular docking* protein-protein hanya dilakukan pembuangan pelarut dan selanjutnya dapat langsung dilakukan simulasi *molecular docking* (Baspinar *et al.*, 2014; Tunchbag *et al.*, 2011). Pada *docking* protein-ligan, protein ditambahkan atom hidrogen dan di cek *grid box*-nya agar menghasilkan posisi yang tepat untuk ligan yang berinteraksi dengan protein (Huey *et al.*, 2012;Trott *et al.*, 2009;). Pada enzim *glutathione peroxide* *Grid box* diatur dengan formasi center x: 28.737, y: 37.584 dan z: 41.084. Size sumbu x, y dan z yaitu 40 dengan jarak 1 Å. *Grid box* untuk enzim *superoxide dismutase* diatur dengan formasi center x: -8.585, y: 36.58 dan z: 215.925. Size sumbu x,y dan z yaitu 40 dengan jarak 1 Å. Formasi *grid box* dari kedua enzim disimpan dalam suatu *note* untuk simulasi *molecular docking* dan hasil dari preparasi tersebut disimpan dalam format pdbqt. Tahapan preparasi protein secara lengkap ditunjukkan pada **Gambar 3.5**.



Gambar 3. 5 Tahapan Preparasi Protein

3.2.1.3 *Molecular Docking Protein-Protein*

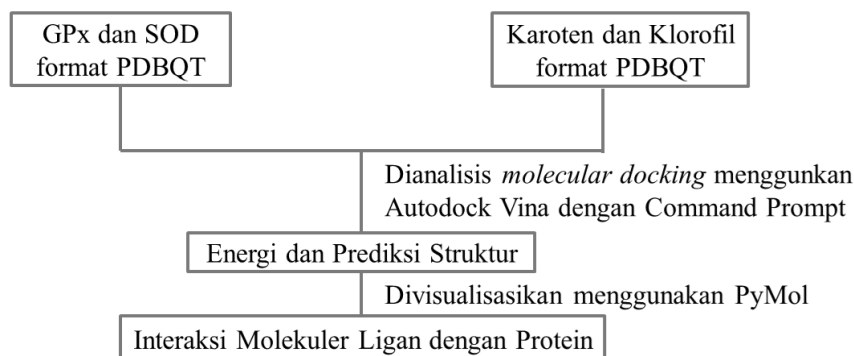
Struktur protein dan ligan hasil preparasi dilakukan *docking* protein-protein menggunakan PRISM dengan mengisi PDB ID protein atau memasukkan file format pdb yang akan diproses (Huey *et al.*, 2012;Trott *et al.*, 2009;Baspinar *et al.*, 2014; Tunchbag *et al.*, 2011). Tahapan *Molecular Docking* Protein-Protein ditunjukkan pada **Gambar 3.6**.



Gambar 3. 6 Tahapan *Molecular Docking* Protein-Protein

3.2.1.4 *Molecular Docking Protein-Ligan*

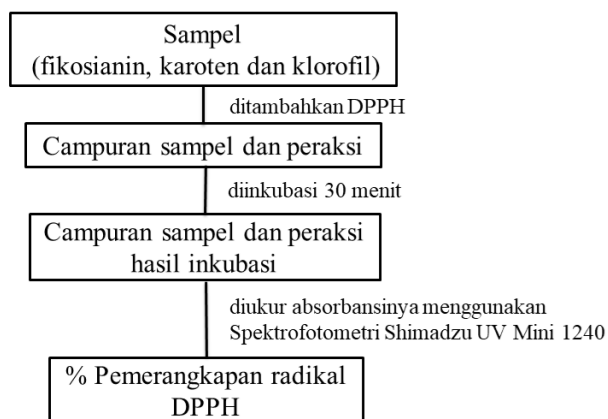
Struktur protein dan ligan hasil preparasi dilakukan *molecular docking* protein-ligan menggunakan Autodock Vina. Formasi *grid box* dari protein yang disimpan dalam *note* yang akan digunakan dalam proses *molecular docking* ditambahkan nama protein dan ligan yang akan diproses. Nama protein dan ligan yang akan diproses harus disamakan agar terhindar dari *error*. Proses *molecular docking* protein-ligan melibatkan perintah komputer atau *Command Prompt* (Huey *et al.*, 2012;Trott *et al.*, 2009). Tahapan *molecular docking* protein-ligan ditunjukkan pada **Gambar 3.7**.



Gambar 3. 7 Tahapan Molecular Docking Protein-Ligan

3.2.2 Uji Aktivitas Antioksidan Pigmen *Spirulina platensis*

Uji *in vitro* dilakukan menggunakan metode DPPH untuk mengukur aktivitas antioksidan pigmen-pigmen *Spirulina platensis*. Tahapan pengujian ini terdiri dari preparasi sampel, penyiapan larutan DPPH, penambahan sampel dengan larutan DPPH, inkubasi dan pengukuran absorbansi sampel. Tahapan umum pengujian aktivitas antioksidan DPPH ditunjukkan pada **Gambar 3.8**



Gambar 3. 8 Tahapan Pengujian Aktivitas Antioksidan

Uji antioksidan dilakukan berdasarkan penelitian *Sun et al* dengan sedikit modifikasi. Fikosianin, ekstrak karoten dan klorofil diuji diencerkan terlebih dahulu 10x lalu tambahkan DPPH 40 ppm dalam pelarut metanol dengan perbandingan 2:1. Campuran sampel dan pelarut diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Setelah absorbansi, sampel diukur pada panjang gelombang 517 nm. Persen pemerangkapan dapat dihitung berdasarkan persamaan berikut :

$$\% \text{ Pemerangkapan} = \left(\frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \right) \times 100\%$$

(Sun *et al.*, 2011)