

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia. Waktu penelitian dimulai bulan Februari sampai bulan Agustus 2019.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : (1) *Molecular Docking* menggunakan perangkat keras yaitu laptop *acer one 14* dengan spesifikasi prosesor Intel(R) Celeron(R) 2957U @ 1,40GHz, RAM 2GB, Windows 7 Ultimate 64-bit sebagai sistem operasi dan perangkat lunak yang digunakan adalah *Vina* dan *AutoDock*, *Open Babel GUI*, *PyMOL*, *PLIP*, dan *UCSF Chimera*. (2) Uji aktivitas penghambatan enzim α -amilase menggunakan inkubator, neraca analitik, *magnetic stirer* Thermo Scientific CIMAREC, Spektrofotometer UV-Vis Shimadzu UV-Mini 1240, dan alat gelas lainnya. (3) Pembuatan larutan *buffer* fosfat menggunakan neraca analitik, *magnetic stirer* Thermo Scientific CIMAREC, pH meter Mettler Toledo, batang magnet dan alat – alat gelas lainnya (4) Proses pengamatan uji stabilitas penyimpanan larutan dan padatan pigmen fikosianin menggunakan neraca analitik, Spektrofotometer UV-Vis Shimadzu UV-Mini 1240, lemari pendingin, lux meter dan alat – alat gelas kimia lainnya.

3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan pada *studi in silico Molecular Docking* adalah sebagai berikut: Protein target yang digunakan adalah α -amilase pankreas pada manusia. Kristal protein diunduh dari <https://www.rcsb.org/> dengan kriteria pemilihan kata PDB ID 1HNY: *the structure of human pancreatic alpha-amylase*

Fina Nurjanah, 2019

STUDI MOLECULAR DOCKING, EVALUASI IN VITRO, DAN Uji Stabilitas Penyimpanan
Fikosianin *Spirulina platensis* sebagai Kandidat Antidiabetes

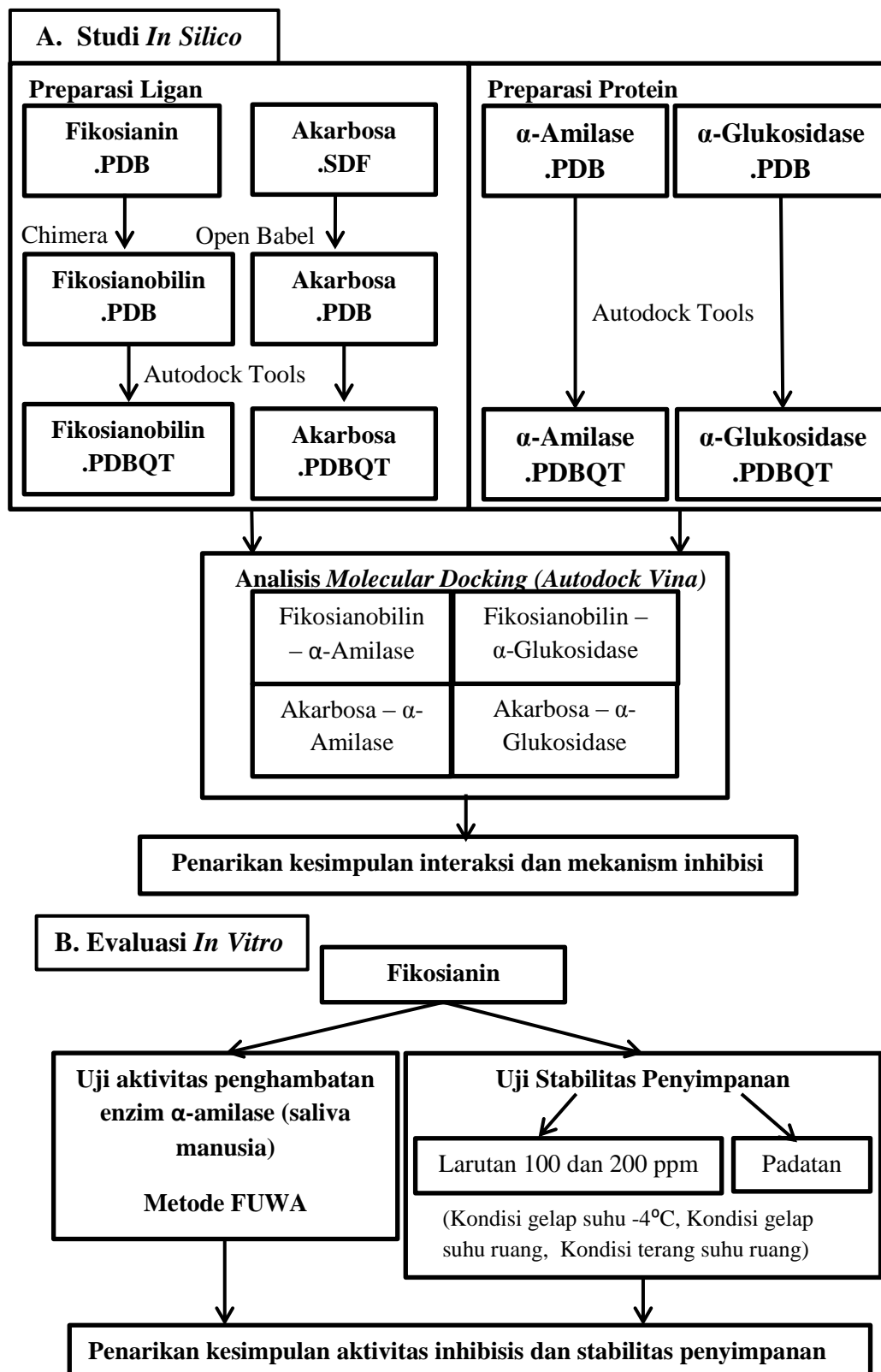
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

at 1.8 angstroms resolution and comparisons with related enzymes yang terdapat pada organisme *homo sapiens* dengan *X-Ray diffraction* yang berada pada resolusi pengukuran adalah 1,8Å. Kristal protein α -glukosidase diunduh dari <https://www.rcsb.org/> dengan kriteria pemilihan kata PDB ID 2ZE0. Dan digunakan struktur kristal fikosianin yang diunduh dari <https://www.rcsb.org/> dengan kriteria pemilihan kata PDB ID 1GH0: *crystal structure of c-phycoyanin from spirulina platensis* yang terdapat pada organisme *Arthrospira platensis* *X-Ray diffraction* yang berada pada resolusi pengukuran adalah 2,2 Å. Sebagai pembandingan, digunakan obat komersial akarbosa dimana struktur 3D dari akarbosa diunduh dari <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Bahan yang digunakan dalam uji aktivitas inhibisi enzim α -amilase adalah padatan fikosianin dengan kemurnian sebesar 2,911 yang sudah termasuk kategori *food grade*, saliva manusia didapatkan dari tiga orang berbeda non diabetes di usia awal 20 tahunan, aquades, natrium fosfat (NaH_2PO_4 teknis) dan dinatrium fosfat (Na_2HPO_4 p.a) digunakan untuk membuat *buffer* fosfat sebagai pelarut, *starch soluble*, *iodine* pro analisis, *potassium iodide* pro analisis, dan larutan HCl 1 N. Bahan yang digunakan pada uji stabilitas penyimpanan pigmen fikosianin adalah pigmen fikosianin, aquades, dan *buffer* fosfat.

3.3. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dua metode, yaitu studi *in silico* dan evaluasi *in vitro*. Pada studi *in silico* dilakukan analisis *molecular docking* dan pada evaluasi *in vitro* dilakukan uji aktivitas penghambatan pigmen fikosianin terhadap kerja enzim α -amilase (saliva manusia) serta dilakukan uji stabilitas penyimpanan pigmen fikosianin untuk mengetahui penyimpanan paling efektif untuk mempertahankan kestabilan fikosianin berdasarkan aplikasinya sebagai suplemen fungsional. Skema penelitian ditunjukkan pada **Gambar 3.1**.



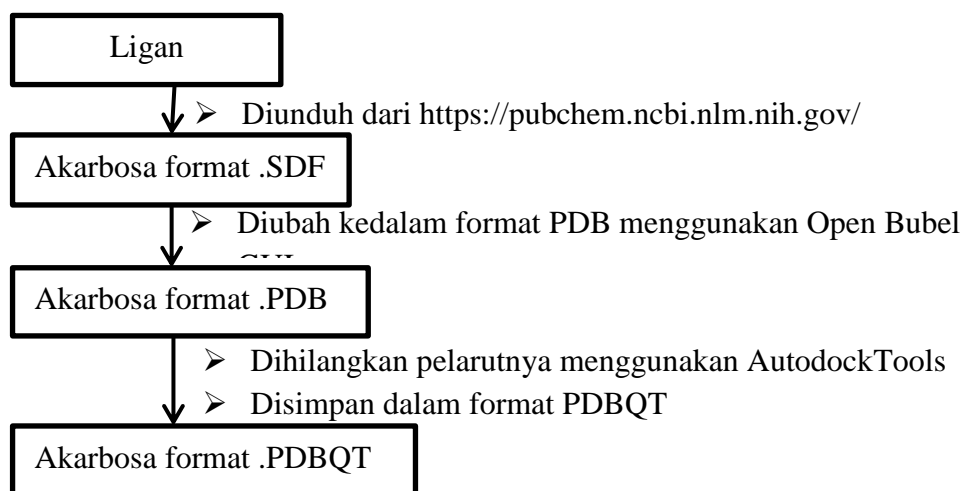
Gambar 3.1. Skema penelitian

3.3.1. Studi *In Silico*

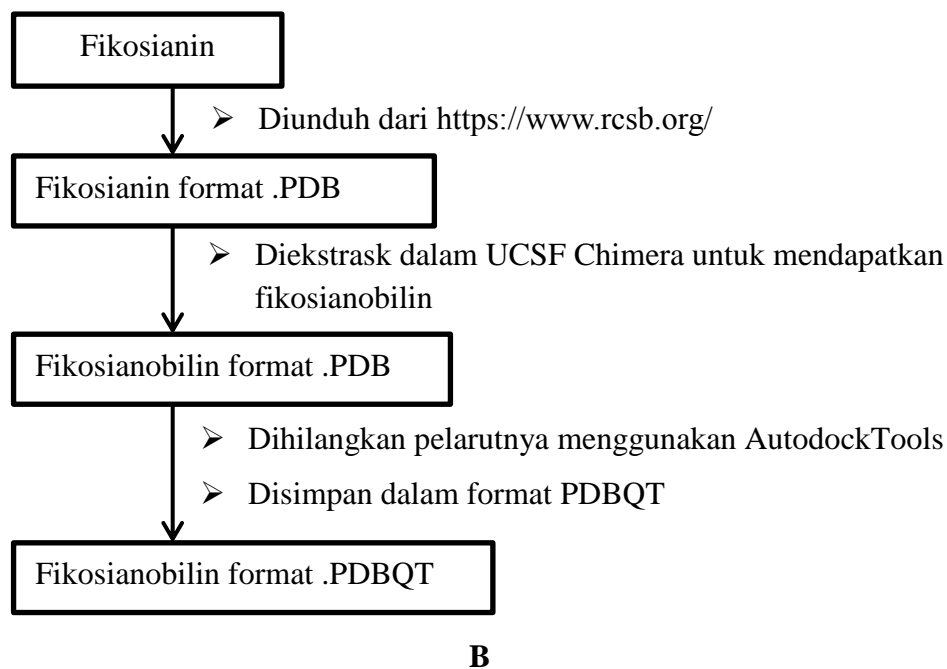
Pada studi *in silico* terdapat beberapa tahapan yang meliputi preparasi ligan, preparasi protein, preparasi penambatan molekul, analisis *molecular docking*, validasi penambatan, visualisasi molekuler dan analisis mekanisme inhibisi, serta analisis interaksi molekuler (Inbio, 2018). Berikut merupakan uraian dari tahapan yang dilakukan pada studi *in silico*.

3.3.1.1. Preparasi Ligan

Senyawa akarbosa (obat komersial diabetes) diunduh dari Website PubChem pada laman <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Pengunduhan dilakukan dengan struktur 3D format SDF, struktur tersebut yang akan digunakan untuk analisis penambatan molekul. Data struktur 3D inhibitor uji yaitu fikosianobilin diekstrak dari fikosianin yang diunduh dari RCSB *Protein Data Bank* (RCSB PDB). Perangkat lunak UCSF Chimera digunakan untuk memisahkan fikosianobilin dari fikosianin sehingga memperoleh berkas fikosianobilin dalam format PDB. Dengan mengklik Select>Residue(CYC)>Invert(selectedmodel)>Action>Delete>SavePDB. Data akarbosa yang telah diunduh dikonversi dari format .SDF ke format .PDB menggunakan perangkat lunak Open Babel GUI. Data akarbosa dan fikosianobilin sebagai inhibitor uji dengan format .PDB dimuat pada perangkat lunak AutodockTools dengan mengklik Ligan>Input>Choose. Data disimpan dengan format .PDBQT. Skema preparasi ligan divisualisasikan pada **Gambar 3.2**.



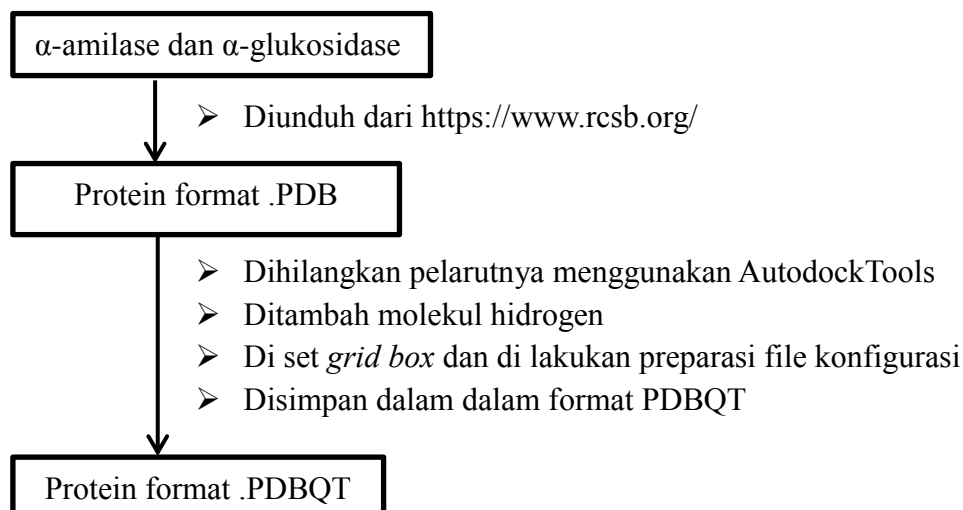
A



Gambar 3.2. Skema preparasi ligan
A. Akarbosa B. Fikosianobilin

3.3.1.2. Preparasi Protein

Proses selanjutnya adalah preparasi protein yang digunakan sebagai reseptor. Protein yang digunakan adalah enzim α -amilase dan α -glukosidase. Struktur 3D protein dengan format .PDB diunduh dari *Protein Data Bank* yang dapat diakses pada laman <https://www.rcsb.org/> (Inbio, 2018). Protein harus dilakukan preparasi lebih lanjut menggunakan AutodockTools. Data protein disederhanakan dengan menghapus molekul air. Data protein dengan format .PDB dimuat pada perangkat lunak AutodockTools dengan mengklik Grid>Macromolekul>Choose. Lokasi situs penambatan diatur sesuai dengan posisi inhibitor dengan mengklik Grid>Set Map Types>Choose Ligand, kemudian pilih Grid Box>Center>Center on Ligand. Lokasi penambatan (*grid box*/kubus kisi) disesuaikan dengan ukuran ligan (tidak lebih kecil dari ukuran ligan). Konfigurasi penambatan molekuler dibuat dan disimpan dalam format .txt dengan mengklik Docking>Output>Vina configuration. Data protein disimpan dalam format .PDBQT. Skema preparasi protein divisualisasikan pada **Gambar 3.3**.



Gambar 3.3. Skema preparasi protein

3.3.1.3. Preparasi Penambatan *Molecular Docking*

Molecular docking dilakukan dengan Autodock Vina (Trott & Olson, 2010). Data reseptor, data fikosianobilin, dan data akarbosa yang telah di preparasi digunakan sebagai input. Lokasi situs penambatan diatur sesuai dengan posisi inhibitor dengan mengklik Grid>Set Map Types>Choose Ligand, kemudian pilih Grid Box>Center>Center on Ligand. Lokasi penambatan (*grid box*) disesuaikan dengan ukuran ligan. Konfigurasi penambatan molekuler dibuat dan disimpan dalam format .txt. File konfigurasi dibuat untuk masing-masing senyawa dan tiap-tiap protein

3.3.1.4. Analisis *Molecular Docking*

Analisis penambatan molekul menggunakan program Autodock Vina pada Autodock tools dengan *Command syntax* : vina —config conf.txt —log log.txt . Hasil penambatan keluar dalam bentuk prediksi struktur dan nilai energi bebas gibbs (-). Tingkat afinitas dikatakan bagus apabila nilai energi bebas fikosianobilin sebagai senyawa uji lebih tinggi dibandingkan dengan akarbosa terhadap ligan (dalam negatif). Ikatan hidrogen yang dikatakan stabil apabila semakin banyak ikatan hidrogen pada senyawa dibandingkan dengan akarbosa

protein. Data posisi ligan kemudian disimpan dalam format .PDBQT dengan *Command syntax* : Vina_split –input all.pdbqt.

3.3.1.5. Validasi Penambatan

Validasi penambatan dilakukan untuk menguji apakah obat komersil pada situs aktif protein sama dengan hasil kristalografi jika dibandingkan dengan pemodelan hasil penambatan molekul, jika tidak dilakukan penambatan ulang, hal ini bertujuan untuk mengetahui posisi yang tepat mengenai situs aktif dari protein. Nilai RMSD inhibitor hasil penambatan dan hasil kristalografi dihitung. Kalkulasi penghitungan nilai RMSD dilakukan dengan perangkat lunak PyMOL dengan memasukkan perintah “rms_cur[spasi](nama ligan yang telah di *docking*),[spasi](nama ligan yang belum di *docking*)”.

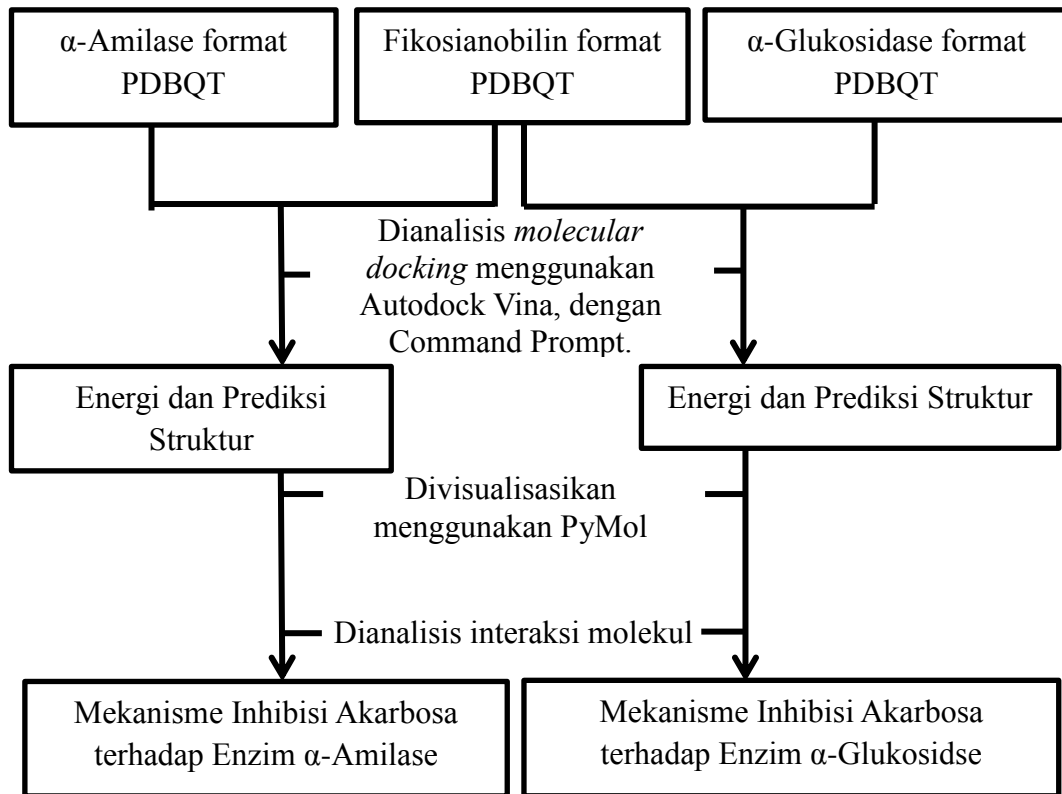
3.3.1.6. Visualisasi Molekuler dan Analisis Mekanisme Inhibisi

Visualisasi model fikosianobilin, model akarbosa, dan data reseptor di visualisasikan dengan menggunakan perangkat lunak PyMOL. Visualisasi data reseptor dengan menggunakan model *surface*, sedangkan model fikosianobilin dan akarbosa di visualisasikan dengan model *spheres*. Hasil visualisasi disimpan dalam format .PNG. Parameter yang diamati adalah posisi ligan terhadap reseptor, sehingga dapat dianalisis mekanisme inhibisinya.

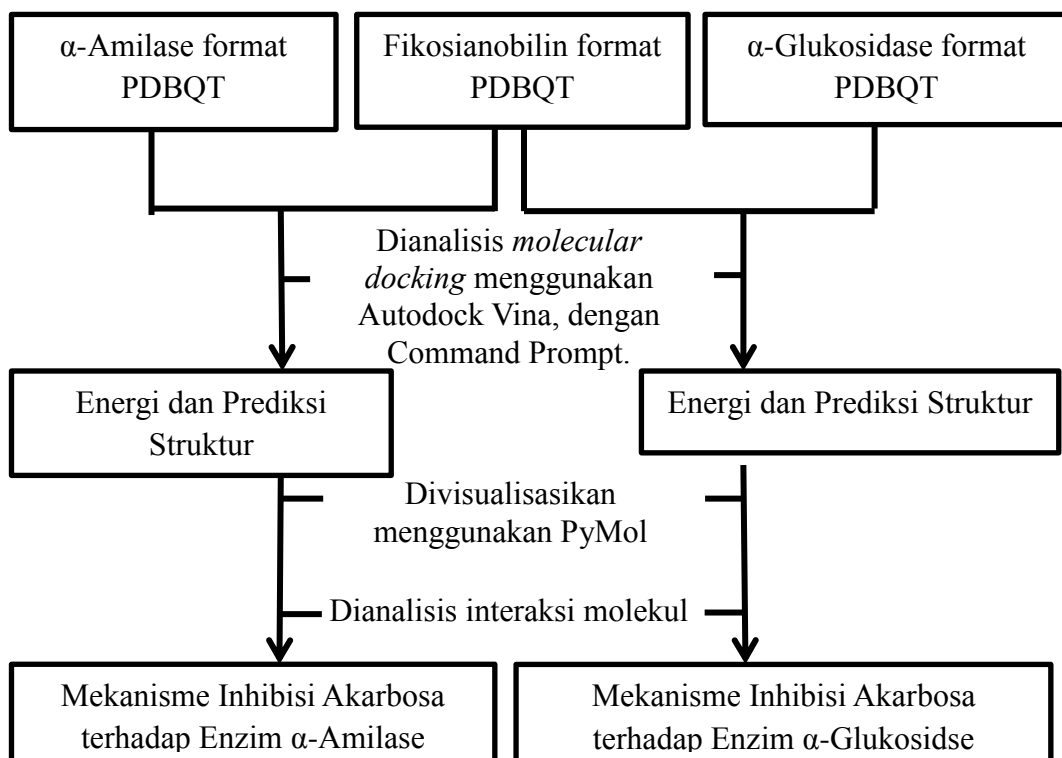
3.3.1.7. Analisis Interaksi Molekuler

Model fikosianobilin, model akarbosa, dan data reseptor digabungkan dalam satu file dengan format .PDB menggunakan perangkat lunak PyMOL. Interaksi molekuler kompleks inhibitor maupun ligan dianalisis dengan *Protein-Ligand Interaction Profiler* (PLIP) (Salentin *et al.*, 2015).

Analisis interaksi intramolekuler fokus terhadap dua analisis yaitu ikatan hidrogen, dan interaksi hidrofobik. Parameter yang diamati jumlah ikatan hidrogen, residu asam amino dan interaksi hidrofobik yang terbentuk dari penambatan ligan dengan protein reseptor. Skema analisis *molecular docking* divisualisasikan pada **Gambar 3.6.** dan **Gambar 3.7.**



Gambar 3.4. Skema analisis *molecular docking* fikosianobilin – enzim



Gambar 3.5. Skema analisis *molecular docking* akarbosa – enzim

3.3.2. Evaluasi *In Vitro*

3.3.2.1. Uji Aktivitas Penghambatan Enzim α -Amilase

Aktivitas penghambatan enzim α -amilase (saliva manusia) oleh pigmen fikosianin ditentukan menggunakan metode FUWA (Xiao *et al.*, 2006) dengan beberapa penyesuaian. Sebanyak 3 mL larutan saliva ditambahkan 3 mL larutan fikosianin dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Campuran ditambah 3 mL pati 1% dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 15 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 3 mL HCl 1 N kemudian ditambahkan 1 mL larutan iodium. Pati terhidrolisis bila menghasilkan larutan kompleks berwarna kuning, dan berwarna biru jika tidak terjadi hidrolisis. Larutan diencerkan dengan penambahan aquades kemudian absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm. Prosedur uji aktivitas penghambat α -amilase ditunjukkan pada **Tabel 3.1**.

Tabel 3.1. Prosedur uji aktivitas penghambat α -amilase

Reagen	Volume (mL)			
	Blanko	Kontrol Blanko	Sampel	Kontrol Sampel
Fikosianin (1000 ppm)	-	-	3	3
Pelarut Sampel	3	3	-	-
Pelarut Enzim	-	3	-	3
Enzim (Saliva)	3	-	3	-
Diinkubasi pada suhu 37° C, 15 menit				
Substrat 1 %	3	3	3	3
Diinkubasi pada suhu 37 ° C, 15 menit				
HCl 1N	3	3	3	3
KI	1	1	1	1
Diencerkan, kemudian diukur absorbansinya di panjang gelombang 600 nm.				

Setiap percobaan dilakukan dua kali, dan aktivitas penghambatan α -amilase (%inhibisi) dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

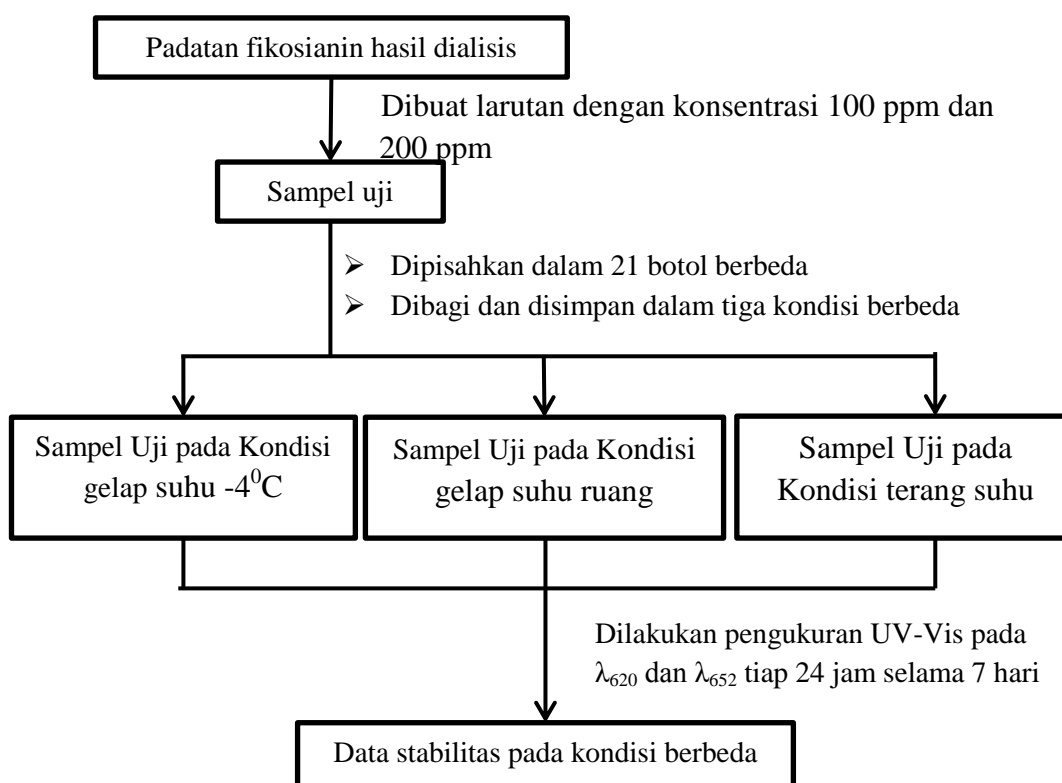
$$\text{Persen inhibisi (\%)} = \frac{S - B}{S} \times 100$$

Keterangan : S = Selisih nilai absorbansi sampel dan kontrol sampel

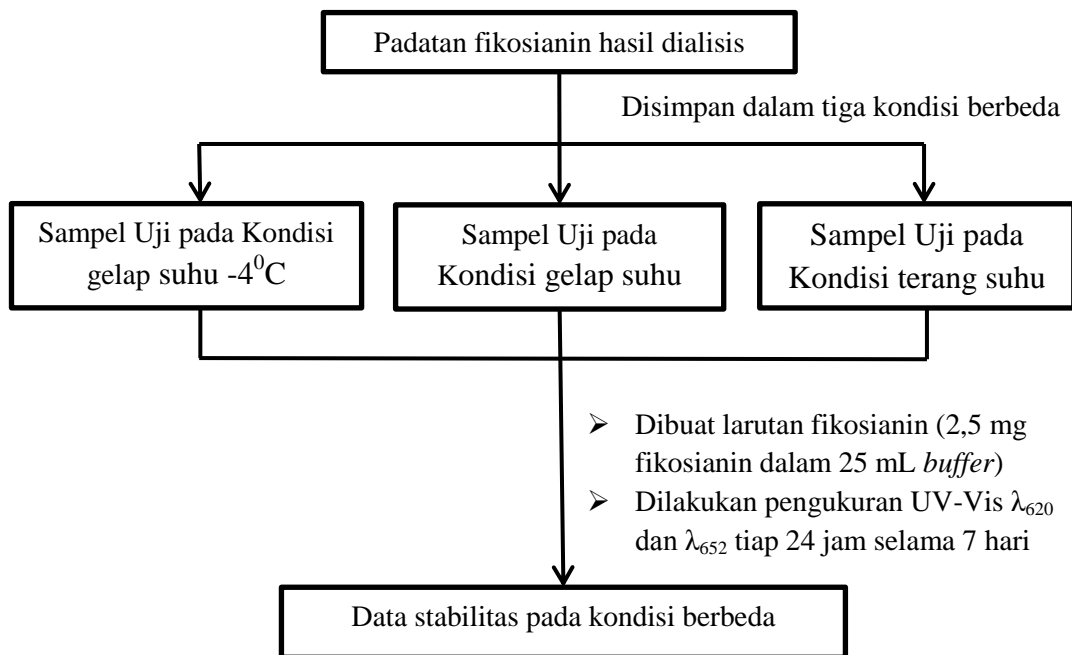
B = Selisih nilai absorbansi blanko dan kontrol blanko

3.3.2.2. Pengamatan Stabilitas Penyimpanan Larutan dan Padatan Pigmen Fikosianin

Stabilitas penyimpanan fikosianin diamati melalui perubahan nilai konsentrasi fikosianin yang diperoleh dari analisis spektrofotometri UV-Vis. Pengamatan stabilitas penyimpanan didasarkan pada Setyawan (2018) dengan beberapa penyesuaian. Pigmen fikosianin murni hasil dialisis dilakukan uji stabilitas penyimpanan selama 7 hari. Uji stabilitas penyimpanan ini dilakukan terhadap dua sampel yaitu pigmen fikosianin dalam bentuk larutan dan pigmen fikosianin dalam bentuk padatan. Kedua sampel disimpan dalam tiga kondisi berbeda yaitu pada kondisi gelap suhu -4°C , kondisi gelap suhu ruang, dan kondisi terang suhu ruang. Setiap interval waktu 24 jam, konsentrasi fikosianin diukur absorbansinya pada panjang gelombang 620 nm dan 652 nm. Skema pengamatan stabilitas penyimpanan pigmen fikosianin divisualisasikan pada **Gambar 3.6.** dan **Gambar 3.7.**



Gambar 3.6. Skema pengamatan stabilitas penyimpanan larutan fikosianin



Gambar 3.7. Skema pengamatan uji stabilitas penyimpanan padatan fikosianin