

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Universitas Pendidikan Indonesia dan di tempat tinggal peneliti yaitu Kabupaten Bandung, Provinsi Jawa Barat. Penelitian dilakukan secara dalam jaringan dan luar jaringan. Waktu penelitian dimulai pada bulan Maret-Juli 2022.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

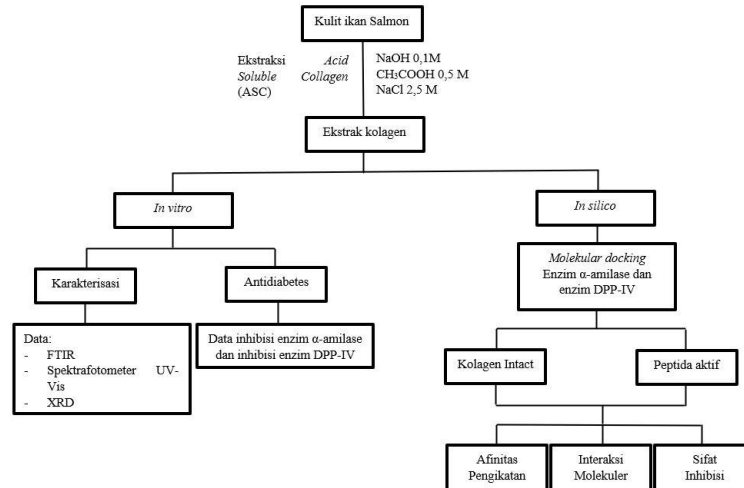
Untuk *in vitro* menggunakan sentrifugator, *Fourier Transform Infra-Red* (FTIR), Spektrofotometer UV-Vis, *Freeze-Dryer* dan SDS-PAGE. Sedangkan untuk *in silico* menggunakan aplikasi *Moleckular docking* yang diinstal pada perangkat keras dengan menggunakan software AutoDock Tools, AutoDock Vina, PyMOL, dan BIOVIA *Discovery Studio Visualizer* 2021, Open Babel dan website BIOPEP, PeptidaRanker, AllerTop, ToxinPred.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini secara *in vitro* yaitu kulit ikan salmon (*Salmo Salar*), NaOH (Merck), Asam Asetat (Merck), NaCl (Merck), akuades, kain blacu, KBr, *3,5-dinitrosalicylic acid* (sigma), Buffer fosfat (pH 6,9), *starch soluble* (Merck), maltosa (Merck), NaH₂PO₄ (Merck), enzim papain dan enzim bromelain, ninhidrin, saliva penderita non-diabetes mellitus tipe-2 dan saliva penderita diabetes mellitus tipe-2. Sedangkan untuk *in silico* yaitu struktur enzim alfa-amilase dengan kode 1XH0 dan struktur enzim DPP-IV dengan kode 3KWF. Ligan FQ (Phe-Gln), ligan FR (Phe-Arg), ligan VW (Val-Trp), ligan WF (Trp-Phe), ligan WG (Trp-Gly), ligan HF (His-Phe), ligan PM (Pro-Met), ligan YW (Tyr-Trp), ligan SWY, ligan GGG, ligan FDMG, dan ligan HVWFG. Untuk kontrol positif adalah ligan akarbosa dan linagliptin.

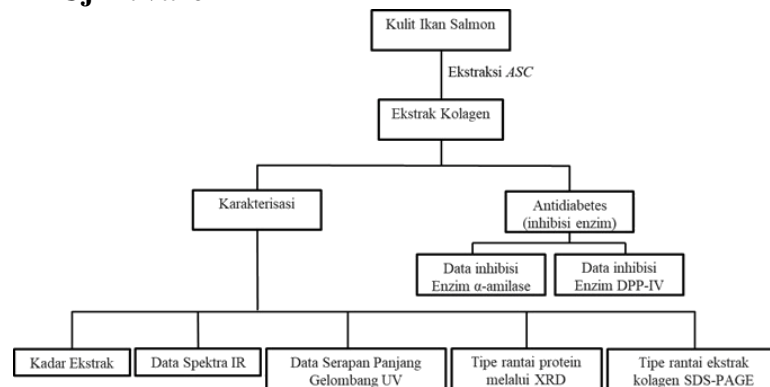
3.3 Diagram alir

3.3.1 Alur uji secara keseluruhan



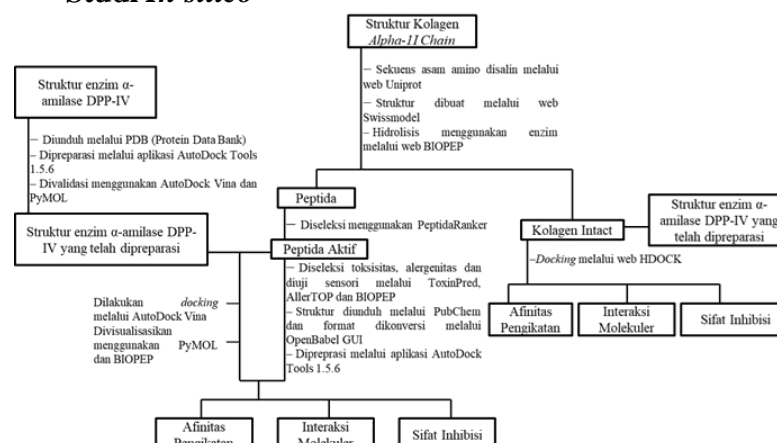
Gambar 3. 1 Alur penelitian *in vitro* dan *in silico*

3.3.2 Uji *In vitro*



Gambar 3. 2 Alur penelitian *in vitro*

3.3.3 Studi *In silico*



Gambar 3. 3 Alur penelitian *in silico*

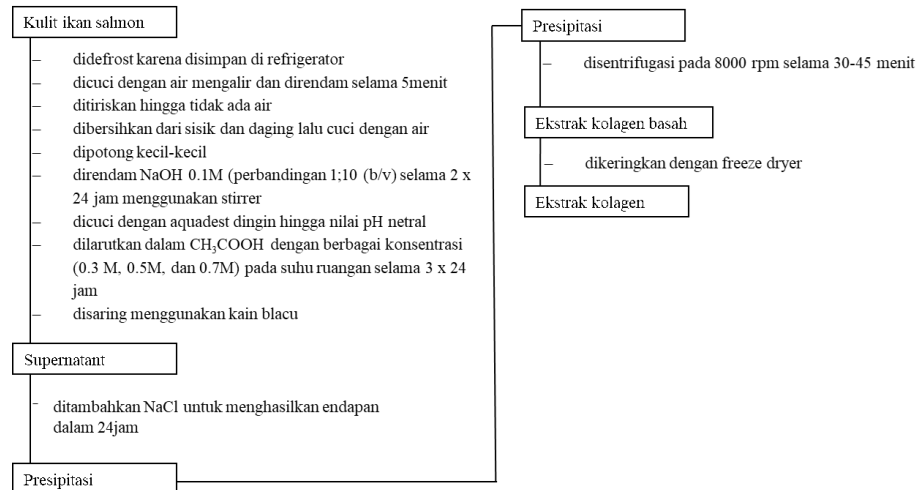
3.4 Uji *In Vitro*

3.4.1 Ekstraksi kolagen

Ekstraksi kolagen kulit ikan salmon (*Salmo salar*) diekstraksi menggunakan metode *acid-soluble collagen* (ASC) yang dimodifikasi dari metode (Chuaychan *et al.*, 2015). Limbah kulit ikan salmon sebanyak 1 kg didedroset setelah disimpan dalam refrigerator. Kemudian, kulit salmon dicuci menggunakan air mengalir dan direndam selama 5 menit. Setelah kulit ditiriskan hingga tidak ada air yang menetes, kulit salmon dibersihkan dari sisik dan daging yang masih menempel dan dibersihkan dengan air mengalir. Kulit ikan yang telah dibersihkan, dipotong menjadi bagian-bagian kecil.

Lalu, sampel direndam dalam NaOH 0,1 M (perbandingan 1:10 (b/v)) untuk menghilangkan protein non-kolagen dan lemak selama 2 x 24 jam dengan beberapa kali pengadukan pada awal maserasi. Larutan NaOH diganti dengan yang baru setiap hari. Selanjutnya, kulit dicuci dengan aquadest dingin hingga nilai pH netral. Selanjutnya, ekstraksi dilakukan dengan cara dilarutkan dalam CH₃COOH konsentrasi 0,5 M pada suhu ruangan selama 3 x 24 jam. Jika sudah terlarut sempurna, hasil ekstraksi disaring menggunakan kain blacu hingga didapatkan residu dan supernatant. Setelah itu, ditambahkan NaCl 2,5 M terhadap supernatant

untuk menghasilkan endapan selama 24 jam. Hasil presipitasi dikumpulkan dan disentrifugasi pada 4000 rpm selama 30-45 menit. Jika kolagen basah telah terbentuk, maka langsung dikeringkan dengan freeze dryer. Alur penelitian ditunjukkan pada gambar 3.3.



Gambar 3. 4 Alur penelitian ekstraksi kolagen ikan salmon

3.4.2 Spektrofotometer UV-Vis

Ekstrak kolagen menggunakan metode (Iswariya *et al.*, 2018) dan dimodifikasi. Ekstrak kolagen dibuat konsentrasi 20ppm dan diukur absorbansi maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

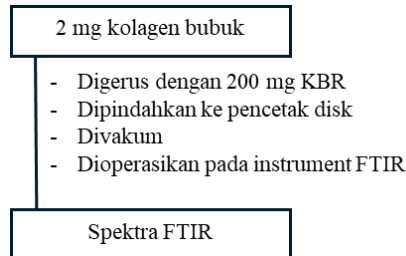
3.4.3 Kadar Protein

Kadar protein menggunakan metode (GORNALL *et al.*, 1949) untuk ekstrak kolagen dari kulit ikan salmon (*Salmo salar*) menggunakan metode biuret. Dibuat standar kolagen dengan konsentrasi 2000 ppm. Kemudian dimasukkan ke 2 tabung reaksi berbeda. Lalu 8 mL biuret dicampurkan dengan 2 mL larutan uji. Inkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Kemudian di ukur pada panjang gelombang 543 nm. Blanko berisi 8mL biuret dengan 2 mL akuades.

3.4.4 FTIR

Karakterisasi gugus fungsi kolagen diadaptasi dari metode (Moreno *et al.*, 2012) dengan dimodifikasi. Karakterisasi dilakukan menggunakan FTIR (*Fourier Transform Infra-Red*). Sebanyak 2 mg Kolagen dan 200 mg KBr digerus hingga homogen (tercampur) dan diletakkan pada alat pencetak disk, selanjutnya divakum bertujuan untuk menghilangkan udara pada disk.

Disk yang telah dicetak lalu dimasukkan kedalam alat FTIR (*Fourier Transform Infra-Red*) dan diukur pada panjang gelombang 400 cm^{-1} - 4.000 cm^{-1} . Hasil spektrum IR akan muncul. Alur penelitian spektra ftir ekstrak ditunjukkan pada gambar 3.4



Gambar 3. 5 Alur penelitian FTIR ekstrak kolagen ikan salmon

3.4.5 Analisis ukuran peptida dengan SDS-PAGE

Pengujian SDS-PAGE menggunakan metode (Laemmly,1970) dan dimodifikasi. Analisis ekstrak kolagen kulit ikan salmon menggunakan SDS-PAGE. Pada tahap awal membuat Gel SDS 14% menggunakan air mili-Q, polyacrilamide 30%, resolving buffer, SDS 10%, APS 10%, TEMED. Selanjutnya adalah denaturasi protein dengan memasukkan lysate protein yang ditambahkan dengan sample buffer yang kemudian didinginkan. Kemudian tahap SDS-Page dengan melepaskan sisir pada gel dan pasang gel kedalam dudukan elektroforesis dan masukkan 1x running buffer lalu sampel hasil denaturasi protein dimasukkan ke dalam sumur SDS gel lalu diatur voltase kontrol untuk running SDS-PAGE hingga sampel menyentuh dasar gel. Terakhir dengan coomasie blue staining dengan gel hasil elektroforesis dipindahkan ke dalam wadah dan dicuci dengan akuades kemudian dilakukan pewarnaan Coomasie Blue selama 1 jam dan dihilangkan dengan menggunakan campuran metanol, asam asetat glasial, dan akuades selama semalam.

3.4.6 XRD

Karakterisasi XRD diadaptasi dari metode (Cao *et al.*, 2019). Instrumen XRD digunakan untuk merekam struktur kristal dari sampel PSC yang diliofilisasi. Persamaan Bragg $2d\sin\theta = \lambda$ ($\lambda = 0,154$) digunakan untuk

menggambarkan hasil difraksi sinar-X. Sumber sinar-X adalah Cu Ka, tegangan tabung 40 kV, arus tabung 40 mA, rentang pemindaian 10° – 50° (2θ), dan kecepatan pemindaian 0,02°/s.

3.4.7 Uji aktivitas inhibisi α -amilase

Uji aktivitas inhibisi α -amilase diadaptasi dari metode (Li *et al.*, 2018) dengan dimodifikasi. Tahap awal adalah mempersiapkan buffer natrium fosfat pH 6,9. Selanjutnya, 70 μ L α -amilase (dari saliva non diabetes dan diabetes) dicampur dengan 930 μ L buffer natrium fosfat (0,02 M, pH 6,9 dengan 6 mM NaCl). Kemudian, ditambahkan 800 μ L sampel kolagen kulit ikan salmon atau akarbosa (40, 80, 120, 160, 200ppm). Setelah inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C , ditambahkan 500 μ L larutan pati 1% dalam bufer natrium fosfat (0,02 M, pH 6,9 dengan 6 mM NaCl) dan campuran diinkubasi kembali selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1000 μ L DNS (*3,5-dinitrosalisyllic acid*). Kemudian dipanaskan selama 10 menit dalam waterbath dalam air yang mendidih dan didinginkan pada suhu kamar. Absorbansi diukur pada 540 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1700, Jepang). Akarbosa digunakan sebagai kontrol positif. Blanko kontrol diperlakukan dengan sama namun tanpa inhibitor.

Rumus % inhibisi:

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

3.4.8 Uji aktivitas inhibisi DPP-IV

Uji aktivitas inhibisi DPP-IV dari metode *Abnova DPP (IV) Inhibitor Screening Assay Kit*. Sampel ekstrak kolagen (10 μ L), didispersikan dalam buffer (20 mM Tris-HCl yang mengandung 100 mM NaCl dan 1 mM EDTA, pH 8,0) pada berbagai konsentrasi, dicampur dengan buffer uji dan DPP-IV dalam 96 well . Kemudian, larutan substrat (*Gly-Pro-Aminomethylcoumarin*) ditambahkan untuk memulai reaksi. Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, dan fluoresensi

diukur menggunakan pembaca pelat (Synergy MX, Bio Tek) pada panjang gelombang eksitasi 330 nm dan panjang gelombang emisi 450 nm.

Rumus % inhibisi:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{aktivitas awal} - \text{inhibitor}}{\text{aktivitas awal}} \times 100\%$$

3.5 Studi *In Silico*

3.5.1 Identifikasi dan Hidrolisis kolagen kulit ikan salmon (*Salmo salar*)

Kolagen kulit ikan salmon termasuk ke dalam jenis kolagen tipe-1 rantai α -1. Struktur rantai kolagen diperoleh dari Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) dengan format FASTA kemudian struktur yang diperoleh disalin ke web BIOPEP (<https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>) kemudian pada bagian tab analysis dan pilih Enzyme(s) action. Selanjutnya, struktur rantai kolagen kulit ikan salmon dilakukan pemotongan enzim menggunakan enzim kimotripsin, tripsin, papain, dan bromelain. Hasil dari pemotongan struktur rantai kolagen kulit ikan salmon oleh beberapa enzim diatas akan menghasilkan bioaktif peptida yang berpotensi sebagai inhibitor untuk enzim α -amilase, dan DPP-IV.

3.5.2 Seleksi peptida aktif

Hasil hidrolisis yang dilakukan pada web BIOPEP yang menghasilkan bioaktif peptida, namun tidak semua peptida bersifat aktif. Untuk mengetahui peptida yang bersifat aktif dapat diuji menggunakan web PeptideRanker (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>) yang menghasilkan nilai antara 0 hingga 1. Peptida yang mendapatkan nilai >0.8 termasuk ke dalam peptida aktif.

3.5.3 Analisis toksisitas peptida aktif dan alergenitas peptida aktif

Bioaktif peptida diuji toksisitasnya di web ToxinPred (<http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/>) dan akan dihasilkan berupa informasi mengenai peptida aktif yang bersifat toksik atau tidak. Sedangkan pengujian untuk mengetahui peptida yang bersifat allergen atau non-

allergen dilakukan di web AllerTOP (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>) dengan memasukkan peptida aktif pada web tersebut.

3.5.4 Analisis sensori peptida aktif

Bioaktif peptida kemudian diuji di web BIOPEP (<https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>) untuk mengetahui rasa dari peptida aktif tersebut. Pengujian dilakukan dengan memilih tab *sensory peptide and amino acids* lalu klik tab *analysis* dan pilih *profiles of sensory activity* dengan tahap akhir memasukkan peptida aktif.

3.5.5 Preparasi ligan peptida aktif

Bioaktif peptida yang sudah lolos dari uji non-toksik dan non-allergen dipreparasi untuk *docking*. Ligan yang digunakan adalah ligan dari peptida aktif dan kontrol positif inhibitor dengan struktur 3D diunduh dari web PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) menggunakan format sdf. yang kemudian diubah menjadi format .pdb menggunakan aplikasi Open Babel GUI. Kemudian, struktur ligan disesuaikan rotasinya dengan AutoDock Tools.

3.5.6 Preparasi enzim target Diabetes Mellitus tipe 2

Enzim target Diabetes Mellitus tipe 2 yang digunakan pada penelitian ini adalah α -amilase dan *dipeptidil peptidase-IV* (DPP-IV). Struktur enzim diunduh dari web Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) dengan format .pdb. Kemudian dipreparasi menggunakan aplikasi AutoDock (Fakih & Dewi, 2020). Preparasi dilakukan dengan menghilangkan air atau pelarut dan diperoleh rantai enzim murni. Selanjutnya dilakukan penambahan molekul polar dan muatan. Lalu disimpan dengan format .pdbqt.

3.5.7 Validasi metode *molecular docking*

Validasi metode *molecular docking* bertujuan untuk melakukan verifikasi kebenaran dari simulasi yang digunakan dengan cara melakukan *docking* ulang ligan natif dan sisi aktif enzim. Berikut merupakan cara validasi *moleckular docking*:

- Protein dan ligan yang sudah terpisah menggunakan aplikasi AutoDock di-*redocking* dengan mengatur ukuran grid box dimana ukurannya disesuaikan dengan ukuran ligan natif dan diatur ukuran x, y, dan z. Kemudian disimpan pada file dengan format grid.txt jika sudah menemukan ukuran yang tepat.
- Validasi dilakukan dengan cara membuka ligan hasil *docking* untuk mencari nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*) menggunakan aplikasi PyMOL. Jika nilai RMSD < 2Å maka dapat dinyatakan valid untuk siap digunakan ligan uji lain. RMSD < 2Å sering digunakan sebagai kriteria prediksi struktur terikat dengan benar (Allouche, 2012).

Tabel 3.1 Koordinat grid box yang digunakan untuk simulasi docking

No.	Ligan Natif	Koordinat (Å)			Ukuran (Å)			RSMD (Å)
		X	Y	Z	X	Y	Z	
1.	Carmegliptin (B1Q1)	46,499	51,555	34,033	12	10	16	0,480
2.	Akarbosa (AAO)	7,033	15,159	39,944	22	16	18	1,960

3.5.8 Simulasi *molecular docking*

Simulasi *docking* menggunakan AutoDock Vina. Data yang perlu disiapkan adalah file protein dan ligan yang telah dipreparasi sebelumnya dengan format .pdbqt dan ukuran grid ligan natif yang disimpan pada conf.txt. Simulasi *docking* akan menghasilkan nilai afinitas ikatan.

3.5.9 Analisis interaksi molekular

Visualisasi hasil *docking* menggunakan perangkat lunak Biovia *Discovery Studio Visualizer 2021* dimana dapat teramati interaksi molekuler yang terbentuk antara kompleks ligan dengan enzim target.

3.5.10 Analisis afinitas pengikatan peptida aktif, sisi pengikatan aktif dan inhibisi

Inhibisi peptida aktif dapat ditentukan dengan cara menganalisis dari kesamaan dalam menempati posisi dimana sisi pengikatan antara peptida aktif dengan pembanding terhadap enzim target menempati posisi yang sama.