

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Februari sampai dengan bulan Juli 2022. Penelitian dilakukan di laboratorium riset Kimia Hayati 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* adalah neraca analitis, alat gelas, *freezer*, *chiller*, *freeze dryer*, sentrifugator, *set alat* elektroforesis gel, spektrofotometer UV-Vis (UV mini 1240, Shimadzu), spektrofotometer FTIR (Shimadzu 8400), Difraktometer Sinar-X (XRD) MiniFlex, dan *BioVision's ACE1 Inhibitor Screening Kit*.

Adapun alat yang digunakan untuk uji *in silico* simulasi *molecular docking* dalam penelitian ini adalah perangkat keras dengan spesifikasi sebagai berikut: Prosesor AMD A4-9125 *Dual-Core* 2,3 GHz *up to* 2,6 GHz, RAM 4GB DDR4-1866 SDRAM, 256GB SSD M2, dengan sistem operasi Windows 10 *Home Single Language* 64 bit. Perangkat lunak yang digunakan adalah AutoDock Tools 1.5.6 (Morris *et al.*, 2009), AutoDock Vina 1.1.2 (Trott & Olson, 2010), OpenBabel GUI 2.3.1 (O'Boyle *et al.*, 2011), Avogadro 1.2.0 (Hanwell *et al.*, 2012), PyMOL 2.5.2 (Schrödinger, L. & DeLano, W., 2020), dan BIOVIA Discovery Studio Visualizer (Dassault Systèmes BIOVIA, 2021).

3.2.2 Bahan

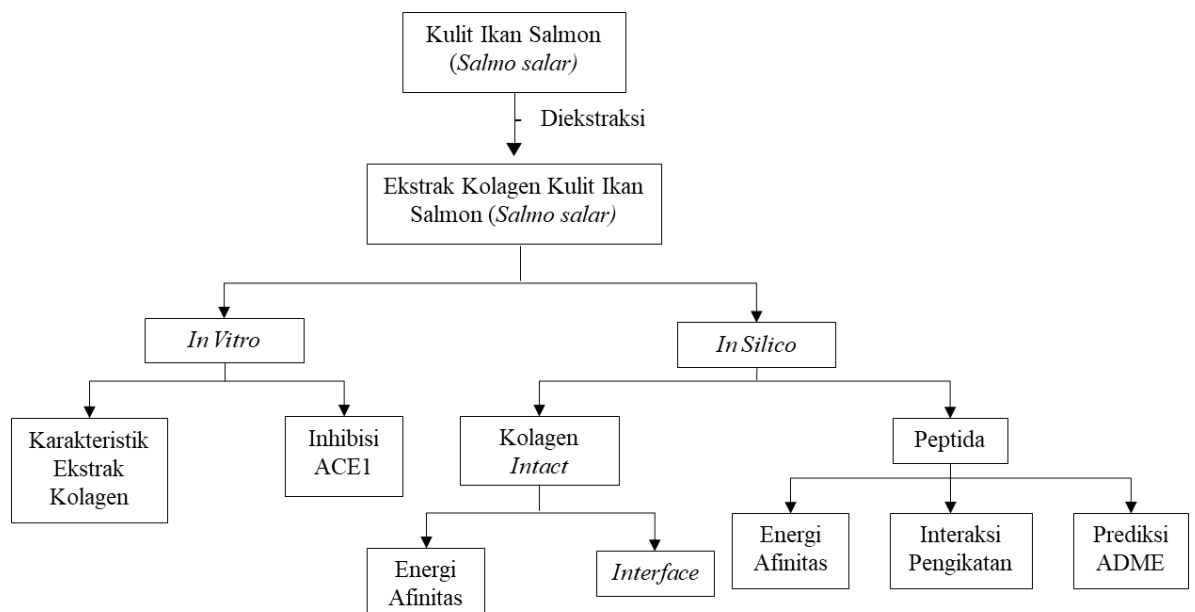
Adapun bahan yang digunakan dalam studi *in vitro* adalah kolagen kulit ikan salmon (*Salmo salar*), akuades, natrium hidroksida ($\text{NaOH} \geq 97\%$), asam asetat (CH_3COOH) glasial (100%), garam natrium klorida ($\text{NaCl} \geq 99,5\%$), kasein, tembaga (II) sulfat penta hidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 99-100,5%), natrium kalium tetrat tetra hidrat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 99-102%).

Bahan yang digunakan dalam penelitian *in silico molecular docking* adalah struktur protein enzim ACE1, ligan uji peptida aktif kolagen kulit ikan salmon (*Salmo salar*). Struktur protein enzim ACE1 dengan ligan natif lisonipril (PDB:

1O86) diperoleh dari *database Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org>) (Berman *et al.*, 2000) dengan format pdb. Adapun data struktur 3D dari senyawa peptida kolagen kulit ikan salmon (*Salmo salar*) diperoleh dari *database PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) (Kim *et al.*, 2016) dalam format sdf dan dibuat menggunakan perangkat lunak Avogadro 1.2.0 (Hanwell *et al.*, 2012).

3.3 Prosedur Penelitian

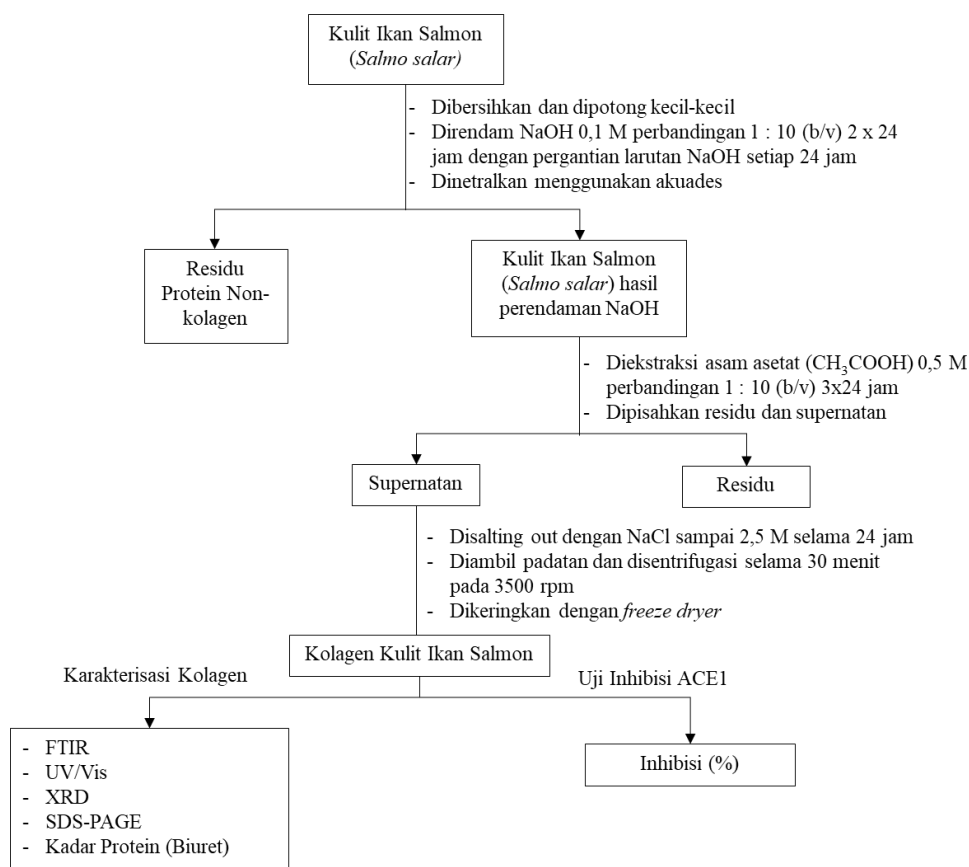
Penelitian ini terdiri dari dua jenis penelitian, yaitu studi *in vitro* dan studi *in silico*. Seluruh tahapan dari prosedur penelitian dapat dilihat pada **Gambar 3.1.**



Gambar 3. 1 Diagram Keseluruhan Penelitian

3.3.1 Studi *In Vitro*

Tahapan penelitian *in vitro* ditunjukkan pada **Gambar 3.2**.



Gambar 3. 2 Tahapan Penelitian *In Vitro*

3.3.1.1 Ekstraksi Kolagen

Sampel kulit ikan salmon diperoleh dari Laboratorium Riset Kimia Hayati, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia. Kulit dari sisik ikan salmon dicuci bersih menggunakan air mengalir, direndam selama 2-5 menit, dan dicuci kembali menggunakan air mengalir untuk membersihkan kulit dan daging yang masih menempel. Kemudian kulit dipotong kecil-kecil untuk memudahkan proses ekstraksi.

Proses ekstraksi dilakukan berdasarkan metode Chuaychan *et al.* (2015) dengan modifikasi. Kulit dimasukkan ke dalam larutan NaOH 0,1 M dengan perbandingan 1:10 (b/v) pada suhu ruang dan diaduk selama beberapa kali dalam 2 x 24 jam untuk menghilangkan protein non-kolagen. Larutan NaOH diganti dengan yang baru setiap harinya. Sampel kulit kemudian dicuci menggunakan akuades dingin untuk netralisasi. Sampel kulit ikan salmon diekstraksi menggunakan larutan

asam asetat (CH_3COOH) dengan konsentrasi 0,5 M pada suhu kamar selama 3 x 24 jam. Hasil ekstraksi disaring menggunakan kain blacu untuk memisahkan residu dengan supernatan. Supernatan dipresipitasi menggunakan NaCl 2,5 M selama 24 jam dan disentrifugasi pada 3500 rpm selama 30 menit. Kolagen yang dihasilkan dikeringkan menggunakan *freeze dryer*.

3.3.1.2 Karakterisasi Kolagen

Analisis kandungan protein dari kolagen kulit ikan salmon dilakukan berdasarkan metode biuret (Gornall *et al.*, 1949) dengan standar kasein. Konsentrasi kasein dibuat pada 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, dan 500 ppm. Sebanyak 2 mL larutan standar dan sampel ditambahkan ke dalam 8 mL biuret. Campuran diinkubasi pada suhu 37 °C selama 15 menit. Diukur absorbansi sampel pada panjang gelombang 543 nm.

Pengujian FTIR dari kolagen dilakukan berdasarkan metode Moreno *et al.* (2012) dengan modifikasi. Kolagen kering sebanyak 2 mg digerus dengan 200 mg KBr. Kemudian diukur menggunakan FTIR Shimadzu 8400 dengan rentang panjang gelombang antara 4000 – 400 cm^{-1} . Pengujian UV dari sampel kolagen menggunakan UV mini 250 berdasarkan metode (Iswariya *et al.*, 2018) dengan modifikasi. Sebanyak 10 mg sampel kolagen dilarutkan dalam 100 mL akuades. Larutan diencerkan dari 2 mL menjadi 10 mL, kemudian diukur panjang gelombang maksimumnya pada rentang 200 – 300 nm dengan akuades sebagai blanko.

Analisis XRD dari kolagen kulit ikan salmon dilakukan berdasarkan metode Bak *et al.* (2018). Ekstrak kolagen diukur menggunakan radiasi $\text{CuK}\alpha$ (0,154 nm) pada 2θ 3°- 60° menggunakan XRD MiniFlex.

Sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) dilakukan berdasarkan metode Laemmli (1970) dengan modifikasi. SDS-PAGE dilakukan menggunakan 15% (w/v) *separating gel* dan 5% *stacking gel* poliakrilamida. Sampel diinkubasi terlebih dahulu dengan *buffer* sampel dengan perbandingan 1:1 dan dipanaskan pada suhu 95°C selama 5-10 menit, lalu didinginkan dengan segera (*snap freeze*). Sebanyak 10 μL sampel dimasukkan ke dalam sumur dan dijalankan selama 30 menit pada tegangan 80 V sampai semua sampel terkumpul pada batas bawah *stacking gel*. Kemudian dilakukan kenaikan voltase selama bertahap dari 100 V, 120 V, hingga 150 V sampai sampel menyentuh

dasar gel. Gel hasil elektroforesis dicuci dengan akuades selama 3x5 menit, kemudian diwarnai menggunakan *Coomassie Blue* selama 1 jam. Proses *destaining* gel menggunakan campuran metanol, asam asetat glasial, dan akuades selama semalaman.

3.3.1.3 Uji Aktivitas Inhibisi ACE1

Pengukuran inhibisi ACE1 dilakukan menggunakan *BioVision's ACE1 Inhibitor Screening Kit*. Sebanyak 40 μL larutan enzim ACE1 dicampurkan dengan masing-masing 25 μL sampel kolagen (S), 25 μL enzim kontrol (EC), dan 25 μL kontrol tanpa enzim (BC). Dibuat volume pada setiap sumur sebanyak 200 μL menggunakan *buffer* ACE1 dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Setelah itu ditambahkan larutan substrat 50 μL (10 μL substrat dalam 40 μL larutan *buffer* ACE1) pada masing-masing sumur, dan diinkubasi pada suhu 37°C. Sampel diukur absorbansinya pada panjang gelombang 345 nm sebanyak dua kali pada 60 menit dan 120 menit. Dihitung *slope* dari masing-masing dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\text{Slope} = \frac{A_1 - A_2}{t_2 - t_1}$$

Keterangan

A₁: absorbansi pada waktu 1

t₂: waktu 2

A₂: absorbansi pada waktu 2

t₁: waktu 1

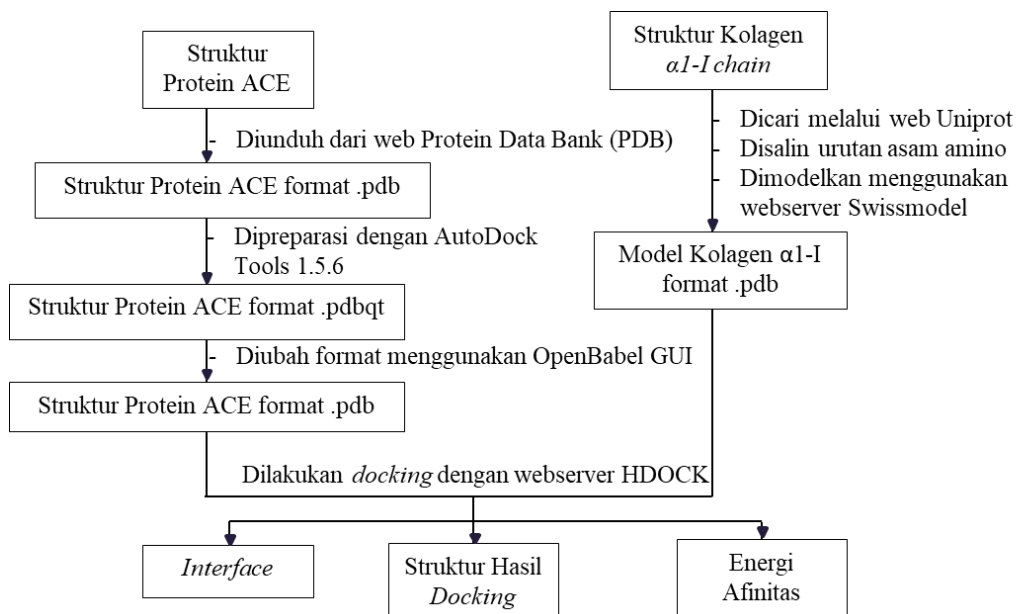
Inhibisi dari sampel dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{(\text{Slope [EC]} - \text{Slope [BC]}) - (\text{Slope [S]} - \text{Slope [BC]})}{(\text{Slope [EC]} - \text{Slope [BC]})} \times 100\%$$

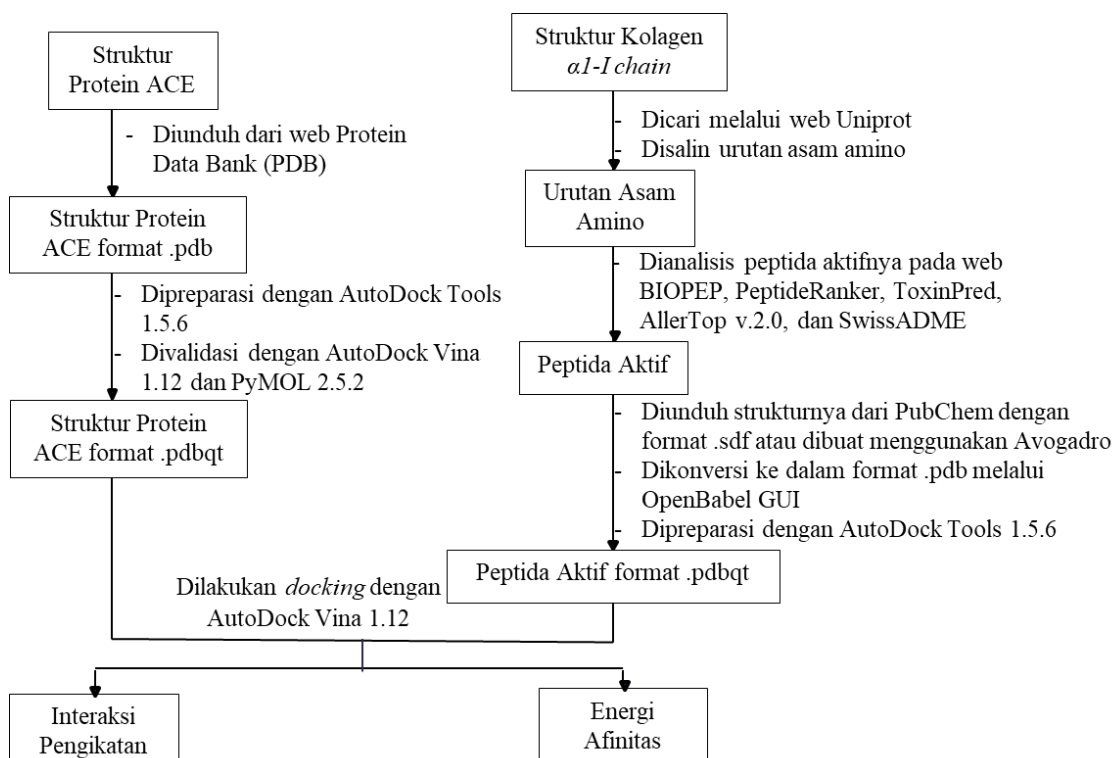
3.3.2 Studi *In Silico*

Studi *in silico* dilakukan melalui metode simulasi *molecular docking* kolagen *intact* dan peptida aktif hasil seleksi (ligan) terhadap ACE1. Tahapan umum dari studi *molecular docking* ini meliputi preparasi protein dan ligan menggunakan perangkat lunak AutoDock Tools 1.5.6 (Morris *et al.*, 2009), simulasi *docking* menggunakan HDOCK untuk kolagen *intact* dan AutoDock Vina 1.1.2 (Trott & Olson, 2010) untuk ligan, validasi hasil perhitungan *molecular docking* menggunakan PyMOL 2.5.2 (Schrödinger, L. & DeLano, W., 2020), serta visualisasi sisi pengikatan dan interaksi molekuler menggunakan PyMOL 2.5.2

(Schrödinger, L. & DeLano, W., 2020) dan BIOVIA Discovery Studio Visualizer (Dassault Systèmes BIOVIA, 2021). Tahapan penelitian *in silico* ditunjukkan pada **Gambar 3.3** dan **Gambar 3.4**.



Gambar 3. 3 Tahapan Penelitian *In Silico Molecular Docking* Protein-Protein



Gambar 3. 4 Tahapan Penelitian *In Silico Molecular Docking* Peptida

3.3.2.1 Preparasi Protein (Reseptor)

Struktur protein ACE1 (PDB: 1O86) diunduh dari basis data *Protein Data Bank* (PDB) (<https://www.rcsb.org>) (Berman *et al.*, 2000) dengan format pdb. Preparasi protein dilakukan menggunakan perangkat lunak AutoDock Tools 1.5.6 (Morris *et al.*, 2009) dengan cara menghilangkan molekul air, memisahkan ligan *native*, menambahkan atom hidrogen pada gugus polar, dan muatan parsial dengan *compute gasteiger*, lalu disimpan dalam format pdb. Penghilangan molekul air pada reseptor diperlukan karena dapat mengganggu proses *docking* dan pencarian konformasi dari ligan, sementara itu hidrogen polar ditambahkan untuk memungkinkan interaksi ikatan hidrogen antar molekul (Munawaroh *et al.*, 2020). Setelah itu, diatur *grid box* untuk sisi pengikatan antara protein dengan ligan. Pengaturan *grid box* dipusatkan pada ligan natif dengan koordinat x, y, z berturut-turut 40,935 Å; 32,383 Å; dan 47,286 Å; *spacing* 1 Å, serta dimensi 8 Å × 14 Å × 14 Å, lalu disimpan dalam bentuk txt.

3.3.2.2 Molecular Docking Protein-Protein

Perhitungan *molecular docking* antara protein ACE1 (PDB: 1O86) dengan kolagen hasil pemodelan SwissMODEL (Schwede *et al.*, 2003) dilakukan menggunakan *webservice* HDOCK (Yan *et al.*, 2017). Struktur kompleks hasil *docking* divisualisasikan pada program PyMOL 2.5.2 (Schrödinger & DeLano, 2020) dan diidentifikasi residu asam amino pada *interface*.

3.3.2.3 Preparasi Ligan

Pencarian peptida aktif kolagen kulit ikan salmon (*Salmo salar*) dilakukan menggunakan web *database* Uniprot (<https://uniprot.org/uniprot>) (Apweiler *et al.*, 2004) untuk mencari urutan asam amino pada kolagen α -II chain dengan uniprot id C0PUP9 dan web BIOPEP (<https://biochemia.uwm.edu.pl>) (Minkiewicz *et al.*, 2019) untuk proses hidrolisis secara enzimatik. Pencarian peptida aktif dilakukan menggunakan PeptideRanker (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>) (Mooney *et al.*, 2012). Peptida aktif yang memiliki nilai lebih dari 0,75 (Pearman *et al.*, 2020) analisis toksisitasnya menggunakan ToxinPred (Gupta *et al.*, 2013) (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/>), alergenisitasnya menggunakan AllerTop v.2.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>) (Dimitrov *et al.*, 2014), dan sifat absorpsi serta permeabilitasnya dengan SwissADME

(<http://www.swissadme.ch>.) (Daina *et al.*, 2017). Struktur peptida aktif diunduh dari *database* PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) (Kim *et al.*, 2016) dalam format sdf. Masing-masing struktur dikonversi ke dalam format pdb menggunakan OpenBabel GUI 2.3.1 (O'Boyle *et al.*, 2011) untuk menyesuaikan format dalam proses *molecular docking*. Ligan dipreparasi menggunakan perangkat lunak AutoDock Tools 1.5.6 (Morris *et al.*, 2009). Diatur torsi pada ligan dengan cara sebagai berikut:

- *Ligand* → *Torsion Tree* → *Choose Torsion*
- *Ligand* → *Torsion Tree* → *Set Number of Torsion*

Ligan kemudian disimpan dalam format pdbqt. dengan cara:

Ligand → *Output* → *Save as PDBQT*.

3.3.2.4 Perhitungan dan Validasi *Molecular Docking*

Protein dan ligan yang telah dipreparasi dibuatkan *file config* untuk dilakukan simulasi *molecular docking* menggunakan AutoDock Vina 1.1.2 (Trott & Olson, 2010) dengan bantuan *command prompt*. Validasi dan visualisasi hasil perhitungan dilakukan melalui perangkat lunak PyMOL 2.5.2 (Schrödinger, L. & DeLano, W., 2020). Validasi metode dilakukan dengan cara menghitung ulang protein dengan ligan natif. Hasil *docking* dapat dikatakan valid jika memenuhi nilai *root mean square deviation* (RMSD) kurang dari 2 Å (Trott & Olson, 2010).

Visualisasi struktur kompleks ligan dan protein dilakukan melalui perangkat lunak PyMOL 2.5.2 (Schrödinger, L. & DeLano, W., 2020) dan BIOVIA Discovery Studio Visualizer (Dassault Systèmes BIOVIA, 2021). PyMOL 2.5.2 (Schrödinger, L. & DeLano, W., 2020) digunakan untuk membuat kompleks ligan dengan protein, di mana protein divisualisasikan menggunakan struktur *surface* dan ligan melalui *ball and stick*. BIOVIA Discovery Studio Visualizer (Dassault Systèmes BIOVIA, 2021) digunakan untuk melihat struktur 3D dan 2D dari kompleks serta interaksi dengan residu asam amino yang terbentuk antara protein dengan ligan.