

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

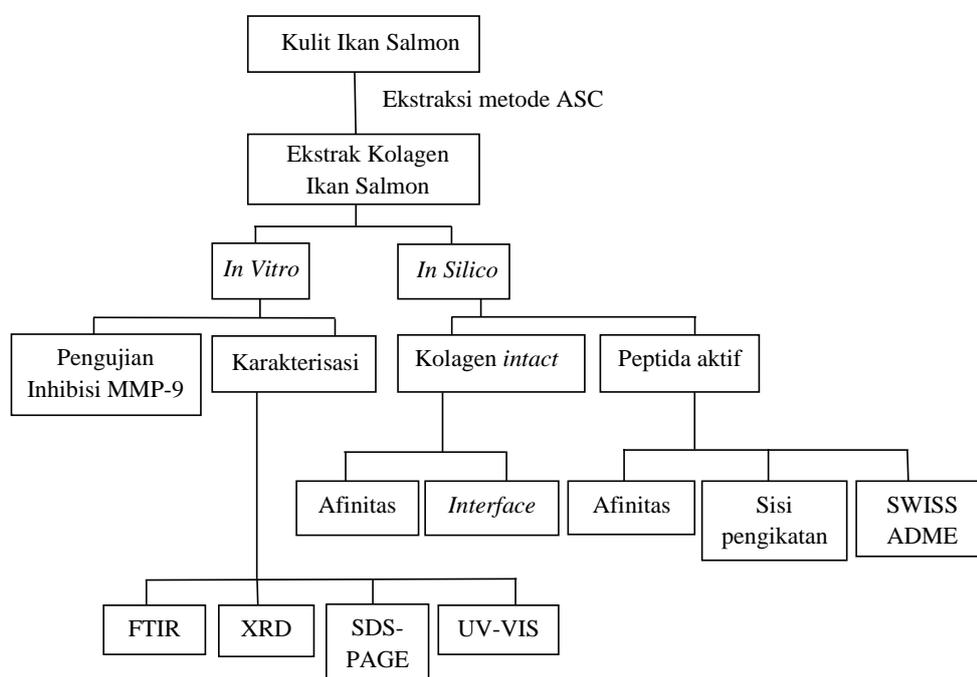
Penelitian ini dilaksanakan secara luring dan daring, yakni di Laboratorium Riset Kimia FPMIPA UPI dan tempat tinggal peneliti, yakni Kota Bandung, Provinsi Jawa Barat. Waktu penelitian berlangsung dari bulan Maret hingga Juli 2022.

3.2 Alat dan bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada pengujian *in vitro* dibutuhkan *freeze dryer*, *centrifuge*, pH meter, SDS-PAGE, instrumen UV-VIS dan FTIR, dan XRD. Sementara, alat yang digunakan dalam metode *in silico* terdiri dari aplikasi *molecular docking*, yakni BIOPEP, PeptidaRanker, OpenBabel, AutoDock Tools, PyMol, Autodock Vina, dan BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2021.

3.2.2 Bahan



Gambar 3.1. Alur Penelitian In Vitro dan In Silico

Bahan yang digunakan pada pengujian *in vitro* terdiri dari kulit ikan Salmon, aquades, NaOH 0.1 M, CH₃COOH 0.5M, NaCl 2.5M, dan larutan biuret. Sementara dalam pengujian *in silico*, bahan yang dibutuhkan terdiri dari struktur enzim, rantai

penyusun kolagen ikan salmon salar (kolagen tipe-I), struktur ligan natif (LTQ), kontrol positif inhibitor (struktur allantoin), dan peptida aktif. Pada penelitian ini, alur penelitian terbagi ke dalam dua metode besar, yakni *in vitro* dan *in silico*, seperti yang tercantum pada Gambar 3.1.

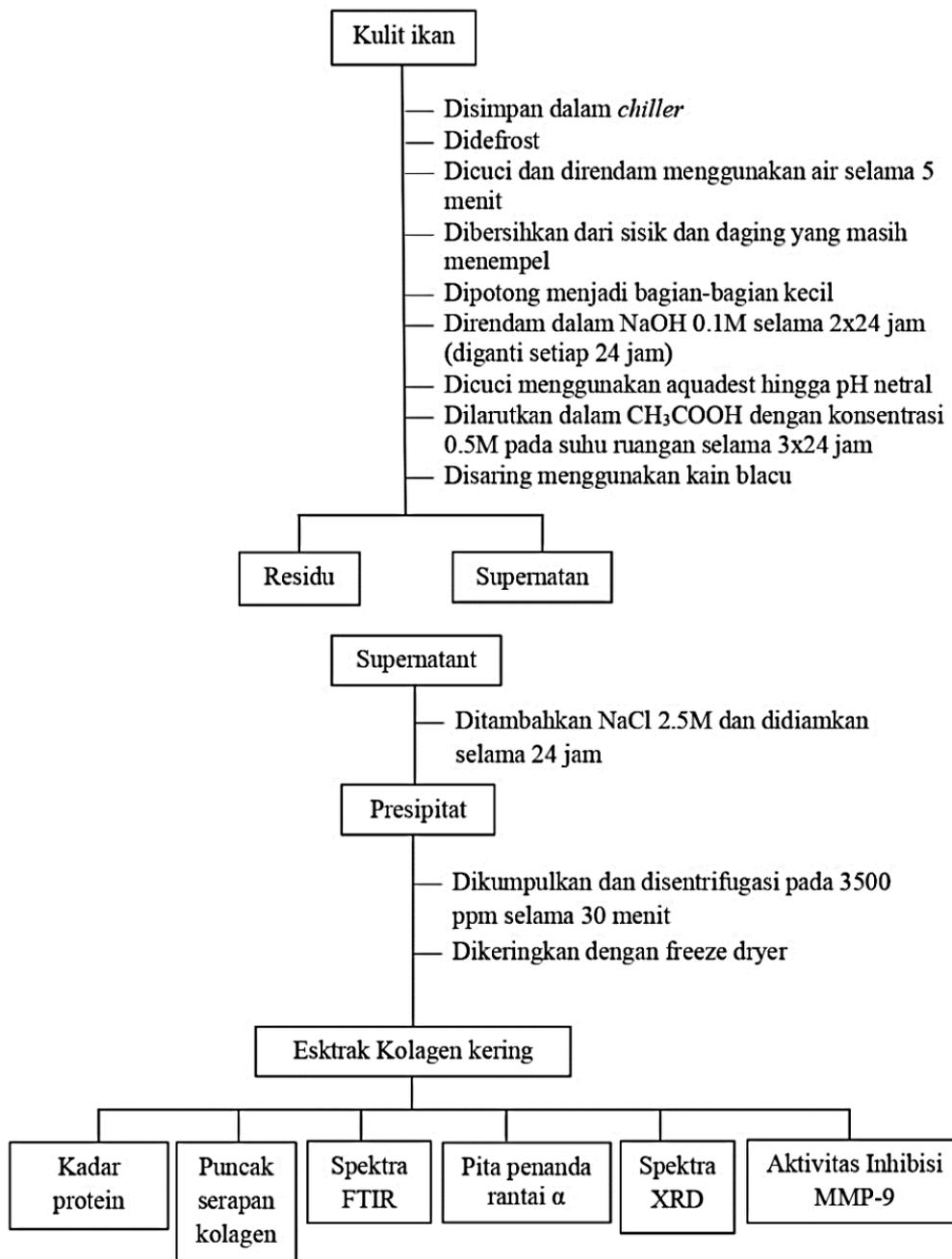
3.3 Metode *In vitro*

Prosedur pengerjaan *in vitro* yang ditunjukkan pada Gambar 3.2. meliputi ekstraksi kulit ikan salmon, dilanjutkan dengan pengeringan oleh *freeze dryer*. Ekstrak kolagen yang dihasilkan kemudian dikarakterisasi dengan FTIR, XRD, UV dan SDS-PAGE, dan diuji aktivitas inhibisi MMP-9.

3.3.1 Preparasi dan Ekstraksi Kolagen Kulit Ikan *Salmo salar*

Preparasi dan ekstraksi kolagen dilakukan berdasarkan metode Chuaychan *et al.* (2015) yang dimodifikasi. Limbah kulit ikan salmon sebanyak 1 kg didedroset setelah disimpan dalam *refrigerator*. Kemudian, kulit salmon dicuci menggunakan air mengalir dan direndam selama lima 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.

Ekstraksi kolagen dari kulit salmon kemudian dilakukan dengan metode *acids extraction* (ACS). 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. Larutan NaOH diganti dengan yang baru setiap hari dan sesekali diaduk. Selanjutnya, kulit dicuci dengan aquadest dingin hingga nilai pH netral, yakni pH 7. Kemudian, ekstraksi dilakukan dengan cara dilarutkan dalam CH₃COOH dengan konsentrasi 0.5M 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 konsentrasi 2.5M terhadap supernatant selama 24 jam untuk menghasilkan endapan. Hasil presipitasi dikumpulkan dan disentrifugasi pada 3500 rpm selama 30 menit. Jika kolagen basah telah terbentuk, maka langsung dikeringkan dengan *freeze dryer*. Ekstrak kolagen kemudian digrinder hingga berbentuk serbuk.



Gambar 3.2. Alur penelitian penentuan aktivitas inhibisi ekstrak kolagen terhadap enzim MMP-9.

3.3.2 Penentuan Kadar Protein

Kadar protein dalam ekstrak kolagen ditentukan melalui metode Biuret. Larutan ekstrak kolagen dibuat dalam konsentrasi 2000 ppm menggunakan aquades. Dalam dua tabung reaksi berbeda, dimasukkan 2 ml larutan sampel dan ditambahkan larutan biuret sebanyak 8 ml. Sampel yang diuji diinkubasi terlebih dahulu selama

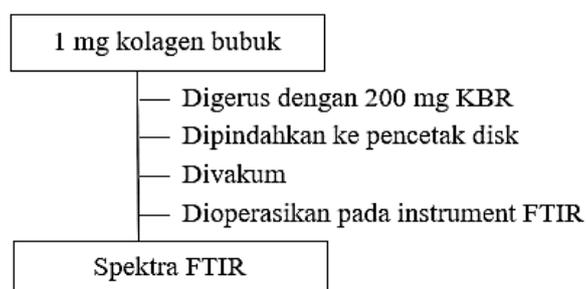
15 menit pada suhu 37°C, dan dilanjutkan dengan penentuan spektra menggunakan instrument UV VIS pada 543 nm. Blanko yang digunakan adalah 2 ml larutan sampel dan 8 ml biuret.

3.3.3 Karakterisasi UV VIS

Ekstrak kolagen dilarutkan dalam aquades untuk membuat konsentrasi sebesar 20 ppm. Penentuan peak dari ekstrak kolagen diamati menggunakan instrumen spektrofotometri UV-VIS pada 200-300 nm.

3.3.4 Karakterisasi Fourier Transform Infra Red (FTIR)

Karakterisasi FTIR dilakukan untuk menganalisis gugus-gugus fungsi pada sampel kolagen hidrolisat ikan salmon dan dilakukan berdasarkan metode Moreno *et al.* (2012) yang dimodifikasi. Sampel kolagen hidrolisat hasil *freeze-dried* sebanyak 1 mg digerus dengan 200 mg KBr dan ditempatkan pada permukaan pencetak disk dalam kondisi suhu ruang. Sampel kemudian dioperasikan pada instrument FTIR dengan panjang gelombang 4000 cm^{-1} hingga 500 cm^{-1} dan resolusi spektrum sebesar 4 cm^{-1} . Prosedur dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan dan spektra IR yang dihasilkan dapat langsung dianalisis. Gambar 3.3. menunjukkan alur pengerjaan pengujian FTIR.



Gambar 3.3. Alur karakterisasi ekstrak kolagen kulit ikan salmon dengan FTIR

3.3.5 X-ray Diffraction (XRD)

Thin-film XRD digunakan untuk mengidentifikasi jarak dan fasa dari kolagen. Ekstrak kolagen 1% sebanyak 0,5 ml ditambahkan ke dalam cover glass dan ditempatkan hingga kering dalam chiller pada suhu 4 °C. Sistem XRD dioperasikan menggunakan radiasi $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0.15418 \text{ nm}$) pada 45 kV dan 200 mA (Bak *et al.*, 2018).

3.3.6 Karakterisasi Protein dengan SDS-PAGE

Karakterisasi protein pada sampel kulit ikan salmon dianalisis dengan terlebih dahulu menyiapkan larutan denaturasi pada tabung 1,5 ml yang terdiri dari campuran lysate protein dan sample buffer dengan rasio 1:1. Kemudian, campuran dipanaskan pada suhu 95°C untuk didenaturasi dan langsung didinginkan sesaat sebelum dielektroforesis. Gel pada SDS-PAGE diatur dan dimasukkan running buffer sebanyak 1 kali hingga menutupi permukaan gel. Campuran hasil denaturasi ditambahkan menggunakan micropipete ke dalam sumur sebanyak 10-15µL. Tegangan SDS-PAGE diatur pada 80V selama 30 menit hingga sampel berada di batas bawah stacking gel. Voltase mulai dinaikkan secara perlahan hingga 150V hingga sampel mengenai dasar gel. Bahan yang digunakan dalam *staining* pita protein adalah Coomassie blue. Pencucian gel dilakukan dengan cara memindahkannya ke dalam wadah dan dicuci selama 3x5 menit menggunakan aquadest. Pewarnaan gel kemudian dilakukan menggunakan Coomassie Blue dan dilanjutkan dengan penghilangan warna dengan campuran akuades, metanol, dan asam asetat glasial. Penghilangan warna dilakukan selama semalam.

3.3.7 Uji Inhibisi Enzim MMP-9

Pengujian inhibisi ekstrak kolagen terhadap enzim MMP-9 diterapkan menggunakan MMP9 Inhibitor Screening Assay Kit Colorimetric ab139448. Bahan yang digunakan pada pengujian enzim terdiri dari substrat, inhibitor, enzim MMP-9 dan Buffer assay. Sebelum pengujian inhibitor dan substrat dihangatkan dalam suhu ruangan untuk mencairkan DMSO. Preparasi larutan dilakukan dengan 1 µL inhibitor dilarutkan dalam 200 µL buffer assay. Kemudian, pada tabung kedua 6.4 µL substrat dilarutkan dalam 153.6 µL buffer assay. Sementara untuk enzim, MMP-9 dilarutkan dengan buffer assay dengan perbandingan 1/60. Ketiga larutan tersebut sama-sama diinkubasi pada suhu 37°C. Pada microplate, dimasukkan buffer assay sebanyak 90 µL untuk blanko, 70 µL untuk kontrol, 50 µL untuk inhibitor MMP-9, dan variasi untuk sampel. Setelah microplate beserta larutan diekuilibrasikan pada suhu 37 °C, ditambahkan enzim MMP-9, inhibitor, dan inhibitor sampel seperti yang tercantum pada Tabel 3.1. Selanjutnya, dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 30-60 menit dan langsung ditambahkan 10 µL substrat MMP-9. Pembacaan dilakukan menggunakan microplate reader pada A_{412nm}.

Tabel 3.1. Komposisi bahan untuk pengujian inhibisi MMP-9 dalam microplate wells

	Buffer assay (μL)	MMP9 (μL)	Inhibitor (μL)	Substrat (μL)	Volume total (μL)
Blanko	90	0	0	10	100
Kontrol	70	20	0	10	100
Inhibitor MMP9	50	20	20	10	100
Inhibitor uji	x	20	y	10	100

Ikatan thioester pada substrat thiopeptide menggantikan ikatan peptida pada sisi pemotongan MMP-9. Melalui reaksi hidrolisis pada enzim akan menghasilkan gugus sulfhidril yang akan membentuk asam 2-nitro-5-thiobenzoat ketika bereaksi dengan DTNB (reagen Ellman, 5,50-dithiobis-asam 2-nitrobenzoat) (Yurttas *et al.*, 2021). Pembacaan microplate reader berada pada absorbansi 412 nm dikarenakan hasil reaksi antara reagen Ellman (DTNB) dan gugus sulfhidril berupa warna kuning (Jedhe & Arora, 2021).

3.4 Metode *In silico*

Metode *In silico* merupakan metode yang dilakukan untuk mengetahui interaksi molekuler, afinitas pengikatan, dan sifat inhibisi yang dimiliki kolagen kulit ikan salmon. Metode yang digunakan berdasarkan penelitian Berliana (2021). Bagan alir prosedur pengerjaan studi *in silico* tercantum pada Gambar 3.4.

3.4.1 Pengunduhan Struktur Kolagen Kulit Ikan *Salmo salar* dan Hidrolisis Enzimatik

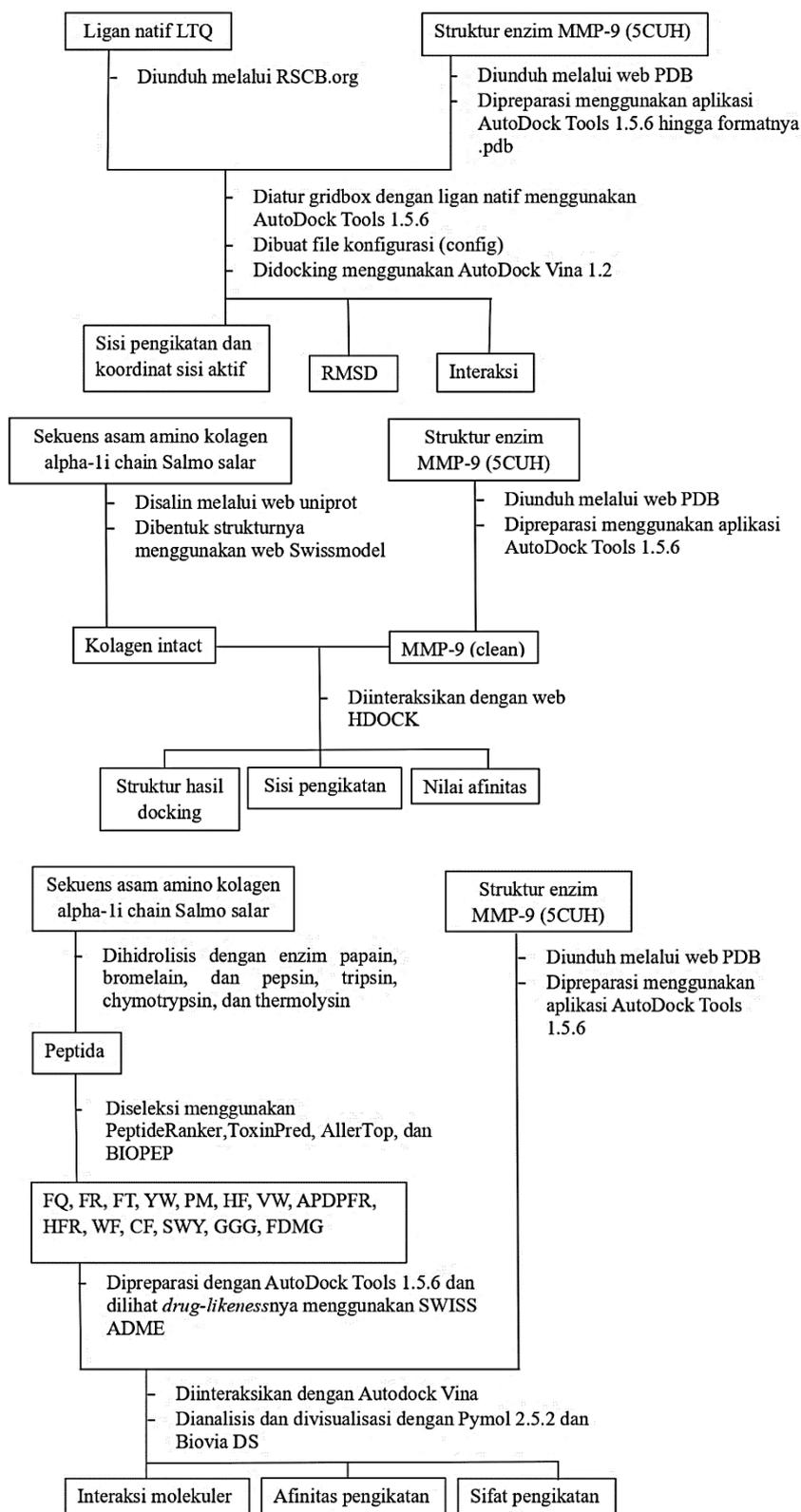
Struktur kolagen tipe-1 rantai alpha-1 diperoleh dari situs Uniprot.org. Kolagen tersebut kemudian dihidrolisis secara enzimatik menggunakan enzim papain, bromelain, chymotrypsin, termolisin, tripsin, dan pepsin. Hidrolisis dilakukan dengan cara menyalin sekuens dari struktur kolagen ke laman BIOPEP. Hasil dari reaksi hidrolisis tersebut adalah sejumlah peptida aktif.

3.4.2 Pemilihan Peptida Aktif

Peptida yang sebelumnya diperoleh dari laman BIOPEP dilanjutkan dengan seleksi melalui laman PeptidaRanker. Seleksi ini berfungsi untuk memilah peptida yang bersifat aktif. Prediksi kereaktifan suatu fragmen berada pada rentang 0 hingga 1.

3.4.3 Analisis Toksisitas dan Alerginitas

Analisis toksisitas dan alerginitas dilakukan untuk mengetahui dan mengidentifikasi peptida yang bersifat non-toksik dan non-alergen. Prediksi toksisitas peptida diperoleh dengan cara menyalin sekuens peptida ke laman ToxinPred (<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred/design.php>). Sementara, prediksi alerginitas diperoleh dengan cara menyalin sekuens ke laman AllerTop v 2.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>).



Gambar 3.4. Bagan prosedur validasi docking dan penentuan afinitas pengikatan, interaksi molekuler, dan sifat inhibisi dari kolagen intact dan peptida aktif kolagen Salmo salar terhadap enzim MMP-9

3.4.4 Sensori Peptida

Sensori peptida berfungsi untuk memprediksi rasa dari peptida aktif. Tahapan dari prediksi sensori diawali dengan membuka laman BIOPEP. Kemudian, dipilih *tab sensory peptides and amino acids*, lalu pilih *analysis*. Bagian untuk memasukkan sekuens peptida aktif terdapat pada bagian *profiles of sensory activity*.

3.4.5 Preparasi Ligan Peptida Aktif

Ligan yang digunakan untuk simulasi molecular docking berasal dari peptida aktif dan kontrol positif inhibitor. Sekuens kedua peptida yang sebelumnya bersifat non-toksik dan non-alergen diunduh dalam bentuk 3D melalui PubChem dengan format .sdf. Kemudian, digunakan aplikasi OpenBabel GUI 2.4.1. untuk mengubah format file menjadi .pdb. Selanjutnya, struktur ligan disesuaikan bentuk rotasinya menggunakan aplikasi AutoDock Tools 1.5.6.

3.4.6 Preparasi Enzim Target

Enzim target yang digunakan pada penelitian ini adalah MMP-9. Struktur dari enzim tersebut diunduh dalam format .pdb dengan kode 5CUH melalui laman Protein Data Bank (PDB). Preparasi enzim dilakukan dengan menghapus molekul yang tidak dibutuhkan atau dapat mengganggu selama simulasi docking. Hasil preparasi menggunakan Autodock Tools 1.5.6 adalah rantai enzim yang murni. Selanjutnya, rantai enzim ditentukan muatannya setelah ditambahkan molekul hidrogen polar, dan disimpan dalam format .pdbqt.

3.4.7 Validasi dan Simulasi Molecular Docking

Validasi metode docking dilakukan untuk memeriksa dan memverifikasi kebenaran dari simulasi dengan cara me-redocking ligan dengan sisi aktif enzim target. Proses validasi diawali dengan pengaturan grid box yang disesuaikan dengan ukuran ligan natif. Grid box dibuat dengan memilih tab *grid>grid box>center on ligand*. Jarak yang dipakai pada ukuran x, y, dan z adalah 1 Å. File kemudian disimpan dalam format grid.txt ketika ukuran grid box sudah sesuai. Caranya adalah dengan memilih tab *file* kemudian pilih *output grid dimension file*. Aplikasi PyMOL kemudian digunakan untuk mencari nilai RMSD dari simulasi ligan. Metode dianggap valid jika nilai RMSD tidak lebih dari 2. Grid box yang diperoleh memiliki nilai sebesar 0.704, sehingga metode dianggap valid. Grid box dari validasi docking ditunjukkan pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2 Grid box untuk simulasi docking

No.	Ligan natif	Koordinat (Å)			Ukuran (Å)			RMSD (Å)
		X	Y	Z	X	Y	Z	
1.	LTQ	49.939	20.824	12.710	8	14	16	0.704

Setelah dilakukan validasi, dilanjutkan dengan simulasi docking menggunakan aplikasi Autodock Vina 1.1.2. Dalam menjalankan simulasi docking, dibutuhkan data protein dan ligan dalam bentuk .pdbqt dan ukuran grid ligan natif dalam file dengan format conf.txt. Melalui simulasi ini akan dihasilkan sepuluh pose ligan yang memiliki afinitas ikatan (*kcal/mol*) berbeda dan kemudian disimpan sebagai file .pdbqt.

3.4.8 Analisis Interaksi Molekuler dan Afinitas Pengikatan Kolagen Dengan Enzim MMP-9

Struktur kolagen diunduh secara bersamaan dengan struktur enzim MMP-9 yang telah dipreparasi ke laman HDOCK. Struktur dibentuk dengan cara menyalin sekuens asam amino dari kolagen *Salmo salar* ke web swissmodel.expasy. Sisi pengikatan, nilai afinitas, dan residu asam amino yang terlibat didapatkan beberapa menit setelah pengunduhan.

3.4.9 Analisis Interaksi Molekuler dan Afinitas Pengikatan Peptida Aktif dengan Enzim MMP-9

Melalui perangkat lunak Biovia Discovery Studio Visualizer 2021, interaksi molekuler antara ligan dengan enzim MMP-9 dapat diketahui. Hasil visualisasi dari interaksi diamati dalam bentuk 2D dan 3D. Kompleks ligan-enzim target dengan afinitas terbaik pun dipilih.

3.4.10 Analisis Sifat Inhibisi Peptida Aktif dengan Enzim MMP-9

Visualisasi dari pengikatan antara peptida aktif dengan pembandingnya terhadap enzim target juga dapat diamati menggunakan Biovia Discovery Studio Visualizer 2021. Dari persamaan pengikatan antara sampel dengan pembanding terhadap enzim target, maka sifat inhibisi peptida aktif dapat diketahui. Selain itu, dibandingkan pula residu yang terikat diantara peptida aktif dan enzim target dengan residu kontak ligan natif.