

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara maritim tropis yang kaya akan keanekaragaman organisme laut, termasuk alga merah *Eucheuma spinosum*, sumber karagenan dan komponen bioaktif lainnya yang bernilai tinggi secara ekonomi dan farmasi. Alga merah ini banyak dibudidayakan di Kawasan pesisir Indonesia untuk industri makanan, kosmetik dan farmasi karena kandungan fitokimianya seperti flavonoid, alkaloid, saponin dan steroid yang menunjukkan aktivitas antioksidan dan antibakteri dalam berbagai penelitian laboratorium modern (Santosa et al. 2025). Namun, fokus penelitian terhadap potensi bioaktif alga *E. spinosum* masih dominan pada ekstrak tumbuhan itu sendiri, sedangkan eksplorasi mikroorganisme yang hidup bersimbiosis atau epifit pada permukaan alga, khususnya produksi protein dan peptida bioaktif dari bakteri tersebut masih sangat terbatas dalam penelitian ilmiah terbaru terutama mengenai aktivitas antiviral dengue. Studi tentang bakteri epifit yang melekat pada permukaan alga menunjukkan bahwa komunitas bakteri epifit merupakan reservoir metabolit sekunder yang potensial sebagai agent antimikroba dan menunjang mekanisme pertahanan alga terhadap mikroba patogen (Allam et al. 2025).

Protein dan peptida dari organisme laut telah menjadi fokus riset bioaktif karena dapat menunjukkan berbagai efek fisiologis termasuk antioksidan, antiinflamasi, antihipertensi, antikanker, antibakteri dan aktivitas antimikroba pada berbagai model *in vitro* dan *in vivo*, menunjukkan bahwa sumber laut adalah sumber berkelanjutan untuk penemuan molekul terapeutik baru (Leong & Chang, 2024; Alboofetileh et al. 2021). Studi tentang protein dan peptida bioaktif dari bakteri yang berasosiasi dengan alga menunjukkan potensi luar biasa untuk aplikasi farmasi, namun penelitian belum banyak dilakukan terutama berkaitan dengan virus dengue. Padahal Indonesia merupakan salah satu negara dengan beban tinggi penyakit dengue yang terus meningkat setiap tahunnya, membutuhkan sumber antimikroba alternatif yang efektif, aman dan berbiaya rendah. Sementara penelitian yang ada kebanyakan membahas mengenai ekstrak alga secara langsung dan dampaknya terhadap bakteri atau aktivitas antioksidan, sangat sedikit yang mengevaluasi peptida dari bakteri epifit yang hidup bersimbiosis dengan *E. spinosum* sebagai sumber anti-dengue atau modulasi respon imun (Santosa et al. 2025).

Dengue merupakan penyakit tertular yang disebabkan oleh infeksi virus dengue (DENV) dan ditularkan oleh nyamuk *Aedes aegypti* serta *Aedes albopictus*. Penyakit ini bukan hanya menjadi masalah di Indonesia tetapi juga merupakan masalah kesehatan bagi masyarakat global. Diperkirakan sekitar 390 juta infeksi dengue terjadi setiap tahun, dimana 96 juta diantaranya manifestasi secara klinis. Sebelum tahun 1970, hanya sembilan negara yang mengalami epidemi demam berdarah. Namun saat ini, demam berdarah endemik di lebih dari 100 negara terutama di

negara tropis dan sub-tropis seperti Indonesia. Jumlah kasus DBD dilaporkan meningkat dari 2,4 juta kasus pada tahun 2015 menjadi 4,5 juta kasus pada tahun 2022 sehingga diperlukan usaha maksimal dan berkelanjutan dalam menangani masalah DBD (Dengue, 2022).

Penelitian epidemiologi menunjukkan bahwa dengue tetap endemic di banyak wilayah Indonesia, dengan prevalensi tinggi dan sirkulasi berbagai serotipe virus yang menyulitkan upaya pengendalian serta pencegahan penyakit ini. Ada empat serotipe virus dengue, DENV-1–4 yang secara genetis dan antigenik berbeda, meskipun masing-masing serotipe memunculkan kisaran manifestasi penyakit yang serupa selama periode infeksi (Khan et al. 2023; Utama et al. 2019). Hingga saat ini belum ada terapi antiviral spesifik yang benar-benar efektif untuk DENV di pasar klinis dan sebagian besar penanganan hanya bersifat suportif untuk meringankan gejala serta mencegah komplikasi serius (Jiang et al. 2025). Keterbatasan terapi tersebut mendorong pencarian agen antiviral baru dari sumber alami yang memiliki aktivitas poten terhadap DENV dengan toksisitas minimal. Di antara kandidat sumber alam, organisme laut termasuk alga, mikroalga dan mikroba laut telah menjadi fokus penelitian karena diperkaya dengan senyawa bioaktif yang dapat memodulasi mekanisme biologis yang relevan dengan infeksi viral (Gbadebo & Oke. 2025).

Marine algae sendiri telah menjadi fokus penelitian dunia karena kaya akan senyawa bioaktif yang juga menunjukkan potensi aktivitas antiviral. Misalnya, *sulphated polysaccharides* dari alga merah seperti karagenan telah dilaporkan memiliki aktivitas antiviral terhadap berbagai virus, menunjukkan bahwa metabolit yang diproduksi oleh alga dapat menghambat replikasi virus melalui berbagai mekanisme. Lebih lanjut, penelitian pada mikroalga menunjukkan bahwa peptida hasil hidrolisis protein alga dapat menunjukkan aktivitas antiviral terhadap dengue virus, yang menguatkan gagasan bahwa protein dan peptida bioaktif dari sumber laut merupakan kandidat terapeutik yang menjanjikan (Kumar et al. 2025; Lee et al. 2023). Besarnya potensi biota laut Indonesia membuat para ilmuwan dan produsen senyawa bioaktif dunia mulai melirik laut sebagai sumber bahan baku obat dan *nutraceutical* yang potensial. Alga merupakan salah satu sumber daya alam laut yang paling potensial di Indonesia (Ahmad et al. 2017). Alga merah (*Rhodophyta*) merupakan kelompok makroalga laut yang kaya akan metabolit sekunder seperti polisakarida, flavonoid, terpenoid dan protein beragam. Spesies *Euclima spinosum* terutama dikenal karena nilai ekonominya dalam industri pangan dan karagenan, namun penelitian juga menunjukkan bahwa alga spesies ini mengandung komponen bioaktif dengan aktivitas biologis lain seperti antioksidan dan antibakteri. Ekstrak *E. spinosum* telah diuji dan menunjukkan aktivitas antioksidan kuat berdasarkan uji radikal bebas DPPH, menunjukkan bahwa *E. spinosum* memiliki komponen yang berpotensi dikembangkan sebagai agen terapeutik atau nutraceutik (Damongilala et al. 2021). Meskipun demikian, pemanfaatan *E. spinosum* masih

terbatas pada uji aktivitas antibakteri dan antioksidan – belum banyak dieksplorasi untuk aktivitas antiviral, apalagi terhadap virus penting seperti DENV.

Alga laut tidak hidup sendirian di ekosistem laut, permukaan dan jaringan alga sering menjadi habitat bagi komunitas mikroorganisme termasuk bakteri epifit dan simbiosis yang hidup melekat pada alga. Bakteri-bakteri ini dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang beragam sebagai hasil coevolusi dengan hospesnya dan banyak di antaranya memiliki aktivitas biologis yang menarik untuk penelitian farmasetik. Karena alga menyediakan lingkungan nutrisi dan tempat hidup, bakterinya sering menghasilkan protein dan senyawa bioaktif untuk bertahan hidup yang jauh lebih kompleks dibandingkan yang dihasilkan alga saja, karena mereka dapat menghasilkan metabolit seperti steroid, terpenoid dan peptida yang memiliki aktivitas biologis potensial (Asmi. 2021; Pratiwy et al. 2022).

Kandungan protein antar spesies alga bervariasi. Alga mengandung 5-15%, sedangkan alga merah mengandung protein yang lebih tinggi yaitu 10-47% dari berat kering. Beberapa jenis alga dilaporkan mengandung senyawa antiviral, anti tumor dan imunomodulator (Pradhan et al. 2022; Gonzalez-Ballesteros et al. 2022). Penelitian lain telah melakukan isolasi protein dari bakteri simbiosis *Cobetia marina* yang ditemukan pada *E. spinosum* dengan menunjukkan bahwa protein tersebut memiliki aktivitas antibakteri dan potensi antiviral terhadap dengue dalam uji *in vitro*. Hal ini memicu minat lebih lanjut pada bakteri epifit alga sebagai sumber potensial agen antiviral baru melalui produksi protein dan peptida bioaktif (Karim et al. 2024).

Sejauh ini belum banyak data penelitian yang mengeksplorasi kelompok senyawa protein dan peptida bioaktif dari simbiosis alga sebagai bahan baku antiviral. Alga diketahui merupakan salah satu eukariota laut yang kaya akan bakteri simbiosis (Chakraborty et al. 2017). Eksplorasi senyawa bioaktif dari bakteri simbiosis menjadi pilihan yang menarik perhatian para peneliti, karena dapat menghindari eksploitasi yang berlebihan terhadap alga laut dan tidak berkompetisi dengan industri pengolahan pangan (Bibi et al. 2023). Dari beberapa hasil penelitian sebelumnya diketahui bakteri simbiosis alga laut mengandung ribuan senyawa kimia yang berpotensi sebagai obat-obatan dengan karakteristik dan keunikan sifat dan fungsi fisiologis yang lebih beragam dibandingkan dengan alga laut (Ahmad et al. 2021; Chukwudulue et al. 2023; Ahmad et al. 2019).

Oleh karena itu, penelitian ini sangat penting dilakukan karena menjembatani pengetahuan antara potensi bioaktif alga laut dan mikroorganisme simbiosisnya dengan kebutuhan akan terapi antiviral dengue yang efektif. Produksi dan karakterisasi protein serta peptida bioaktif dari bakteri epifit alga ini dapat membuka wawasan baru dalam penemuan kandidat antiviral, khususnya untuk penyakit yang berdampak besar di Indonesia. Penelitian ini diharapkan dapat memperkaya basis pengetahuan ilmiah tentang sumber-sumber alami antiviral serta memberikan kontribusi terhadap pengembangan Solusi terapeutik baru berbasis sumber daya laut Indonesia yang berkelanjutan.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan Masalah dari penelitian ini, yaitu sebagai berikut:

1. Bagaimana mengisolasi dari bakteri epifit simbion alga laut *E. spinosum* yang berpotensi sebagai *agent's antiviral dengue*, antioksidan dan antiinflamasi?
2. Bagaimana permurnian protein dan peptida bioaktif yang dihasilkan memiliki potensi sebagai *agent's antiviral dengue*, antioksidan dan antiinflamasi?
3. Bagaimana menghidrolisis protein bakteri epifit simbion alga laut menjadi peptida bioaktif sebagai *agent's antiviral dengue*, antioksidan dan antiinflamasi?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk :

1. Memperoleh isolat bakteri epifit simbion alga laut *E. spinosum* yang berpotensi menghasilkan peptida yang berpotensi sebagai *agent's antiviral dengue*, antioksidan dan antiinflamasi
2. Memperoleh protein murni dari bakteri epifit simbion alga laut *E. spinosum* yang berpotensi sebagai *agent's antiviral dengue*, antioksidan dan antiinflamasi
3. Memperoleh hasil hidrolisis protein bakteri epifit simbion alga laut *E. spinosum* menjadi peptida bioaktif sebagai *agent's antiviral dengue*, antioksidan dan antiinflamasi

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian adalah memberikan informasi mengenai bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum*, khususnya terkait isolasi bakteri epifit alga laut yang berpotensi menghasilkan peptida yang memiliki sifat sebagai *agent's antiviral dengue*, antioksidan dan antiinflamasi. Penelitian ini juga dapat memperluas wawasan mengenai potensi mikroba laut sebagai sumber bioaktif alami yang dapat dimanfaatkan untuk kepentingan kesehatan dan bioteknologi.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum*, media *Nutrient Agar* (NA), media *Nutrient Agar* (NA), *Bovine Serum Albumin* (BSA), serbuk DPPH (2,2-Difenil-2-Pikrilhidrazil), Tris (hidroksimetil) amino metana, asam trikloroasetat (TCA) 20%, HCl (Merck), NaCl (merck), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (merck), β -merkaptotetanol (merck), $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$ (merck), metanol p.a, folin ciocalteu, Na_2CO_3 (merck), NaOH (merck), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (merck), Natrium K-tartrat, CuSO_4 , CaCl_2 , telur *Artemia Salina Leach*, air laut steril, buffer A, buffer B, buffer C, Lowry A, Lowry B, enzim pepsin, akuades, alcohol, kertas saring, kapas, kasa, tali, spirtus, es batu, natrium diklofenak 50 mg, CH_3COOH 0,1%, *Triss buffer*, asam asetat glasial, pH meter, label, *tissue roll*, plastik wrap, plastik tahan panas, kertas saring, sabun dan aluminium foil.

2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik (Ohaus), hotplate stirrer (Fisher), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), Refrigerated Centrifuge (Beckman–Coulter), mikropipet P1000 (DLAB), tip mikropipet, shaker waterbath (Daihan Scientific), inkubator (Memmert), autoclave (All American), membran MWCO (Vivaspin), vortex (Trias Nathomi Chemindo), seperangkat alat BSLT, cawan petri (Pyrex) dan berbagai peralatan gelas lainnya.

2.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli 2025 hingga Desember 2025 di Laboratorium Biokimia Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Laboratorium Bioteknologi Terpadu Fakultas Peternakan, Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian, Science Building Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin dan Pusat Penelitian Penyakit Tropis Universitas Airlangga Surabaya, Jawa Timur.

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Pembuatan Media

Pembuatan Media Nutrient Agar (NA). Media *Nutrient Agar* (NA) dibuat dengan menimbang media sebanyak 1 g, kemudian dimasukkan dan dilarutkan dalam 50 mL akuades yang sebelumnya telah disterilisasi dengan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Selanjutnya media NA ditunggu hingga dingin, sehingga dapat dituang secara aseptis pada cawan petri yang sudah steril sebanyak ± 20 mL. dibiarkan dingin dan memadat (Girsang et al., 2025).

Pembuatan Media Nutrient Broth (NB). Media *Nutrient Broth* (NB) dibuat dengan menimbang media NB sebanyak 8 g, dimasukkan kedalam erlenmeyer 1000 mL.

kemudian media disterilkan dengan cara di *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C (Kulla et al., 2023).

Pembuatan Media Inokulum. Sebanyak 4 g media *Nutrient Broth* (NB) dilarutkan dalam 500 mL akuades. Disterilisasi dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C. Diambil 1-2 koloni bakteri yang telah ditumbuhkan pada media *Nutrient Agar* (NA) yang telah memadat menggunakan jarum ose steril. Selanjutnya koloni bakteri dimasukkan ke dalam media cair yang telah disterilisasi. Kemudian bakteri pada media cair diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C serta di shaker dengan kecepatan 150 rpm (Kulla et al., 2023; Herawati et al., 2024).

Pembuatan Media Produksi. Media Inokulum diambil sebanyak 10% ditambahkan pada medium kultur bakteri baru. Tahap berikutnya erlenmeyer yang telah berisikan medium produksi dan starter diinkubasi selama waktu optimum yaitu 42 jam menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm (Agustina et al., 2025; Kulla et al., 2023; Herawati et al., 2024).

2.4.2 Pembuatan Buffer

Pembuatan Buffer A (Buffer Lisis). Tris (hidroksimetil) aminometana sebanyak 6,05 g dilarutkan dengan akuades sampai 125 mL. Kemudian ditambahkan HCl 2 M sedikit demi sedikit sambil diatur pH-nya hingga mencapai pH 8,3. Selanjutnya ditambahkan NaCl sebanyak 58,5 g dan 0,555 g CaCl₂, 5 mL β-mercaptoetanol dan 2,5 mL triton X-100 kemudian dicukupkan volumenya sampai 500 mL dengan akuades (Karim et al., 2019).

Pembuatan Buffer B. Tris (hidroksimetil) aminometana sebanyak 6,05 g dilarutkan dengan akuades sampai 125 mL. Kemudian ditambahkan HCl 0,2 M sedikit demi sedikit sambil diatur pH-nya hingga mencapai pH 8,3. Selanjutnya ditambahkan NaCl sebanyak 5,85 g dan 0,555 g CaCl₂, kemudian dicukupkan volumenya sampai 500 mL dengan akuades (Karim et al., 2019).

Pembuatan Buffer C. Tris (hidroksimetil) aminometana sebanyak 6,05 g dilarutkan dengan akuades sampai 125 mL. Kemudian ditambahkan HCl 0,2 M sedikit demi sedikit sambil diatur pH-nya hingga mencapai pH 8,3. Selanjutnya ditambahkan NaCl sebanyak 5,85 g dan 0,555 g CaCl₂, kemudian dicukupkan volumenya sampai 500 mL dengan akuades (Karim et al., 2019).

2.4.3 Peremajaan Isolat Bakteri Simbion Alga Merah

Isolat murni 1-2 ose diinokulasikan ke dalam 500 mL medium *Nutrient Broth* (NB) yang telah disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit dan diinkubasi dalam *shaker incubator* selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian, dituang pada cawan petri steril berisi media *Nutrient Agar* (NA) yang telah memadat, lalu di inkubasi selama 2×24 jam pada suhu 37°C. Isolat yang telah dikondisikan pada suhu ruang kemudian diinokulasi kembali dalam media

Nutrient Agar (NA) baru dengan jarum ose steril. Hasil inokulasi kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2×24 jam (Sukiman et al., 2025; Sirri et al., 2019).

2.4.4 Penentuan Waktu Optimum Bakteri Simbion Alga Merah *Eucheuma spinosum*

Optimasi pertumbuhan dan produksi optimum isolat bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum* dilakukan dengan memindahkan kultur murni dari media NA yang telah diremajakan sebanyak 2-3 ose ke dalam 250 mL media inokulum steril dalam erlenmeyer, lalu diinkubasi dalam shaker incubator pada suhu 37°C dan kecepatan 150 rpm selama 24 jam. Sebanyak 10% inokulum aktif kemudian diinokulasikan ke dalam 500 mL media produksi steril (NB) dan diinkubasi kembali dalam shaker incubator pada suhu 37°C dan kecepatan 150 rpm selama ±3 hari. Pengambilan sampel dilakukan setiap 6 jam selama 72 jam untuk memantau pertumbuhan bakteri melalui pengukuran Optical Density (OD) pada panjang gelombang 660 nm (Mardiana, 2019; Asmi, 2021).

2.4.5 Produksi Protein dari Isolat Bakteri Simbion Alga Merah *Eucheuma spinosum*

Isolat bakteri hasil peremajaan diambil 2-3 ose, dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi media inokulum steril, lalu diinkubasi dalam shaker incubator dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya, diinokulasikan kultur bakteri sebanyak 10% ke dalam 1500 mL media produksi steril, kemudian dikocok dalam shaker incubator pada kecepatan 150 rpm dan suhu 37°C selama waktu produksi optimum. Setelah itu, media produksi yang mengandung kultur dipisahkan dengan disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm dan suhu 4°C selama 30 menit. Filtrat yang merupakan ekstrak kasar protein ekstraseluler dan endapan yang merupakan protein intraseluler dipisahkan, kemudian protein intraseluler ditambahkan buffer A, lalu disimpan di dalam lemari es (Asmi, 2021).

2.4.6 Fraksinasi Protein Bioaktif dari Bakteri Epifit Simbion Alga Merah *Eucheuma spinosum*

Filtrat dan endapan yang diperoleh ditambahkan ammonium sulfat secara bertahap sesuai dengan tingkat kejenuhan, kemudian dидiamkan selama 24 jam dalam lemari es, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit. Filtrat dan endapan yang diperoleh dari setiap sentrifugasi tersebut dipisahkan, kemudian endapan dilarutkan kembali dalam buffer B hingga larut. Langkah-langkah tersebut dilakukan untuk ammonium sulfat dengan kejenuhan (F1) 0-20%; (F2) 20-40%; (F3) 40-60% dan (F4) 60-80%. Adapun fraksi yang telah dilarutkan tersebut disimpan dalam lemari es yang selanjutnya akan di dialisis dan diuji kadar proteinnya (Rohmah et al., 2019).

2.4.7 Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Penentuan Larutan Standar. Kadar protein dari hasil pemurnian ditentukan berdasarkan metode lowry. Kadar protein dalam sampel selama pemurnian

ditentukan dengan cara membuat larutan induk protein Bovine Serum *Albumine* (BSA) dengan konsentrasi 1 mg/mL. Kemudian membuat larutan standar protein Bovine Serum *Albumine* (BSA) dengan berbagai tingkat konsentrasi yaitu 0,02 mg/mL; 0,04 mg/mL; 0,08 mg/mL; 0,16 mg/mL dan 0,32 mg/mL dimasukkan ke dalam deret tabung reaksi dan dicukupkan volumenya hingga 2 mL. Kemudian ditambahkan 2,75 mL reagen lowry B dan dicampur merata dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Selanjutnya, ditambahkan 0,25 mL reagen lowry A, dikocok merata dengan cepat dan didiamkan selama 15 menit sampai warna biru terbentuk. Diukur absorbannya pada panjang gelombang maksimal dan didiamkan kurva standarnya untuk mendapatkan persamaan standar.

Penentuan Kadar Protein pada Sampel. Sampel protein sebanyak 2 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan ke dalam masing-masing tabung sebanyak 2,75 mL reagen lowry B dan disimpan selama 30 menit pada suhu kamar. Kemudian 0,25 mL reagen lowry A ditambahkan, kemudian dihomogenkan dan disimpan selama 15 menit pada suhu ruang. Kemudian dibaca absorbansi pada panjang gelombang 743 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Rohmah et al., 2019; Sefrienda et al., 2022). Perhitungan kadar protein enzim dilakukan dengan mensubstitusikan nilai absorbansi larutan yang diperoleh dari hasil pengukuran spektrometri ke dalam persamaan kurva regresi larutan standar protein. Kadar protein dihitung menggunakan persamaan (1) dan (2).

$$y = ax + b \quad (1)$$

$$x = \frac{y - b}{a} \text{ fp} \quad (2)$$

Keterangan :

a = slope

b = intersept

y = absorbansi

x = kadar protein (mg/mL)

fp = faktor pengenceran

2.4.8 Dialisis Pemurnian Hasil Fraksinasi Protein Bioaktif dari Bakteri Epifit Simbion Alga Merah *Eucheuma spinosum*

Endapan yang diperoleh dari hasil pengendapan menggunakan garam (ammonium sulfat) dimurnikan melalui proses dialisis. Dipindahkan larutan protein hasil fraksinasi ke dalam membran selofan, dipastikan membran tersebut tidak bocor. Kemudian gelas kimia diisi buffer C dan dimasukkan membran berisi fraksi protein kedalamnya dengan digantung menggunakan benang, kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama ± 10 jam. Buffer C diganti setiap 2 jam, kemudian buffer C yang diganti diuji dengan $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ untuk mengetahui apakah masih terdapat garam. Dialisis dihentikan bisa dialisat sudah tidak mengandung garam yang ditandai dengan tidak terbentuknya endapan warna putih. Selanjutnya, fraksi hasil dialisis dilakukan pengukuran kadar protein (Warsidah et al., 2023).

2.4.9 Hidrolisis Protein

Ekstrak protein hasil pemurnian dihidrolisis dengan enzim pepsin. Hidrolisis dilakukan pada berbagai variasi waktu (30; 60; 90; 120; 150; 180 menit) dengan perbandingan enzim : substrat yaitu 3 : 100 pada suhu 37°C untuk menentukan kondisi optimum pada pembuatan hidrolisis protein, kemudian diinaktifkan dengan pemanasan dalam air mendidih selama 10 menit dan disentrifugasi pada 10.000 rpm, suhu 4°C selama 20 menit. Hidrolisat protein ditentukan derajat hidrolisisnya (DH) lalu disimpan pada suhu -20°C sebelum digunakan (Ahmad et al., 2021). Hidrolisat yang diperoleh disimpan di freezer untuk selanjutnya di ultrafiltrasi menggunakan membran *cut off* 10 kDa; 5 kDa; 3 kDa dan dilakukan uji toksisitas, aktivitas antioksidan, aktivitas antiinflamasi dan anti dengue (Kusumaningtyas et al., 2015; Yana dan Permatasari, 2022). Derajat hidrolisis (DH) dapat ditentukan dengan menghitung persentase protein dalam TCA 20% dibagi dengan protein terlarut dengan menggunakan rumus pada persamaan (3).

$$\text{Derajat Hidrolisis (\%)} = \frac{\text{Protein terlarut TCA 20\%}}{\text{Protein Total}} \times 100\% \quad (3)$$

2.4.10 Cut Off Peptida dengan Membran MWCO.

Membran *cut off* dibilas dengan buffer C sebanyak 3 kali untuk memastikan bahwa tidak ada kontaminan atau sisa-sisa bahan sebelumnya, dengan masing-masing bilasan dilakukan selama 10 menit. Setelah itu, proses sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 5.500 rpm pada suhu 15°C. Bilasan kedua dan ketiga dilakukan dengan waktu 5 menit dan pada suhu serta kecepatan yang sama dengan bilasan pertama. Hidrolisat protein yang diperoleh selanjutnya diultrafiltrasi menggunakan membran MWCO berdasarkan berat molekul. Hidrolisat yang telah melalui proses hidrolisis kemudian disentrifugasi menggunakan membran *cut off* dengan berbagai ukuran yaitu 10 kDa, 5 kDa dan 3 kDa pada kecepatan 5.500 rpm selama 20 menit pada suhu 15°C. Penyaringan dilakukan secara bertahap, dimulai dengan menggunakan membran *cut off* 10 kDa untuk memisahkan peptida yang memiliki ukuran lebih besar dari 10 kDa. Selanjutnya, dilakukan penyaringan dengan memberan *cut off* 5 kDa, untuk memisahkan peptida yang berada pada rentang 10-5 kDa. Terakhir dilakukan penyaringan dengan membran *cut off* 3 kDa untuk memisahkan peptida yang berukuran 5-3 kDa dan peptida yang lebih kecil dari 3 kDa. Proses ini menghasilkan empat fraksi peptida yang berbeda, yaitu peptida yang berukuran >10 kDa, 10-5 kDa, 5-3 kDa dan <3kDa. Masing-masing fraksi dipisahkan dalam botol yang berbeda untuk pengujian lebih lanjut. Selanjutnya, hasil dari proses *cut off* ini diuji untuk menilai tingkat toksisitas, aktivitas antioksidan dan aktivitas antiinflamasinya (Lestari dan Giordan, 2020; Lestari et al., 2020; Ahmad et al., 2021).

2.4.11 Penentuan Aktivitas Antioksidan Fraksi Peptida dengan Metode DPPH

Pembuatan Larutan DPPH 0,4 Mm. Ditimbang sebanyak 0,015 g DPPH dan dimasukkan ke dalam labu ukura 100 mL, kemudian dilarutkan menggunakan pelarut metanol dan ditepatkan volumenya hingga tanda batas. Selanjutnya ukur panjang gelombang maksimum DPPH pada panjang gelombang maksimum 515 nm (Purwanto et al., 2017).

Pembuatan Larutan Induk Asam Askorbat 500 ppm. Larutan stok asam askorbat 500 ppm 0,1 mL kemudian ditambahkan metanol p.a sebanyak 9,9 mL sehingga didapatkan larutan asam askorbat konsentrasi 5 ppm dengan volume total 10 mL, kemudian dibuat deret standar dengan konsentrasi 5 ppm masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL dan 4 mL ke dalam tabung reaksi yang berbeda untuk membuat deret standar 0,25 ppm; 0,5 ppm; 1 ppm; 2 ppm dan 4 ppm dengan penambahan 1 mL larutan DPPH 0,4 mM dan dicukupkan dengan metanol p.a masing-masing 3,75 mL; 3,5 mL; 3 mL; 2 mL dan 0 mL hingga 5 mL untuk masing-masing deret standar. Pengukuran dilakukan dengan cara menginkubasi deret standar asam askorbat dalam ruangan gelap selama 30 menit. Deret standar kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Selanjutnya, masing-masing larutan asam askorbat dengan konsentrasi yang berbeda tersebut diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum (Maesaroh et al., 2018; Suryanita et al., 2019).

Penentuan Aktivitas Antioksidan pada Sampel. Sampel yang akan diuji disiapkan terlebih dahulu dengan konsentrasi awal 500 ppm. Untuk membuat deret ukur, sampel tersebut dipipet sebanyak 0,1 mL; 0,2 mL; 0,4 mL; 0,8 mL dan 1,6 mL yang kemudian masing-masing diperkirakan mencapai konsentrasi 10 ppm; 20 ppm; 40 ppm; 80 ppm dan 160 ppm. Setelah sampel dipipet, masing-masing volume sampel dimasukkan ke dalam vial, kemudian ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0,4 mM. Setelah itu, metanol p.a ditambahkan hingga volume campuran mencapai 5 mL. Campuran ini kemudian dikocok hingga homogen. Selanjutnya, campuran yang telah homogen dibiarkan selama 30 menit dalam kondisi gelap. Setelah waktu inkubasi, aktivitas antioksidan diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 515 nm. Pengukuran absorbansi dilakukan untuk setiap konsentrasi sampel yang telah dibuat (Purwanto et al., 2017).

2.4.12 Uji *In Vitro* Aktivitas Antiinflamasi

Pembuatan Larutan TBS (*Triss Buffer Saline*). Larutan TBS dibuat dengan melarutkan 4,35 g NaCl ke dalam akuades 200 mL, selanjutnya ditambahkan 605 mg *Triss buffer* dan 200 mL akuades. Kemudian untuk mengatur pH ditambahkan asam asetat glasial untuk mendapatkan pH patologis 6,2 – 6,5 kemudian ditambahkan 100 mL akuades (Reynaldi dan Yani, 2021).

Pembuatan 1% BSA (*Bovine Serum Albumin*). Pembuatan BSA 1% dilakukan dengan melarutkan 1 g BSA (*Bovine Serum Albumin*) dengan 100 mL larutan *Triss buffer saline* (Reynaldi dan Yani, 2021).

Pembuatan Larutan Kontrol Negatif. Sebanyak 50 μ L *Triss buffer saline* ditambahkan 450 μ L BSA 1% untuk membuat kontrol negatif (Farida et al., 2018).

Pembuatan Larutan Uji dan Kontrol Positif. Natrium diklofenak diambil sebanyak 50 mg dan dilarutkan dalam *Triss buffer saline* sebanyak 25 mL. Larutan induk yang digunakan adalah 2000 ppm. Kemudian larutan induk masing-masing diencerkan menjadi 25; 50; 100; 200 dan 400 ppm. Penggunaan natrium diklofenak sebagai kontrol positif karena memiliki efek yang cepat dalam menghilangkan inflamasi (peradangan) selain itu juga merupakan obat antiinflamasi non steroid yang aksinya secara non selektif dan memiliki kelarutan yang baik dalam air dan pelarut organik. Kemudian larutan uji dibuat dengan konsentrasi yang sama dengan larutan induk 2000 ppm dan diencerkan menjadi 25; 50; 100; 200 dan 400 ppm (Novika et al., 2021).

Pengujian Aktivitas Antiinflamasi. Larutan uji dan natrium diklofenak diambil sebanyak 50 μ L dari setiap konsentrasi larutan kemudian ditambahkan BSA 1% sebanyak 450 μ L. Masing-masing konsentrasi kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Selanjutnya, dilakukan pemanasan selama 5 menit di suhu 70°C, lalu didiamkan hingga dingin. Larutan kemudian ditambahkan 3 mL larutan *Triss buffer saline* dan dikocok dengan kuat agar pada tabung tidak terjadi penggumpalan sehingga memudahkan saat pembacaan di spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 660 nm (Fadlilaturrahmah et al., 2022). Perhitungan persentase penghambatan denaturasi protein adalah pada persamaan (5).

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A_{KN} - A_{LU}}{A_{KN}} \times 100\% \quad (5)$$

Keterangan :

A_{KN} = Absorbansi Kontrol Negatif

A_{LU} = Absorbansi Larutan Uji

2.4.14 Uji Agent's Antiviral Dengue

Uji pendahuluan dilakukan uji toksisitas menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Selanjutnya dilakukan uji sitotoksitas, sel Vero dengan kepadatan 1×10^4 sel/sumur dikultur dalam pelat sumur yang berisi kaca dek yang dilapisi dengan poli-L-lisin untuk memfasilitasi adhesi sel. Pelat sumur digunakan untuk kelompok inkubasi 1 jam dan 2 hari. Kemudian dilakukan pada kelompok pertama, kelompok yang terinfeksi virus DENV-2 tanpa perlakuan dengan fraksi peptida dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Kelompok kedua yang terinfeksi virus DENV-2 diberi perlakuan dengan fraksi peptida 10 μ g/mL dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Kelompok ketiga, terdiri dari kontrol positif berisi sel vero yang

terinfeksi DENV-2 dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam serta kontrol negatif yang berisi sel Vero yang tidak terinfeksi DENV-2 dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Pengelompokan untuk sel yang terinfeksi DENV-2 dan diinkubasi selama 2 hari pada suhu 37°C. Supernatan dari setiap sumur kemudian diukur menggunakan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Persentase viabilitas sel (%) dan nilai CC₅₀ (µg/mL) adalah pada persamaan 6 dan 7 (Karim et al., 2024; Fouda et al., 2022).

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{\text{Absorbansi sampel eksperimen}}{\text{Absorbansi kontrol eksperimen}} \times 100 \quad (6)$$

$$\text{CC}_{50} = \frac{50 - b}{a} \quad (7)$$

Keterangan :

a = slope

b = intersept