

**PERAN ASTAXANTHIN TERHADAP PERBAIKAN SIFAT FISIKOKIMIA
ALBUMIN DALAM KONDISI NORMOGLIKEMIK**

TESIS

oleh

**WULIDA KHORUNNISA
176090100111018**



**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

**PERAN ASTAXANTHIN TERHADAP PERBAIKAN SIFAT FISIKOKIMIA
ALBUMIN DALAM KONDISI NORMOGLIKEMIK**

TESIS

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains dalam Bidang Biologi**

oleh

WULIDA KHORUNNISA

176090100111018



**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

HALAMAN PENGESAHAN TESIS**PERAN ASTAXANTHIN TERHADAP PERBAIKAN SIFAT FISIKOKIMIA
ALBUMIN DALAM KONDISI NORMOGLIKEMIK****WULIDA KHORUNNISA
176090100111018**

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 19 Desember 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains dalam Bidang Biologi

Pembimbing I

Menyetujui,

Pembimbing II

Prof. SUTIMAN BAMBANG SUMITRO, SU., D.Sc
NIP 19540311 198002 1 002

Dr. SRI WIDYARTI, M. Si
NIP 19670525 199103 2 001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Magister Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Prof. AMIN SETYO LEKSONO, S.Si., M.Si., Ph.D
NIP 19721117 200012 1 001

SUSUNAN TIM PEMBIMBING DAN PENGUJI

Judul Tesis:

PERAN ASTAXANTHIN TERHADAP PERBAIKAN SIFAT FISIKOKIMIA ALBUMIN DALAM KONDISI NORMOGLIKEMIK

Nama : Wulida Khoirunnisa
NIM : 176090100111018

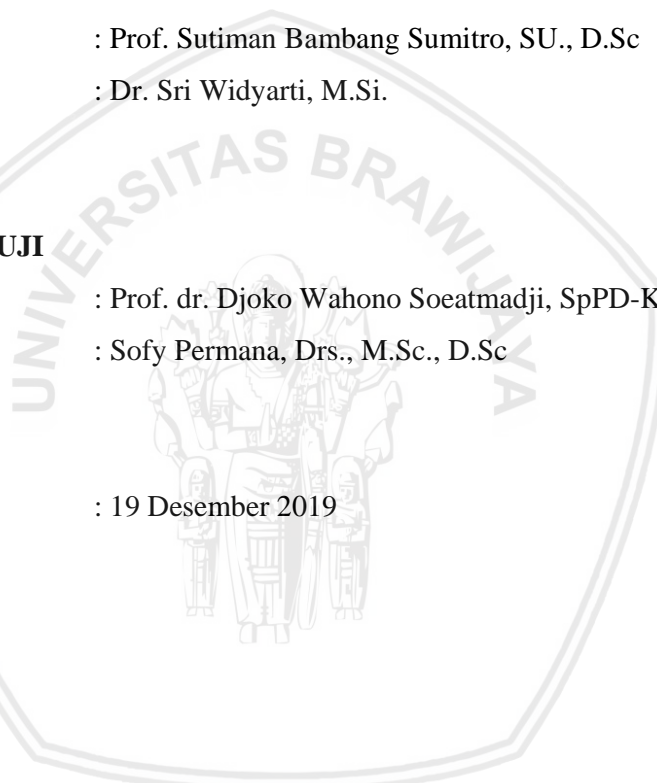
KOMISI PEMBIMBING

Ketua : Prof. Sutiman Bambang Sumitro, SU., D.Sc
Anggota : Dr. Sri Widyarti, M.Si.

TIM DOSEN PENGUJI

Dosen Penguji I : Prof. dr. Djoko Wahono Soeatmadji, SpPD-KEMD
Dosen Penguji II : Sofy Permana, Drs., M.Sc., D.Sc

Tanggal Ujian : 19 Desember 2019



HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah Tesis ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

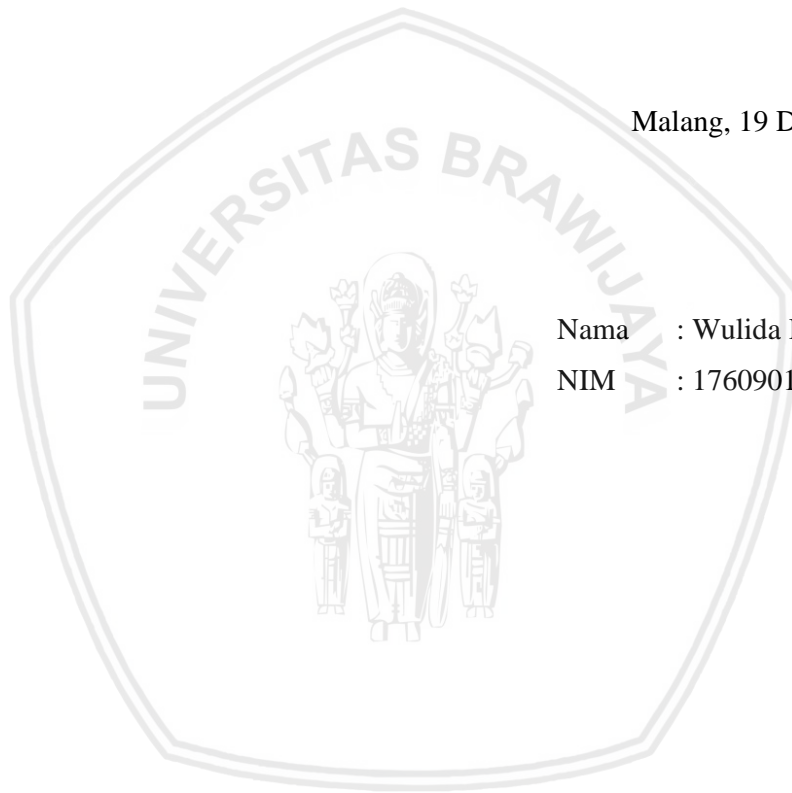
Apabila ternyata di dalam Naskah Tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur jiplakan, saya bersedia Tesis (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 2 dan pasal 70).

Malang, 19 Desember 2019

(Materai)

Nama : Wulida Khoirunnisa

NIM : 176090100111018

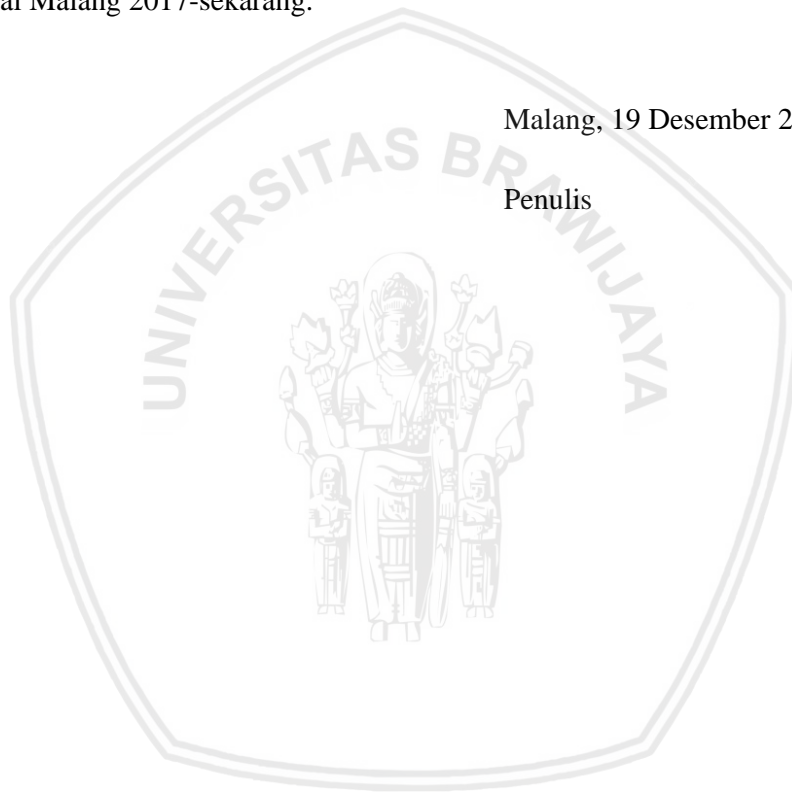


RIWAYAT HIDUP

Wulida Khoirunnisa, Lumajang, 16 Agustus 1993 anak dari ayah Muchammad Chamzah dan ibu A'yunil Hisbiyah, SD sampai SMP di Kabupaten Lumajang, MA di Kabupaten Sleman, lulus MA tahun 2012, selanjutnya melanjutkan studi di Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang mulai tahun 2012 dan menyelesaikan studi pada tahun 2016 dengan tugas akhir berjudul “Konstruksi Plasmid pSB1C3 Pengkode Antibodi scFv Manusia sebagai Dasar Desain Marker Infeksi Demam Berdarah”. Pengalaman kerja sebagai asisten praktikum Histologi Hewan dan Teknik Analisis Biologi Molekuler untuk Jurusan Biologi, FMIPA, UB pada tahun 2015 dan 2016, pengelola jurnal di Berkala Penelitian Hayati *Journal of Biological Researches* (Perkumpulan Biologi Jawa Timur) pada tahun 2016-sekarang dan manajer *editing* di Klinik Jurnal Malang 2017-sekarang.

Malang, 19 Desember 2019

Penulis



PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS

Tesis ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



RINGKASAN

Peran Astaxanthin terhadap Perbaikan Sifat Fisikokimia Albumin dalam Kondisi Normoglikemik

Wulida Khoirunnisa, Sri Widyarti, Sutiman Bambang Sumitro
Program Magister Biologi, Jurusan Biologi,
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya
2019

Albumin merupakan komponen darah yang sangat penting di dalam fisiologi darah. Albumin merupakan 60% protein plasma dari total protein yang ada di dalam darah yang berfungsi sebagai *scavenger* dan *transporter*. Pada berbagai kasus penyakit diabetes melitus, albumin sering mengalami glikasi. Hal ini dapat mengubah sifat dan fungsi albumin. Glikasi merupakan proses penambahan gugus karbohidrat non enzimatis pada suatu protein. Terdapat 12-18% protein yang bekerja di dalam sistem sirkulasi (termasuk albumin) mengalami glikasi secara *in vivo* pada kondisi normoglikemik. Kondisi ini terjadi ketika glukosa plasma puasa dalam konsentrasi kurang dari 5.6 mmol/L. Apabila konsentrasi glukosa menjadi sedikit lebih jenuh, plasma akan mengalami glikasi yang menghasilkan *advanced glycation end product* (AGE) dan bersifat *irreversible*. Perubahan albumin akibat glikasi akan mempengaruhi rheologi sehingga perlu diupayakan perbaikan fungsi dengan menambahkan senyawa antioksidan. Hal ini tentunya diharapkan dapat memperbaiki sifat dan fungsi albumin tanpa mempengaruhi rheologi alami dari albumin. Astaxanthin sangat dipertimbangkan untuk memperbaiki fungsi albumin. Hal ini disebabkan astaxanthin merupakan antioksidan super yang tidak menambah jumlah elektron tidak berpasangan sehingga tidak menambah kadar *radical oxygen species* (ROS) dan tidak mempengaruhi rheologi albumin. Penelitian ini menginvestigasi penambahan astaxanthin dalam mempertahankan sifat fisikokimia albumin pada kondisi normoglikemik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil spektrum UV, perbedaan karakter, struktur, fungsi dan viskositas *bovine serum albumin* terglykasi (BG) normoglikemik (2.0 dan 2.6 mM) serta kemampuan peluruhan ROS oleh astaxanthin (7.282 dan 3.641 $\mu\text{g/ml}$) setelah ditambahkan ke dalam BSA glikasi. Konsentrasi glukosa dan astaxanthin yang digunakan merupakan hasil penelitian pendahuluan berdasarkan *screening* glukosa 2.0 mM hingga 1 M dan astaxanthin 3.641 $\mu\text{g/ml}$ hingga 364.1 $\mu\text{g/ml}$ dengan spektrofotometri UV. Sampel diinkubasi (waktu glikasi) selama 14 dan 21 hari serta waktu penambahan astaxanthin selama tujuh hari berdasarkan *screening* dengan spektrofotometri UV. Metode penelitian ini dilakukan berdasarkan pendekatan fisikokimia antara lain analisis spektrum UV, analisis viskositas, analisis profil spektra *fourier transform infrared spectrometer* (FTIR), analisis kemampuan peluruhan ROS dengan *electron spin resonance* (ESR). Berdasarkan hasil *screening* menggunakan spektrofotometer UV, glukosa 2.0 dan 2.6 mM memiliki profil spektrum UV mendekati BSA 1 mM. Sehingga sampel yang digunakan adalah sampel BG 2.0 dan 2.6 mM yang diglikasi selama 14 hari (BG 2.0 14D dan BG 2.6 14D) dan 21 hari (BG 2.0 21D dan BG 2.6 21D), kemudian ditambahkan astaxanthin masing-masing dengan konsentrasi 7.282

$\mu\text{g/ml}$ (BG + AE 7.282) dan $3.641 \mu\text{g/ml}$ (BG + AE 3.641) selama tujuh hari. Konsentrasi glukosa 2.0 dan 2.6 mM memberikan profil spektrum UV mendekati nilai BSA 1 mM sehingga dapat lebih sesuai jika dilakukan mekanisme glikasi normoglikemik. Konsentrasi astaxanthin 7.282 dan $3.641 \mu\text{g/ml}$ yang ditambahkan ke dalam BG memberikan profil spektrum UV mendekati nilai absorbansi BSA 1 mM. Di samping itu, berdasarkan nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm didapatkan persentase hiperkromisitas. Peningkatan persentase hiperkromisitas mengindikasikan bahwa BSA mengalami denaturasi dan perubahan konformasi. Berdasarkan hasil kuantifikasi spektrum UV menggunakan persentase hiperkromisitas, BG 2.6 14D + AE 3.641 memiliki nilai yang lebih rendah (69.56%) dibanding sampel lainnya. Hasil analisis viskositas menunjukkan sampel BG 2.0 14D + AE 3.641 memberikan nilai yang lebih rendah (0.9012 cP) dibanding sampel lainnya. Analisis FTIR menunjukkan puncak gugus amida I ($1600\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$) yang menjadi penanda perubahan pengikatan gugus C=O terhadap gugus N-H dan peregangan gugus C-N pada BSA dan BG. Berdasarkan pengamatan pada puncak gugus amida I, BSA 1 mM mempunyai intensitas 51.18% pada 1636.29 cm^{-1} dan BG 2.6 21D + AE 3.641 $\mu\text{g/ml}$ mempunyai intensitas 50.08% pada 1664 cm^{-1} . Sampel tersebut memberikan intensitas yang meningkat (BG 2.6 21D mempunyai intensitas 37.35% pada 1645.93 cm^{-1}) dan mendekati nilai intensitas BSA 1 mM. Berbeda dengan BSA 1 mM, sampel BG memiliki puncak amida II yang menunjukkan adanya struktur glikoprotein. Hasil analisis ESR menunjukkan nilai g paling rendah pada sampel BG 2.6 14D + AE 7.282 $\mu\text{g/ml}$ dan BG 2.6 21D + AE 3.641 $\mu\text{g/ml}$ sebesar 0.4074 dan didapatkan persentase *scavenging* 79.61% pada keduanya. Nilai g pada semua sampel ~ 0.4 sehingga termasuk dalam kategori radikal organometal ($0 < g < 6$). Hal ini menjelaskan bahwa mekanisme glikasi yang terjadi belum sampai memunculkan radikal bebas. Konsentrasi astaxanthin yang lebih rendah ($3.641 \mu\text{g/ml}$) terbukti efektif dalam upaya memperbaiki struktur, fungsi, dan konformasi BG mendekati karakter BSA 1 mM. Penelitian ini sangat potensial untuk dilanjutkan terutama pada investigasi waktu glikasi yang lebih optimal dan analisis spektrofotometri untuk mengetahui keberhasilan glikasi.

SUMMARY

The Role of Astaxanthin on the Albumin Physicochemical Properties Repairment in Normoglycemic Conditions

Wulida Khoirunnisa, Sri Widyarti, Sutiman Bambang Sumitro
Magister Program of Biology, Department of Biology
Faculty of Mathematics and Natural Science, Brawijaya University
2019

Albumin is a blood component that is very important in blood physiology. Albumin is 60% of plasma protein from the total protein present in the blood which have a functions as natural scavenger and transporter. In various cases of diabetes mellitus, glycation has been occurred. It could change the characteristics and function of albumin. Glycation is the process of adding non-enzymatic carbohydrate groups to a protein. There are 12-18% of proteins that work in the circulatory system (including albumin) sustain an in vivo glycation under normoglycemic conditions. This condition occurs when fasting plasma glucose in a concentration of less than 5.6 mmol/L. If the glucose concentration becomes slightly more saturated, plasma will run into glycation which produces advanced glycation end product (AGE) and its irreversible. The changes in albumin due to glycation will affect rheology, so it is necessary to improve its function by adding antioxidant compounds. It is certainly expected to improve the characters and functions of albumin without affecting the natural rheology of albumin. Astaxanthin is highly considered to improve the function of albumin. This is due to astaxanthin is a super antioxidant that does not increase the number of unpaired electrons so that it does not increase the levels of radical oxygen species (ROS) and does not affect the rheology of albumin. This research investigates the addition of astaxanthin in maintaining the physicochemical properties of albumin under normoglycemic conditions. This study aims to determine the profile of the UV spectrum, differences in character, structure, function and viscosity of normoglycemic (2.0 and 2.6 mM) glyceic serum albumin glyceic (BG) and the ability to scavage ROS by astaxanthin (7.282 and 3.641 $\mu\text{g/ml}$) after being added to BSA glycation. Selected glucose and astaxanthin concentrations is obtained by the result of preliminary research based on screening of glucose 2.0 mM to 1 M and astaxanthin 3.641 $\mu\text{g/ml}$ to 364.1 $\mu\text{g/ml}$ by UV spectroscopy. The samples were incubated (glycation time) for 14 and 21 days and the time of adding astaxanthin for seven days based on screening with UV spectrophotometry. This research method is based on a physicochemical approach including UV spectrum analysis, viscosity analysis, fourier transform infrared spectrometer (FTIR) spectra analysis, ROS scavage capability analysis with electron spin resonance (ESR). Based on the results of screening using a UV spectrophotometer, glucose 2.0 and 2.6 mM have a UV spectrum profile close to 1 mM BSA. So, the samples used were BG 2.0 and 2.6 mM samples and they were glycated for 14 days (BG 2.0 14D and BG 2.6 14D) and 21 days (BG 2.0 21D and BG 2.6 21D), then astaxanthin was added with a concentration of 7.282 $\mu\text{g/ml}$ (BG + AE 7.282) and 3.641 $\mu\text{g/ml}$ (BG + AE 3.641) for seven days. Glucose concentrations of 2.0 and 2.6 Mm give a UV spectrum profile close to

1 mM BSA value so that it can be more suitable if normoglycemic glycation is performed. Astaxanthin concentrations of 7.282 and 3.641 $\mu\text{g/ml}$ added to BG gave a UV spectrum profile close to the absorbance value of 1 mM BSA. In addition, based on the absorbance value at a wavelength of 280 nm a percentage of hyperchromicity is obtained. An increase in the percentage of hyperchromicity indicates that BSA is undergoing denaturation and conformational changes. Based on the results of quantification of the UV spectrum using the percentage of hyperchromicity, BG 2.6 14D + AE 3.641 has a lower value (69.56%) than others. The result of viscosity analysis showed that BG 2.0 14D + AE 3.641 samples gave lower values (0.9012 cP) than other samples. FTIR analysis shows the peak of the amide group I (1600-1700 cm^{-1}) which is a marker of changes in the binding of C=O groups to N-H groups and stretching of C-N groups on BSA and BG. Based on observations on the peak of the amide group I, BSA 1 mM has an intensity of 51.18% at 1636.29 cm^{-1} and BG 2.6 21D + AE 3.641 $\mu\text{g/ml}$ has an intensity of 50.08% at 1664 cm^{-1} . The sample gives increased intensity (BG 2.6 21D has an intensity of 37.35% at 1645.93 cm^{-1}) and approaches the intensity value of BSA of 1 mM. Unlike the BSA 1 mM, BG samples have an amide II peak that indicates the presence of a glycoprotein structure. ESR analysis results showed the lowest value of g in the BG sample 2.6 14D + AE 7.282 $\mu\text{g/ml}$ and BG 2.6 21D + AE 3.641 $\mu\text{g/ml}$ of 0.4074 and a rinse of 79.61% was obtained in each. G values in all samples were ~ 0.4 that included in the organometal radical category ($0 < g < 6$). This explains why the interactions that occur have not yet led to free radicals. Lower astaxanthin concentrations (3,641 $\mu\text{g/ml}$) have been shown to be effective in efforts to improve the structure, function, and conformation of BG to move the character of BSA 1 mM. This research is very potential to be carried out in a more optimal investigation of glycation time and spectrofluorometric analysis to obtain glycation.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah Robbil ‘Aalamiin, dengan ungkapan rasa syukur pada Allah Yang Maha Kuasa akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis yang merupakan syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains dalam bidang Biologi di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.

Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Prof. Sutiman Bambang Sumitro, SU., D.Sc. selaku Dosen Pembimbing I yang telah mendampingi, memberi pengarahan, tambahan ilmu dan saran-saran yang berguna bagi penulis.
2. Dr. Sri Widyarti, M.Si. selaku Dosen Pembimbing II yang telah mendampingi, memberi pengarahan, memberi semangat, tambahan ilmu dan kemampuan dan saran-saran yang berguna bagi penulis.
3. Prof. dr. Djoko Wahono Soeatmadji, SpPD-KEMD dan Sofy Permana, Drs., M.Sc., D.Sc. selaku Dosen Penguji yang telah memberi saran dan ilmu yang bermanfaat demi perbaikan penyusunan tesis.
4. Orang tua penulis atas segala doa, dukungan, dan motivasi yang tidak ada batasnya.
5. Suami tercinta Zakky Rahmat Dzulfikar, S.T. dan Ananda Tsurayya Faizatul Kamila atas segala doa, dukungan, semangat, dan pelipur lara yang tidak ada batasnya.
6. M. Irsyad Nur, Siti Imama, Maburr, Syahputra Wibowo dan segenap *working group* Sains Kompleksitas atas segala ilmu dan wawasan yang berguna bagi penulis.
7. Rekan-rekan Magister Biologi 2017 dan seluruh civitas akademik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

Penulisan tesis ini merupakan upaya optimal penulis sebagai sarana terbaik dalam pengembangan ilmu pengetahuan. Saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan untuk menjadikan karya ini semakin bermanfaat.

Malang, Desember 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	i
SUMMARY	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN RINGKASAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.4. Manfaat Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Pendekatan Fisikokimia.....	4
2.2. Albumin.....	4
2.3. Rheologi Albumin.....	5
2.4. Glikasi Albumin (Mekanisme dan Karakter Fisikokimia).....	6
2.5. Astaxanthin.....	9
2.6. Identifikasi kandungan produk astaxanthin.....	10
2.7. Spektrofotometri UV Vis.....	10
2.8. <i>Electron spin resonance</i> (ESR).....	11
2.9. Viskometri.....	12
2.10. <i>Fourier transform infrared spectrometer</i> (FTIR).....	12
2.11. Kerangka Konsep Penelitian.....	14
BAB III METODE PENELITIAN	16
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	16
3.2. Kerangka Operasional.....	16
3.3. Glikasi.....	17
3.3.1. Larutan stok BSA dan glukosa.....	17
3.3.2. Ekstraksi astaxanthin.....	17
3.3.3. <i>Working solution</i>	18
3.3.4. Mekanisme Glikasi dan Penambahan Astaxanthin.....	18
3.4. Spektrofotometri UV.....	19
3.5. Viskometri.....	20
3.6. FTIR.....	21
3.7. ESR.....	21
3.8. Atribut Objek Penelitian.....	22

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	25
4.1. Hasil Penelitian.....	25
4.1.1. Astaxanthin.....	25
4.1.2. Spektrofotometri UV.....	26
4.1.3. Viskometri.....	31
4.1.4. FTIR.....	35
4.1.5. ESR.....	43
4.2. Pembahasan.....	46
 BAB V PENUTUP	 54
5.1. Kesimpulan.....	54
5.2. Saran.....	54
 DAFTAR PUSTAKA	 55
LAMPIRAN	61



DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1	Pembagian zona Panjang gelombang terkait dengan gugus fungsi yang terbaca pada spektra FTIR	13
2	Peta sampel	18
3	Nilai absorbansi sampel BSA 1 mM dan sampel BSA glikasi 14 hari pada panjang gelombang 230 nm, 248 nm, dan 260 nm	27
4	Nilai absorbansi sampel BSA 1 mM dan sampel BSA glikasi 21 hari pada Panjang gelombang 230 nm, 248 nm, dan 260 nm	29
5	Intensitas sampel BSA 1 mM dan BG hasil analisis FTIR berdasarkan puncak daerah Amida I dan II	37
6	Intensitas sampel BSA 1 mM, BG 2.0 14D dan setelah ditambahkan astaxanthin hasil analisis FTIR berdasarkan puncak daerah Amida I dan II	38
7	Intensitas sampel BSA 1 mM, BG 2.6 14D dan setelah ditambahkan astaxanthin hasil analisis FTIR berdasarkan puncak daerah Amida I dan II	39
8	Intensitas sampel BSA 1 mM, BG 2.0 21D dan setelah ditambahkan astaxanthin hasil analisis FTIR berdasarkan puncak daerah Amida I dan II	40
9	Intensitas sampel BSA 1 mM, BG 2.6 21D dan setelah ditambahkan astaxanthin hasil analisis FTIR berdasarkan puncak daerah Amida I dan II	43

DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1	Struktur protein albumin (PDB: 1AO6)	5
2	Ilustrasi reaksi Maillard terkait proses glikasi protein (Tsekovska dkk, 2016)	7
3	Struktur HSA terglikasi dengan glukosa berdasarkan studi in silico (Widyarti dkk, 2018)	8
4	Posisi pengikatan albumin dengan lokasi residu lisin dan arginin yang terlibat dalam mekanisme glikasi (Arasteh dkk, 2014)	8
5	Struktur kimia astaxanthin (Polotow dkk, 2014)	9
6	Contoh profil spektrum UV pada BSA (Lu dkk, 2012)	11
7	Profil FTIR yang menunjukkan puncak amida I dan amida II (Ioannou & Varotsis, 2017)	13
8	Jenis spektrum pada kajian biologi yang menunjukkan puncak biomolekuler dari 3000-800 cm ⁻¹ (Baker dkk, 2014)	14
9	Kerangka konsep penelitian	15
10	Kerangka operasional	16
11	Komposisi sampel dan mekanisme glikasi	18
12	Hasil analisis rata-rata konsentrasi massa astaxanthin dalam 1 kaplet asta plus menggunakan HPLC berdasarkan panjang gelombang 480 nm selama 15 menit pada suhu kolom 25°C	25
13	Hasil spektrofotometri UV glukosa 2.0 mM – 3.0 dibandingkan dengan spektrum BSA 1 mM. Hasil screening menunjukkan bahwa glukosa dengan konsentrasi 2.0 mM dan 2.6 mM mempunyai spektra mendekati BSA 1 mM yang diprediksi lebih kompatibel dengan BSA 1 mM	26
14	Hasil spektrofotometri UV BG 2.0 mM dan 2.6 mM dibandingkan dengan spektra BSA 1 mM glikasi 14 hari dan penambahan astaxanthin. Konsentrasi glukosa 2.0 dan 2.6 mM dan astaxanthin 7.282 dan 3.641 µg/ml membuat salah satu puncak spektra yang terbentuk mendekati puncak spektra BSA 1 mM	28
15	Hasil spektrofotometri UV BG 2.0 mM dan 2.6 mM dibandingkan dengan spektra BSA 1 mM setelah glikasi 21 hari dan penambahan astaxanthin. Konsentrasi glukosa 2.0 dan 2.6 mM dan astaxanthin 7.282 dan 3.641 µg/mL menjadikan spektra yang terbentuk lebih mendekati BSA 1 mM dibandingkan BSA glikasi dengan glikasi 14 hari	29
16	Skema hasil analisis spektrofotometri UV yang menunjukkan bahwa sampel BG 2.6 21D + AE 3.641 µg/mL memiliki nilai absorbansi terendah pada Panjang gelombang 230 nm	30
17	Persentase hiperkromisitas BG 2.0 dan BG 2.6 14 dan 21 hari setelah penambahan berbagai konsentrasi astaxanthin	31



18	Skema persentase hiperkromisitas (panjang gelombang 280 nm) yang menunjukkan bahwa BG 2.6 14D + AE 3.641 $\mu\text{g/mL}$ memiliki persentase hiperkromisitas terendah	31
19	Viskositas dinamik pada sampel BSA 1 mM dibandingkan BSA glikasi 2.0 mM (A) dan 2.6 mM (B) 14 hari, kemudian dilanjutkan dengan penambahan astaxanthin konsentrasi 7.282 $\mu\text{g/mL}$ dan 3.641 $\mu\text{g/mL}$	33
20	Viskositas dinamik pada sampel BSA 1 mM dibandingkan BSA glikasi 2.0 mM (A) dan 2.6 mM (B) 21 hari, kemudian dilanjutkan dengan penambahan astaxanthin konsentrasi 7.282 $\mu\text{g/mL}$ dan 3.641 $\mu\text{g/mL}$	34
21	Skema nilai viskositas dinamik yang menunjukkan bahwa BG 2.0 14D + AE 3.641 $\mu\text{g/mL}$ mempunyai nilai viskositas paling rendah	34
22	Hasil analisis FTIR untuk BSA 1 mM dibandingkan dengan astaxanthin pelarut etanol yang menunjukkan puncak amida I di kedua sampel	35
23	Hasil analisis FTIR untuk BSA 1 mM dibandingkan dengan BG 2.0 dan BG 2.6 14 dan 21 hari. Sampel BG memiliki dua puncak pada daerah amida I dan II	36
24	Hasil analisis FTIR untuk BSA 1 mM dibandingkan dengan BG 2.0 14 hari. Sampel BG memiliki dua puncak pada daerah amida I dan II	38
25	Hasil analisis FTIR untuk BSA 1 mM dibandingkan dengan BG 2.6 14 hari. Sampel BG memiliki dua puncak pada daerah amida I dan II	39
26	Hasil analisis FTIR untuk BSA 1 mM dibandingkan dengan BG 2.0 21 hari. Sampel BG memiliki dua puncak pada daerah amida I dan II	41
27	Hasil analisis FTIR untuk BSA 1 mM dibandingkan dengan BG 2.6 21 hari. Sampel BG memiliki dua puncak pada daerah amida I dan II	42
28	Nilai g dan persentase scavenging sampel BG 2.0 (A) dan BG 2.6 (B) pada 14 hari. Terdapat peningkatan persentase scavenging dan penurunan nilai g pada sampel BG 2.6. Sedangkan pada sampel BG 2.0, peningkatan persentase scavenging dan penurunan nilai g terdapat pada sampel BG 2.0 14 hari setelah penambahan astaxanthin 7.282 $\mu\text{g/mL}$	44
29	Nilai g dan persentase scavenging sampel BG 2.0 (A) dan BG 2.6 (B) pada 21 hari. Terdapat penurunan persentase scavenging dan peningkatan nilai g pada sampel BG 2.6. Sedangkan pada sampel BG 2.0, peningkatan persentase scavenging dan penurunan nilai g terdapat pada sampel BG 2.0 21 hari setelah penambahan astaxanthin 3.641 $\mu\text{g/mL}$	45
30	Skema nilai g dan persentase scavenging yang menunjukkan	46

- bahwa sampel BG 2.6 21D + AE 3.641 $\mu\text{g/mL}$ memiliki nilai g paling rendah dan persentase scavenging tertinggi dibandingkan sampel lainnya, hasil yang sama juga terdapat pada sampel BG 2.6 14D + AE 7.282 $\mu\text{g/mL}$
- 31 Skema fungsionalisasi ikatan C-H dan pembentukan ikatan C-C: mekanisme organometal “*true C-H activation*” (a) dan mekanisme non-organometal melalui oksidasi spesies reaktif (b) (Klussmann dan Devarajulu, 2011) 49
- 32 Hasil *docking* pada penelitian Wibowo dkk (2019) yang menunjukkan daerah pengikatan astaxanthin terhadap gHSA (A) dan astaxanthin terhadap HAS (B). 51



DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1	Sertifikat bebas plagiasi tesis	59
2	Naskah publikasi	60
3	Sertifikat penyaji pada International Seminar on Bioscience and Biological Education (ISBBE) UNY, 29-30 Oktober 2018	68



DAFTAR SIMBOL, SINGKATAN, DAN DEFINISI

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
μ_B	Magneton Bohr
Abs n	nilai absorbansi BSA 1 mM normal
Abs t	nilai absorbansi sampel
AGE	<i>Advanced Glycation End Product</i>
ALA	Asam amino alanin
ARG	Asam amino arginin
ASP	Asam amino asam aspartat
AX	Astaxanthin
BG	BSA Glikasi
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
Cys	Asam amino sistein (<i>Cystein</i>)
DCCT	<i>Diabetes Control and Complications Trial</i>
DM	Diabetes Mellitus
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ESR	<i>Electron Spin Resonance</i>
f	Frekuensi resonansi
FTIR	<i>Fourier-Transform Infra-Red</i>
GLN	Asam amino glutamin
GLU	Asam amino asam glutamat
h	Konstanta Planck
Hb	Hemoglobin
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
I	Kuat arus yang mengalir pada kumparan Hemholtz
LEU	Asam amino leusin
LYS	Asam amino lisin
Met	Asam amino metionin
n	Jumlah lilitan pada kumparan Hemholtz
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
r	Jari-jari kumparan Hemholtz
ROS	Radical Oxygen Species
SER	Asam amino serin
Trp	Asam amino triptofan
TYR	Asam amino tirosin
UV	<i>Ultraviolet</i>
VAL	Asam amino valin

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Nama unit</u>
°C	Celcius
A	Ampere
Am ²	Ampere meter persegi
cm	Centimeter
cP	Centipoise
Hz	Hertz
kDA	Kilodalton
mg	Milligram
mM	Milimolar
Mol/L	Molar per liter
nm	namometer
pc	pikosecond
µg/ml	Mirkogram per mililiter



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Albumin merupakan komponen darah yang sangat penting di dalam fisiologi darah. Berdasarkan total albumin yang menyusun plasma darah, hanya 30-40% albumin yang berada pada bagian intravaskuler, sedangkan 60-70% lainnya beredar pada kapiler dan bagian ekstrasvaskuler sesuai dengan fungsinya sebagai agen transportasi molekul dan peluruh radikal bebas (*scavenger*) (Wu dkk, 2016). Berat molekul albumin yang rendah menjadikan albumin mampu untuk memelihara tekanan osmotik pada plasma darah dibandingkan dengan protein globular lainnya. Albumin juga mempunyai titik isoelektrik yang lemah sehingga protein ini memiliki muatan negatif pada pH fisiologis. Struktur albumin tidak berdiri sendiri, melainkan membentuk ikatan fisiologis dengan molekul lainnya. Terdapat 12-18% protein yang bekerja di dalam sistem sirkulasi (termasuk albumin) mengalami glikasi secara *in vivo* pada kondisi normoglikemik (Li & Yan, 2017).

Albumin menjadi target untuk beberapa modifikasi enzimatik dan non-enzimatik. Reaksi umum non-enzimatik yang ada di dalam albumin mempunyai dampak signifikan pada sifat fisik dan fungsionalnya melalui reduksi molekul gula, seperti glukosa dan fruktosa, yang dikenal sebagai reaksi glikasi *Maillard* (Tvekovska dkk, 2016). Gugus gula yang ditambahkan pada gugus amina protein menyebabkan pembentukan basa Schiff yang bersifat *reversible* (Rondeau dkk, 2010; Sadowska-Bartosz dkk, 2014). Hal ini dapat mengubah struktur dan fungsi awal albumin selama beberapa periode untuk menghasilkan ketoamina atau produk Amadori. Produk-produk ini mengalami perubahan yang diikuti oleh reaksi-reaksi lain seperti siklisasi, oksidasi dan dehidrasi untuk membentuk produk akhir glikasi yang lebih stabil (AGEs). Glikasi dapat mengubah struktur dan fungsi albumin melalui mekanisme disfungsi protein. Perubahan ini memunculkan keterkaitan dengan masalah patologis seperti diabetes mellitus (Ledesma-Osuna dkk, 2008; Zurawska-Plaksej dkk, 2018). Berdasarkan peran albumin sebagai agen transportasi maupun *scavenger*, albumin merupakan salah satu protein yang sudah dipastikan mengalami glikasi.

Albumin mempunyai 35 residu sistein, 1 residu triptofan, 59 residu lisin dan 23 residu arginin dari 585 residu asam amino total yang secara teori menyebabkan proses glikasi (Freitas dkk, 2017). Dengan demikian, perubahan konformasi albumin disebabkan oleh modifikasi pada daerah pengikatan albumin ketika glikasi terjadi (Arasteh dkk, 2014).

Bovine serum albumin (BSA) merupakan protein yang kaya akan lisin (59; 10.1%) dan residu arginin (23; 3.9%). Selain itu di dalam konteks *in vivo*, albumin mengalami glikasi pada residu arginin, lisin dan sistein. Perubahan konformasi albumin disebabkan oleh glikasi termasuk peningkatan berat molekul dan hidrofobisitas (Rondeau dkk, 2010; Xu dkk, 2013).

Perubahan albumin akibat glikasi akan mempengaruhi rheologi sehingga perlu diupayakan perbaikan fungsi dengan menambahkan senyawa antioksidan. Hal ini tentunya diharapkan dapat memperbaiki sifat dan fungsi albumin tanpa mempengaruhi rheologi alami dari albumin. Astaxanthin sangat dipertimbangkan untuk memperbaiki fungsi albumin. Hal ini disebabkan astaxanthin merupakan antioksidan super yang tidak menambah jumlah elektron tidak berpasangan sehingga tidak menambah kadar *radical oxygen species* (ROS) dan tidak mempengaruhi rheologi albumin. Astaxanthin merupakan karotenoid *xanthophyll* yang terkandung dalam mikroalga, fungi, tanaman kompleks dan organisme laut. Astaxanthin mempunyai gugus hidroksil (OH) dan keto (C=O) pada cincin ionon astaxanthin yang menjelaskan beberapa fitur unik astaxanthin, yaitu kemampuan untuk diesterifikasi dan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi. Astaxanthin juga merupakan antioksidan (Fassett & Coombes, 2011). Berdasarkan peran ini, astaxanthin diharapkan mampu meningkatkan kapasitas albumin.

Kajian terkait diabetes melitus terbatas pada lingkup menurunkan kadar gula darah dan injeksi insulin. Namun, angka penderita diabetes mellitus masih tetap tinggi, bahkan pengobatan per oral maupun injeksi ini menyebabkan peningkatan berat badan yang drastis pada penderitanya. Selain itu, diabetes mellitus menyebabkan kondisi komplikasi dengan penyakit kardiovaskuler lainnya. Pada kondisi ini, upaya penurunan kadar gula darah maupun injeksi insulin tidak mampu bersinergi dengan baik, sehingga perlu dilakukan kajian lain. Sains kompleksitas beserta studi terkait rheologi darah (albumin) menjadi salah satu pendekatan yang lebih terorientasi pada upaya memelihara kadar gula darah dan insulin.

Penelitian ini membahas terkait mekanisme glikasi yang dilakukan dengan penambahan glukosa konsentrasi rendah pada BSA. Penambahan glukosa konsentrasi rendah dalam penelitian ini merepresentasikan glikasi normoglikemik. Kajian terkait dengan albumin glikasi dilakukan melalui pendekatan fisikokimia seperti analisa spektrofotometri UV, viskositas, spektroskopi *Fourier-Transform Infra-Red* (FTIR), dan *Electron Spin Resonance* (ESR). Analisa tersebut digunakan untuk mengetahui dinamika

karakter fisikokimia BSA setelah mengalami glikasi dan perbaikannya melalui penambahan astaxanthin.

1.2. Rumusan Masalah

Penelitian ini memiliki rumusan masalah antara lain:

1. Bagaimana karakter fisikokimia BSA terglikasi glukosa (BG) 2.0 dan 2.6 mM terkait dengan hiperkromisitas, viskositas, gugus fungsi, dan kemampuan peluruhan radikal bebas?
2. Bagaimana karakter fisikokimia BG setelah ditambahkan astaxanthin terkait dengan hiperkromisitas, viskositas, gugus fungsi, dan kemampuan peluruhan radikal bebas?
3. Bagaimana perbedaan karakter fisikokimia kompleks BG-Astaxanthin terkait dengan fungsi *transporter* dan *scavenger* dengan BSA 1 mM?

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini mempunyai tujuan untuk mengetahui karakter fisikokimia BSA terglikasi glukosa (BG) 2.0 dan 2.6 mM, BG setelah ditambahkan astaxanthin terkait dengan hiperkromisitas, viskositas, gugus fungsi, dan kemampuan peluruhan radikal bebas. Selain itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan karakter fisikokimia kompleks BG-Astaxanthin terkait dengan fungsi *transporter* dan *scavenger* dengan BSA 1 mM.

1.4. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan memberikan perspektif baru terkait manajemen struktur dan fungsi albumin sebagai *transporter* dan *scavenger* berdasarkan pendekatan fisikokimia. Perspektif ini diharapkan dapat menjadi penyelesaian masalah diabetes mellitus berbasis mempertahankan kondisi seimbang albumin dalam darah.

BAB II

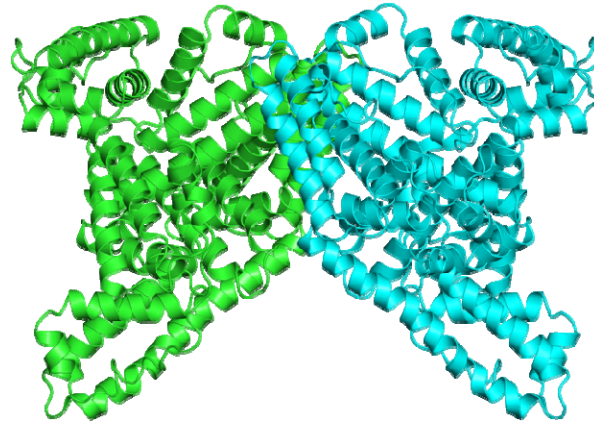
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Pendekatan Fisikokimia

Fisikokimia merupakan suatu karakter yang mengacu pada sifat fisik suatu senyawa kimia penyusun material organik maupun inorganik. Kajian fisikokimia menggunakan prinsip dan konsep tersebut dalam menganalisis suatu komponen senyawa (selanjutnya akan disebut sebagai komposit). Analisis fisikokimia dilakukan menggunakan instrumen fisika dan kimia seperti untuk mengetahui absorbansi larutan, kekentalan, daya fluoresensi, kemampuan peluruhan, konduktivitas listrik, identifikasi logam transisi dalam suatu kompleks senyawa dan identifikasi ukuran partikel penyusun senyawa. Berdasarkan analisis fisikokimia tersebut menghasilkan suatu besaran yang dapat diinterpretasikan sebagai performa suatu senyawa (Jian dkk, 2018).

2.2. Albumin

Albumin merupakan protein yang mempunyai berat molekul sekitar 66.7 kDa, terdiri dari dua rantai polipeptida tunggal yang mengandung 585 asam amino (Gambar 1). Albumin merupakan protein plasma utama, mewakili sekitar 60% dari total protein dalam darah, dengan konsentrasi antara 3.0 dan 5.0 g/dL dan waktu paruh 14 hingga 20 hari. Molekul albumin mengandung 17 ikatan disulfida dan satu residu sistein bebas (Cys34), serta enam residu metionin (Met87, Met123, Met298, Met329, Met446, Met548), yang memiliki peningkatan kemampuan ketika bereaksi dengan *Radical Oxygen Species* (ROS). Struktur albumin membuatnya lebih mudah untuk melakukan fungsi fisiologisnya, seperti mempertahankan pH dan tekanan osmotik darah. Albumin dapat mengikat logam dengan valensi variabel, seperti bilirubin (apabila berikatan dengan albumin, bilirubin menjadi mampu menghambat peroksidasi lipid dan menunjukkan sifat antioksidan lainnya). Selain itu, albumin mampu mengikat homosistein (yang dapat mengoksidasi lipoprotein). Oleh karena albumin mempunyai konsentrasi tinggi di dalam plasma darah, albumin juga berfungsi sebagai *scavenger* alami. Sifat antioksidan albumin akan menurun pada beberapa penyakit, seperti diabetes mellitus. Selain itu pada penyakit hati, ginjal dan kondisi penuaan, oksidasi albumin terakumulasi di dalam darah, yang memungkinkan untuk dianggap sebagai penanda stres oksidatif secara patologis. Karakter albumin tersebut memungkinkan evaluasi perkiraan jumlah ROS yang dihasilkan dalam darah dengan tingkat modifikasi oksidatif albumin (Freitas dkk, 2016; Gorobets dkk, 2017).



Gambar 1. Struktur protein albumin (PDB: 1AO6)

2.3. Rheologi Albumin

Rheologi adalah bidang ilmiah yang mencakup fenomena aliran materi (padatan, cairan, dan gas) dan terutama melibatkan perilaku yang tergantung waktu di bawah pengaruh tekanan. Kata rheologi muncul pada tahun 1929 untuk menyebut disiplin masyarakat yang terlibat dalam studi tentang bagaimana material berubah bentuk sebagai respons terhadap perilaku adaptasi. Hal ini diketahui berdasarkan kutipan Heraclitus: “ $\pi\alpha\nu\tau\alpha \rho\epsilon\iota$ ” yang diterjemahkan sebagai “semuanya mengalir”. Segala sesuatu dapat berpeluang mengalir, namun peluang ini berada pada batas yang berbeda tergantung seberapa banyak, arah, dan untuk berapa lama tekanan yang diterapkan. Tujuan rheologi adalah untuk memberikan parameter kuantitatif yang mendefinisikan perubahan bentuk suatu material sebagai fungsi gaya, waktu dan orientasi spasial (Janmey dan Schliwa, 2008).

Pengujian rheologi telah digunakan secara luas untuk meningkatkan pemahaman cairan tubuh manusia dan hewan dalam banyak mekanisme bidang biologi, kesehatan, dan farmasi. Studi yang banyak dikembangkan adalah terkait karakterisasi dan evaluasi polipeptida sintetik terhadap protein alami, memantau peran protein pada pembentukan jaringan di dalam cairan biologis, mempelajari mekanisme penuaan hasil ekskresi membran sinovial dalam sendi, mengembangkan polimer yang larut dalam air untuk proses pelepasan molekul pengontrol kinerja obat-obatan, mengukur indeks energi agregasi sel darah merah untuk eritrosit; membangun kinetika pembentukan gel pada trombosit darah dan mempelajari mekanisme pembekuan darah (Janmey dan Schliwa, 2008).

Penelitian Ekowati, dkk (2016) menunjukkan bahwa viskositas plasma darah normal pada manusia menjadi lebih rendah dengan memberikan penambahan 10 μl air hingga 6 ml

plasma. Hal ini mengindikasikan fungsi air pada rheologi darah. Peran air dalam mempengaruhi viskositas terkait dengan dinamika konformasi albumin.

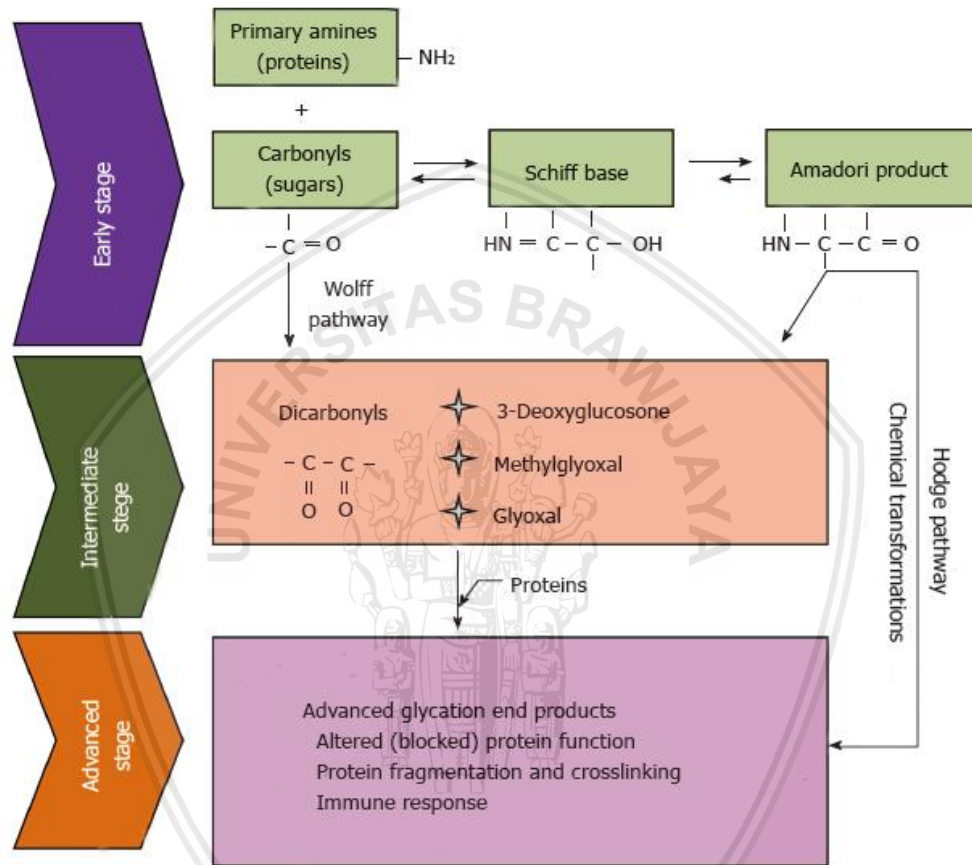
2.4. Glikasi Albumin (Mekanisme dan Karakter Fisikokimia)

Glikasi (glikosilasi non-enzimatik) merupakan proses penambahan karbohidrat non-enzimatik terhadap suatu protein sehingga memproduksi residu reaktif protein. Tipe gula yang digunakan dalam glikasi adalah glukosa, fruktosa atau derivatnya. Berbeda dengan glikasi, glukosilasi merupakan modifikasi protein yang dimediasi oleh enzim pada pengikatan ATP-dependen terhadap gula. Glikosilasi terjadi pada bagian yang ditentukan molekul target dan merupakan bentuk modifikasi protein *post-translation* yang memerlukan protein *mature*. Mekanisme glikasi sedang banyak digunakan di negara-negara dengan kasus diabetes melitus, yang menyediakan posisi awal untuk mengevaluasi hubungan antara peningkatan kadar hemoglobin A1C terglykasi dan penyakit diabetes melitus. Secara *in vivo*, glikasi telah dijelaskan dalam protein seperti kristal lensa, kolagen, feritin, apolipoprotein, dan serum albumin. Selain glukosa, gugus gula lainnya seperti galaktosa, fruktosa, ribosa, asam sialat, manosa, glukosa 6-fosfat, gliseraldehid, dan fucose telah digunakan secara *in vitro* sebagai agen glikasi, yang mempercepat proses glikasi (Arasteh dkk, 2014; Singh dkk, 2014).

Di dalam proses glikasi, gugus gula akan mengalami reaksi Maillard yang sesuai dengan kondensasi antara senyawa karbonil gula pereduksi dan kelompok residu amino bebas khusus seperti lisin atau arginin (Gambar 2). Selain kelarutan produk di tahap akhir glikasi, reaksi intermediet memunculkan agregat berwarna coklat gelap (Arasteh dkk, 2014). Glikasi protein menurunkan fungsi normal mereka dengan mengubah konformasi molekul, aktivitas enzimatik, dan fungsi reseptor (Singh dkk, 2014).

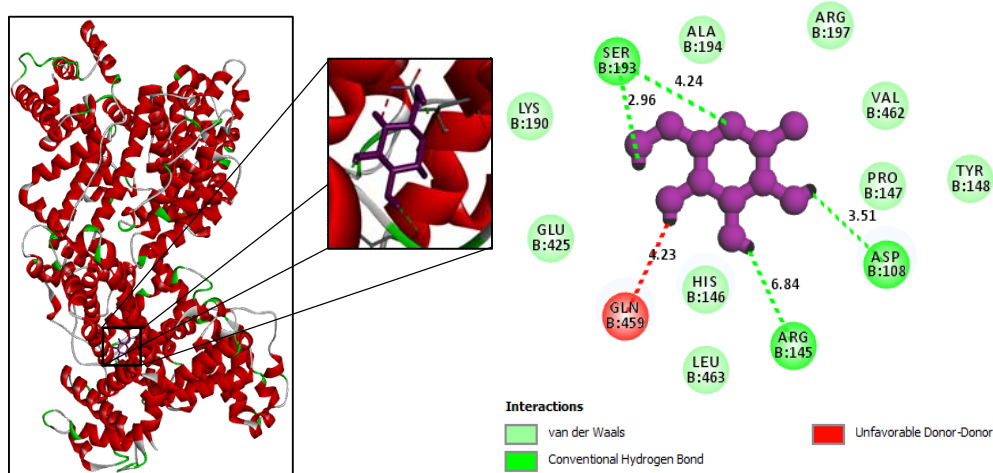
Mekanisme glikasi terjadi pada tiga tingkatan yaitu glikasi awal, glikasi menengah dan glikasi akhir. Glikasi awal mengarah pada pembentukan basis Schiff, glikasi menengah menghasilkan produk-produk Amadori dan glikasi akhir produk oksidasi berlebih yang menghasilkan *advanced glycated end product* (AGE). Berdasarkan penelitian secara *in silico* Widyarti, dkk (2018), terjadi perubahan ikatan hidrogen pada domain B struktur *human serum albumin* terglykasi untuk residu Ser193, Arg145, dan Asp108 serta ikatan *unfavorable donor donor* pada Glu459 (Gambar 3 dan 4). Selama produksi AGEs, protein mengalami mekanisme glikasi dan oksidasi (Roohk dan Zaidi, 2008). Sebagai tahap awal dari reaksi termasuk interaksi dengan gula pereduksi, seperti glukosa, dan kelompok residu amino dari lisin dan arginin, penelitian terbaru menunjukkan

bahwa proses glikasi difasilitasi dengan mudah dengan adanya residu histidin yang berada di dekat lisin. Reaksi tahap akhir adalah reaksi yang tidak dapat diubah karena melibatkan mekanisme dehidrasi, hidrolisis, dan lainnya, yang mengarah pada pembentukan AGE (Arasteh dkk, 2014). Produk AGE dianggap sebagai penanda berbagai penyakit, seperti diabetes melitus, arteriosklerosis, gagal ginjal, dan penyakit Alzheimer. Namun, produk AGE juga meningkat selama proses penuaan secara normal (Freitas dkk, 2016; Kohzuma dkk, 2011).



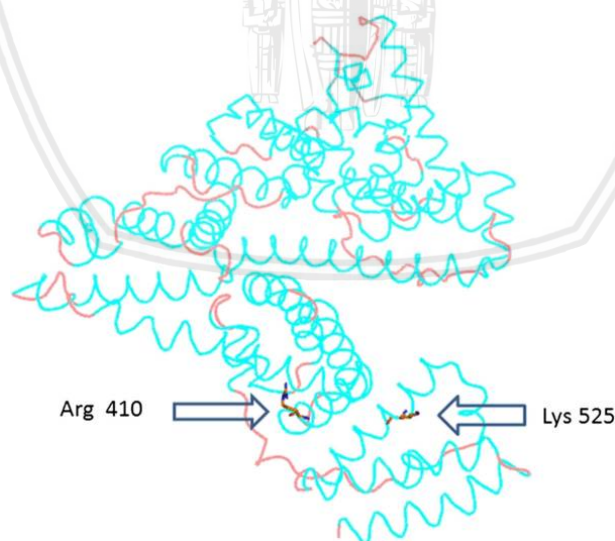
Gambar 2. Ilustrasi reaksi Maillard terkait proses glikasi protein (Tsekovska dkk, 2016)

Level pada beberapa protein glikasi meningkat pada pasien diabetes melitus. Peningkatan level protein glikasi ini menyebabkan perkembangan komplikasi diabetes kronis. Berdasarkan hasil *Diabetes Control and Complications Trial*, tingkat hemoglobin A1c direkomendasikan dapat mencegah onsen dan progresi komplikasi diabetes kronis. Namun, HbA1c tidak sesuai untuk evaluasi variasi jangka pendek pada kontrol glikemik akibat rentang umur eritrosit yang panjang (Arasteh dkk, 2014).



Gambar 3. Struktur HSA terlikasi dengan glukosa berdasarkan studi *in silico* (Wibowo dkk, 2019)

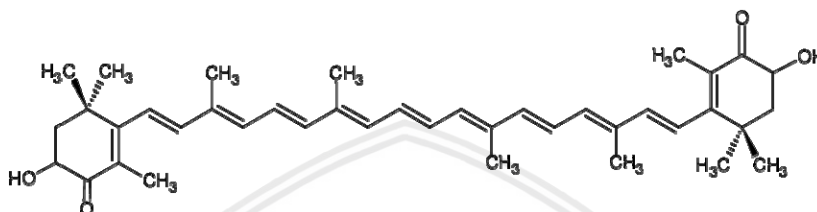
Albumin sangat sensitif terhadap glikasi. Seperti disebutkan sebelumnya, reaksi Maillard non-enzimatik awalnya melibatkan pelekatan glukosa atau senyawa karbohidrat lainnya seperti galaktosa dan fruktosa, ke gugus amino albumin bebas. Efisiensi glikasi tergantung pada sifat dan anomerisasi karbohidrat yang terlibat dalam proses. Sebagai contoh, dibandingkan dengan glukosa, ribosa menginduksi proses glikasi lebih cepat dengan albumin dan membentuk produk seperti amiloid. Studi *in vivo* menunjukkan bahwa proporsi albumin terlikasi pada orang sehat adalah dalam kisaran 1-10%, dibandingkan dengan individu diabetes yang dapat meningkat menjadi 30% (Singh dkk, 2014).



Gambar 4. Posisi pengikatan albumin dengan lokasi residu lisin dan arginin yang terlibat dalam mekanisme glikasi (Arasteh dkk, 2014)

2.5. Astaxanthin

Astaxanthin ($C_{40}H_{52}O_4$, 3,3'-dihydroxy- β,β' -carotene-4,4'-dione) merupakan pigmen *karotenoid* utama yang ditemukan pada hewan air dan mempunyai berat molekul 596.852 g/ml (Pubchem: 5281224). Karotenoid terkandung di dalam banyak makanan laut terkenal seperti salmon, ikan laut berwarna merah, udang, lobster, dan telur ikan. Astaxanthin, seperti halnya dengan senyawa karotenoid lainnya, tidak dapat disintesis oleh hewan sehingga harus diambil dari alam sebagai makanan hewan tersebut (Panis dan Carreon, 2016). Struktur kimia astaxanthin ditampilkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Struktur kimia astaxanthin (Polotow dkk, 2014)

Astaxanthin termasuk dalam kelas *xanthophyll karotenoid*. Senyawa ini terkait erat dengan beta-karoten, lutein, dan zeaxanthin, yang mempunyai banyak fungsi metabolisme dan fisiologis umum dikaitkan dengan karotenoid. Selain itu astaxanthin memiliki sifat kimia yang unik berdasarkan struktur molekulnya. Kehadiran gugus hidroksil (OH) dan keto (C=O) pada masing-masing cincin ionon menjelaskan beberapa fitur unik astaxanthin, yaitu kemampuan untuk diesterifikasi dan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi serta sifat yang lebih polar daripada karotenoid lainnya. Di dalam bentuk molekul bebas, astaxanthin sangat tidak stabil dan sangat rentan terhadap oksidasi. Oleh karena itu, astaxanthin ditemukan di alam dalam bentuk terkonjugasi dengan protein (misalnya otot salmon dan eksoskeleton lobster) atau diesterifikasi dengan satu atau dua asam lemak (monoester dan diester), yang menstabilkan molekul. Berbagai jenis isomer astaxanthin telah dikarakterisasi berdasarkan konfigurasi dua gugus hidroksil pada molekul. Isomer optik dan geometri astaxanthin didistribusikan secara selektif di dalam jaringan yang berbeda. Tingkat astaxanthin bebas di hepar lebih besar daripada dalam plasma, sehingga menunjukkan serapan astaxanthin terkonsentrasi di hepar. Sama seperti jenis karoten lainnya, astaxanthin merupakan senyawa yang sangat lipofilik dan mempunyai bioavailabilitas yang rendah untuk konsumsi per oral. Hal ini menjadikan konsumsi astaxanthin memerlukan agen transportasi yang dapat meningkatkan efektivitas penyerapan dalam tubuh. Berdasarkan kebutuhan *transporter* tersebut, diharapkan albumin dapat dijadikan pilihan yang efektif (Hussein dkk, 2006; Shibata dkk, 2001).

2.6. Identifikasi kandungan produk astaxanthin

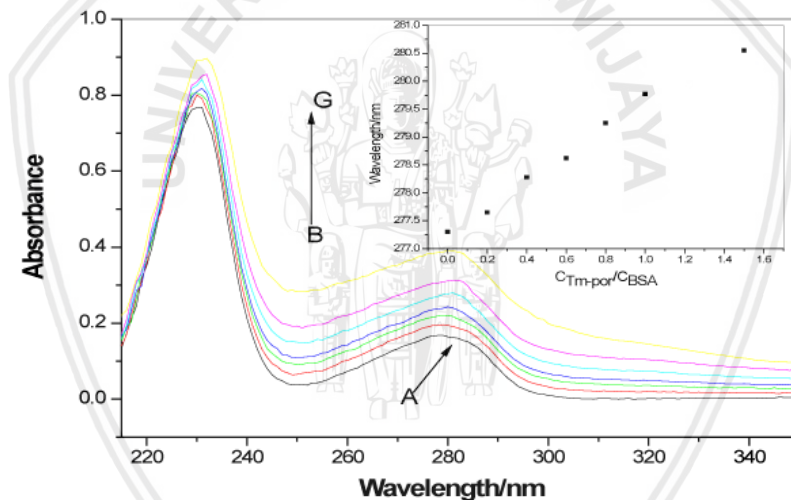
Selama bertahun-tahun, *high-performance liquid chromatography* (HPLC) telah banyak diterapkan dalam analisis karotenoid menggunakan fase gerak isokratik atau gradien baik di dalam fase normal maupun mode fase reversed. Karotenoid terisolasi dan dikarakterisasi dengan beberapa pengotor minor astaxanthin menggunakan kolom gel silika fase normal dengan n-heksana/aseton/tetrahidrofurannya sebagai fase gerak dan pengotor terkait yang teridentifikasi oleh spektroskopi EMS dan NMR. Terdapat penelitian yang mengembangkan metode HPLC fase *reverse* untuk menganalisis karotenoid di kulit udang tombak. HPLC fase *reverse* dengan pelarut umum, seperti etanol, metanol, asetonitril, dan air, digunakan untuk memisahkan karotenoid dalam berbagai bahan biologis (Lu dkk, 2010).

Penelitian lainnya mengembangkan metode HPLC fase *reverse* dengan aseton/air sebagai pelarut untuk menganalisis dan mengidentifikasi beberapa karotenoid dengan *liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry* (LC-APCI-MS). Namun, analisis astaxanthin dengan LC-APCI-MS sering ditemukan gagal menghasilkan puncak simetris, dan resolusi puncak karotenoid cenderung buruk. Terdapat juga penelitian yang menggunakan kolom *L-leucine kernalen Pirkle* (Regis, AS) untuk resolusi cepat dan dianalisis langsung dari stereoisom alltrans-astaxanthin, tetapi reproduktifitas menjadi rendah apabila diulang dengan kolom *L-leucine* identik. Selanjutnya, metode HPLC fase *reverse* berdasarkan kolom C30 dikembangkan untuk pemisahan isomer *cis/trans* karotenoid yang berbeda (Su dkk., 2002; Dugo dkk., 2008). Namun, kolom C30 tidak cocok untuk analisis rutin karena biayanya yang tinggi. Hingga saat ini, tidak ada laporan terkait metode yang konsisten dan simultan untuk karakterisasi astaxanthin sehingga penelitian ini mencoba untuk menggunakan analisis HPLC (Lu dkk, 2010).

2.7. Spektrofotometri UV Vis

Penelitian terkait dengan protein glikasi telah banyak dilakukan menggunakan spektrofotometri UV. Seperti pada penelitian Mallya dkk (2013), penggunaan spektrum UV dilaporkan memberikan sensitifitas yang tinggi dan deteksi spesifik pada absorbansi sampel haemoglobin terglykasi. Selain itu karena spektrofotometri UV mempunyai spesifitas kimia yang tinggi, penggunaan analisis ini menjadi salah satu pakem untuk teknik deteksi suatu penyakit yang non invasif.

Absorpsi spektrum biasanya dilakukan dengan molekul yang dilarutkan dalam pelarut transparan, seperti larutan bufer. Konsentrasi absorbansi zat terlarut bergantung secara linier, oleh karena itu, spektrofotometri UV sangat sesuai untuk pengukuran sampel secara kuantitatif. Panjang gelombang penyerapan dan kekuatan absorbansi suatu molekul tidak hanya bergantung pada sifat kimia melainkan juga pada lingkungan molekul kromofornya. Spektrofotometri merupakan teknik yang sangat baik untuk mengikuti reaksi pengikatan ligan, katalisis enzim, dan transisi konformasi dalam protein dan asam nukleat. Spektrofotometri UV sangat sensitif dan tidak destruktif, dan hanya membutuhkan sejumlah kecil sampel untuk analisis. Analisis spektrum UV untuk memperoleh profil spektrum komponen penyusun suatu material, seperti protein. Spektrum pada spektrofotometer UV menunjukkan penilaian terkait kestabilan material yang ditandai dengan tidak adanya perubahan spektrum apabila ditambahkan dengan material lain (Mallya dkk, 2013). Puncak spektrum untuk BSA terdapat pada panjang gelombang 230 nm sebagaimana profil spektrum UV ditampilkan pada Gambar 6 (Lu dkk, 2012).



Gambar 6. Contoh profil spektrum UV pada BSA (Lu dkk, 2012)

2.8. Electron spin resonance (ESR)

ESR merupakan alat yang digunakan untuk mengetahui perubahan konformasi fleksibilitas dan karakteristik pengikatan albumin di dalam produk plasma. Bentuk spektrum ESR merefleksikan status perputaran molekul probe termasuk karakter perubahan molekuler serta karakter material di dalam satu medium (daya listrik dan kekuatan magnetik). Kualitas karakter transportasi albumin dapat dianalisis dengan berbagai unit plasma menggunakan metode ESR yang mampu memberikan estimasi karakter albumin melalui pengujian perbedaan struktur molekuler albumin. Fungsi

transportasi albumin pada produk plasma dapat dipengaruhi oleh beberapa metode pengumpulan plasma, preparasi, dan filtrasi. (Testa, 2016).

Analisis spektrum ESR dilakukan dengan simulasi komputer yang mempunyai komponen dasar spin Hamilton dengan aksial anisotropi. Spektrum ESR dianalisis melalui simulasi, yang dilakukan dengan *fitting* persegi minimal dari spektrum model yang diukur secara eksperimental. Spektrum ESR terdiri dari sekumpulan besar titik data, yang dapat didekati dengan kurva spektral yang ideal. Selama simulasi, nilai untuk variabel spektrum simulasi akan memprediksi spektrum paling ideal. Nilai prediksi ini termasuk faktor g , konstanta struktur *hyperfine*, dan lebar garis yang dicirikan bentuk dan intensitas dari masing-masing komponen spektral (Kazmierczak dkk, 2006).

2.9. Viskometri

Albumin merupakan mayoritas protein penyusun plasma darah yang berperan penting didalam mekanisme sirkulasi dan kekentalan darah. Untuk menganalisis kekentalan albumin, dapat dilakukan uji viskositas melalui instrumen rheometer atau viskometer. Albumin normal diprediksi mempunyai kekentalan yang relatif lebih rendah dibandingkan dengan albumin terglikasi. Hasil analisis viskositas menghasilkan data kuantitatif berupa besar *centipoise/cP*.

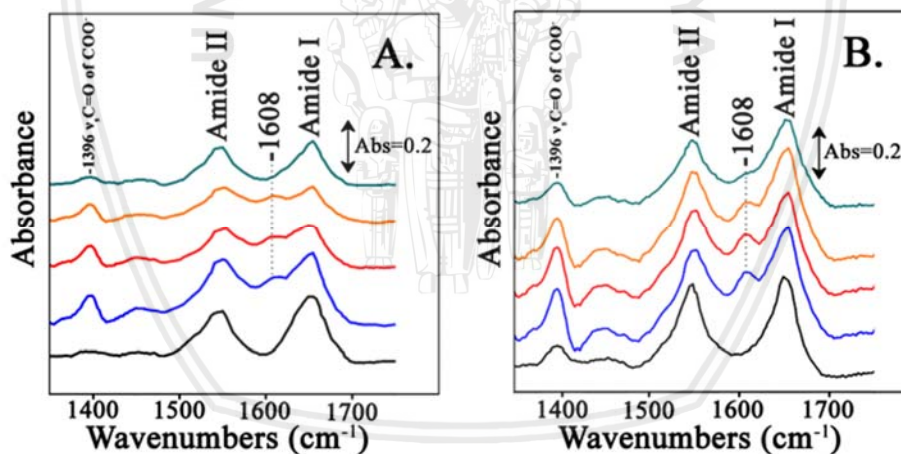
2.10. Fourier transform infrared spectrometer (FTIR)

Analisis FTIR akan menunjukkan spektra gugus fungsi suatu molekul dalam sampel yang diuji. Pada spektra FTIR terdapat sumbu X yang menunjukkan panjang gelombang (cm^{-1}) dan sumbu Y yang menunjukkan intensitas foton yang terserap (transmisi; %). Spektra FTIR menunjukkan profil serapan yang dititik beratkan pada *peak* atau puncak yang mendekati sumbu X. Beberapa *peak* akan lebih besar dibandingkan yang lain karena sifat polar molekul. Semakin banyak molekul polar, maka semakin kuat puncaknya. Pengulangan puncak ini juga dapat menentukan kekuatan dari molekul, bahkan molekul yang sama dapat mempunyai puncak yang berbeda. Terdapat pembagian daerah pembacaan spektra FTIR menjadi lima zona sebagaimana tabel 1 dan contoh spektra FTIR ditampilkan pada Gambar 7 dan 8. Mekanisme glikasi pada protein ditandai dengan spektra pada $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan gugus amida I dan amida II. Gugus amida I menunjukkan adanya $\text{C}=\text{O}$ (70-85%) yang mengikat gugus N-H dan ditandai dengan peningkatan intensitas spektra pada rentang panjang gelombang $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$. Gugus

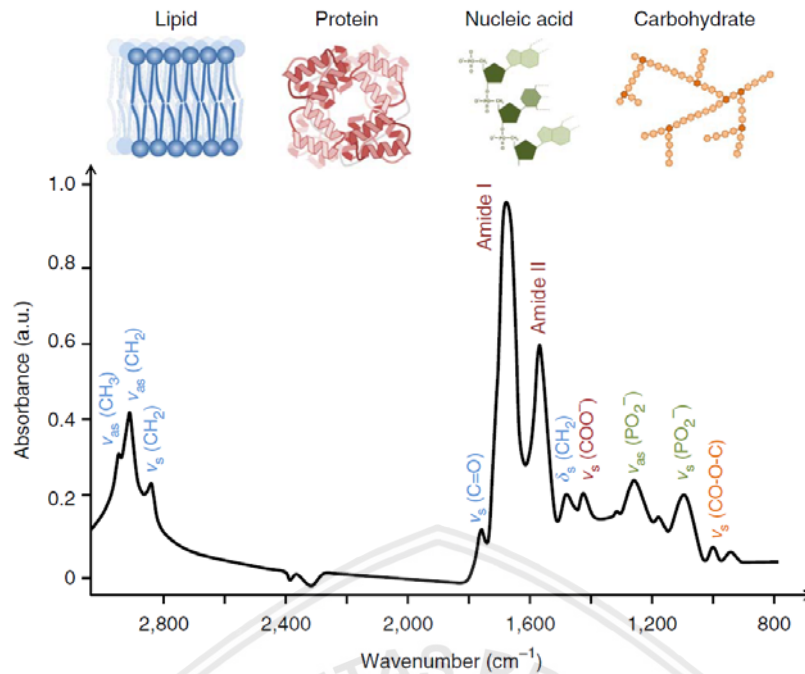
amida II menunjukkan adanya ikatan N-H (40-60%) dan C-N (18-40%) pada rentang panjang gelombang 1500-1600 cm^{-1} (Baker dkk, 2014; Ioannou & Varotsis, 2017).

Tabel 1. Pembagian zona panjang gelombang terkait dengan gugus fungsi yang terbaca pada spektra FTIR

Zona	Rentang Panjang Gelombang (cm^{-1})	Gugus Fungsi
1	3700-3200	Alkohol (O-H; 3650-3200 cm^{-1}), alkalina (=C-H; 3340-3250 cm^{-1}), N-H (3500-3200 cm^{-1})
2	3200-2700	Karbon Hidrogen (C-H; 3100-3000 cm^{-1}), Karbon Hidrogen Alkil (2960-2850 cm^{-1}), Aldehida ($\sim 2900 \text{ cm}^{-1}/\sim 2700 \text{ cm}^{-1}$), Asam Karboksilat (O-H; 3000-2500 cm^{-1})
3	2300-2000	Alkina (C \equiv C; 2260-2000 cm^{-1}), Nitril (C \equiv N, 2260-2220 cm^{-1})
4	1850-1650	Keton (C=O; 1750-1705 cm^{-1}), Aldehida (C=O; 1740-1720 cm^{-1}), Ester (C=O; 1750-1735 cm^{-1}), Asam Karboksilat (C=O; 1750-1700 cm^{-1}), Amida (C=O; 1690-1650 cm^{-1})
5	1680-1450	Alkena (C=C; 1680-1620 cm^{-1}), Benzena (C=C; 1500-1450 cm^{-1})



Gambar 7. Profil FTIR yang menunjukkan puncak amida I dan amida II (Ioannou & Varotsis, 2017)



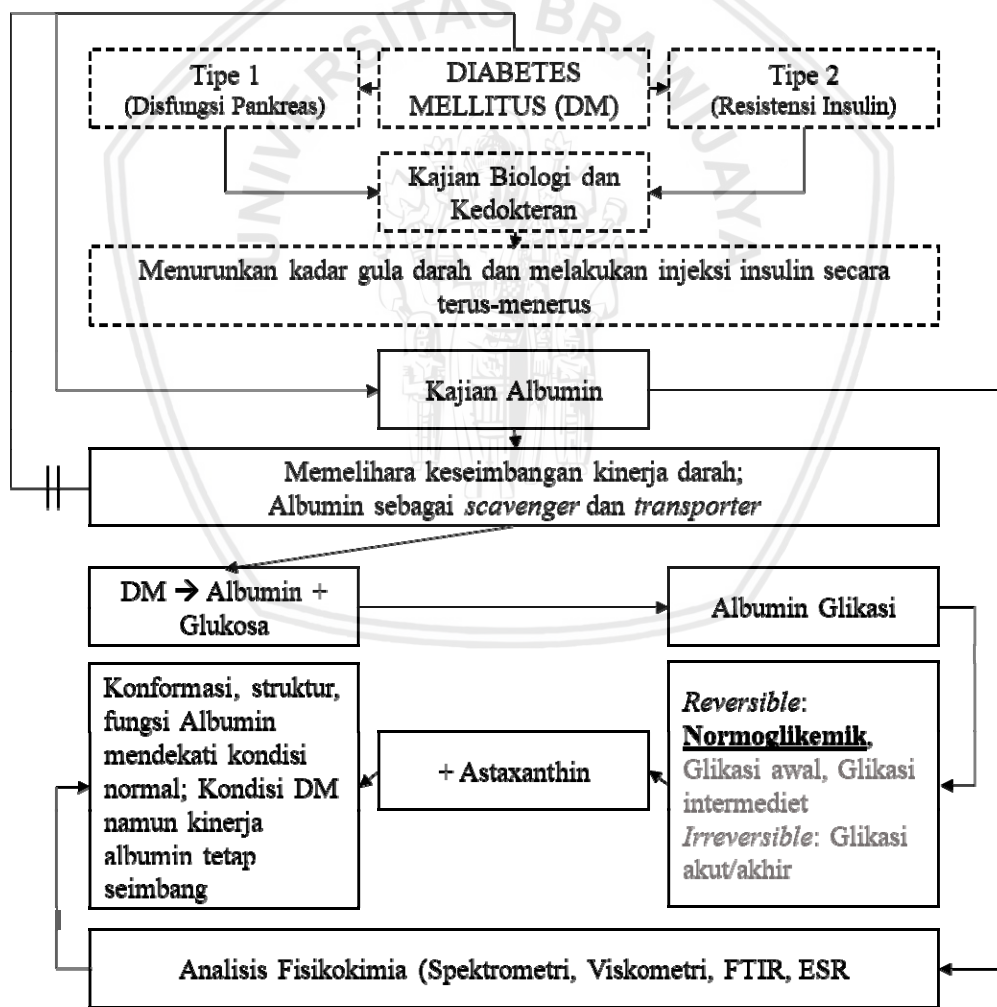
Gambar 8. Jenis spektrum pada kajian biologi yang menunjukkan puncak biomolekuler dari 3000-800 cm^{-1} (Baker dkk, 2014)

2.11. Kerangka Konsep Penelitian

Diabetes melitus (DM) merupakan salah satu penyakit metabolik yang terbagi menjadi dua jenis yaitu DM tipe 1 dan DM tipe 2. DM tipe 1 disebabkan oleh disfungsi pankreas sehingga produksi insulin berkurang daripada kondisi normal, sedangkan DM tipe 2 disebabkan oleh resistensi insulin terhadap kontrol kadar gula darah di dalam tubuh. Penanganan penyakit DM telah dikaji berdasarkan paradigma Biologi dan Kedokteran, namun, solusi yang diberikan adalah dengan menurunkan kadar gula darah dan melakukan injeksi insulin. Ketika terjadi suatu kondisi kadar gula darah tinggi, kemudian dilakukan injeksi insulin, maka kualitas hidup seseorang akan mengalami penurunan secara drastis.

Albumin berperan penting dalam menjaga rheologi darah berdasarkan peranannya sebagai agen transportasi. Di dalam permasalahan diabetes melitus, glukosa digunakan sebagai molekul penting yang dapat mempengaruhi rheologi albumin. Glikasi merupakan mekanisme penambahan karbohidrat non-enzimatik terhadap suatu protein sehingga memproduksi residu reaktif protein. Apabila glukosa terkonsentrasi di dalam albumin, maka, akan terjadi glikasi membentuk albumin terglykasi (*glycated albumin*). Terdapat tiga tahapan glikasi yaitu, glikasi awal, glikasi menengah dan glikasi akhir. Tahapan glikasi awal dan intermediet mempunyai karakteristik *reversible* sehingga albumin terglykasi dapat kembali mendekati albumin normal. Sedangkan, tahapan glikasi akhir mempunyai

karakteristik *irreversible* membentuk *advanced glycated end product* (AGE) sehingga albumin sulit untuk dikembalikan mendekati fungsi awalnya. Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini menggunakan albumin yang diglikasi dengan glukosa konsentrasi rendah yang diharapkan sebagai model glikasi awal atau menengah sehingga dapat menjadi pembuktian awal perbaikan albumin terglykasi. Astaxanthin merupakan pigmen karotenoid utama yang mempunyai kemampuan diesterifikasi dan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi. Penelitian ini menjadikan astaxanthin sebagai senyawa yang membantu dalam upaya perbaikan albumin terglykasi dalam hal peningkatan performa *scavenging* albumin. Kompleks albumin, glukosa dan astaxanthin akan memunculkan perubahan konfigurasi struktur gugus fungsi, viskositas, dan profil kinerja antioksidan yang dikaji berdasarkan pendekatan fisikokimia antara lain analisis spektrofotometri, viskometri, FTIR, dan ESR. Kerangka konsep diatas dijelaskan pada Gambar 9.



Gambar 9. Kerangka konsep penelitian

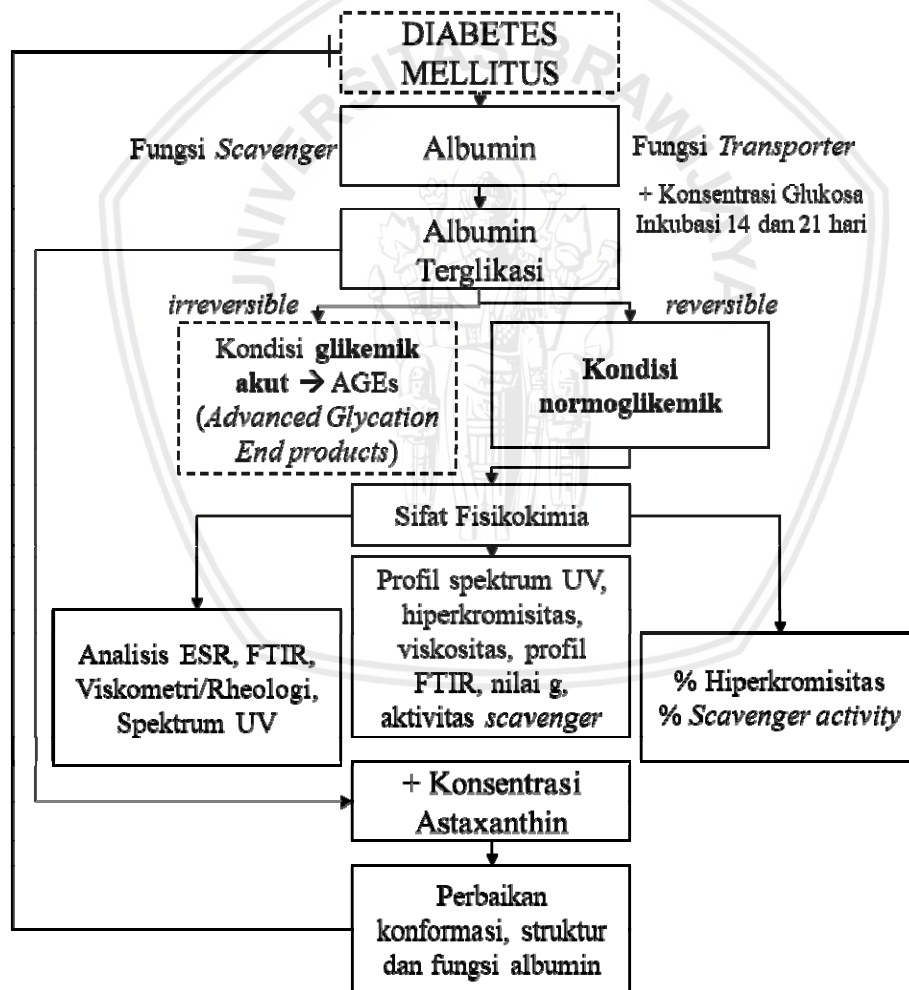
BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei-Desember 2018. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler, Laboratorium Fisiologi Hewan, Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya Malang; Laboratorium Organik, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya Malang; Laboratorium Fisika Lanjut, Jurusan Fisika FMIPA Universitas Brawijaya Malang.

3.2. Kerangka Operasional

Penelitian ini dilaksanakan berdasarkan kerangka operasional sebagaimana Gambar 10.



Gambar 10. Kerangka operasional

3.3. Glikasi

3.3.1. Larutan stok BSA dan glukosa

Preparasi sampel diawali dengan pembuatan larutan stok albumin, glukosa dan natrium azida. Larutan stok albumin menggunakan *bovine serum albumin* (BSA: BioWORLD, kemurnian 98%, cat#L18122302) dibuat dengan konsentrasi 10 mM dalam PBS ($\text{Cl}_2\text{H}_3\text{K}_2\text{Na}_3\text{O}_8\text{P}_2$) 0.1 M dengan pH 7.4. Larutan stok glukosa (Sigma-Aldrich) dibuat dengan konsentrasi 1 M dalam PBS 0.1 M dengan pH 7.4. Larutan stok natrium azida (Sigma-Aldrich) dibuat dengan konsentrasi 1% dalam PBS 0.1 M dengan pH 7.4. Larutan stok astaxanthin (AstaPlus) dibuat dengan konsentrasi 36.41 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dalam PBS 0.1 M dengan pH 7.4.

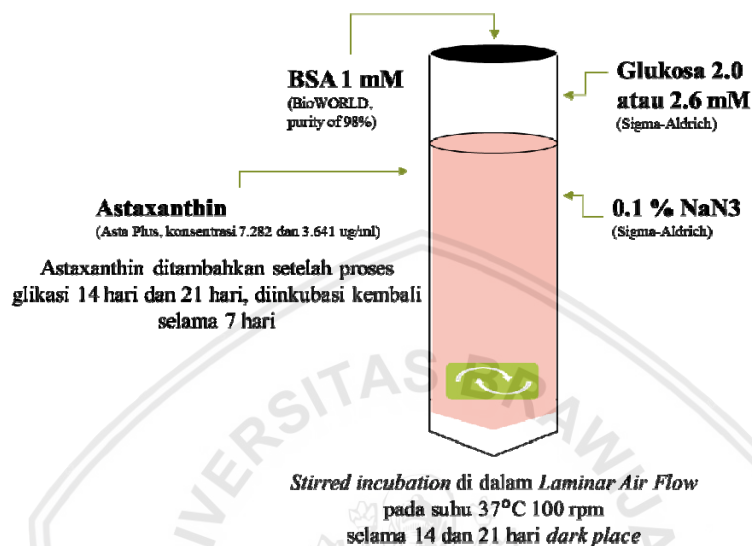
3.3.2. Ekstraksi astaxanthin melalui HPLC

Astaxanthin diekstrak dari kaplet komersil AstaPlus dengan metode ekstraksi etanol. Satu kaplet Astaplus digerus menggunakan mortar steril, disaring, dan dilarutkan ke dalam 1000 μl methanol absolut pada mikrotub 1.5 ml. Larutan ini disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm, 4°C, selama 10 menit, dan diisolasi bagian supernatant. Dibuat larutan stok astaxanthin 1000 μl konsentrasi 36.41 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dengan mengencerkan hasil ekstraksi astaxanthin sebanyak 45 μl ke dalam 955 μl PBS 0.1 M pH 7.4. Pemilihan kaplet AstaPlus dilakukan berdasarkan pemindaian beberapa merek suplemen yang mengandung astaxanthin, serbuk, terlarut di dalam etanol sehingga dapat lebih mudah untuk melakukan isolasi astaxanthin. Karena astaxanthin bersifat lipofilik atau hidrofobik, sehingga tidak dapat menggunakan pelarut berbasis air (polar). Etanol dipilih sebagai astaxanthin karena bersifat non polar. Etanol telah digunakan pada penelitian Reyes, dkk (2014) untuk melakukan ekstraksi astaxanthin dari mikroalga *Haematococcus pluvialis*.

Supernatan ekstrak astaxanthin dianalisis dengan HPLC (Shimadzu SCL 10 AVP, kolom Shim-pack VP ODS 5 μm 150 x 4.6 mm, 25°C) untuk mengetahui rata-rata konsentrasi massa dalam satuan $\mu\text{g}/\text{ml}$. Volume sampel astaxanthin yang digunakan sebanyak 100 μl , dirunning selama 15 menit, metode isokratik, dengan panjang gelombang 480 nm pada fase mobilisasi methanol : air : diklormetan : asetonitril (70:4:13:13).

3.3.3. Working solution

Working solution dibuat dengan melarutkan masing-masing BSA 10 mM, glukosa 1 M dan natrium azida 1% ke dalam PBS 0.1 M dengan pH 7.4 hingga mencapai konsentrasi BSA 1 mM, glukosa 2.0 dan 2.6 mM, dan natrium azida 0.1%. *Working solution* digunakan dalam menyusun komposisi sampel glikasi sebagaimana Gambar 11.



Gambar 11. Komposisi sampel dan mekanisme glikasi

3.3.4. Mekanisme Glikasi dan Penambahan Astaxanthin

Sampel glikasi dibuat dengan dua variasi glukosa (2.0 dan 2.6 mM) dimasukkan ke tabung steril berlapis *aluminium foil*, *stirred-incubation* (120 rpm, 37°C) di dalam *laminar air flow* selama 14 dan 21 hari. Setiap hari dilakukan pemantauan terhadap suhu dan kecepatan putaran inkubasi. Berikut ini merupakan penamaan untuk sampel glikasi (Tabel 2).

Tabel 2. Peta sampel

No	Nama Sampel	Waktu Glikasi (hari)	Konsentrasi BSA (mM)	Konsentrasi Glukosa (mM)	Konsentrasi NaN ₃ (%)	Konsentrasi Astaxanthin (µg/mL)
1	BG 2.0 14D	14	1	2.0	0.1	
2	BG 2.6 14D	14	1	2.6	0.1	
3	BG 2.0 21D	21	1	2.0	0.1	
4	BG 2.6 21D	21	1	2.6	0.1	
5	BG 2.0 14D + AE 7.282	14	1	2.0	0.1	7.282
6	BG 2.6 14D + AE 7.282	14	1	2.6	0.1	7.282
7	BG 2.0 21D + AE 7.282	21	1	2.0	0.1	7.282
8	BG 2.6 21D + AE 7.282	21	1	2.6	0.1	7.282
9	BG 2.0 14D + AE 3.641	14	1	2.0	0.1	3.641

No	Nama Sampel	Waktu Glikasi (hari)	Konsentrasi BSA (mM)	Konsentrasi Glukosa (mM)	Konsentrasi NaN ₃ (%)	Konsentrasi Astaxanthin (µg/mL)
10	BG 2.6 14D + AE 3.641	14	1	2.6	0.1	3.641
11	BG 2.0 21D + AE 3.641	21	1	2.0	0.1	3.641
12	BG 2.6 21D + AE 3.641	21	1	2.6	0.1	3.641

Sampel BG 2.0 14D dan BG 2.6 14D dipanen pada hari ke-14 kemudian masing-masing dibagi ke dalam tiga tabung steril berlapis *aluminium foil*. Ketiganya digunakan untuk sampel glikasi 14 hari, sampel yang ditambahkan astaxanthin 7.282 µg/ml (BG 2.0 14D + AE 7.282 dan BG 2.6 14D + AE 7.282) dan sampel yang ditambahkan astaxanthin 3.641 µg/ml (BG 2.0 14D + AE 3.641 dan BG 2.6 14D + AE 3.641). Tabung yang berisi sampel glikasi 14 hari disimpan dalam suhu -20°C untuk dianalisis lebih lanjut, sedangkan sampel glikasi 14 hari yang ditambahkan astaxanthin diinkubasi kembali (*stirred-incubation*; 120 rpm, 37°C) di dalam laminar air flow selama tujuh hari. Setelah inkubasi berjalan selama 7 hari seluruh sampel BG 14D yang masing-masing telah ditambah astaxanthin dipanen dan disimpan dalam suhu -20°C untuk dianalisis lebih lanjut.

Sampel BG 2.0 21D dan BG 2.6 21D dipanen pada hari ke-21 kemudian masing-masing dibagi ke dalam tiga tabung steril berlapis aluminium foil. Ketiganya digunakan untuk sampel glikasi 21 hari, sampel yang ditambahkan astaxanthin 7.282 µg/ml (BG 2.0 21D + AE 7.282 dan BG 2.6 21D + AE 7.282) dan sampel yang ditambahkan astaxanthin 3.641 µg/ml (BG 2.0 21D + AE 3.641 dan BG 2.6 21D + AE 3.641). Tabung yang berisi sampel glikasi 21 hari disimpan dalam suhu -20°C untuk dianalisis lebih lanjut, sedangkan sampel glikasi 21 hari yang ditambahkan astaxanthin diinkubasi kembali (*stirred-incubation*; 120 rpm, 37°C) di dalam laminar air flow selama 7 hari. Setelah inkubasi berjalan selama 7 hari, seluruh sampel BG 21D yang masing-masing telah ditambah astaxanthin dipanen dan disimpan dalam suhu -20°C untuk dianalisis lebih lanjut. Berdasarkan penelitian Abu-Gosh dkk (2017), pemilihan waktu tujuh hari merupakan waktu terpendek untuk meningkatkan akumulasi astaxanthin dengan BSA.

3.4. Spektrofotometri UV

Analisis spektrum UV (Thermo Spectronic: Genesys 10 UV spectrophotometer) diawali dengan penentuan panjang gelombang deteksi. Larutan BSA 10 mM diencerkan dalam *phosphate-buffered saline* (PBS) 0.1 M dengan pH 7.4 hingga didapat konsentrasi 1 mM. Glukosa 10 mM diencerkan dalam PBS 0.1 M dengan pH 7.4 hingga didapat konsentrasi 2.0, 2.2, 2.4, 2.6, 2.8, dan 3.0 mM. Keenam sampel tersebut kemudian diukur

spektrum absorbansi pada rentang panjang gelombang 200-400 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis mode survey scanned. Spektrum absorbansi BSA 1 mM, glukosa 2.0, 2.2, 2.4, 2.6, 2.8, dan 3.0 mM ditampilkan secara tumpang tindih (*overlay*) sehingga dapat ditentukan panjang gelombang optimum.

Analisis spektrum UV (Thermo Spectronic: Genesys 10 UV spectrophotometer) dilakukan untuk sampel BSA, glukosa, astaxanthin, glikasi, dan glikasi + astaxanthin. Analisis spektrum UV dilakukan dengan mode survey scanned pada rentang panjang gelombang 200-300 nm untuk mengetahui gugus *backbone* dan gugus aromatik asam amino sebagai konfigurasi *blue shift* dan *red shift* setiap sampel. Bagian ini menunjukkan adanya perubahan konformasi serapan BSA normal maupun terlikasi.

Analisis hiperkromisitas dilakukan berdasarkan selisih nilai absorbansi sampel (t) dan absorbansi BSA 1 mM (n) dibandingkan absorbansi BSA glikasi (g). Nilai absorbansi yang digunakan untuk mengukur hiperkromisitas didapatkan dari hasil pengukuran spektrum UV pada panjang gelombang 280 nm. Nilai yang muncul merupakan kuantifikasi profil seluruh sampel sehingga dapat diinterpretasikan perbedaannya. Persentase hiperkromisitas yang dicari adalah yang menunjukkan nilai paling rendah. Hal ini mengindikasikan bahwa sampel yang mempunyai persentase hiperkromisitas rendah semakin mendekati karakter BSA 1 mM. Peningkatan persentase hiperkromisitas mengindikasikan bahwa BSA mengalami denaturasi dan perubahan konformasi (Ansari & Dash, 2013). Hiperkromisitas dapat ditentukan berdasarkan persamaan 1.

$$\% \text{Hiperkromisitas} = \frac{([Abs\ t] - [Abs\ n])}{[Abs\ t]} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

Abs t = nilai absorbansi sampel

Abs n = nilai absorbansi BSA 1 mM normal

3.5. Viskometri

Analisis viskositas (Viskometer KPG Cannon-Feske Schott Gerate) dilakukan untuk seluruh sampel. Analisis ini digunakan untuk mengukur viskositas atau kekentalan pada masing-masing sampel sehingga dapat diketahui perubahan kekentalan sampel glikasi dibandingkan dengan sampel glikasi + astaxanthin. Berdasarkan Shen dkk (2019) dan Luers dkk (2012), BSA yang mengalami glikasi memberikan nilai viskositas yang lebih

tinggi dibanding sebelum terglikasi yang dijelaskan sebagai agregasi dan *cross-linking* dari BSA.

3.6. FTIR

Analisis FTIR (8400S/Shimadzu) dilakukan untuk sampel glikasi 14 dan 21 hari serta sampel glikasi + astaxanthin. Sebelum dilakukan analisis FTIR, semua sampel difreeze dry untuk menghilangkan molekul air yang dapat mengganggu proses pengukuran FTIR. Sampel glikasi yang telah difreeze dry berupa serbuk berwarna putih sedangkan sampel glikasi + astaxanthin berupa serbuk berwarna jingga. Analisis FTIR memberikan informasi utama terkait puncak gelombang (*peak*) dan intensitas yang dapat dijadikan pembuktian perubahan konformasi gugus fungsi semua sampel. Berdasarkan Baker dkk (2014), pengukuran spektra FTIR pada sampel biologi (lipid, protein, DNA maupun karbohidrat) difokuskan pada area spektra amida I dan amida II ($1500-1700\text{ cm}^{-1}$).

3.7. ESR

Analisis ESR diawali dengan membuat stok DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) konsentrasi 0.004% di dalam pelarut methanol 95% sebagai kontrol oksidan yang akan diujikan bersama semua sampel. Kemudian disiapkan tabung durham dan karet sumbat yang telah disterilisasi. Sampel sebanyak 42.86 ul diambil dan dihomogenasi ke dalam tabung mikrotub yang telah berisi 257.14 ul DPPH 0.004%. Spektra seluruh sampel diukur dalam suhu ruang (Wu & Yen, 2005). Analisa sampel menggunakan ESR (TDS 100 1B) berfungsi untuk mengukur kapasitas antioksidan astaxanthin dalam perbaikan BG berdasarkan nilai g sampel dan nilai g DPPH. Pengukuran ESR menunjukkan nilai frekuensi (f) dan kuat arus (I) (Zhang & Kim, 2019). Nilai tersebut digunakan untuk menentukan medan magnet (B) menggunakan persamaan berikut

$$B = \mu_0 \left(\frac{4}{\pi} \right) \frac{n}{r} I \dots\dots\dots (2)$$

$$\mu_0 = 1.2566 \times 10^{-6} \text{ Vs/Am}$$

n = jumlah lilitan pada kumparan Helmholtz (*n* = 320)

r = jari – jari kumparan Helmholtz (*r* = 6.8 cm)

I = kuat arus yang mengalir pada kumparan Helmholtz (A)

Selanjutnya, nilai medan magnet (B) digunakan untuk menghitung nilai g albumin (g-albumin) dan nilai g DPPH (g-DPPH) menggunakan rumus sebagaimana berikut.

$$g = \frac{hf}{\mu_B B} \dots\dots\dots (3)$$

h = konstanta Planck ($h = 6,625 \times 10^{-24} \text{ Am}^2$)

f = frekuensi resonansi (Hz)

μ_B = magneton Bohr ($\mu_B = 9,274078 \times 10^{-24} \text{ Am}^2$)

Nilai g-DPPH ditentukan secara khusus menggunakan rumus nilai g-DPPH sebagaimana berikut.

$$g \text{ - hitung DPPH} = \frac{g \text{ - referensi DPPH}}{g \text{ - terukur DPPH}} \dots\dots\dots (4)$$

$g \text{ - referensi DPPH} = 2,0036$

$g \text{ - terukur DPPH}$ = nilai g dari perhitungan nilai medan magnet (B)

Hasil perhitungan persamaan 3 digunakan untuk menghitung nilai g albumin terkalibrasi menggunakan rumus sebagaimana berikut.

$$g \text{ - kalibrasi albumin} = g \text{ - hitung DPPH} \times g \text{ - albumin} \dots\dots\dots (5)$$

Selanjutnya, kapasitas antioksidan ditentukan berdasarkan rumus sebagaimana berikut.

$$\text{Persentase scavenging} = \frac{g \text{ DPPH-g albumin}}{g \text{ DPPH}} \times 100\% \dots\dots\dots (6)$$

3.8. Atribut Objek Penelitian

Penelitian ini menggunakan BSA 1 mM, glukosa 2.0 dan 2.6 mM, astaxanthin 7.282 dan 3.641 µg/mL, natrium azida 0.1% sebagai objek penelitian yang diglikasi untuk mendapatkan kondisi normoglikemik. Objek penelitian ini akan bergantung pada karakter fisikokimia yang didapatkan dari persentase hiperkromisitas, profil spektrum FTIR, viskositas dan persentase scavenging.

Penelitian pendahuluan telah dilakukan untuk menentukan konsentrasi BSA dan glukosa yang selanjutnya dianalisis spektrofotometri UV. Standar protein yang ideal untuk pengukuran kuantifikasi protein adalah sampel protein murni yang akan diuji pada suatu sampel. Namun hal tersebut tidak selalu menjadi pilihan karena jika protein murni tidak tersedia, terlalu mahal, dan sulit didapatkan maka penggunaan BSA dapat dijadikan alternatif. BSA merupakan protein globular yang sering dijadikan standar konsentrasi protein dalam penelitian laboratorium dan aplikasi biokimia. BSA banyak bermanfaat karena tidak memerlukan stabilisasi yang rumit dalam pengaruh reaksi biokimia yang berbeda. Aspek lain yang bermanfaat dari BSA adalah berukuran kecil dan mudah dalam penyimpanannya. Penggunaan BSA sudah sangat lazim sejak pengukuran protein Bradford dilakukan pertama kali pada tahun 1976. BSA mempunyai karakter seperti sensitivitas, kompatibilitas dengan material lain dalam sampel, linearitas kurva standar, dan variasi protein untuk hasil yang konsisten (Brady & Macnaughtan, 2015). Glikasi terjadi dalam aliran darah ke sebagian kecil struktur gula sederhana yang diserap seperti glukosa, fruktosa dan galaktosa. Penggunaan glukosa dalam penelitian berdasar pada keseluruhan penelitian terkait glikasi menggunakan glukosa (Rondeau dkk, 2010; Zurawska-Plaksej dkk, 2018). Natrium azida banyak digunakan dalam penelitian glikasi sebagai agen preservasi, pengondisian aseptis, dan antibiotik. Natrium azida berperan sebagai bakteristatik dengan menghambat sitokrom oksidase dalam bakteri gram negatif, gram positif (seperti Streptococcus, Pneumococcus, dan Lactobacillus) secara intrinsic resisten (Perez Gutierrez, 2012; Perez Gutierrez, 2013). Konsentrasi natrium azida yang digunakan adalah 0.1% karena berdasarkan penelitian Zurawska-Plaksej dkk (2018), konsentrasi ini efektif untuk preservatif glikasi selama 21 hari pada phosphate-buffered saline (PBS) 0.1 M dengan pH 7.4

Konsentrasi BSA 1 mM digunakan karena berdasarkan penelitian He dkk (2014) dan Khoirunnisa dkk (2019) konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi kritis yang larut (soluble) dengan pelarut berbasis air (misalnya PBS). Penelitian pendahuluan dilakukan untuk menentukan konsentrasi glukosa 2.0, 2.2, 2.4, 2.6, 2.8 dan 3.0 mM. Konsentrasi yang digunakan adalah 2.0 dan 2.6 karena sebelumnya telah melakukan analisis spektrofotometri UV pada rentang 2-5 mM dan kedua konsentrasi tersebut memberikan nilai hiperkromisitas yang lebih rendah dibandingkan konsentrasi lainnya. Penelitian pendahuluan juga dilakukan untuk penentuan konsentrasi astaxanthin yang digunakan. Konsentrasi astaxanthin dari 36.41 $\mu\text{g/mL}$ hingga 3.461 $\mu\text{g/mL}$ dipindai berdasarkan analisis spektrofotometri UV dengan membandingkan BSA 1 mM. Konsentrasi astaxanthin

7.282 dan 3.641 $\mu\text{g/mL}$ mempunyai profil yang mendekati BSA 1 mM. Larutan buffer berbasis air yang digunakan adalah PBS 0.1. M ph 7.4. Larutan buffer membantu untuk menjaga konsistensi pH sampel. Osmolaritas dan konsentrasi ion di dalam larutan buffer tersebut sesuai dengan cairan isotonic tubuh, sehingga banyak digunakan pada penelitian *in vitro* dan *in vivo* (He dkk, 2014).

Penggunaan kecepatan 120 rpm menyesuaikan dengan penelitian Rondeau dkk (2010) dan Zurawska-Plaksej dkk (2018). Suhu 37°C digunakan karena menyesuaikan dengan suhu fisiologis tubuh. Beberapa penelitian sebelumnya menggunakan suhu 50°C menghasilkan AGEs sehingga kurang sesuai dengan target penelitian ini (kondisi normoglikemik).



BAB IV

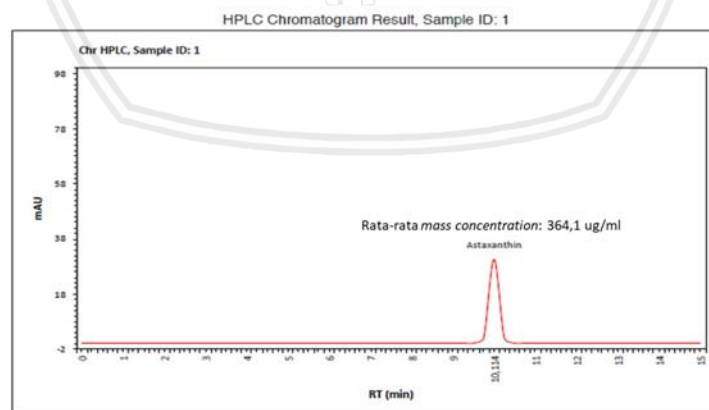
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

Penelitian ini dianalisis berdasarkan spektrofotometri UV, viskometri, FTIR dan ESR. Penampakan sampel BSA sebelum dilakukan glikasi berwarna jernih, sedangkan setelah 14 dan 21 hari berubah menjadi lebih keruh. Penampakan sampel BSA glikasi yang ditambahkan astaxanthin sebelum dilakukan inkubasi berwarna jingga jernih, sedangkan setelah glikasi 14 dan 21 hari berubah menjadi jingga-keruh. Proses glikasi dilakukan di dalam *laminar air flow* untuk meminimalkan kontaminasi dan menggunakan metode *stirred-incubation* untuk memaksimalkan homogenasi sampel serta menjaga konsistensi suhu pada seluruh bagian sampel.

4.1.1. Astaxanthin

Astaxanthin yang digunakan adalah Asta Plus (Simex, Indonesia) dan merupakan produk suplemen yang dijual bebas. Berdasarkan informasi pada kemasan Asta Plus terkandung astaxanthin 4 mg dan selenium 15 mcg. Massa satu kaplet Asta Plus adalah 650 mg yang kemudian digerus dengan mortar sehingga mendapatkan serbuk Asta Plus. Analisis HPLC pada panjang gelombang 480 nm selama 15 menit pada suhu kolom 25 °C menunjukkan rata-rata konsentrasi massa 364,1 µg/ml (Gambar 12). Nilai rata-rata konsentrasi massa ini yang kemudian dijadikan dasar perhitungan konsentrasi astaxanthin yang digunakan dalam perlakuan.

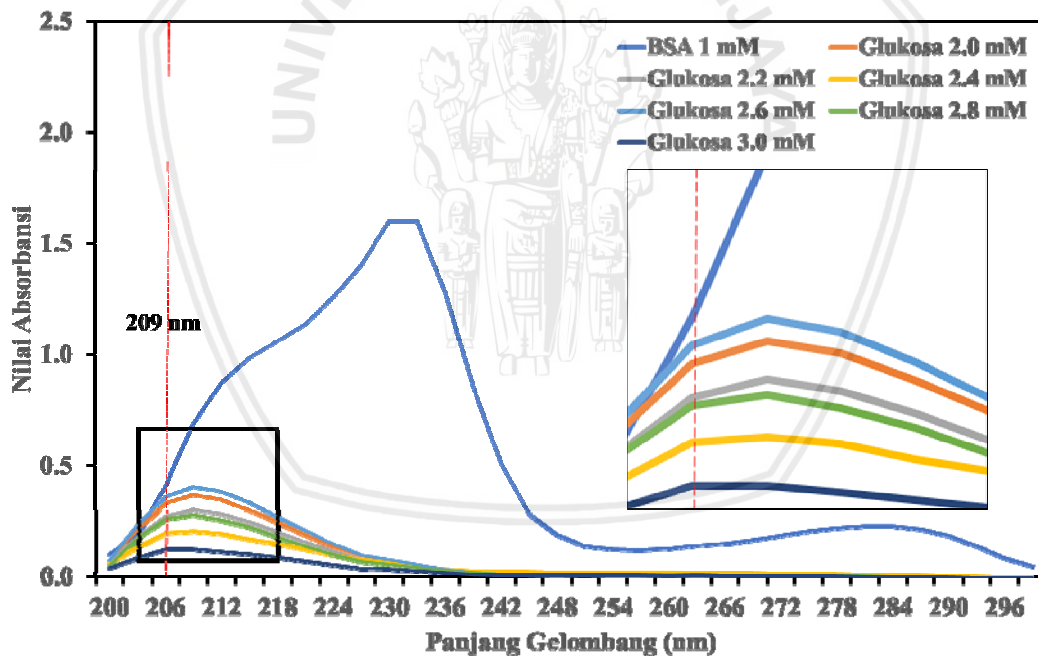


Gambar 12. Hasil analisis rata-rata konsentrasi massa astaxanthin dalam 1 kaplet *asta plus* menggunakan HPLC berdasarkan panjang gelombang 480 nm setama 15 menit pada suhu kolom 25°C

4.1.2. Spektrofotometri UV

Analisis spektrum UV dilakukan pada sampel glukosa, BSA, BG, dan BG dengan penambahan astaxanthin berdasarkan rentang panjang gelombang 200-300 nm. Spektrum BSA 1 mM dijadikan spektrum dasar penentuan konsentrasi glukosa yang akan digunakan dalam proses glikasi. Secara umum, dengan peningkatan konsentrasi BSA mengindikasikan bahwa terdapat BSA yang terlarut di dalam PBS.

Berdasarkan Gambar 13, analisis spektrum UV glukosa 2.0-3.0 mM menunjukkan absorbansi tertinggi pada Panjang gelombang ~209 nm. Di antara lima konsentrasi glukosa yang dianalisis, konsentrasi glukosa 2.0 dan 2.6 mM mempunyai nilai absorbansi tertinggi (masing-masing 0.404 dan 0.367) dibandingkan dengan konsentrasi glukosa lainnya. Hal ini membuat kedua konsentrasi glukosa tersebut lebih mendekati nilai absorbansi BSA 1 mM pada Panjang gelombang yang sama yaitu 0.685. Profil spektrum UV BSA dan glukosa berbeda pada puncak nilai absorbansi. Berdasarkan hasil tersebut, konsentrasi glukosa 2.0 dan 2.6 mM digunakan lebih lanjut untuk mekanisme glikasi BSA 1 mM.



Gambar 13. Hasil spektrofotometri UV glukosa 2.0 mM – 3.0 dibandingkan dengan spektrum BSA 1 mM. Hasil *screening* menunjukkan bahwa glukosa dengan konsentrasi 2.0 mM dan 2.6 mM mempunyai spektra mendekati BSA 1 mM yang diprediksi lebih kompatibel dengan BSA 1 mM

Berdasarkan waktu glikasi 14 hari, pada BG 2.0 dan BG 2.6 setelah penambahan astaxanthin, didapatkan profil spektrum UV sebagaimana Gambar 14. Profil spektrum BG 2.0 dan BG 2.6 dibandingkan dengan BSA 1 mM berbeda pada daerah panjang gelombang lebih dari 236 nm. Spektrum UV BG 2.0 dan BG 2.6 memiliki tiga puncak gelombang, yaitu pada 230 nm, 248 nm, dan 260 nm sedangkan BSA 1 mM hanya ada di puncak 230 nm. Namun demikian, diawali pada panjang gelombang 278 nm, spektrum UV semua sampel sama-sama konstan meskipun nilai absorbansi lebih tinggi pada sampel BG 2.0 dan BG 2.6. Apabila dibandingkan dengan spektra glukosa, profil spektra BG 2.0 dan 2.6 berbeda.

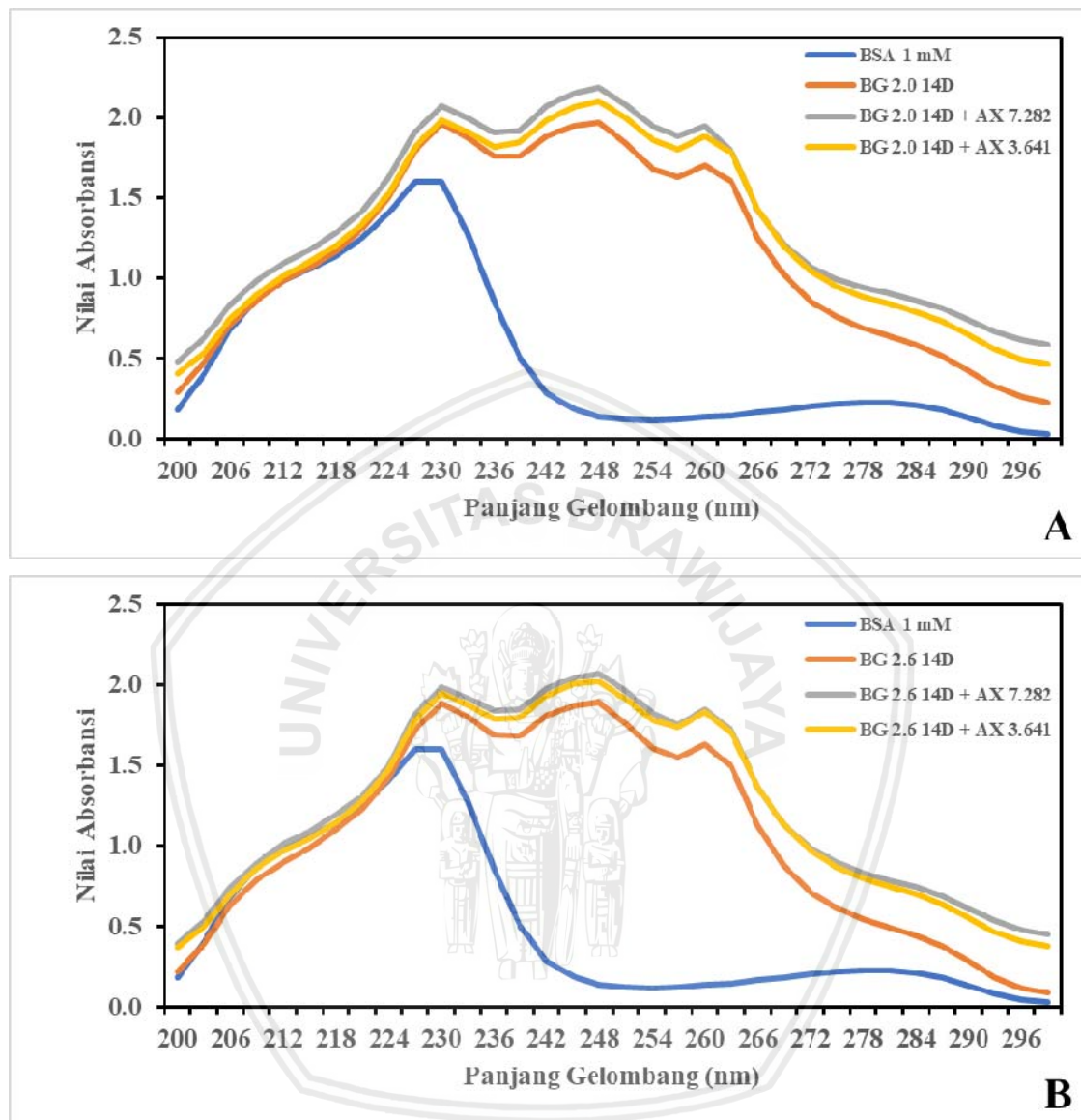
Nilai absorbansi sampel BG 2.0 dan BG 2.6 yang telah ditambahkan astaxanthin (konsentrasi 7.282 dan 3.641 $\mu\text{g/mL}$) pada spektra *backbone* (230 nm) mempunyai profil yang sama dengan BSA 1 mM. Berdasarkan spektra pada panjang gelombang 230 nm, BSA 1 mM, sampel BSA glikasi, maupun sampel BSA glikasi setelah penambahan astaxanthin mempunyai nilai absorbansi maksimum dibandingkan dengan panjang gelombang 227 nm dan 233 nm. Demikian pula pada puncak 248 nm dan 260 nm sampel selain BSA 1 mM, juga mempunyai nilai absorbansi maksimum dibanding panjang gelombang 245 nm dan 251 nm serta 257 nm dan 263 nm. Nilai absorbansi pada tiga panjang gelombang tersebut dapat diketahui pada Tabel 3. Nilai absorbansi yang semakin mendekati nilai absorbansi BSA 1 mM dikategorikan sebagai karakter yang mendekati BSA 1 mM.

Tabel 3. Nilai absorbansi sampel BSA 1 mM dan sampel BSA glikasi 14 hari pada panjang gelombang 230 nm, 248 nm, dan 260 nm

No.	Nama Sampel	Puncak panjang gelombang (nm)		
		230	248	260
1	BSA 1 mM	1.598	-	-
2	BG 2.0 14D	1.960	1.967	1.705
3	BG 2.0 14D + AX 7.282	2.074	2.189	1.948
4	BG 2.0 14D + AX 3.641	1.982	2.097	1.886
5	BG 2.6 14D	1.885	1.892	1.630
6	BG 2.6 14D + AX 7.282	1.988	2.075	1.848
7	BG 2.6 14D + AX 3.641	1.945	2.019	1.830

Spektra pada gugus aromatik asam amino juga masih terjaga sehingga diprediksi mekanisme glikasi masih mampu mempertahankan konformasi BSA. Konsentrasi glukosa maupun astaxanthin yang lebih tinggi telah terkonfirmasi dapat memicu perubahan konformasi BSA sehingga dengan menggunakan konsentrasi yang lebih rendah dapat lebih

efektif mempercepat waktu glikasi. Hal ini dapat dijadikan referensi dalam mengondisikan albumin dalam kondisi normoglikemik.



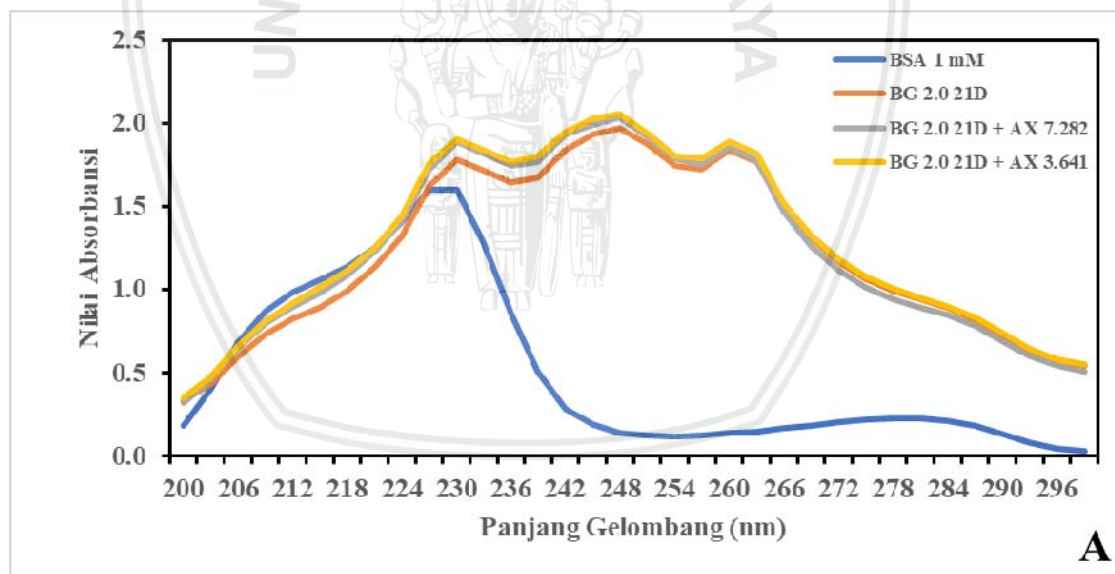
Gambar 14. Hasil spektrofotometri UV BG 2.0 mM dan 2.6 mM dibandingkan dengan spektra BSA 1 mM glikasi 14 hari dan penambahan astaxanthin. Konsentrasi glukosa 2.0 dan 2.6 mM dan astaxanthin 7.282 dan 3.641 µg/ml membuat salah satu puncak spektra yang terbentuk mendekati puncak spektra BSA 1 mM.

Berdasarkan waktu glikasi 21 hari, puncak spektra *backbone* 230 nm ada di semua sampel. Di antara konsentrasi astaxanthin yang ditambahkan, sampel BG 2.0 maupun BG 2.6 penambahan astaxanthin 7.282 µg/mL dan 3.641 µg/mL mempunyai nilai absorbansi yang lebih mendekati BSA 1 mM sehingga kedua konsentrasi astaxanthin inilah yang

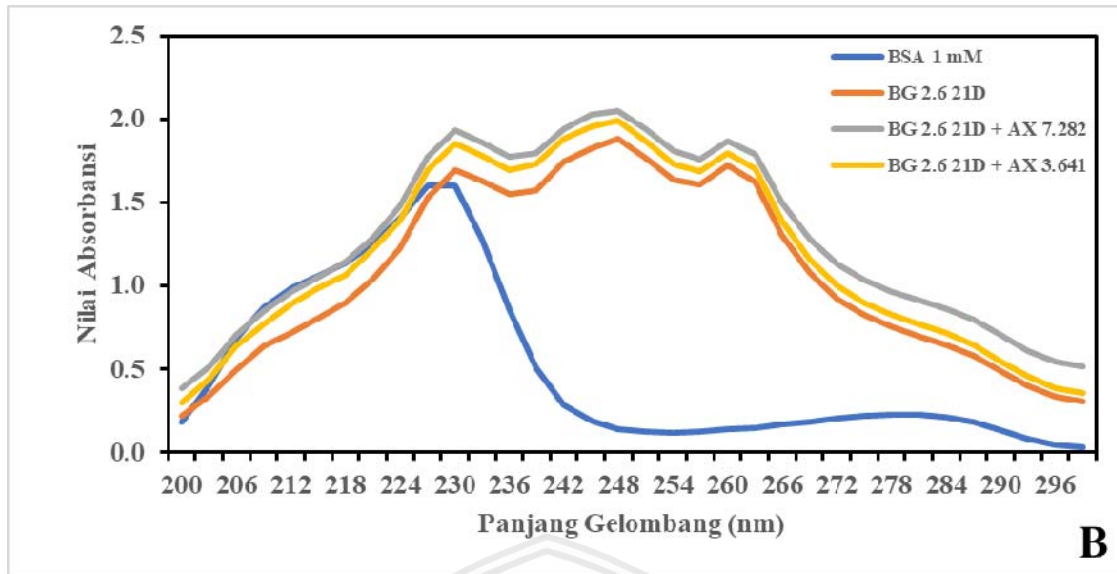
kemudian diprediksi secara efektif menjadikan nilai absorbansi BSA glikasi mendekati profil BSA 1 mM dibandingkan dengan nilai absorbansi sampel BSA glikasi 14 hari pada puncak yang sama (Gambar 15). Nilai absorbansi yang lebih mendekati BSA 1 mM menjadikan waktu glikasi 21 hari lebih efektif dalam membentuk kondisi normoglikemik pada BSA (Tabel 4). Konsentrasi astaxanthin sebesar 3.641 $\mu\text{g/mL}$ diprediksi efektif memperbaiki BSA glikasi glikasi 21 hari dibandingkan astaxanthin 7.282 $\mu\text{g/mL}$. Hasil ini dapat lebih mudah dipahami pada skema Gambar 16.

Tabel 4. Nilai absorbansi sampel BSA 1 mM dan sampel BSA glikasi 21 hari pada panjang gelombang 230 nm, 248 nm, dan 260 nm

No.	Nama Sampel	Puncak panjang gelombang (nm)		
		230	248	260
1	BSA 1 mM	1.598	-	-
2	BG 2.0 21D	1.781	1.967	1.837
3	BG 2.0 21D + AX 7.282	1.890	2.034	1.861
4	BG 2.0 21D + AX 3.641	1.906	2.059	1.890
5	BG 2.6 21D	1.693	1.880	1.723
6	BG 2.6 21D + AX 7.282	1.933	2.051	1.872
7	BG 2.6 21D + AX 3.641	1.856	1.992	1.794



A

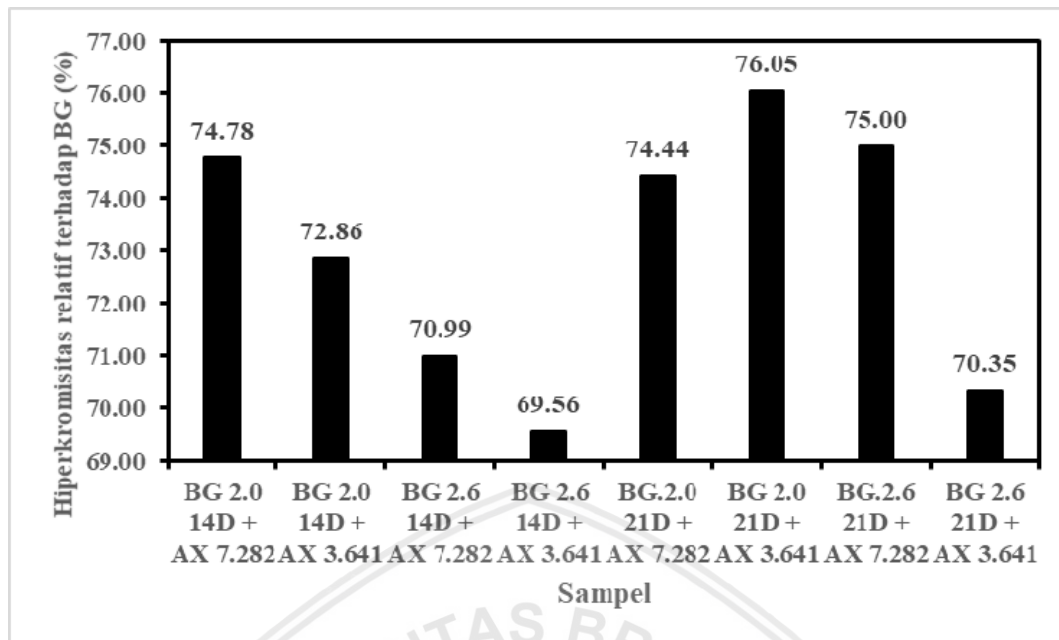


Gambar 15. Hasil spektrofotometri UV BG 2.0 mM dan 2.6 mM dibandingkan dengan spektra BSA 1 mM setelah glikasi 21 hari dan penambahan astaxanthin. Konsentrasi glukosa 2.0 dan 2.6 mM dan astaxanthin 7.282 dan 3.641 $\mu\text{g}/\text{mL}$ menjadikan spektra yang terbentuk lebih mendekati BSA 1 mM dibandingkan BSA glikasi dengan glikasi 14 hari.

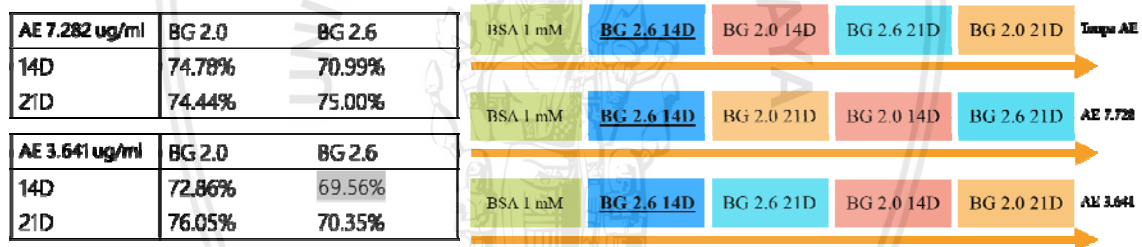
AE 7.282 $\mu\text{g}/\text{ml}$	BG 2.0	BG 2.6	BSA 1 mM	BG 2.6 21D	BG 2.0 21D	BG 2.6 14D	BG 2.0 14D	Tipe AE
14D	2.074	1.988						AE 7.282
21D	1.890	1.933						
AE 3.641 $\mu\text{g}/\text{ml}$	BG 2.0	BG 2.6	BSA 1 mM	BG 2.6 21D	BG 2.0 21D	BG 2.6 14D	BG 2.0 14D	AE 3.641
14D	1.982	1.945						AE 3.641
21D	1.906	1.856						

Gambar 16. Skema hasil analisis spektrofotometri UV yang menunjukkan bahwa sampel BG 2.6 21D + AE 3.641 $\mu\text{g}/\text{mL}$ memiliki nilai absorbansi terendah pada Panjang gelombang 230 nm.

Analisis hiperkromisitas ditinjau dari perhitungan nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm. Berdasarkan rumus persamaan (1), didapatkan hasil perhitungan persentase hiperkromisitas sesuai dengan Gambar 17 dan 18. Sampel BG 2.6 14D + AX 3.641 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mempunyai persentase hiperkromisitas terendah sebesar 69.56%. Persentase hiperkromisitas yang rendah menunjukkan adanya peningkatan kemampuan sampel di dalam menyerap sinar UV pada panjang gelombang 280 nm. Berdasarkan Gambar 17, astaxanthin 3.641 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diprediksi mempunyai peran di dalam memperbaiki BSA glikasi 21 hari. Dibandingkan dengan BSA glikasi 14 hari, waktu glikasi 21 hari dengan glukosa 2.0 mM menjadi lebih efektif dalam membentuk kondisi normoglikemik karena mempunyai persentase hiperkromisitas yang lebih tinggi.



Gambar 17. Persentase hiperkromisitas BG 2.0 dan BG 2.6 14 dan 21 hari setelah penambahan berbagai konsentrasi astaxanthin.



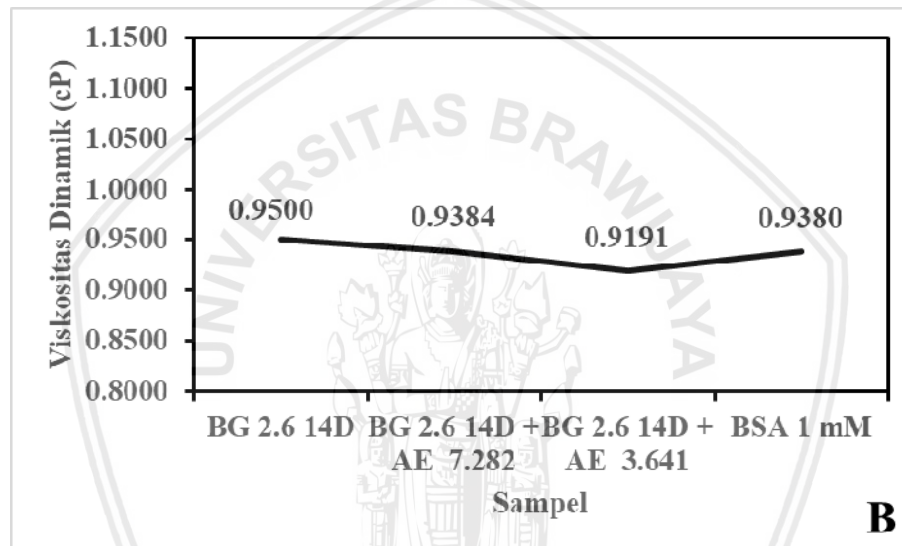
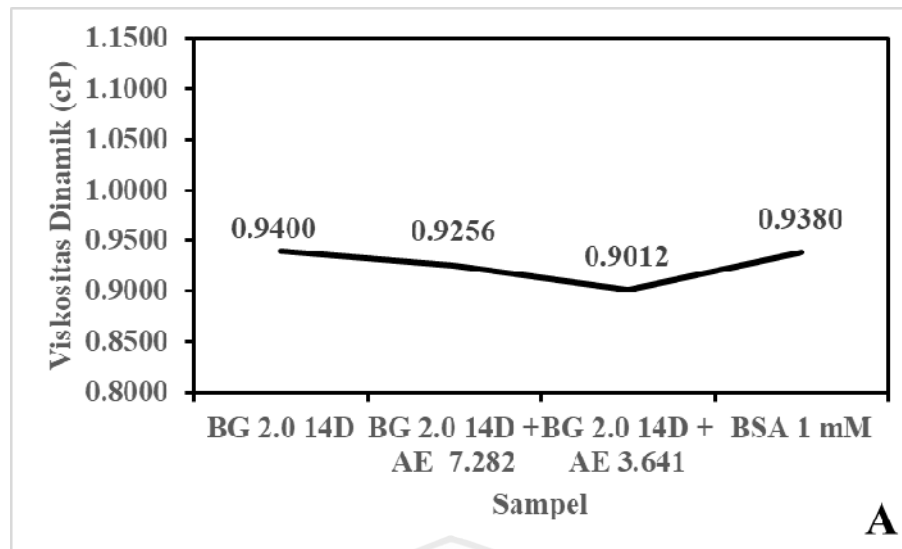
Gambar 18. Skema persentase hiperkromisitas (panjang gelombang 280 nm) yang menunjukkan bahwa BG 2.6 14D + AE 3.641 $\mu\text{g/mL}$ memiliki persentase hiperkromisitas terendah.

4.1.3. Viskometri

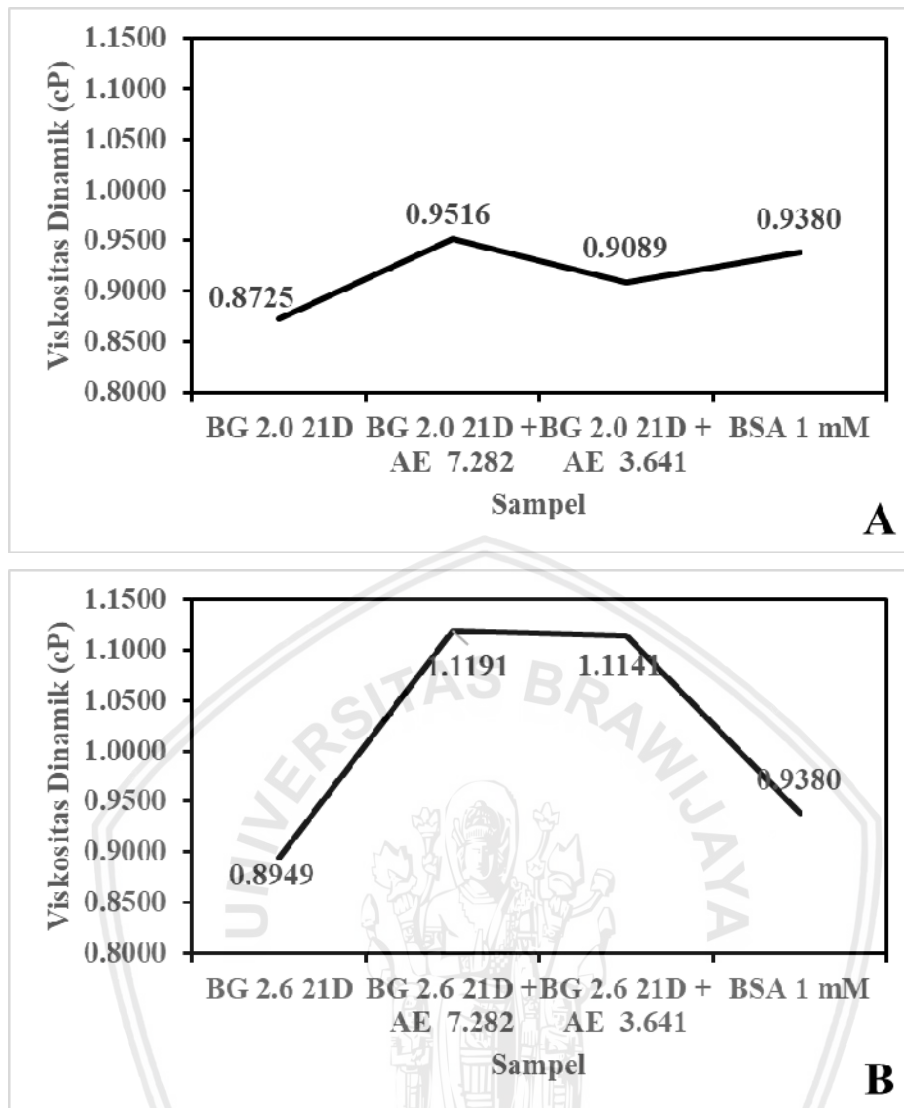
Analisis viskositas merupakan analisis yang digunakan untuk mengidentifikasi kekentalan suatu sampel larutan. Analisis viskositas pada sampel BG 2.0 dan BG 2.6 14 dan 21 hari mempunyai nilai viskositas dinamik sebagaimana Gambar 19 dan 20. Nilai viskositas dinamik BSA 1 mM (0.9389 cP) digunakan sebagai dasar perhitungan selisih nilai viskositas BSA glikasi dan BSA glikasi setelah penambahan astaxanthin. Berdasarkan Gambar 19, nilai viskositas dinamik pada sampel BG 2.0 14 hari mengalami peningkatan sebesar 0.0020 cP dibanding BSA 1 mM. BSA glikasi 2.0 14 hari setelah penambahan astaxanthin 7.282 $\mu\text{g/mL}$ mempunyai nilai viskositas yang menurun 0.0124 menjadi

0.9256 cP. Sedangkan pada sampel BSA glikasi setelah penambahan astaxanthin 3.642 $\mu\text{g}/\text{mL}$, nilai viskositas semakin menurun (0.0368) menjadi 0.9012 cP. Pada konsentrasi glukosa yang lebih tinggi (2.6 mM), peningkatan nilai viskositas pada sampel BSA glikasi juga terjadi sebesar 0.0120 menjadi 0.9500 cP dibanding BSA 1 mM. Setelah penambahan astaxanthin 7.482 $\mu\text{g}/\text{mL}$ peningkatan tidak signifikan juga terjadi sebesar 0.0004 menjadi 0.9384 cP. Namun, pada penambahan astaxanthin yang lebih rendah, nilai viskositas menurun 0.0189 menjadi 0.9191 cP. Setelah dibandingkan dengan BSA glikasi, penambahan astaxanthin dengan konsentrasi lebih rendah (3.642 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mampu menurunkan viskositas sebesar 0.0364 menjadi 0.9089 cP.

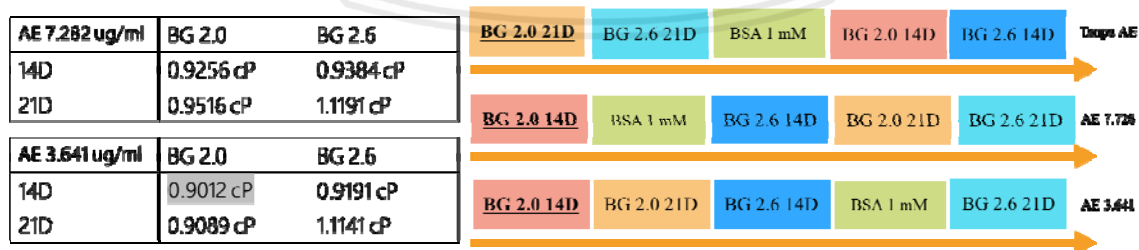
Berdasarkan Gambar 20, nilai viskositas dinamik pada sampel BG 2.0 21 hari mengalami penurunan menjadi 0.8725 cP dibanding BSA 1 mM. BSA glikasi 2.0 21 hari setelah penambahan astaxanthin 7.282 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mempunyai nilai viskositas yang 0.9516 cP. Sedangkan pada sampel BSA glikasi setelah penambahan astaxanthin 3.642 $\mu\text{g}/\text{mL}$, nilai viskositas menjadi 0.9089 cP. Apabila dibandingkan dengan BG 2.0 mM, nilai viskositas BG 2.0 setelah penambahan astaxanthin 7.282 $\mu\text{g}/\text{mL}$ menjadi 0.9516 cP. Demikian pula pada penambahan astaxanthin yang lebih rendah, nilai viskositas meningkat menjadi 0.9089 cP. Pada konsentrasi glukosa yang lebih tinggi (2.6 mM), nilai viskositas BSA glikasi justru menurun menjadi 0.8949 cP namun meningkat signifikan setelah ditambah astaxanthin. BSA glikasi setelah penambahan astaxanthin mempunyai nilai viskositas yang meningkat secara signifikan menjadi 1.1191 cP untuk astaxanthin 7.282 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan 1.1141 cP untuk astaxanthin yang lebih rendah dibandingkan dengan BSA 1 mM. Hal yang sama juga terjadi apabila nilai viskositas BSA glikasi setelah penambahan astaxanthin dibandingkan dengan BG 2.6 21 hari. Nilai viskositas yang lebih rendah diprediksi mampu menurunkan kekentalan atau rheologi dari BSA glikasi dengan penambahan astaxanthin. Skema Gambar 21 memberikan pemahaman lebih mudah terkait BG 2.0 14D + AE 3.641 $\mu\text{g}/\text{mL}$ yang mempunyai nilai viskositas paling rendah.



Gambar 19. Viskositas dinamik pada sampel BSA 1 mM dibandingkan BSA glikasi 2.0 mM (A) dan 2.6 mM (B) 14 hari, kemudian dilanjutkan dengan penambahan astaxanthin konsentrasi 7.282 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan 3.641 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



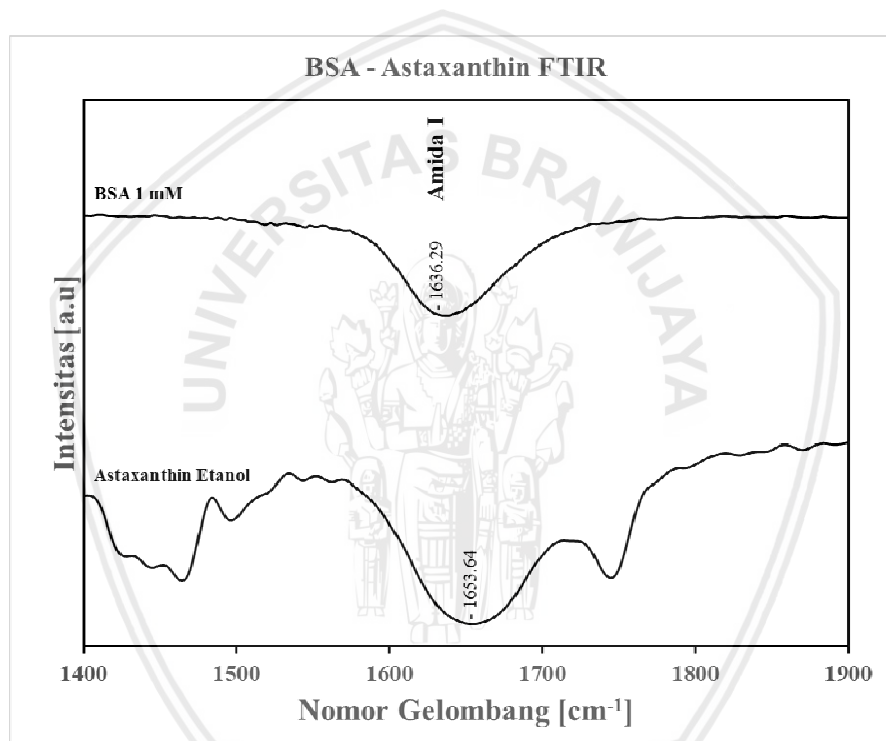
Gambar 20. Viskositas dinamik pada sampel BSA 1 mM dibandingkan BSA glikasi 2.0 mM (A) dan 2.6 mM (B) 21 hari, kemudian dilanjutkan dengan penambahan astaxanthin konsentrasi 7.282 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan 3.641 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



Gambar 21. Skema nilai viskositas dinamik yang menunjukkan bahwa BG 2.0 14D + AE 3.641 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mempunyai nilai viskositas paling rendah.

4.1.4. FTIR

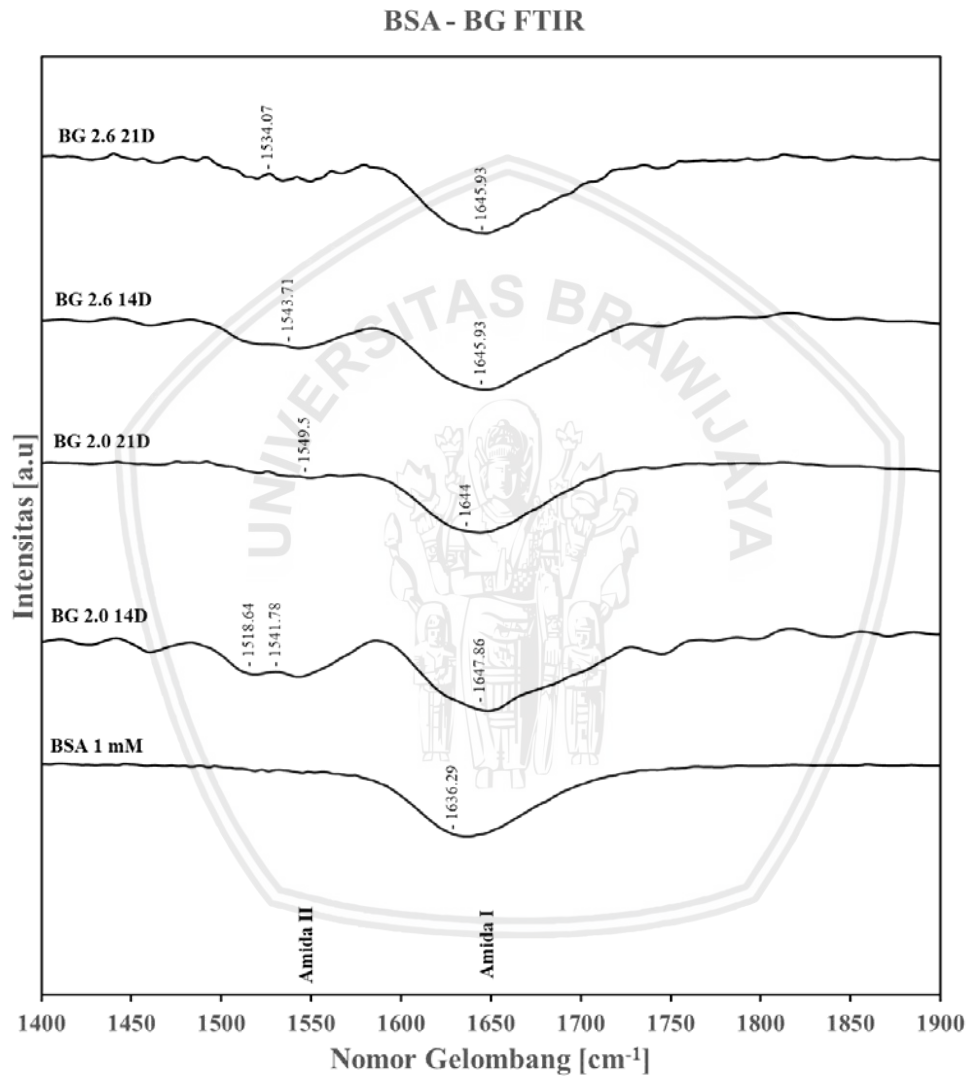
Fourier Transform Infrared Spectroscopy merupakan metode yang digunakan untuk mengetahui gugus fungsi sampel. Interpretasi spektra FTIR dilakukan berdasarkan zona panjang gelombang yang kemudian membentuk profil sampel masing-masing. Gambar 22 merupakan spektra FTIR BSA 1 mM dengan Astaxanthin (pelarut etanol). Profil spektra BSA 1 mM mempunyai lebih sedikit puncak dibandingkan dengan astaxanthin etanol. Pada sampel BSA 1 mM terdapat puncak amida I pada nomor gelombang 1636.29 cm^{-1} dengan intensitas 51.18% yang menunjukkan adanya C=O. Sedangkan pada astaxanthin puncak amida I berada pada nomor gelombang 1653.64 cm^{-1} dengan intensitas 10%. Nilai intensitas BSA 1 mM menjadi dasar penentuan sampel BG dan BG + astaxanthin.



Gambar 22. Hasil analisis FTIR untuk BSA 1 mM dibandingkan dengan astaxanthin pelarut etanol yang menunjukkan puncak amida I di kedua sampel.

Gambar 23 menunjukkan spektra FTIR pada BSA 1 mM dan BG 2.0 dan BG 2.6 pada 14 dan 21 hari. Dibandingkan spektra BSA 1 mM, sampel BG menunjukkan adanya spektra di daerah amida I dan amida II. Sampel BSA 1 mM tidak memiliki puncak pada amida II. Pergangan maupun pergeseran puncak menjadi ciri khas masing-masing sampel. Intensitas pada setiap puncak sampel BG dapat diketahui pada Tabel 5. Apabila dibandingkan dengan puncak daerah amida I BSA 1 mM, sampel BG bergeser ke kanan. Di antara sampel BG, puncak pada amida I yang memiliki intensitas tertinggi adalah BG

2.0 21D sebesar 45.79%. berdasarkan intensitas pada daerah amida I dan II, BG 2.0 21D memiliki intensitas yang lebih tinggi (pada 1549.5 cm^{-1} sebesar 80.91% dan pada 1644 cm^{-1} sebesar 45.79%). Berdasarkan adanya puncak pada amida I, seluruh sampel mempunyai ikatan C=O. Sedangkan, sampel BG memiliki amida I dan II yang mengindikasikan bahwa ikatan C=O bergabung dengan ikatan N-H dan peregangan pada ikatan C-N (Ioannou & Varotsis, 2017). Struktur ini merupakan ciri khas dari glikoprotein yang terdapat pada sampel semua sampel BG.



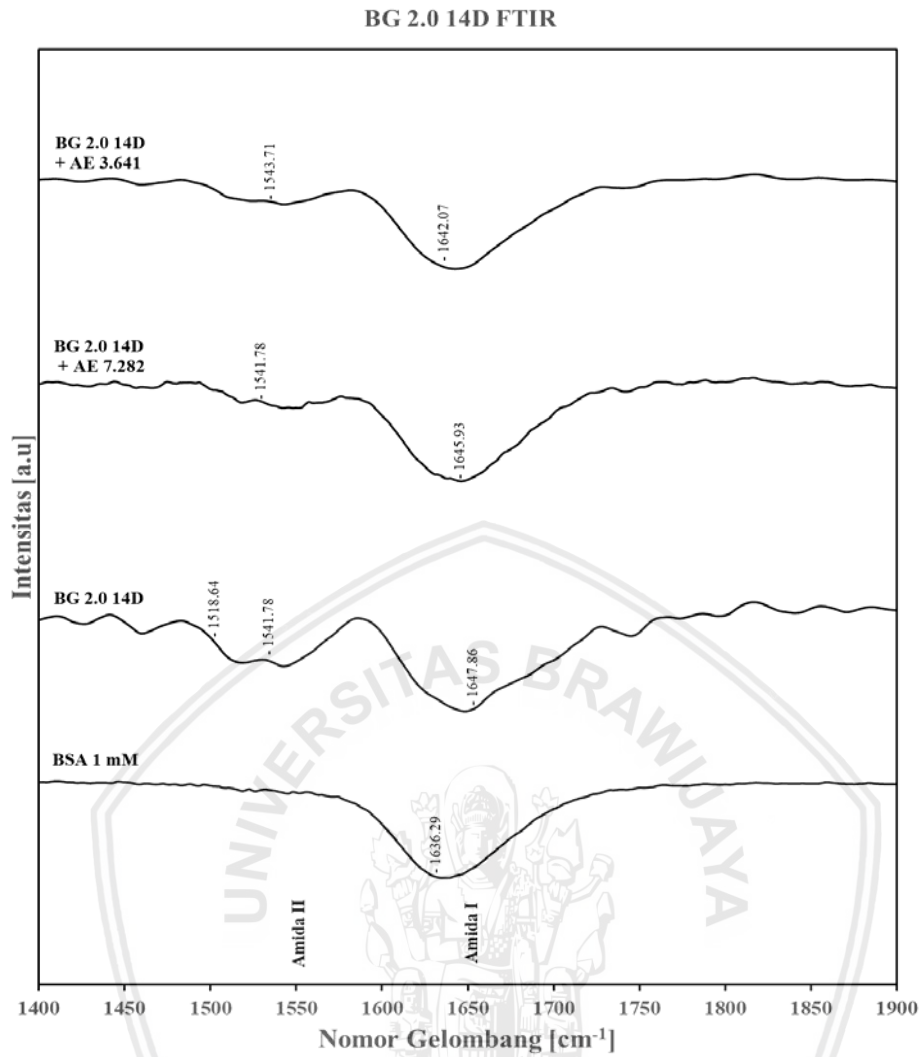
Gambar 23. Hasil analisis FTIR untuk BSA 1 mM dibandingkan dengan BG 2.0 dan BG 2.6 14 dan 21 hari. Sampel BG memiliki dua puncak pada daerah amida I dan II.

Tabel 5. Intensitas sampel BSA 1 mM dan BG hasil analisis FTIR berdasarkan puncak daerah Amida I dan II

No	Nama Sampel	Puncak Nomor Gelombang (cm ⁻¹)	Intensitas	Rantai
1	BSA 1 mM	1636.29	51.18	Amida I
2	BG 2.0 14D	1518.64	54.54	Amida II
		1541.78	52.91	
		1647.86	31.17	Amida I
3	BG 2.0 21D	1549.5	80.91	Amida II
		1644	45.79	Amida I
4	BG 2.6 14D	1543.71	63.855	Amida II
		1645.93	37.396	Amida I
5	BG 2.6 21D	1534.07	70.826	Amida II
		1645.93	37.35	Amida I

Gambar 24 menunjukkan spektra FTIR pada BSA 1 mM dan BG 2.0 waktu glikasi 14 dan 21 hari. Dibandingkan spektra BSA 1 mM, sampel BG maupun BG + astaxanthin menunjukkan adanya puncak spektra di daerah amida I dan amida II. Sebagaimana penjelasan terkait spektra amida II yang menunjukkan adanya glikoprotein, setelah penambahan astaxanthin, puncak pada daerah amida II BG 2.0 14D berkurang. Hal tersebut dapat diketahui dari Gambar 24 dan Tabel 6 bahwa puncak yang dihasilkan lebih landai. Setelah glikasi, puncak pada daerah amida I mengalami pergeseran. Intensitas 51.18% pada amida I yang dimiliki oleh BSA 1 mM menurun menjadi 31.17% pada 1647.86 cm⁻¹ namun meningkat setelah ditambahkan astaxanthin. Peningkatan intensitas yang paling tinggi (mendekati intensitas BSA 1 mM) terdapat pada penambahan astaxanthin 3.641 µg/mL (44.37%) dibandingkan penambahan astaxanthin 7.282 µg/mL (42.38%).

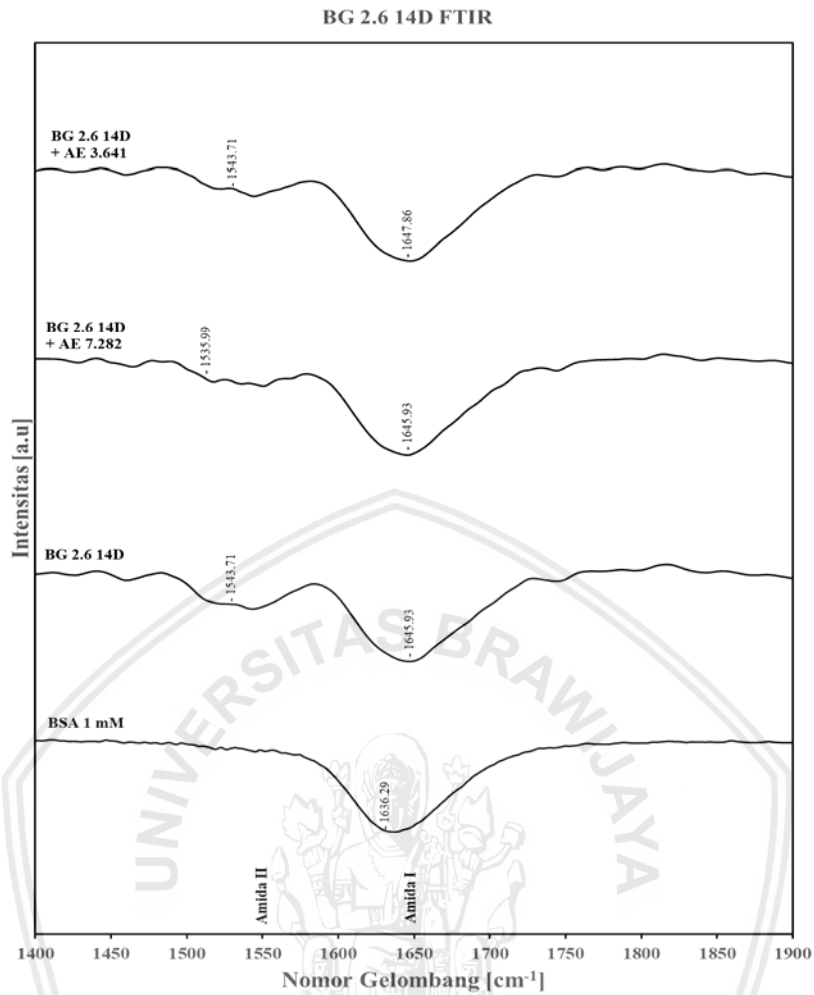
Gambar 25 menunjukkan spektra FTIR BSA 1 mM dibandingkan BG 2.6 14 hari. Sampel BG 2.6 14D maupun yang telah ditambahkan astaxanthin mempunyai puncak pada amida II dan mengalami pergeseran nomor gelombang dibandingkan BSA 1 mM. Penurunan intensitas pada amida I terjadi setelah proses glikasi menjadi 37.396%. Penambahan astaxanthin 7.282 µg/mL meningkatkan intensitas pada puncak amida I dibandingkan sampel BG 2.6 14D (41.435%) dan lebih tinggi dibandingkan penambahan astaxanthin 3.641 µg/mL (40.034%). Puncak amida II pada sampel BG mengalami peningkatan intensitas setelah penambahan astaxanthin 7.282 µg/mL (77.538%) dibandingkan penambahan astaxanthin 3.641 µg/mL (72.748%) (Tabel 7).



Gambar 24. Hasil analisis FTIR untuk BSA 1 mM dibandingkan dengan BG 2.0 14 hari. Sampel BG memiliki dua puncak pada daerah amida I dan II.

Tabel 6. Intensitas sampel BSA 1 mM, BG 2.0 14D dan setelah ditambahkan astaxanthin hasil analisis FTIR berdasarkan puncak daerah Amida I dan II

No	Nama Sampel	Puncak Nomor Gelombang (cm ⁻¹)	Intensitas	Rantai
1	BSA 1 mM	1636.29	51.18	Amida I
2	BG 2.0 14D	1518.64	54.54	Amida II
		1541.78	52.91	
		1647.86	31.17	Amida I
3	BG 2.0 14D + AE 7.282	1541.78	77.52	Amida II
		1645.93	42.38	Amida I
4	BG 2.0 14D + AE 3.641	1543.71	75.4	Amida II
		1642.07	44.37	Amida I



Gambar 25. Hasil analisis FTIR untuk BSA 1 mM dibandingkan dengan BG 2.6 14 hari. Sampel BG memiliki dua puncak pada daerah amida I dan II.

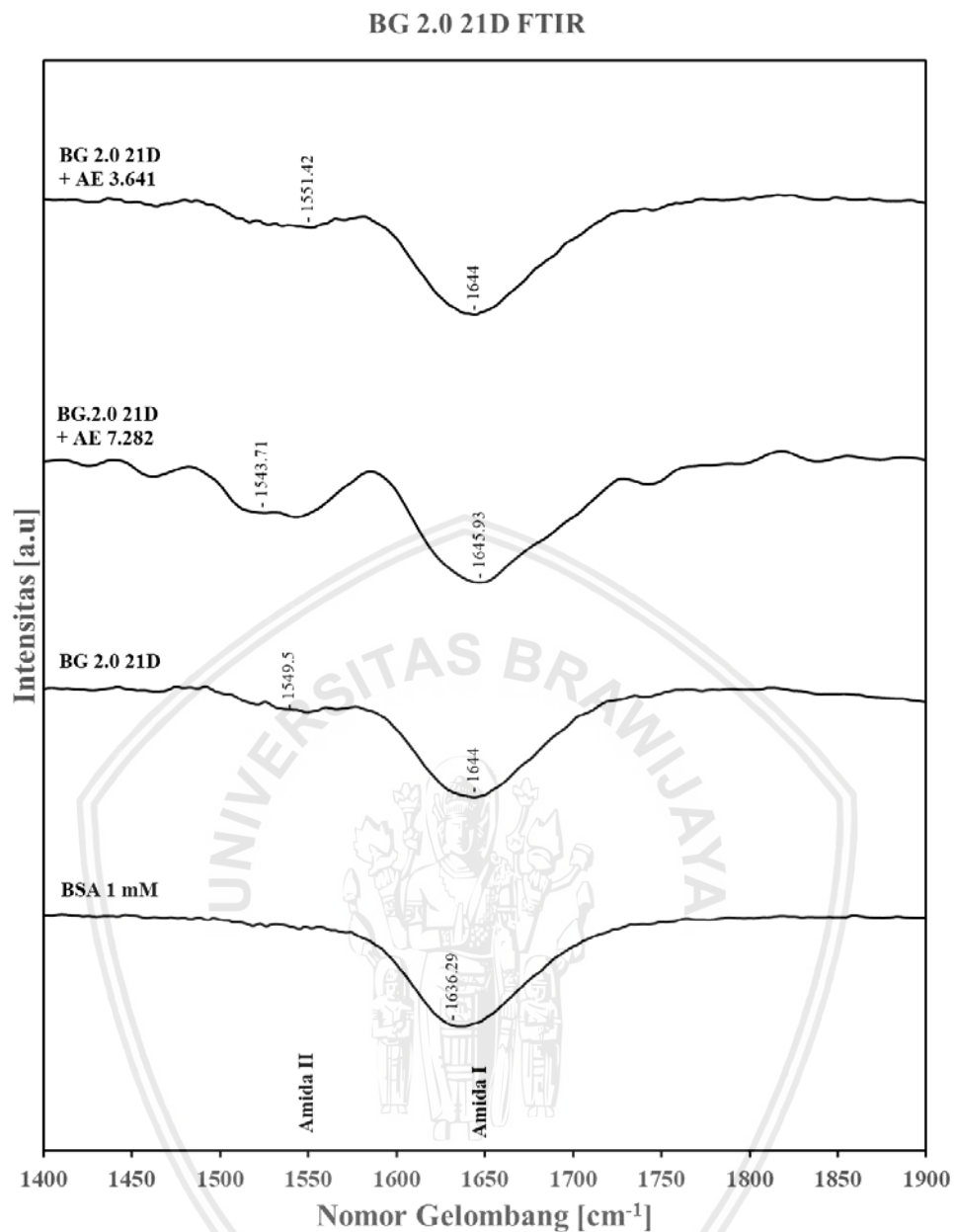
Tabel 7. Intensitas sampel BSA 1 mM, BG 2.6 14D dan setelah ditambahkan astaxanthin hasil analisis FTIR berdasarkan puncak daerah Amida I dan II

No	Nama Sampel	Puncak Nomor Gelombang (cm ⁻¹)	Intensitas	Rantai
1	BSA 1 mM	1636.29	51.18	Amida I
	BG 2.6 14D	1543.71	63.855	Amida II
		1645.93	37.396	Amida I
3	BG 2.6 14D + AE 7.282	1535.99	77.538	Amida II
		1645.93	41.435	Amida I
4	BG 2.6 14D + AE 3.641	1543.71	72.748	Amida II
		1647.86	40.034	Amida I

Gambar 26 menunjukkan spektra FTIR sampel BSA 1 mM dibanding BSA glikasi 2.0 21 hari. Sama halnya pada inkubasi 14 hari, BG inkubasi 21 hari memiliki puncak pada daerah amida I dan II. Puncak amida I pada sampel BG maupun BG + astaxanthin mengalami pergeseran dibandingkan BSA 1 mM. Dibandingkan BSA 1 mM, intensitas pada amida I BG 2.0 21D mengalami penurunan hingga 45.79%. Namun, setelah ditambahkan astaxanthin, intensitas semakin menurun hingga 34.66% pada penambahan 7.282 $\mu\text{g/mL}$ dan 45.112% pada penambahan 3.641 $\mu\text{g/mL}$. Hal yang sama terdapat pada puncak amida II dimana setelah penambahan astaxanthin, intensitas semakin menurun. Pada sampel BG 2.0 21D penambahan astaxanthin 3.641 $\mu\text{g/mL}$ menghasilkan intensitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan 7.282 $\mu\text{g/mL}$ (Tabel 8).

Tabel 8. Intensitas sampel BSA 1 mM, BG 2.0 21D dan setelah ditambahkan astaxanthin hasil analisis FTIR berdasarkan puncak daerah Amida I dan II

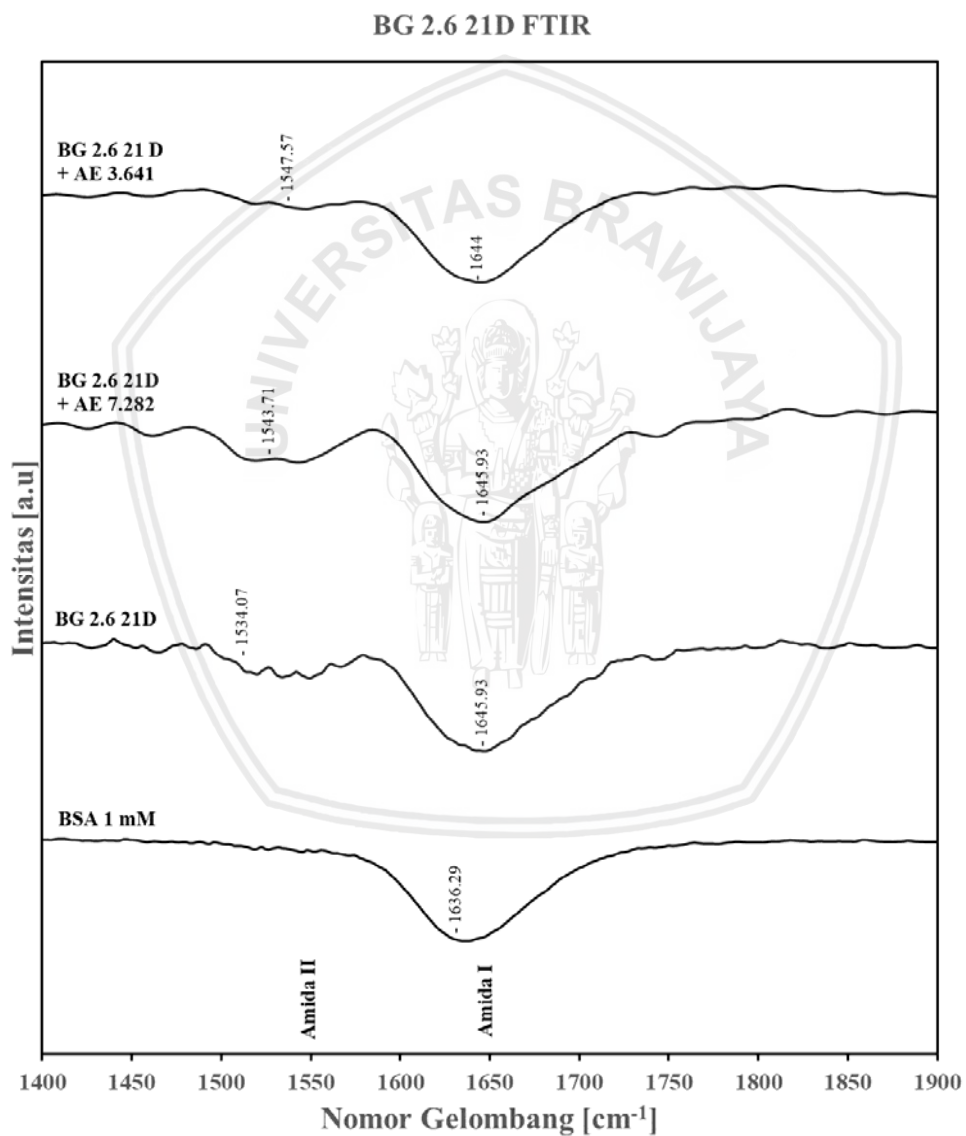
No	Nama Sampel	Puncak Nomor Gelombang (cm^{-1})	Intensitas	Rantai
1	BSA 1 mM	1636.29	51.18	Amida I
2	BG 2.0 21D	1549.5	80.91	Amida II
		1644	45.79	Amida I
3	BG 2.0 21D + AE 7.282	1543.71	61.57	Amida II
		1645.93	34.66	Amida I
4	BG 2.0 21D + AE 3.641	1551.42	80.805	Amida II
		1644	45.112	Amida I



Gambar 26. Hasil analisis FTIR untuk BSA 1 mM dibandingkan dengan BG 2.0 21 hari. Sampel BG memiliki dua puncak pada daerah amida I dan II.

Gambar 27 menunjukkan spektra FTIR sampel BSA 1 mM dibanding BSA glikasi 2.6 21 hari. Berdasarkan puncak amida I, sampel BG 2.6 21D maupun yang telah ditambahkan astaxanthin mengalami pergeseran dibandingkan BSA 1 mM. Sebagaimana hasil pada kelompok sampel lainnya, sampel BG 2.6 21D juga mempunyai puncak amida I dan II. Puncak amida I pada BG 2.6 21D mengalami penurunan intensitas hingga 37.35% dibandingkan BSA 1 mM. Setelah penambahan astaxanthin 3.641 µg/mL, terjadi

peningkatan intensitas hingga 50.08% dan lebih tinggi daripada penambahan astaxanthin 7.282 $\mu\text{g/mL}$ (41.53%). Nilai intensitas pada BG 2.6 21D + AE 3.641 telah mendekati intensitas BSA 1 mM (51.18%) dibandingkan dengan sampel lainnya. Puncak amida II mengalami peregangan pada sampel BG 2.6 21D namun setelah penambahan astaxanthin, peregangan tidak terjadi (spektra lebih halus). Intensitas amida II pada BG 2.6 21D + AE 3.641 merupakan intensitas yang tertinggi (83.24%) dibandingkan sampel lainnya (Tabel 9). Hal ini mengindikasikan bahwa penambahan astaxanthin yang lebih rendah terbukti lebih efektif dalam memperbaiki karakter BG.



Gambar 27. Hasil analisis FTIR untuk BSA 1 mM dibandingkan dengan BG 2.6 21 hari. Sampel BG memiliki dua puncak pada daerah amida I dan II.

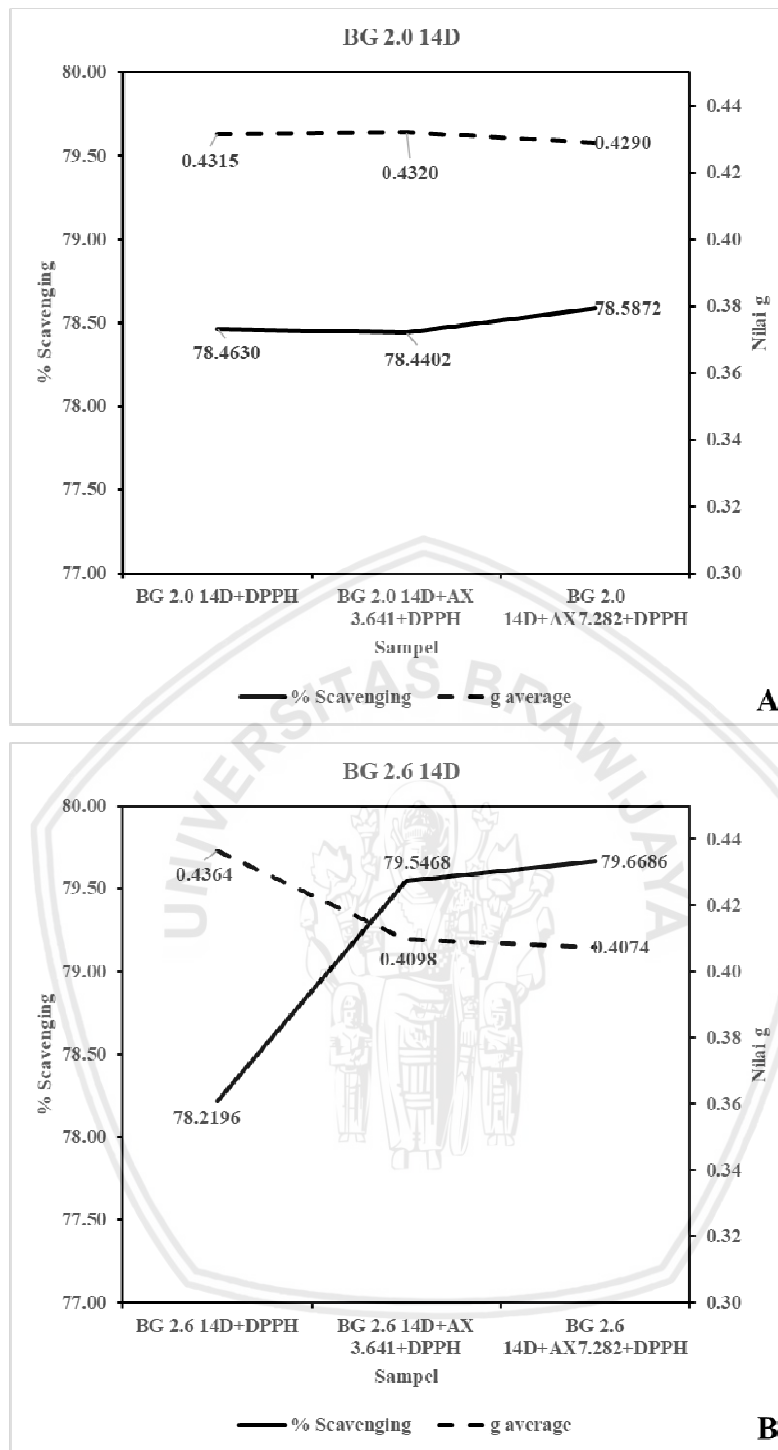
Tabel 9. Intensitas sampel BSA 1 mM, BG 2.6 21D dan setelah ditambahkan astaxanthin hasil analisis FTIR berdasarkan puncak daerah Amida I dan II

No	Nama Sampel	Puncak Nomor Gelombang (cm ⁻¹)	Intensitas	Rantai
1	BSA 1 mM	1636.29	51.18	Amida I
2	BG 2.6 21D	1534.07	70.826	Amida II
		1645.93	37.35	Amida I
3	BG 2.6 21D + AE 7.282	1543.71	68.33	Amida II
		1645.93	41.53	Amida I
4	BG 2.6 21D + AE 3.641	1547.57	83.24	Amida II
		1644	50.08	Amida I

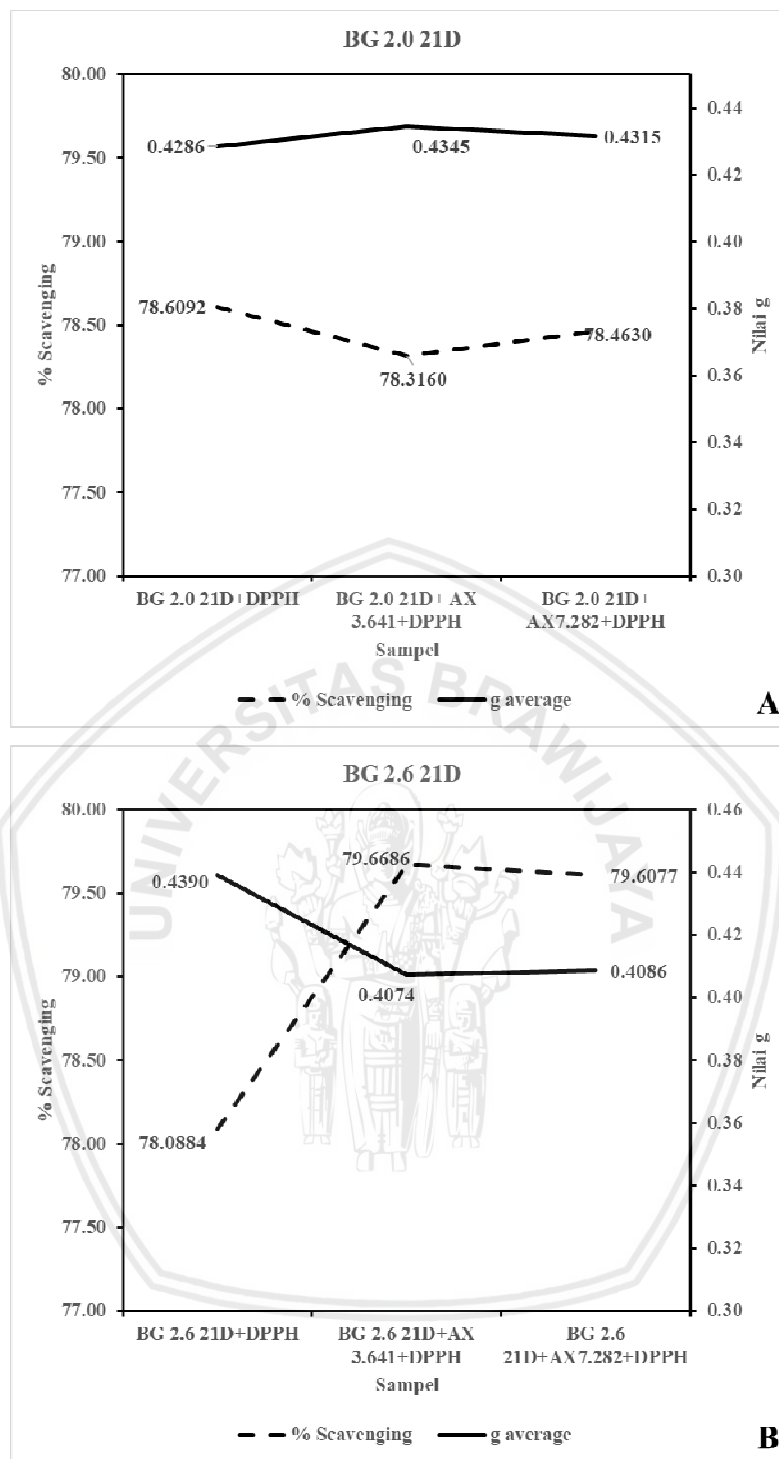
4.1.5. ESR

Analisis *Electron Spin Resonance* (ESR) menjelaskan perubahan konformasi fleksibilitas dan karakteristik pengikatan albumin di dalam produk plasma berdasarkan nilai g. Nilai g pada DPPH referensi adalah 2.0036 yang kemudian dijadikan acuan dalam perhitungan nilai g sampel yang sesungguhnya. Nilai g DPPH yang muncul adalah 6.6669 yang kemudian dikalibrasi dengan nilai g DPPH referensi menghasilkan nilai g terkalibrasi sebagai factor koreksi 0.3. Nilai g merupakan parameter untuk melakukan investigasi area radikal pada suatu sampel.

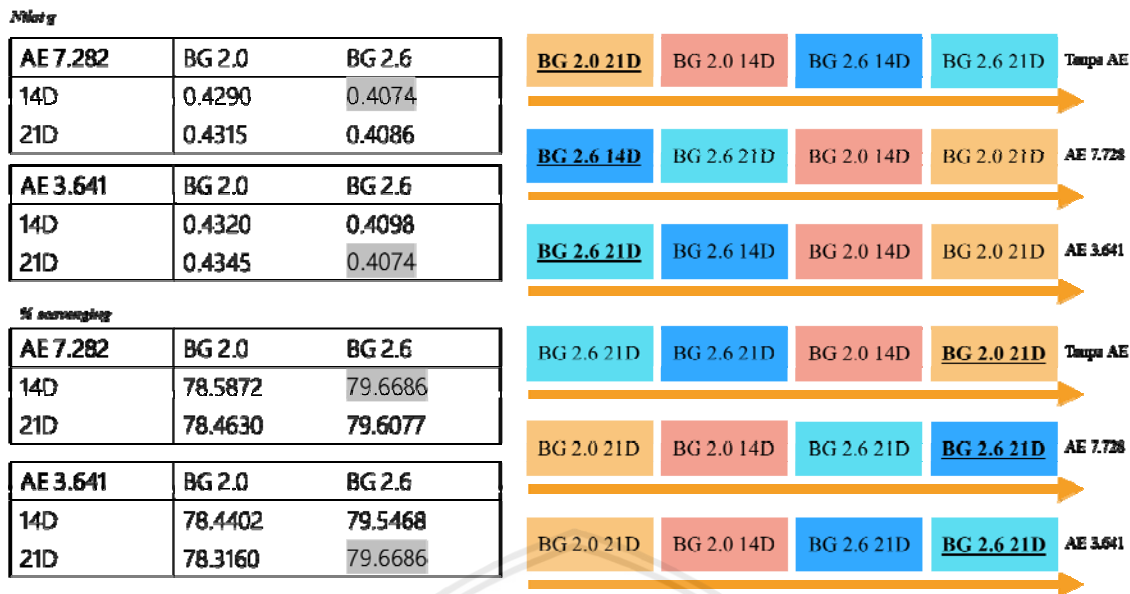
Nilai g dijadikan dasar dalam perhitungan persentase *scavenging* dengan kontrol DPPH referensi (persamaan 6). Kapasitas peluruhan radikal bebas pada astaxanthin ditunjukkan berdasarkan nilai g yang semakin menurun, sedangkan dibutuhkan peningkatan persentase *scavenging* untuk menyimpulkan kemampuan peluruhan radikal bebas oleh astaxanthin. Gambar 28 menunjukkan bahwa peningkatan persentase *scavenging* terdapat pada sampel BG 2.0 14 hari setelah penambahan astaxanthin 7.282 µg/mL sebesar 78.5872% dan nilai g yang menurun hingga 0.4290. Sedangkan pada sampel BG 2.6 peningkatan signifikan hingga 79.5468% pada sampel BG 2.6 14 hari setelah penambahan astaxanthin 3.641 µg/mL. Gambar 29 menunjukkan penurunan persentase *scavenging* dan peningkatan nilai g pada sampel BG 2.6. Sedangkan pada sampel BG 2.0, peningkatan persentase *scavenging* dan penurunan nilai g terdapat pada sampel BG 2.0 21 hari setelah penambahan astaxanthin 3.641 µg/mL. Persentase *scavenging* dan nilai g dapat lebih jelas dipahami pada Gambar 30.



Gambar 28. Nilai g dan persentase *scavenging* sampel BG 2.0 (A) dan BG 2.6 (B) pada 14 hari. Terdapat peningkatan persentase *scavenging* dan penurunan nilai g pada sampel BG 2.6. Sedangkan pada sampel BG 2.0, peningkatan persentase *scavenging* dan penurunan nilai g terdapat pada sampel BG 2.0 14 hari setelah penambahan astaxanthin 7.282 $\mu\text{g/mL}$.



Gambar 29. Nilai g dan persentase *scavenging* sampel BG 2.0 (A) dan BG 2.6 (B) pada 21 hari. Terdapat penurunan persentase *scavenging* dan peningkatan nilai g pada sampel BG 2.6. Sedangkan pada sampel BG 2.0, peningkatan persentase *scavenging* dan penurunan nilai g terdapat pada sampel BG 2.0 21 hari setelah penambahan astaxanthin 3.641 $\mu\text{g/mL}$.



Gambar 30. Skema nilai g dan persentase *scavenging* yang menunjukkan bahwa sampel BG 2.6 21D + AE 3.641 $\mu\text{g/mL}$ memiliki nilai g paling rendah dan persentase *scavenging* tertinggi dibandingkan sampel lainnya, hasil yang sama juga terdapat pada sampel BG 2.6 14D + AE 7.282 $\mu\text{g/mL}$.

4.2 Pembahasan

Penelitian ini memberikan pemahaman baru tentang pentingnya integritas struktur BSA dalam fungsinya sebagai *transporter* dan *scavenger*. Pada penelitian ini, spektrofotometri UV digunakan untuk mengukur kapasitas absorbansi atau transmisi berdasarkan panjang gelombang BSA beserta perubahannya setelah glikasi dan penambahan astaxanthin. Terjadinya perbedaan profil spektrum UV maksimum antara BSA 1 mM dengan BG 2.0 maupun BG 2.6 mM diprediksi akibat adanya interaksi antara BSA dan glukosa juga BSA – glukosa – astaxanthin yang menyebabkan terjadi perubahan kromofor. Perubahan kromofor disebabkan oleh perpindahan elektron yang tidak berikatan antara molekul. Hal ini akan menyebabkan absorbansi spektrum UV terhadap sampel glikasi yang ditambahkan astaxanthin lebih banyak memiliki puncak, sehingga terjadi pula peningkatan persentase hiperkromisitas (Kumar, 2008). Absorbansi pada panjang gelombang 280 nm digunakan untuk melakukan kuantifikasi hiperkromisitas. Persentase hiperkromisitas yang dicari adalah yang menunjukkan nilai paling rendah. Hal ini mengindikasikan bahwa sampel yang mempunyai persentase hiperkromisitas rendah semakin mendekati karakter BSA 1 mM. Peningkatan persentase hiperkromisitas mengindikasikan bahwa BSA mengalami denaturasi dan perubahan konformasi (Ansari & Dash, 2013). Dibandingkan semua sampel, penambahan astaxanthin 3.641 $\mu\text{g/mL}$

memberikan persentase hiperkromisitas yang rendah, sehingga lebih efektif dalam perbaikan struktur BSA setelah glikasi.

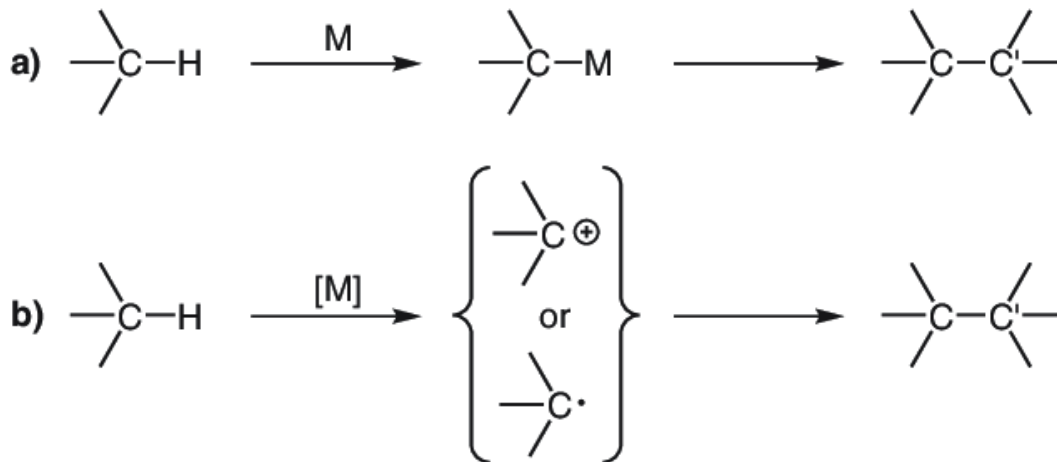
Viskometri memberikan pemahaman bahwa peningkatan nilai viskositas menjadikan perubahan konfirmasi pada albumin (Ekowati dkk, 2018). Berdasarkan hasil penelitian ini penambahan konsentrasi astaxanthin sebesar 3.641 $\mu\text{g/mL}$ pada sampel BG 2.0 14D memberikan nilai viskositas paling rendah yaitu 0.9012 cP. Viskositas atau rheologi dipengaruhi oleh gaya tarik menarik antar molekul sehingga dinamika protein akan meningkat. Perbedaan muatan antara molekul BSA, glukosa, astaxanthin maupun pelarut berbasis air akan menyebabkan pergerakan atau aliran (Ekowati dkk, 2018; Parikesit, 2010).

FTIR memberikan pemahaman spektra gugus fungsi BSA dibandingkan BG dan BG dengan penambahan astaxanthin. Mekanisme glikasi pada protein ditandai dengan spektra pada 1500-1600 cm^{-1} yang menunjukkan gugus amida I dan amida II. Sampel BSA menjadi dasar penentuan perubahan karakter spektra dan intensitas sampel lainnya (Baker dkk, 2014; Ioannou & Varotsis, 2017). Glikoprotein merupakan protein yang mempunyai rantai oligosakarida (glikan) dan secara kovalen terikat pada daerah pengikatan asam amino. Glikoprotein dapat dikatakan sebagai hasil mekanisme glikosilasi dimana gugus karbohidrat terikat pada protein modifikasi cotranslational maupun posttranslational (Han dkk, 2017). Berdasarkan puncak pada amida I dan II terdapat ikatan C=O yang bergabung dengan ikatan N-H dan terjadi peregangan pada ikatan C-N. Ikatan N-H dan C-N pada amida II merupakan karakter glikoprotein sebagai hasil proses glikasi BSA (Ioannou & Varotsis, 2017). Berdasarkan penelitian Abrosimova dkk (2016), pada spektra FTIR BSA terdapat Amida I (nomor gelombang 1700-1600 cm^{-1}) menunjukkan banyak rantai C=O pada ikatan peptida dan mempunyai sensitivitas tinggi terkait komponen struktur sekunder protein. Berdasarkan spektra FTIR, penambahan astaxanthin 3.641 $\mu\text{g/mL}$ terbukti efektif dalam perbaikan sampel BG.

ESR memberikan pemahaman terkait perubahan konformasi albumin di dalam produk plasma berdasarkan nilai g. Persentase scavenging juga dikalkulasi berdasarkan nilai g sehingga dapat diambil kesimpulan terkait kemampuan peluruhan radikal DPPH oleh semua sampel. Nilai g yang terendah adalah pada sampel BG 2.6 baik pada glikasi 14 dan 21 hari setelah penambahan astaxanthin 3.641 $\mu\text{g/mL}$. Nilai g yang rendah menghasilkan kalkulasi persentase scavenging yang lebih tinggi pada sampel tersebut. Nilai g pada semua sampel ~ 0.4 sehingga termasuk dalam kategori radikal organometal ($0 < g < 6$) (Hosono, 2015).

Di dalam bidang kimia, terdapat pembahasan tersendiri terkait dengan organometal. Kimia Organometal merupakan kajian senyawa yang mengandung paling tidak satu ikatan kimia antara atom karbon dari senyawa organik dan metal. Senyawa organometal tersusun atas atom karbon nukleofilik yang dapat bereaksi dengan karbon elektrofilik sehingga membentuk ikatan C-C baru. Senyawa organometal juga disebut sebagai metal substitusi seperti metal alkil, metal alkil halida, dan metal transisi. Selain dari ikatan dengan fragmen atau molekul organil, ikatan dengan karbon 'anorganik', seperti karbon monoksida (metal karbonil), sianida, atau karbida, umumnya juga dianggap sebagai organometal. Organometal biasanya terlarut pada pelarut organik karena sifatnya yang sangat reaktif (terutama dengan molekul air dan oksigen). Struktur ikatan senyawa organometal sangat polar, memiliki ikatan kovalen berdasarkan karakter elektropositifnya dengan atom metal. Istilah "senyawa metal organik" yang terkait namun tetap berbeda mengacu pada senyawa yang mengandung logam dan tidak memiliki ikatan metal-karbon secara langsung melainkan mengandung ligan organik. Metal β -diketonat, alkoksida, dialkylamida, dan kompleks metal fosfin merupakan jenis senyawa metal organik. Senyawa organometal dibedakan dengan awalan "organo-" mis. senyawa organopalladium. Contoh-contoh senyawa organometal tersebut termasuk semua pereaksi Gilman yang mengandung litium dan tembaga. Nikel tetrakarbonil dan ferrosin adalah contoh senyawa organometal yang mengandung logam transisi. Contoh lain termasuk senyawa organomagnesium seperti iodo (metil) magnesium MeMgI , dimethylmagnesium (Me_2Mg), dan semua reagen Grignard; senyawa organolithium seperti n-butylitium ($n\text{-BuLi}$), senyawa organoseng seperti diethylzinc (Et_2Zn) dan chloro (ethoxycarbonylmethyl) zinc ($\text{ClZnCH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OEt}$); dan senyawa organocopper seperti lithium dimethylcuprate ($\text{Li}^+ [\text{CuMe}_2^-]$) (Oliveira dan Elschenbroich, 2006).

Berdasarkan Klusmann dan Devarajulu (2011), mayoritas senyawa organik mengandung banyak ikatan C-H, sehingga permasalahan seleksi dan fungsi area pengikatannya muncul. Hal ini dapat tergantung pada reaktivitas ikatan C-H yang permanen di dalam substrat khusus. Reaktivitas ini kemudian membentuk sistem katalis yang mendesak adanya seleksi sehingga ikatan yang secara alami tidak aktif menjadi teraktivasi. Fungsionalisasi ataupun aktivasi ikatan C-H dapat diklasifikasikan berdasarkan mekanisme reaksinya. Pembentukan ikatan karbon-metal (C-M) dari ikatan C-H disebut sebagai "aktivasi C-H sejati (*true C-H activation*)" melalui mekanisme organometal (Gambar 31).



Gambar 31. Skema fungsionalisasi ikatan C-H dan pembentukan ikatan C-C: mekanisme organometal “*true C-H activation*” (a) dan mekanisme non-organometal melalui oksidasi spesies reaktif (b) (Klussmann dan Devarajulu, 2011).

Penelitian pendahuluan telah dilaksanakan untuk mendapatkan konsentrasi glukosa yang digunakan dalam glikasi adalah 2.0 dan 2.6 mM. Berdasarkan Rondeau dkk (2010), profil spektrum UV glukosa yang mendekati profil BSA tidak mengubah konformasi BSA apabila digunakan untuk proses glikasi. Konsentrasi BSA 1 mM merupakan konsentrasi kritis yang larut (*soluble*) dengan pelarut berbasis air (Khoirunnisa dkk, 2019; He dkk, 2014). Penambahan natrium azida 0.1% dipastikan tidak memberikan efek signifikan terhadap proses glikasi selain sebagai agen preservasi, pengondisian aseptis, dan antibiotik (Perez Gutierrez, 2012; Perez Gutierrez, 2013).

BSA terglykasi mengindikasikan denaturasi maupun perubahan konformasi struktur protein dibandingkan dengan BSA 1 mM (native BSA) berdasarkan analisis fisikokimia pada penelitian ini. BG menunjukkan hiperkromisitas pada Panjang gelombang 280 nm dibandingkan native BSA yang kemungkinan mengekspos residu asam amino aromatik yang bersifat kromoforik. Hal ini menyebabkan pelepasan dan frakmentasi struktur protein sebagai hasil proses glikasi normoglikemik (Ahmad dkk, 2012; Sadowska-Bartosz dkk, 2014).

Mekanisme glikasi terjadi pada setiap organisme berdasarkan beberapa karakteristik, antara lain konsentrasi glukosa, pengikatan gula pereduksi dalam plasma, masa hidup gula pereduksi dan faktor lingkungan internal sehingga sangat sulit sebenarnya untuk melakukan reproduksi pada penelitian in vitro. Berdasarkan fakta tersebut, tidak ada prosedur glikasi yang paten, peneliti melakukan glikasi secara in vitro pada tahap awal penelitian mereka. Penelitian sebelumnya menjelaskan bahwa terdapat dua residu triptofan

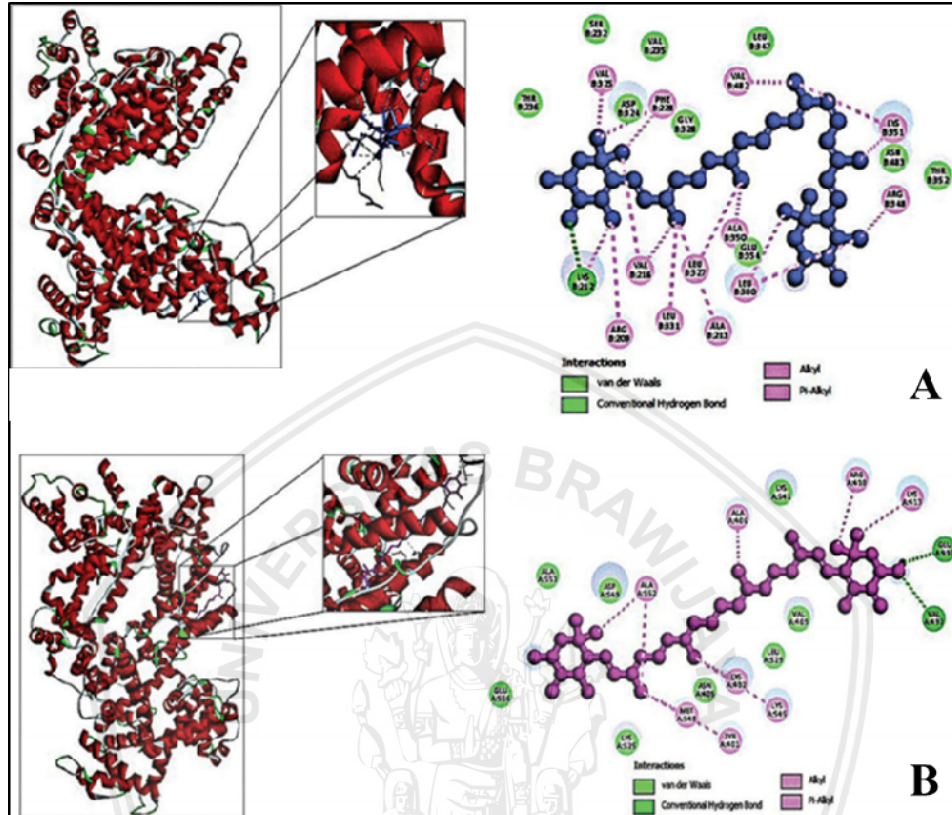
pada molekul BSA (Trp134 dan Trp213), sedangkan pada HSA mempunyai residu Trp214 tetapi Trp134 juga terdeteksi namun jauh dari area hidrofobik. Namun demikian, semua data yang membahas terkait spektra *backbone* 230 nm konsisten sebagai profil spektrum UV BSA 1 mM (Baraka-Vidot dkk, 2012).

Berdasarkan penelitian Wibowo dkk (2019), hasil analisis *docking* menunjukkan terdapat ikatan *unfavorable donor-donor* antara glukosa dan *human serum albumin* (HSA) pada GLN(B):459 dan ikatan hydrogen pada SER(B):193, ARG(B):145, dan ASP(B):108 (Gambar 3). Ikatan *unfavorable donor-donor* pada glutamin domain B menunjukkan interaksi antar molekul dapat disebabkan kerusakan protein. Analisis *docking* pada astaxanthin-glikasi HSA (gHSA) menunjukkan ikatan hydrogen pada LYS(B):351, ARG(B):348, LEU(B):380, ALA(B):350, LEU(B):327, ALA(B):213, VAL(B):216, LEU(B):331 dan ARG(B):209. Ikatan hydrogen mengindikasikan bahwa kompleks astaxanthin dan gHSA terikat kuat. Perpindahan energi bebas dari kompleks makromolekul dan makromolekul biologi merupakan salah satu fungsi ikatan hydrogen (Gambar 32). Analisis *docking* pada astaxanthin-HSA menunjukkan ikatan hydrogen pada GLU(A):492, VAL(B):493 dan ikatan alkil pada ALA(A):552, ALA(A):406, ARG(A):410, LYS(A):413, LYS(A):402, LYS(A):545, MET(A):548 dan TYR(A):401 (Gambar 32). Daerah pengikatan astaxanthin pada HSA berada pada domain A sedangkan pada gHSA berada pada domain B. daerah pengikatan spesifik astaxanthin ke HSA dapat meningkatkan aktivitas *scavenging* sedangkan pada astaxanthin-gHSA dibutuhkan untuk mencegah gHSA tidak stabil (Wibowo dkk, 2019; Verma dkk, 2015).

Berdasarkan penelitian Khoirunnisa (2019), terdapat lima konsentrasi BSA yang digunakan yaitu 750, 500, 100, 10 dan 1 mM, memberikan informasi terkait spektrum UV pada protein yang tidak berubah. Spektrum BSA muncul pada panjang gelombang ~230 nm sebagai spektra *backbone* dan 278 nm sebagai spektra gugus asam amino aromatik seperti triptofan, tirosin, dan fenilalanin. Penelitian tersebut juga memberikan informasi bahwa BSA 1 dan 10 mM diprediksi mampu menjaga konfigurasi albumin sedangkan konsentrasi BSA yang lebih tinggi diprediksi memicu perubahan konformasi dan fungsi albumin. Dengan demikian, penggunaan konsentrasi BSA yang rendah dapat lebih efektif digunakan untuk mekanisme glikasi.

Glukosa menjalankan glikasi non enzimatis protein sehingga dapat mengubah konformasi struktur asli albumin dan dapat menghilangkan kemampuan pengikatannya serta menginduksi sinyal transduksi melalui reseptor glikasi (Zurawska-Plaksej dkk, 2018). Penelitian Rondeau dkk (2010) menjelaskan semakin tinggi konsentrasi glukosa yang

digunakan menentukan semakin banyak molekul glukosa yang terikat pada area pengikatan BSA. Hal ini menjadikan peluang terjadinya glikasi semakin tinggi. Penelitian Rondeau dkk (2010) juga memberikan konfirmasi bahwa hubungan antara protein dan molekul glukosa mengubah konformasi struktur tersier ketika struktur sekunder tidak berubah.



Gambar 32. Hasil *docking* pada penelitian Wibowo dkk (2019) yang menunjukkan daerah pengikatan astaxanthin terhadap gHSA (A) dan astaxanthin terhadap HAS (B).

Aktivitas antioksidan merupakan salah satu dari fungsi serum albumin dan jalur glikasi yang berkaitan dengan fenomena oksidatif dan berpengaruh pada integritas albumin. Glikasi BSA dengan glukosa menginduksi penurunan dosis dependen pada gugus thiol bebas yang terdapat pada protein (metode Ellman's). ketika BSA diinkubasi dengan gradien glukosa yang meningkat maka terjadi peningkatan gugus karbonil. Berdasarkan proses oksidatif dan glikasi, BSA yang terpapar glukosa tinggi maka akan berpeluang membentuk AGEs sehingga akan terjadi penurunan kemampuan antioksidan BSA (Rondeau dkk, 2010). Penelitian Bourdon dkk (1999) menyebutkan bahwa hingga glukosa mencapai 500 mM, kapasitas *trapping* radikal bebas pada albumin tidak berubah.

PBS merupakan larutan buffer berbasis air dan garam yang banyak digunakan pada penelitian biologi. PBS mengandung disodium hydrogen fosfat, sodium klorida, potassium klorida, dan potassium dihidrogen fosfat. Di sisi lain, astaxanthin yang merupakan senyawa hidrofobik sehingga perlu dilakukan pengondisian astaxanthin terlebih dahulu pada saat melakukan ekstraksi. Ekstraksi astaxanthin dari kaplet AstaPlus dilakukan dengan pelarut etanol. Pelarut etanol merupakan salah satu *co-solvent* sehingga dapat dijadikan pelarut transisi sebelum astaxanthin bersinggungan dengan molekul oksigen pada pelarut berbasis air (Jin dkk, 2016). Simulasi dinamika molekuler terkait astaxanthin dan gHSA telah dilakukan di dalam penelitian *in silico* Wibowo dkk (2019).

Astaxanthin dapat menjadi senyawa yang menstabilkan gHSA dan HSA. Astaxanthin dapat mereduksi sitotoksitas yang diakibatkan oleh mekanisme glikasi protein terutama melalui reduksi peroksidasi lipid. Selama proses pendinginan oleh molekul oksigen, energi berpindah dari molekul oksigen ke molekul astaxanthin, kemudian mengubah perpindahan energi tersebut menjadi kondisi triplet yang kaya energi. Kondisi triplet pada astaxanthin dapat mengembalikan protein glikasi menjadi kondisi awalnya (protein *native*) melalui eliminasi energi menjadi panas atau dengan pendinginan fisik sampel. Hal ini mengindikasikan bahwa astaxanthin merupakan molekul stabil yang memiliki aktivitas *scavenging* tanpa memunculkan atom radikal bebas (Nishigaki dkk, 2010; Wibowo dkk, 2019).

Kondisi normoglikemik (<5.6 mmol/L) merupakan marker pra diabetes yang reversible. Penelitian Li and Yan (2017), menjelaskan terdapat 12-18% protein yang bekerja di dalam sistem sirkulasi mengalami glikasi secara *in vivo* pada kondisi normoglikemik. Kondisi ini menjelaskan terkait resiko onset diabetes mellitus tipe 2 berdasarkan tingkat glukosa puasa (*fasting glucose level*) yang terbagi dalam normoglikemik (<5.6 mmol/L), hiperglikemik ringan (5.6-5.0 mmol/L) dan hiperglikemik intermediet (6.1-7.0 mmol/L). Ketiganya dikategorikan ke dalam kondisi pra diabetes. Sedangkan, tingkat glukosa puasa yang lebih dari 7.0 mmol/L mengindikasikan kondisi diabetes (DeFina dkk, 2012). Kondisi normoglikemik pada penelitian skala laboratorium sangat berbeda dengan penelitian klinis. Hal ini terkait dengan konsentrasi glukosa yang lebih rendah (2.6 mM) telah mampu membuat kondisi normoglikemik, sedangkan pada manusia dibutuhkan konsentrasi glukosa yang lebih tinggi. Penelitian ini dilakukan sebagai langkah awal dalam penelitian berbasis albumin sehingga di dalam kondisi normoglikemik maupun tingkat glikasi lainnya, penambahan astaxanthin mampu menjaga keseimbangan fungsi albumin sebagai *scavenger* dan *transporter*.

Waktu glikasi 14 maupun 21 hari diasumsikan mampu membuat kondisi normoglikemik (Zurawska-Plaksej dkk, 2018). Waktu glikasi yang lebih lama dari 21 hari akan menyebabkan perbedaan struktur molekul glikasi yang berpengaruh pada karakter fisikokimia BSA. Namun, pada waktu glikasi 21 hari, banyak faktor yang tidak dapat dikendalikan atau diprediksi sehingga akan lebih baik jika penelitian yang akan datang dilakukan selama 14 hari.



BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan analisis spektrofotometri UV, hiperkromisitas, FTIR, dan ESR, konsentrasi glukosa 2.6 mM memberikan nilai mendekati BSA 1 mM sehingga disimpulkan lebih optimal untuk membuat kondisi normoglikemik dibandingkan glukosa 2.0 mM. Berdasarkan spektrofotometri UV, viskometri, FTIR dan ESR waktu glikasi yang optimal belum dapat ditentukan. Penambahan konsentrasi astaxanthin yang lebih rendah (3.641 $\mu\text{g/mL}$) mampu memperbaiki struktur dan fungsi BSA glikasi mendekati karakter BSA 1 mM dibandingkan astaxanthin 7.282 $\mu\text{g/mL}$. Berdasarkan hasil ESR dan perhitungan nilai g, semua sampel memiliki nilai g ~ 0.4 sehingga termasuk dalam kategori radikal organometal ($0 < g < 6$). Kategori ini menjelaskan bahwa mekanisme glikasi yang terjadi belum sampai memunculkan radikal bebas. Di dalam penelitian ini, kondisi normoglikemik pada BSA telah terjadi, namun belum sampai membentuk komponen AGEs. Waktu glikasi 14 maupun 21 hari diasumsikan mampu membuat kondisi normoglikemik. Waktu glikasi yang lebih lama dari 21 hari akan menyebabkan perbedaan struktur molekul glikasi yang berpengaruh pada karakter fisikokimia BSA. Namun, pada waktu glikasi 21 hari, banyak faktor yang tidak dapat dikendalikan atau diprediksi sehingga akan lebih baik jika penelitian yang akan datang dilakukan selama 14 hari.

5.2 Saran

Penelitian ini sangat potensial untuk dilanjutkan terutama pada investigasi waktu glikasi yang lebih optimal dan analisis spektrofotometri untuk mengetahui keberhasilan glikasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abraham, S. 2016. Spectrofluorometric studies of the effect of ZnO nanoparticles on bovine serum albumin. *Int. J. Tech. Res. Appl.* 4:108-113.
- Abrosimova, K. V., O. V. Shulenina & S. V. Paston. 2016. FTIR study of secondary structure of bovine serum albumin and ovalbumin. *J. Physics Conf. Ser.* 769:1-6.
- Abu-Gosh, S., D. Fixler, A. Gedanken, V. B. Kumar, Z. Dubinsky & D. Iluz. 2017. Nitrogen-doped carbon dots prepared from bovine serum albumin to enhance algal astaxanthin production. *Algal Res.* 23:161-165.
- Ahmad, S., Moinuddin, R. H. Khan, A. Ali. 2012. Physicochemical studies on glycation-induced structural changes in human IgG. *IUBMB Life.* 64:151-156.
- Ansari, N. A. & D. Dash. 2013. Biochemical studies on methylglyoxal-mediated glycated histones: implications for presence of serum antibodies against the glycated histones in patients with type 1 diabetes mellitus. *ISRN Biochem.* 2013:198065.
- Arasteh, A., S. Farahi, M. Habibi-Rezaei & A. A. Moosavi-Movahedi. 2014. Glycated albumin: an overview of the *in vitro* models of an *in vivo* potential disease marker. *J. Diabetes Metab. Disord.* 13:49.
- Baker, M. J., J. Trevisan, P. Bassa, R. Bhargava, K. M. Dorling, P. R. Fielden, S. W. Fogarty, N. J. Fullwood, K. A. Heys, C. Hughes, P. Lasch, P. L. Martin-Hirsch, B. Obinaju, G. D. Sockalingum, J. Sule-Suso, R. J. Strong, M. J. Walsh, B. R. Wood, P. Gardner & F. L. Martin. 2014. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nat. Protocols.* 9:1771-1791.
- Brady, P. N. & M. A. Macnaughtan. 2015. Evaluation of colorimetric assays for analyzing reductively methylated proteins: biases and mechanistic insights. *Anal. Biochem.* 491:43-51.
- DeFina, L. F., G. L. Vega, D. Leonard & S. M. Grundy. 2012. Fasting glucose, obesity, and metabolic syndrome as predictors of type 2 diabetes: the cooper center longitudinal study. *J. Investig. Med.* 60:1164-1168.
- Dukic-Stefanovic, S., J. Gasic-Milenkovic, W. Deuther-Conrad & G. Munch. 2003. Signal transduction pathways in mouse microglia N-11 cells activated by advanced glycation endproducts (AGEs). *J. Neurochem.* 87:44-55.
- Ekowati, R., S. B. Sumitro, D. W. Soeatmadji & E. Widjayanto. 2016. Molecular dynamics simulation for revealing the role of water molecules on conformational change of human serum albumin. *Int. J. Pharm. Clin. Res.* 8:158-161.

- Fassett, R. G. & J. S. Coombes. 2011. Astaxanthin: a potential therapeutic agent in cardiovascular disease. *Mar. Drugs*. 9:447-465.
- Freitas, P. C. A., L. R. Ehlert & J. L. Camargo. 2016. Comparison between two enzymatic methods for glycated albumin. *Anal. Methods*. 8:8173-8178.
- Gorobets, M. G., L. A. Wasserman, A. D. Vasilyeva, A. V. Bychkova, P. G. Pronkin, A. E. Bugrova, M. I. Indeykina, N. G. Shilkina, M. L. Konstantinova, A. S. Kononikhin, E. N. Nikolaev & M. A. Rosenfeld. 2017. Modification of human serum albumin under induced oxidation. *Biochem. Biophys. Mol. Biol.* 474:231-235.
- Han, Y. D., K. R. Kim, Y. M. Park, S. Y. Song, Y. J. Yang, K. Lee, Y. Ku, H. C. Yoon. 2017. Boronate-functionalized hydrogel as a novel biosensing interface for the glycated hemoglobin A1c (HbA1c) based on the competitive binding with signaling glycoprotein. *Mater. Sci. Eng. C*. 77:1160-1169.
- Higuera-Ciajara, I., I. Felix-Valenzuela & F. M. Goycoolea. 2006. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46:185-196.
- Hosono. 2015. Nitrogen centered radical ligands. Available at <http://www.msl.titech.ac.jp/~hosono//facilities/ESR.htm> and http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~kanai/seminar/pdf/Lit_N_Nagashima_M1.pdf
- Hussein, G., U. Sankawa, H. Goto, K. Matsumoto, H. Watanabe. 2006. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *J. Nat. Prod.* 69:443-449.
- Ioannou, A. & C. Varotsis. 2017. Modifications of hemoglobin and myoglobin by Maillard reaction products (MRPs). *PLoS ONE*. 12:e0188095.
- Janmey, P. A. & M. Schliwa. 2008. Rheology. *Curr. Biol.* 18:R639-R641.
- Jian, W., L. Wang, L. Wu & Y. Sun. 2018. Physicochemical properties of bovine serum albumin-glucose and bovine serum albumin-mannose conjugates prepared by pulsed electric fields treatment. *Molecules*. 23:1-12.
- Jin, W., Q. Yang, B. Huang, Z. Bao, B. Su, Q. Ren, Y. Yang & H. Xing. 2016. Enhanced solubilization and extraction of hydrophobic bioactive compounds using water/ionic liquid mixtures. *Green Chem.* 18:3549-3557.
- Kazmierczak, S. C., A. Gurachevsky, G. Matthes & V. Muravsky. 2006. Electron spin resonance spectroscopy of serum albumin: a novel new test for cancer diagnosis and monitoring. *Clin. Chem.* 52:2129-2134.
- Khoirunnisa, W., M. I. Nur, S. Widyarti, S. Permana & S. B. Sumitro. 2019. Physiologic glycated-bovine serum albumin determination using spectrum-UV. *IOP Conf. Ser. J. Physics Conf. Ser.* 1241:1-7.

- Klussmann, M. & S. Devarajulu. 2011. Catalytic oxidative coupling reactions for the formation of carbon—carbon bonds without carbon—metal intermediates. *ChemInform*. 42:10.1002/chin.201121244.
- Kohzuma, T., T. Yamamoto, Y. Uematsu, Z. K. Shihabi & B. I. Freedman. 2011. Basic performance of an enzymatic method for glycated albumin and reference range determination. *J. Diabetes Sci. Technol*. 5:1455-1462.
- Le Dévéhat, C., M. Vimeux & T. Khodabandehlou. 2004. Blood rheology in patients with diabetes mellitus. *Clin. Hemorheol. Microcirc*. 30:297-300.
- Ledesma-Osuna, A. I., G. Ramos-Clamont & L. Vasquez-Moreno. 2008. Characterization of bovine serum albumin glycated with glucose, galactose and lactose. *Acta Biochimica Polonica*. 55:491-497.
- Li, X. & Y. Yan. 2017. Comparative study of the interactions between ovalbumin and five antioxidants by spectroscopic methods. *J. Fluorescence*. 27:213-225.
- Liu, W., Z. Wei, H. Ma, A. Cai, Y. Liu, J. Sun, N. A. DaSilva, S. L. Johnson, L. J. Kirschenbaum, B. P. Cho, J. A. Dain, D. C. Rowley, Z. A. Shaikh & N. P. Seeram. 2017. Anti-glycation and anti-oxidative effects of a phenolic-enriched maple syrup extract and its protective effects on normal human colon cells. *Food Funct*. 8:757-766.
- Lu, M., Y. Zhang, C. Zhao, P. Zhou & L. Yu. 2010. Analysis and identification of astaxanthin and its carotenoid precursors from *Xanthophyllomuces dendrorhous* by high-performance liquid chromatography. *Z Naturforsch*. 65:489-494.
- Lu, X-L., H-C. Yang, H. Wu & A-X. Hou. 2012. Characterization of the interaction between cationic thulium (iii)—porphyrin complex with bovine serum albumin. *J. Mol. Biomark. Diagn*. 3:3.
- Luers, L., K. Rysiewski, C. Dumpitak & E. Birkmann. 2012. Kinetics of advanced glycation end products formation on bovine serum albumin with various reducing sugars and dicarbonyl compounds in equimolar ratios. *Rejuvenat. Res*. 15:201-205.
- Mallya, M., R. Shenoy, G. Kodyalamoole, M. Biswan, J. Karumathil & S. Kamath. 2013. Absorption spectroscopy for the estimation of glycated hemoglobin (HbA1c) for the diagnosis and management of diabetes mellitus: a pilot study. *Photomed. Laser. Surg*. 31:219-224.
- Matthes, G., G. Seibt, V. Muravsky, G. Hersmann & G. Dornheim. 2002. Albumin transport analysis of different collected and processed plasma products by electron spin resonance spectroscopy. *Transfus. Apher. Sci*. 27:129-135.

- Neelofar, K. & J. Ahmad. 2015. Amadori albumin in diabetic nephropathy. *Indian. J. Endocrinol. Metab.* 19:39-46.
- Nishigaki, I., P. Rajendran, R. Venugopal, G. Ekambaram, D. Sakthisekaran & Y. Nishigaki. 2010. Cytoprotective role of astaxanthin against glycated protein/iron chelate-induced toxicity in human umbilical vein endothelial cells. *Phytother. Res.* 24:54-59.
- Oliveira, J. & C. Elschenbroich. 2006. Organometallics. Wiley-VCH-Verl. Weinheim.
- Panis, G. & J. R. Carreon. 2016. Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: a microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. *Algae Res.* 18:175-190.
- Parikesit, A. A. 2010. The role of bioinformatics in protein-protein interaction study. *Sigma J. Sci. Technol.* 13:1-7.
- Perez Gutierrez, R. M. 2012. Inhibition of advanced glycation end-product formation by *Origanum majorana* L. in vitro and in streptozotocin-induced diabetic rats. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2012:598638.
- Perez Gutierrez, R. M. 2013. Inhibition of advanced glycation end products formation by stilbene and phenanthrene derivatives from *Prosthechea michuacana* in vitro and in vivo. *Bol. Latinoam. Caribe. Plant Med. Aromat.* 12:69-80.
- Phelan, S. E. 2001. What is complexity science, really?. *Emergence.* 3:120-135.
- Polotow, T. G., C. V. Vardaris, A. R. Mihaliue, M. S. Goncalves, B. Pereira, D. Ganini & M. P. Barros. 2014. Astaxanthin supplementation delays physical exhaustion and prevents redox imbalances in plasma and soleus muscles of Wistar rats. *Nutrients.* 6:1-21.
- Rahmawati, N. Y., A. H. Harisna, W. Khoirunnisa & N. Yasvinawati. 2016. Production and characterization of nanosilica from baggase through biosynthesis using *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 16:6114-6118.
- Rondeau, P., G. Navarra, F. Cacciabaud, M. Meone, E. Bourdon & V. Militello. 2010. Thermal aggregation of glycated bovine serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1804:789-798.
- Roohk, H. V. & A. R. Zaidi. 2008. A review of glycated albumin as an intermediate glycation index for controlling diabetes. *J. Diabetes Sci. Technol.* 2:114-1121.
- Sadowska-Bartos, I., S. Galiniak & G. Bartosz, G. 2014. Kinetics of glycooxidation of bovine serum albumin by glucose, fructose and ribose and its prevention by food components. *Molecules.* 19:18828-18849.

- Shekunov, B. Y., P. Chattopadhyay, H. H. Y. Tong & A. H. L. Chow. 2006. Particle size analysis in pharmaceuticals: principles, methods, and applications. *Pharma. Res.* 24:203-227.
- Shen, C-Y., C-H. Wu, C-H. Lu, Y-M. Kuo, K-J. Li, S-C. Hsieh & C-L. Yu. 2019. advanced glycation end products of bovine serum albumin suppressed Th1/Th2 cytokine but enhanced monocyte IL-6 gene expression via MAPK-ERK and MyD88 transduced NF- κ B p50 signaling pathways. *Molecules.* 24:2461.
- Shibata, A., Y. Kiba, N. Akati, K. Fukuzawa & H. Terada. 2001. Molecular characteristics of astaxanthin and beta-carotene in the phospholipid monolayer and their distributions in the phospholipid bilayer. *Chem. Phys. Lipids.* 113:11-22.
- Singh, V. P., A. Bali, N. Singh & A. S. Jaggi. 2014. Advanced glycation end products and diabetic complication. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 18:1-14.
- Testa, R., E. Guerra, A. R. Bonfigli, N. D. Gaetano, G. Santini & F. Ceriotti. 2016. Analytical performances of an enzymatic assay for the measurement of glycated albumin. *J. Appl. Lab. Med.* 1: 162-171.
- Tvekovska, R., A. Sredovska-Bozhihinov, T. Niwa, I. Ivanov & R. Mironova. 2016. Maillard reaction and immunogenicity of protein therapeutics. *World J. Immunol.* 6:19-38.
- Wagner, M. C., J. Myslinski, S. Pratap, B. Flores, G. Rhodes, S. B. Campos-Bilderback, R. M. Sandoval, S. Kumar, M. Patel, Ashish & B. A. Molitoris. 2016. Mechanism of increased clearance of glycated albumin by proximal tubule cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 310:1089-1102.
- Wibowo, S., S. Widyarti, S. B. Sumitro & A. Sabarudin. 2019. The role of astaxanthin compared with metformin in preventing glycated human serum albumin from possible unfolding: a molecular dynamic study. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 12:276-282.
- Wu, C-H. & G-C. Yen. 2005. Inhibitory Effect of Naturally Occurring Flavonoids on the Formation of Advanced Glycation Endproducts. *J. Agric. Food Chem.* 53:3167-3173.
- Wu, W-C., W-Y., Ma, J-N. Wei, T-Y., Yu, M-S., Lin, S-R., Shih, C-H., Hua, Y-J., Liao, L-M., Chuang & H-Y., Li. 2016. Serum glycated albumin to guide the diagnosis of diabetes mellitus. *PloS One.* 11:e146780.

- Xu, H., N. Yao, H. Xu, T. Wang, G. Li & Z. Li. 2013. Characterization of the interaction between eupatorin and bovine serum albumin by spectroscopic and molecular modeling methods. *Int. J. Mol. Sci.* 14:14185-14203.
- Yuan, J-P. & F. Chen. 1997. Identification of astaxanthin isomers in *Haematococcus lacustris* by HPLC-photodiode array detection. *Biotechnol. Tech.* 11:455-459.
- Zhang, S. & S. M. Kim. 2019. Synthesis, characterization, antioxidant and anti-diabetic activities of a novel protein–vanadium complex. *Appl. Organometal. Chem.* 33:e5102.
- Zurawska-Plaksej, E., A. Rorbach-Dolata, K. Wiglusz & A. Piwowar. 2018. The effect of glycation on bovine serum albumin conformation and ligand binding properties with regard to gliclazide. *Spectrochimica Acta Part A Mol. Biomol. Spectroscopy.* 15:625-633.



Lampiran

Lampiran 1. Sertifikat bebas plagiasi tesis



Lampiran 2. Naskah publikasi

Journal of Physics: Conference Series

PAPER • OPEN ACCESS

Physiologic Glycated-Bovine Serum Albumin Determination using Spectrum-UV

To cite this article: W Khoirunnisa *et al* 2019 *J. Phys.: Conf. Ser.* **1241** 012003

View the [article online](#) for updates and enhancements.



IOP ebooks™

Bringing you innovative digital publishing with leading voices to create your essential collection of books in STEM research.

Start exploring the collection - download the first chapter of every title for free.

This content was downloaded from IP address 140.213.58.154 on 13/09/2019 at 03:15

Physiologic Glycated-Bovine Serum Albumin Determination using Spectrum-UV

W Khoirunnisa, M I Nur¹, S Widyarti¹, S Permana¹ and S B Sumitro¹

¹ Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Science, Brawijaya University, Jalan Veteran, Malang, East Java 65145, Indonesia

sutiman@ub.ac.id

Abstract. Albumin is not native phase, but it physiologically-binding with another compound which conclude the functions as transporter and scavenger. The general non-enzymatic reaction within proteins, which has a significant impact on their physical and functional properties by reducing sugar, known as glycation. The study investigated the effective composition to glycate the bovine serum albumin (BSA) by UV-spectrum. Five BSA concentrations (750, 500, 100, 10 and 1 mM) was prepared in PBS pH 7.4. The glycation carried out using glucose concentrations (2M, 1.5 M, 1 M, 500 mM, and 100 mM) before and after incubation for seven days. Depending on concentration, BSA 1 mM and 10 mM showed the best UV spectrum of protein that two peaks, 220 and 280 nm. Hence, the glycation by high concentration of glucose would be made a conformational change of BSA which is marked by the UV-spectrum of BSA configuration. Glucose 100 and 500 mM was effective to glycate BSA.

Keywords: Bovine serum albumin, glucose, glycation, UV spectrum

1. Introduction

Albumin is great known proteins of plasma and has a normal concentration around 35–50 g/l. This characters make albumin the most abundant protein with a wide variety of physiological functions [1]. An individual albumin presents approximately 50% of the normal plasma protein and low molecular weight (67 kDa) [2]. Due to its low molecular weight, albumin promotes in osmotic pressure maintenance of plasma, compared with other globulin of plasma. Also, it has weak isoelectric point, this protein has a global negative charge at physiological pH. The structure of albumin allows protein to bind and transport diverse metabolites such as metal ions, fatty acids, bilirubin and drugs. This structures makes an albumin roles as transporter and scavenger, not stand alone, but it physiologically-binding with another molecules. About 12–18% of circulating proteins (including albumin) are glycated in vivo in normoglycemic blood [3].

Protein is a subject to a several enzymatic and non-enzymatic modifications. The general non-enzymatic reaction within proteins, which has a significant impact on their physical and functional properties by reducing sugar, such as glucose and fructose, known as glycation Maillard reaction [4]. The sugars in addition to amine groups of protein leads to the formation of a reversible Schiff base [5,6]. It rearranges to form over a period of days to produce ketoamine or Amadori product. This products undergo rearrangements followed by other reactions (cyclization, oxidation and dehydration) to form more stable advanced glycation end products (AGEs). Glycation transforms the structure and function of protein, managing to protein dysfunction. These changes could be related to pathological problem



Content from this work may be used under the terms of the Creative Commons Attribution 3.0 licence. Any further distribution of this work must maintain attribution to the author(s) and the title of the work, journal citation and DOI.

Published under licence by IOP Publishing Ltd

1

such as diabetes [7,8]. Albumin is one of protein which has a high probability of glycation mechanism. Previous studies have focused albumin as a glycation target due to it acts as a transporter and scavenger. The glycation mechanism of albumin occurs at tryptophan, tyrosine and phenylalanine residues sites. Thus, the albumin conformational changes are caused by modification on binding sites of albumin when glycation happened [1]. BSA is a protein which rich in lysine (59; 10.1%) and arginine residues (23; 3.9%). Besides, *in vivo*, albumin is glycated at the arginine, lysine and cysteine residues. The albumin structural modifications induced by glycation included an increased in molecular weight and higher exposure of hydrophobic sites to the solvent of albumin [6,9].

Spectroscopy is a simple and significant analysis used to investigate structural changes and to explore complex formation such as glycation mechanism of albumin [9]. Spectroscopy is a measurement and interpretation of electromagnetic radiation absorbed or emitted when a molecules of sample moves from one energy state to another. Electrons absorb the energy thereby molecules undergo transition from ground state to excited state and its occurred at wavelength of 200-400 nm [10,11].

The study of protein have done with many modifications and purposes. Since bovine serum albumin (BSA) may express as a modelling protein in *in vitro* experiments. This study investigated the effective composition of BSA and glucose to glycate BSA and keep to maintain its conformational structure by UV-spectrum.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents

BSA (BioWORLD, purity of 98%, cat#L18122302) concentration in 750, 500, 100, 10, and 1 mM were dissolved in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. Glucose (Sigma-Aldrich) concentrations in 2 M, 1.5, 1, 500, and 100 mM were used as glycating agents and were dissolved in 0.1 M PBS, pH 7.4. The samples were preserved by 0.1% natrium azide (Sigma-Aldrich).

2.2. Conditions of glycation

BSA with addition of glucose and natrium azide was dissolved in PBS and was incubated in sterile vial on laminar air flow for seven days stirred-incubation at 120 rpm and a temperature of 37 °C. The parameters of glycation were measured in before incubation (BG2000 0 day; BG1500 0 day; BG1000 0 day; BG500 0 day; BG100 0 day) and after seven days incubation (BG2000 7 days; BG1500 7 days; BG1000 7 days; BG500 7 days; BG100 7 days).

2.3. UV spectrum absorbance of protein

UV absorption spectra were recorded with a Thermo Spectronic (Genesys 10 UV) spectrophotometer (Rochester, USA). Mode of survey scanned protein were calculated at UV wavelength of 200-300 nm. Five BSA concentrations, five glucose concentration, glycated-BSA (before and after seven days incubation) was kept in their concentrations. UV absorption spectra of BSA and glycated BSA were investigated both backbone and aromatic amino acid chains as blue and red shifts also they configuration.

3. Results and Discussion

3.1. UV spectrum of BSA and glucose

UV absorption assay is well accepted which dynamic quenching affects occurred the excited states of the chromophores [9]. Figure 1 shows the UV absorption spectra acquired for BSA at pH 7.4 in various concentrations at wavelength of 200-300 nm. Regularly, with the concentration enhancements of BSA, indicating the saturated of BSA dissolved in sodium phosphate buffer, no more showed the basic UV spectra of protein. BSA possessed two absorption peaks at 230 nm as backbone spectra (blue shift) and 278 nm as aromatic amino acid chain spectra such as Trp, Tyr, and Phe (red shift). BSA 1 mM and 10 mM able to maintain the albumin conformation. Besides, the higher concentrations of BSA (100, 500 and 750 mM) are undetermined as BSA UV absorption spectra. The spectra which undetermined as one of protein has undergone configuration and function changes.

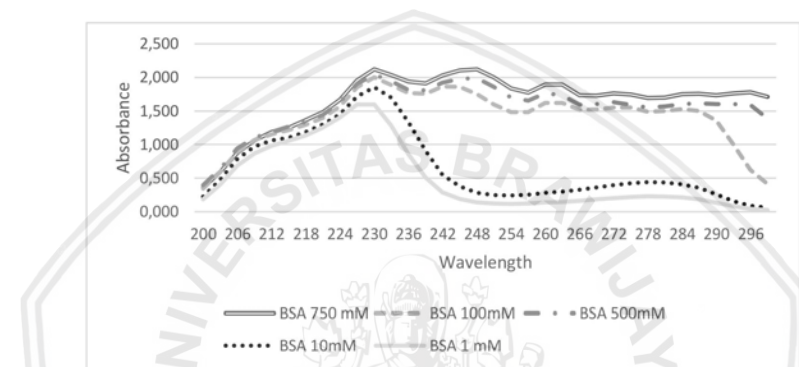


Figure 1. UV absorption spectra of various concentrations of BSA. The 1 mM and 10 mM of BSA concentrations have determined an effective concentration to maintained BSA conformation.

Depending on the UV absorption spectra, the effective of BSA concentration is 1 mM and 10 mM. In this experiment, we continued glycated BSA 1 mM using various glucose concentrations. The concentrations of glucose have screened and concluded that glucose with 100 mM and 500 mM is effective to glycated the BSA approaching the basic spectra of protein. Glucose generates non-enzymatic glycation of proteins also plasma proteins (albumin) as a reducing sugar. Significances of glucose bind to albumin lead to conformational changes of the native albumin structure and through loss of its binding properties and induce the signaling cascades transduced by glycated receptor [8].

Glycation of BSA and glucose have done with BSA 750 mM and three glucose concentrations (2M, 1.5 M and 1 M) also BSA 1 mM and two glucose concentrations (500 mM and 100 mM) before and after incubation for seven days. Figure 2 showed that the BSA 750 mM sustain a conformational change. The UV absorption spectra indicated that the absorption value was too high (absorbance of 2.0 – 3.0) deviated to the BSA 750 mM. Absorption peak of backbone spectra (230 nm) has gone and aromatic amino acid spectra too high (more than 0.5 in absorbance). Higher concentration of glucose confirmed to make a conformational change of BSA so, lower concentration of glucose was effective to elevate the glycation.

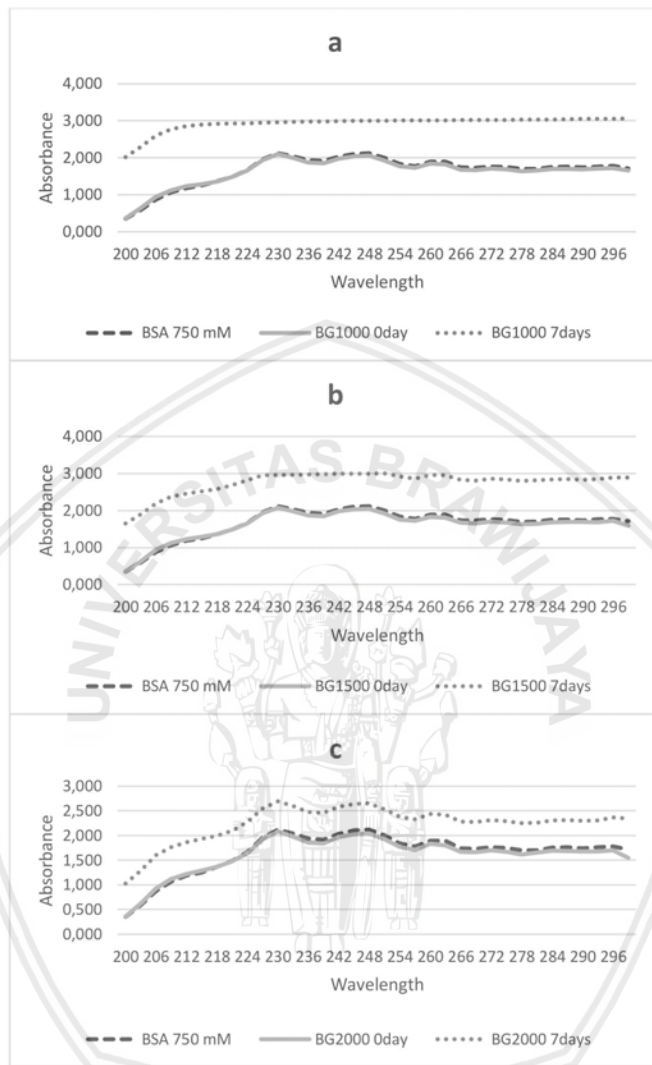


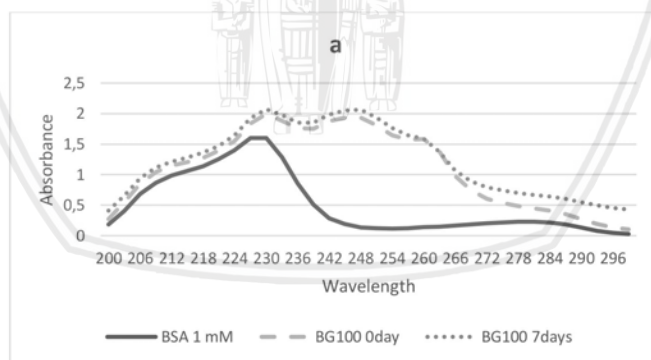
Figure 2. UV absorption spectra of glycated BSA 750 mM with glucose 1000 mM (a), glucose 1500 mM (b) and glucose 2000 mM (c). The glycation of BSA by three glucose concentrations showed the conformational spectrum of BSA and it could not maintain the native spectra of BSA. The BSA structure was ruined and could not produce the physiological glycated BSA.

3.2. UV spectrum of physiologic glycated BSA

The lower of BSA and glucose concentrations were indicated the effective composition of compound which could glycated the BSA and maintain the conformational structure of protein. It was determined by composition of BSA 1 mM with 100 mM and 500 mM. Based on before and after seven days incubations, it made a fabulous UV absorption spectra and it almost consistent both 100 mM and 500 mM concentration of glucose as shown as figure 3. When it compared with peak of BSA 1 mM, both BG100 and BG500 showed a stable peak especially at 230 nm and 280 nm, but it fluctuated in other wavelength. The conformational changes caused by intercalation of glucose. The concentrations of glucose (500 and 100 mM) was given an effective stimulation of BSA to glycate the BSA and keep to maintain its conformational structure. Although, the previous study show more significantly result to produce the physiologic glycated albumin, this study found that the time of exposure of reducing sugar could be shorten, no more weeks to make a glycated protein [5].

The glycation mechanism eventuating in organism body be decided by several characteristics (e.g. glucose concentration, other arrangement of reducing sugar in plasma, revealing time of reducing sugar and local environment) and it is difficult to reproduce to in vitro experiment. Despite the fact that, there is no equalized model of glycation, researchers apply in vitro glycation for primary research. There is two tryptophan residues of BSA molecule (Trp134 and Trp213), while human serum albumin has a tryptophan residue (Trp214), but Trp134 is detected far from the hydrophobic cleft of BSA. However, all data regarding the 230 nm backbone spectra of BSA 1 mM which consistent with the majority of previous study. UV spectra showed a strong quenching at 280 nm for sample which incubated after seven days. It accompanied with an increasing concentration of glucose indicates that binding to BSA receptors. Perhaps, the receptors change the microenvironment of amino acid residues, such as tyrosine which apparently derives from glycation mechanism of neighboring arginine or lysine residues [8,12].

Glycation transforms a function and structure of protein, managing to the protein dysfunction. Surprisingly, this study presents in vitro protein glycation at physiological glucose concentrations and could glycated BSA within seven days incubation approaching the basic spectra of protein. This study and some present research suggest several important avenues for future protein glycation research. It is important to question that some research accepted pathophysiological mechanisms if they could not be explained in vivo at physiological concentrations reducing agent. The evidence of this study clarify that lower concentration of reducing sugar and low BSA concentration plays an early role in physiologic glycated BSA as a novel and it explains a gap in the some of literature that have compared. The duration or time of exposure of the reducing sugar need to be further investigated. Some of previous study declared that the effective incubation is 4-7 weeks, but it might be shorter [8,10,12,13].



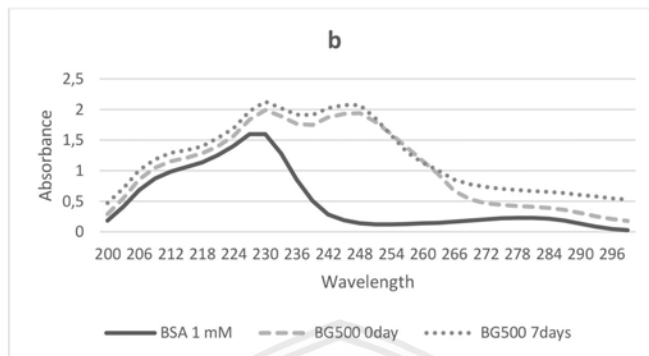


Figure 3. UV absorption spectra of glycated BSA 1 mM with glucose 100 mM (A) and glucose 500 mM (B). Both glucose concentration showed the conformational spectrum of BSA and they could change the aromatic amino acid chains spectrum (at wavelength around of 280 nm).

4. Conclusions

The effective of BSA concentration is 1 and 10 mM to glycate BSA without made a conformational change of protein structure. Higher concentration of BSA and glucose showed more chromophore spectra. But, lower concentration of BSA and glucose have no significant effect to produce more chromophore spectra. So, the conformation based on UV spectra was more stable. To know protein glycation function and conformational change of its structure need further analyzed such as with Electron Spin Resonance, Fourier Transform Infrared Spectroscopy, viscosity and spectrofluorometry.

5. Acknowledgements

The authors thank to *Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi* (Directorate of Research and Community Services, Directorate of Research Strengthening and Development, Ministry of Research and Higher Education) FY 2018.

References

1. Arasteh, A., Farahi, S., Habibi-Rezaei, M., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2014). Glycated albumin: an overview of the in vitro models of an in vivo potential disease marker. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, *13*, 49. Doi: 10.1186/2251-6581-13-49.
2. Hori, M., Yagi, M., Nomoto, K., Ichijo, R., Shimode, A., Kitano, T., & Yonei, Y. (2012). Experimental models for advanced glycation end product formation using albumin, collagen, elastin, keratin and proteoglycan. *Anti-Aging Medicine*, *9*, 125-134.
3. Li, X., & Yan, Y. (2017). Comparative study of the interactions between ovalbumin and five antioxidants by spectroscopic methods. *Journal of Fluorescence*, *27*(1), 213-225. Doi: 10.1007/s10895-016-1948-3.
4. Tvekovska, R., Sredovska-Bozhihinov, A., Niwa, T., Ivanov, I., & Mironova, R. (2016). Maillard reaction and immunogenicity of protein therapeutics. *World Journal of Immunology*, *6*(1), 19-38. Doi: 10.5411/wji.v6.i1.19.
5. Rondeau, P., Navarra, G., Cacciabauda, F., Meone, M., Bourdon, E., & Militello, V. (2010). Thermal aggregation of glycated bovine serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1804*(4), 789-798. Doi: 10.1016/j.bbapap.2009.12.003.

6. Sadowska-Bartosz, I., Galiniak, S., & Bartosz, G. (2014). Kinetics of glycoxidation of bovine serum albumin by glucose, fructose and ribose and its prevention by food components. *Molecules*, *19*(11), 18828-18849. Doi: 10.3390/molecules191118828.
7. Ledesma-Osuna, A. I., Ramos-Clamont, G., & Vasquez-Moreno, L. (2008). Characterization of bovine serum albumin glycated with glucose, galactose and lactose. *Acta Biochimica Polonica*, *55*(3), 491-497.
8. Zurawska-Plaksej, E., Rorbach-Dolata, A., Wiglusz, K., & Piwowar, A. (2018). The effect of glycation on bovine serum albumin conformation and ligand binding properties with regard to glioclazide. *Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *15*, 625-633. Doi: 10.1016/j.saa.2017.08.071.
9. Xu, H., Yao, N., Xu, H., Wang, T., Li, G., & Li, Z. (2013). Characterization of the interaction between eupatorin and bovine serum albumin by spectroscopic and molecular modeling methods. *International Journal of Molecular Science*, *14*(7), 14185-14203. Doi: 10.3390/ijms140714185.
10. Lee, P., & Wu, W. (2015). Review: modifications of human serum albumin and their binding effect. *Current Pharmaceutical Design*, *21*(14), 1862-1865.
11. Miyake, N., Miura, T., Hisanaga, R., Yamashita, S., Sato, T., & Yoshinari, M. (2016). Effect of physicochemical surface modifications on bovine serum albumin adsorption to tetragonal zirconia polycrystal in vitro through the change of the zeta potential. *Journal of Oleo Science*, *65*(12), 1003-1010. Doi: 10.5650/jos.ess16053.
12. Baraka-Vidot, J., Guerin-Dubourg, A., Bourdon, E., & Rondeau, P. (2012). Impaired drug-binding capacities of in vitro and in vivo glycated albumin. *Biochimie*, *94*(9), 1960-1967. Doi: 10.1016/j.biochi.2012.05.017.
13. Vlassopoulos, A., Lean, M. E. J., & Combet, E. (2013). Role of oxidative stress in physiological albumin glycation: a neglected interaction. *Free Radical Biology & Medicine*, *60*, 318-324. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.010.

Lampiran 3. Sertifikat penyaji pada *International Seminar on Bioscience and Biological Education* (ISBBE) UNY, 29-30 Oktober 2018

