

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan yaitu penelitian eksperimental laboratoris secara *in vitro* menggunakan kombinasi ekstrak etanolik daun teh (*Camellia sinensis*) dan daun sirsak (*Annona muricata* L.) dengan hasil akhir berupa nilai IC_{50} , selain itu juga secara *in silico* menggunakan senyawa katekin dan *acetogenin* dengan protein HER2 dan *ER- α* .

B. Tempat dan Waktu

1. Tempat

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Penelitian, Teknologi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Februari 2018-Juni 2018.

C. Variabel Penelitian dan Definisi Oprasional

1. Variabel Penelitian

a. Analisis kandungan kimia metode KLT

Variabel bebas : Kombinasi ekstrak etanolik daun teh dan daun sirsak

Variabel tergantung : Nilai Rf pada plat KLT.

Variabel terkontrol : Waktu eluen mencapai batas plat.

b. Uji antioksidan metode DPPH

Variabel bebas : Konsentrasi kombinasi ekstrak etanolik daun teh dan daun sirsak.

Variabel tergantung : Aktivitas antioksidan kombinasi ekstrak etanolik daun teh dan daun sirsak.

Variabel terkontrol : Suhu dan waktu inkubasi.

c. *In silico* Molekular Docking

Variabel bebas : Bentuk konformasi optimal katekin dan *acetogenin*.

Variabel tergantung : *Docking score*.

Variabel terkontrol : Perangkat keras dan lunak komputer, struktur protein HER2 dan *ER- α* .

d. Optimasi sediaan granul *effervescent*

Variabel bebas : Formulasi granul *effervescent*.

Variabel tergantung : Kelarutan granul *effervescent*.

Variabel terkontrol : Waktu dan suhu pengeringan serbuk.

2. Definisi Operasional

a. Harga *Retardation Factor* (Rf)

Harga Rf merupakan jarak yang ditempuh oleh senyawa flavonoid dari batas bawah yang ditentukan, dibagi dengan jarak atas yang ditempuh oleh pelarut yang sudah ditentukan.

b. *Docking Score*

Nilai ini memperlihatkan energi total dari ikatan protein dengan ligan, semakin kecil *docking score* maka semakin baik atau poten suatu senyawa (ligan).

c. IC₅₀

Pada uji antioksidan nilai IC₅₀ merupakan suatu bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak dalam (µg/ml) yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50%.

D. Instrument Penelitian

1. Alat Penelitian

Seperangkat komputer, alat-alat gelas, timbangan analitik, oven, spektrofotometer UV-Vis, aluminium foil, vorteks, mikropipet, tip mikropipet, blender, rotary evaporator, chamber, water bath, cawan porselin, kertas saring, pipa kapiler, kuvet, corong, ayakan mesh 20, mortar, stemper.

2. Bahan Penelitian

a. Bahan utama

Daun teh (*Camellia sinensis*) yang didapatkan dari Wonosobo dan daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang diperoleh dari daerah Bantul.

b. Bahan

Atanol 70%, aquadets, DPPH, lempeng KLT silika gel GF254, n-Butanol, asam asetat, metanol, asam askorbat, asam sitrat, asam tartrat, natrium bicarbonat, aspartam, natrium benzoat, rutin, PVP, amoniak, struktur protein reseptor HER2 dan ER- α .

E. Cara Kerja

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Fakultas Farmasi UGM Unit 2 pada bagian Laboratorium Biologi Farmasi.

2. Pembuatan Ekstrak

a. Pengumpulan bahan dan pembuatan serbuk

Daun teh yang digunakan sebanyak 10 kg dan daun sirsak sebanyak 10 kg, dengan perlakuan yang sama, kedua daun dibersihkan dan di keringkan di udara terbuka dibawah sinar matahari dengan ditutupi menggunakan kain hitam, pengeringan dilakukan selama 10 hari atau sampai daun mudah rapuh ketika di remas, kemudian diblender hingga halus sampai menjadi serbuk simplisia.

b. Pembuatan ekstrak etanolik daun *Camellia sinensis* dan daun *Annona muricata* L.

Serbuk simplisia yang diperoleh dilarutkan dalam etanol 70% dengan perbandingan serbuk : etanol 70% 1:6 menggunakan metode maserasi yaitu dilakukan dengan merendam serbuk simplisia ke dalam etanol 70% selama 4 hari dan dilakukan pengadukan setiap hari agar mendapatkan penyarian yang optimal. Maserat kemudian disaring setelah 4 hari dan dilakukan remaserasi selama 2 hari untuk memaksimalkan hasil maserasi. Setelah 2 hari maserat disaring kembali, lalu hasilnya dicampurkan dengan yang pertama dan

diuapkan menggunakan *Rotary Evaporator* hingga menjadi ekstrak kental dan ditimbang bobotnya.

3. Uji Kandungan Senyawa Kimia

Uji ini dilakukan dengan metode KLT yang dilakukan dengan menotolkan sampel larutan uji yaitu kombinasi ekstrak etanolik daun teh dan daun sirsak pada plat KLT menggunakan pipa kapiler, kemudian di elusi dengan fase gerak yang sudah jenuh di dalam bejana yang tertutup rapat. Untuk mengetahui kejenuhan fase gerak, ke dalam bejana tertutup dimasukkan kertas saring hingga keluar dari bejana. Fase gerak jenuh ditandai dengan kertas saring yang sudah basah sampai pada bagian yang berada diluar bejana. Untuk identifikasi senyawa flavonoid atau polifenol dalam ekstrak menggunakan fase gerak yaitu *n*-Butanol : Asam Asetat: Air (BAA) dengan perbandingan 7:2:1 sedangkan fase diam yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄. Setelah di elusi plat KLT dikeluarkan dari *chamber* dan dikeringkan dalam oven suhu 60⁰ C selama 10 menit, kemudian plat diamati dibawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan dilihat hasil serta R_f-nya. Setelah itu digunakan pereaksi warna yaitu uap amoniak untuk mendeteksi adanya flavonoid.

4. Uji Aktivitas Antioksidan dengan metode DPPH

a. Pembuatan Larutan Baku DPPH

Sebanyak 15,8 mg serbuk DPPH dimasukkan ke dalam labu takar, kemudian dilarutkan dalam 100 mL metanol p.a sehingga didapatkan konsentrasi 0,4 mM. Larutan di *vortex* selama 30 detik lalu bungkus menggunakan aluminium foil.

b. Pembuatan Larutan Vitamin C

Sebanyak 5 mg vitamin C analisis dimasukkan ke dalam labu takar 50 mL, kemudian ditambahkan metanol p.a hingga tanda batas sebagai larutan induk. Kemudian dibuat seri kadar vitamin C 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ; 20 ; 30 $\mu\text{g/mL}$.

c. Pembuatan Larutan Sampel

Sebanyak 20 mg kombinasi ekstrak etanolik daun sirsak dan daun teh ditambahkan dengan 20 mL metanol p.a sehingga didapatkan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$. Dari larutan induk tersebut dibuat seri kadar 5 ; 7,5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 30 $\mu\text{g/mL}$.

d. Uji Pendahuluan

Menyiapkan 3 tabung reaksi kemudian larutan DPPH 1 mL dimasukkan ke tabung 1 dan ditambahkan 3 mL metanol. Kemudian larutan vitamin C 5 $\mu\text{g/mL}$ 1 mL dimasukkan ke tabung 2 dan ditambahkan 3 mL metanol. Ke dalam tabung ke 3 masukkan larutan Sampel 500 $\mu\text{g/mL}$ 1 mL dan tambahkan 3 mL metanol ke dalamnya. *Vortex* kedua tabung selama 3 detik dan diamkan selama 30 menit, kemudian amati warnanya.

e. Penentuan Operating Time

Menyiapkan 3 labu ukur 5 mL, kemudian masukkan larutan vitamin C 3 ; 4 ; 5 $\mu\text{g/mL}$ sebanyak 1 mL ke labu ukur 1, 2, 3 secara berurutan. Tambahkan 1 mL Larutan DPPH ke dalam masing-masing labu ukur dan tambahkan metanol sampai tanda batas. Pindahkan masing-masing larutan dalam labu takar ke tabung reaksi kemudian *vortex* 30 detik. Baca serapan larutan pada λ 514 nm tiap 5 menit selama 45 menit, dilakukan replikasi 3 kali.

f. Penetapan Panjang Gelombang Maximum

Ke dalam labu ukur 10 mL dimasukkan 1 mL larutan DPPH, kemudian tambahkan metanol sampai tanda batas. Larutan tersebut dipindahkan ke dalam tabung reaksi. *Vortex* larutan selama 30 detik. Diamkan selama *operating time* baca serapan pada panjang gelombang 200-800 nm.

g. Pengukurana Absorbansi Larutan DPPH

Ke dalam labu ukur 10 mL dimasukkan 2 mL larutan DPPH. Tambahkan metanol hingga tanda batas kemudian diamkan selama *operating time*. Baca serapan pada λ Maksimum, lakukan replikasi 3 kali.

h. Pengukuran Absorbansi Larutan Vitamin C dan Sampel

Kedalam labu ukur 10 mL dimasukkan 2 mL larutan DPPH. Tambahkan 2 mL larutan vitamin C atau larutan sampel pada

berbagai seri konsentrasi yang dibuat. Kemudian tambahkan metanol sampai tanda batas. *Vortex* larutan selama 30 detik, dan diamkan selama *operating time*. Baca serapan pada λ Maksimum dan lakukan replikasi 3 kali.

Untuk menghitung IC_{50} dengan cara mengolah data absorbansi sampel menjadi bentuk % antioksidan dengan rumus berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Nilai IC_{50} bisa diperoleh dengan memasukkan nilai 50 sebagai y dalam persamaan regresi linier yang diperoleh dari hubungan $x =$ kadar dan $y =$ % antioksidan.

5. *Molecular Docking*

a. Pengambilan Data

Dalam penelitian ini, data struktur protein target didapatkan melalui *Protein Data Bank* (PDB) dengan mengakses www.rcsb.org. PDB ID yang digunakan adalah HER2 sebagai target *docking* dengan kode protein 3PP0 dan ER- α dengan kode 6B0F. Kemudian *download file* dengan format PDB.

b. Preparasi Reseptor Target dan Ligand Uji

Preparasi protein menggunakan aplikasi DS Visualizer. Buka protein 3PP0 dan 6B0F yang sudah di *download* menggunakan DS Visualizer. Preparasi reseptor dilakukan dengan cara menghilangkan semua ligand, molekul air dan hemoglobin dari penyusunnya. Kemudian simpan reseptor yang sudah dipreparasi

menggunakan format PDB. Selanjutnya untuk preparasi ligand asli 03Q dan 6B0F sebagai ligand uji dilakukan dengan membuka protein 3PP0 dan 6B0F pada DS Visualizer, kemudian hapus semua residu protein dan sisakan bagian ligand, simpan dalam format PDB dengan nama ligand.pdb.

c. Konversi file reseptor dan ligand dalam bentuk PDBQT

Ligand dan reseptor protein 3PP0 dan 6B0F yang sudah di preparasi harus diubah ke dalam format PDBQT agar dapat dilakukan pemrosesan menggunakan Autodock Vina. Untuk mengkonversi format ini digunakan aplikasi Autodock Tools. Jalankan autodock tools, kemudian buka reseptor dan ligand yang sudah di preparasi satu per satu dan tambahkan atom hidrogen. Atur *grid box* hingga semua senyawa masuk ke dalamnya, simpan reseptor dan ligand protein HER2 3PP0 serta ER- α 6B0F dalam format PDBQT.

d. Simulasi *Docking* menggunakan Autodock Vina

File reseptor dan ligan senyawa uji dengan format pdbqt dimasukkan dalam satu folder yang berjudul vina pada local disk C. Untuk menjalankan simulasi docking dengan autodock vina ini dijalankan menggunakan *command prom*. Akan muncul 9 konformasi pada folder tersebut, konformasi yang digunakan adalah yang memiliki nilai RMSD lebih rendah dari 2 Å.

e. Visualisasi Hasil Docking

Untuk dapat melihat hasil docking dapat dilakukan visualisasi menggunakan aplikasi DS Visualizer. Sebelumnya konversikan terlebih dahulu file yang memiliki format PDBQT menjadi PDB menggunakan aplikasi Open Babel agar dapat divisualisasi menggunakan DS Visualizer. Pada bagian input masukkan hasil docking dengan format pdbqt kemudian ubah bagian output menjadi PDB lalu lakukan konversi dengan menekan convert. Setelah itu hasil docking dapat di visualisasi menggunakan DS Visualizer.

6. Sediaan Granul *Effervescent*

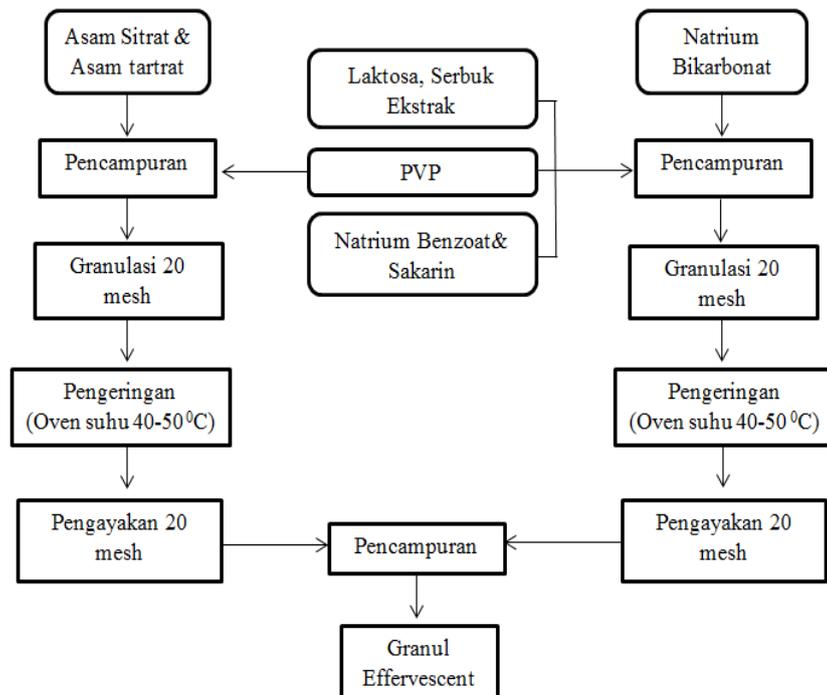
a. Formulasi Granul *effervescent*

Tabel 1. Formulasi sediaan granul *effervescent*

No	Bahan	Perlakuan (%)			
		F.1	F.2	F.3	F.4
1	Serbuk Ekstrak	1,5	1,5	1,5	1,5
2	Asam Sitrat	16,4	20,7	14	8
3	Asam Tartrat	11	14	23,5	26
4	Na Bikarbonat	26	32	32,7	33
5	PVP	1,4	1,4	1,4	1,4
6	Natrium Benzoat	1	1	1	1
7	Sakarin	0,5	0,5	0,5	0,5
8	Laktosa	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

Serbuk ekstrak didapatkan dengan memasukkan kombinasi ekstrak kental daun teh dan daun sirsak ke dalam oven pada suhu 45 °C selama 72 jam. Ekstrak yang sudah mengeras kemudian dihaluskan hingga tidak terdapat bentuk kristal ekstrak. Granul *effervescent* ini dibuat dengan metode granulasi basah, metode ini

menggunakan proses granulasi terpisah antara komponen asam dan komponen basa.



Gambar 1. Diagram alir pembuatan granul effervescent

b. Uji Sifat Fisik Granul *Effervescent*

1. Uji Organoleptis

Dilihat secara langsung mulai dari warna, bentuk, bau dan rasa yang dihasilkan. Bentuk dan warna sedapat mungkin sama dengan yang lainnya.

2. Uji Kadar Air

Masukkan 5 gram granul *effervescent* kombinasi ekstrak daun teh dan daun sirsak ke dalam alat uji kadar air. Lakukan pengaturannya pada suhu 105°C selama 5 menit.

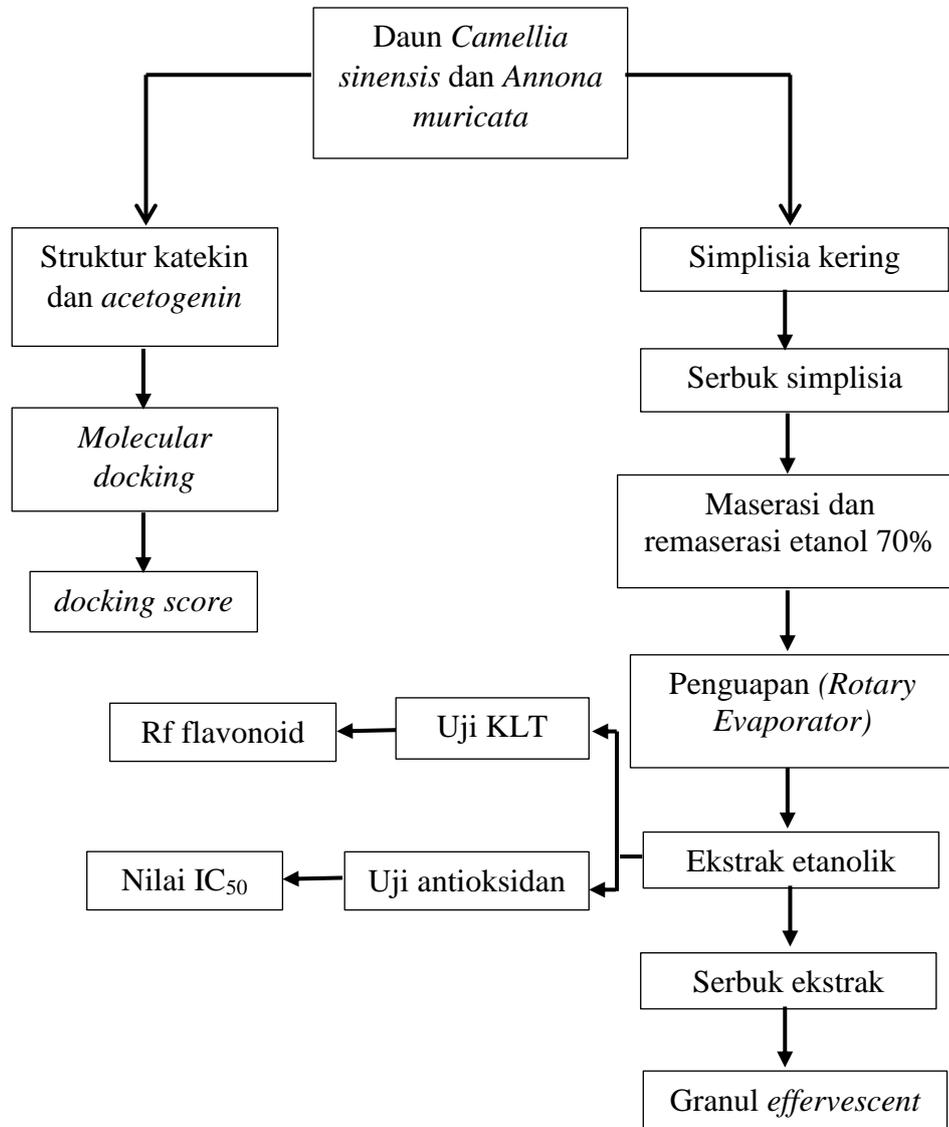
3. Analisis pH

Sebanyak 1 gram granul *effervescent* kombinasi ekstrak daun teh dan daun sirsak dilarutkan pada 150 mL aquadest hingga larut seluruhnya, kemudian dilakukan pengecekan pH larutan menggunakan pH meter.

4. Uji Melarut Granul

Sebanyak 1 gram granul *effervescent* kombinasi ekstrak daun teh dan daun sirsak dilarutkan pada 150 mL aquadest, kemudian dihitung waktu melarutnya.

A. Skema Langkah Kerja



Gambar 2. Skema langkah kerja

B. Analisis Data

1. Uji Fitokimia

Sampel yang telah dielusi menggunakan campuran dari *n*-Butanol : Asam Asetat: Air (BAA) dengan perbandingan 7:2:1 dilihat pada sinar tampak (*visible*) dan UV₂₅₄ nm. Untuk mendeteksi kandungan flavonoid, plat KLT di uapi menggunakan amoniak.

2. Uji Antioksidan

Aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan presentase inhibisi serapan DPPH dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs Kontrol Negatif} - \text{Abs Sampel}}{\text{Abs Kotrol Negatif}} \times 100\%$$

Nilai persen inhibisi yang telah dihitung dari setiap konsentrasi selanjutnya digunakan untuk perhitungan *Inhibitory Concentration 50%* (IC₅₀) yang merupakan nilai konsentrasi suatu bahan untuk menghambat aktivitas DPPH sebesar 50%. Nilai konsentrasi larutan yang telah diencerkan dari ekstrak dan persen inhibisi diplotkan masing-masing pada sumbu x dan y. Kemudian nilai IC₅₀ dihitung dengan regresi linear dengan persamaan $y = b(x) + a$, dengan konstanta y sebesar 50 dan konstanta x sebagai IC₅₀. Tingkat kekuatan antioksidan dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 2. Tingkat kekuatan antioksidan dengan metode DPPH (Mardawati *et al.*, 2008)

No	Intensitas	IC ₅₀
1	Sangat Kuat	<50 µg/ml
2	Kuat	50-100 µg/ml
3	Sedang	101-150 µg/ml
4	Lemah	151-200 µg/ml

3. *Molecular Docking*

Dari molekul yang diujikan dilakukan analisis data nilai *pose* dan *docking score*. Suatu molekul dikatakan memiliki afinitas kestabilan yang baik apabila memiliki *docking score* yang rendah.

4. *Granul Effervescent*

Dari beberapa formulasi dilihat hasil uji organoleptis, kadar air, pH dan waktu melarut. Dibuktikan dengan adanya perbedaan konsentrasi pada formulasi menghasilkan granul *effervescent* dengan optimasi yang berbeda, sehingga dapat dipilih formulasi yang optimal untuk sediaan ini dengan sampel bahan alam.