

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dan penelitian eksploratif dengan metode *in vitro* dan *in silico*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi FKIK UMY, Laboratorium Penelitian FKIK UMY, *Central of Essential Oil Studies* UII dan Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA UGM dari bulan Januari hingga Juni 2016.

C. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

- a. Analisis Kandungan Kimia *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS)

Variabel bebas : Minyak atsiri buah kemukus (*Piper cubeba L.f.*)

Variabel tergantung : Nilai waktu retensi (Rt) rasio muatan (m/z)

Variabel terkontrol : Kondisi GC-MS

- b. Uji Aktivitas Antibakteri

Variabel bebas : Konsentrasi minyak atsiri buah kemukus (*Piper cubeba L.f.*)

Variabel tergantung : Nilai DZI masing masing konsentrasi minyak atsiri buah kemukus (*Piper cubeba L.f.*)

Variabel terkendali : Media pertumbuhan bakteri dan suhu.

c. Uji *In Silico* dengan *Autodock Vina*

Variabel bebas : Bentuk konformasi ikatan antara ligan dan protein target

Variabel tergantung : Skor penambatan molekul

Variabel terkendali : *Hardware, software*, struktur ligan, dan protein Target DNA *gyrase*

2. Definisi Operasional

- a. Waktu retensi/ *retention time* (Rt) adalah waktu yang dibutuhkan oleh senyawa untuk bergerak melalui kolom menuju detektor.
- b. Kadar Hambat Minimum (KHM)/ *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) adalah konsentrasi minimal antibakteri yang dapat menghambat aktivitas bakteri.
- c. Diameter Zona Inhibisi (DZI) adalah diameter yang berupa zona bening yang menunjukkan daya hambat suatu senyawa anti bakteri terhadap bakteri yang diuji dalam satuan milimeter (mm).
- d. Skor penambatan adalah nilai ikatan energi suatu senyawa terhadap proteinnya yang semakin minimum nilainya dianggap semakin baik dan memiliki afinitas yang lebih tinggi yang dinyatakan dengan satuan Kkal/mol.

D. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan meliputi bejana, blender Phillips® seri 2071, sarung tangan *Sensi Gloves*® (*Handscoon Non Steril*), masker Sensi Mask®, pinset Baku®, mikropipet Socorex® skala 10-100µl, pipet ukur Pyrex®, pipet tetes Pyrex®, timbangan analitik Mettler Toledo Scale brite®, gelas beker Pyrex®, dan gelas ukur Pyrex®, alat GC-MS QP2010S Shimadzu®, seperangkat *Personal Computer* (PC) dengan sistem operasi adalah Linux Ubuntu 12.04 LTS 64-bit, *processor Pentium(R) Dual-Core* CPU E6600 @ 3.06 GHz, memory 2048 MB RAM. Aplikasi yang digunakan adalah *Libre Office Calc 4.0*, *DS Visualizer*, *Autodock Tools*, *Open Babel* dan *Marvin Sketch*. Kapas lidi, ose steril yang berasal dari Lab Mikrobiologi FKIK UMY.

2. Bahan Penelitian

Kemukus (*Piper cubeba L.f.*) diperoleh dari pedagang tanaman herbal di Desa Mayungan, Kecamatan Banguntapan, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta, Aquades yang dibeli dari toko Brata Chem, NaCl fisiologis, BHI yang berasal dari Lab Mikrobiologi FKIK UMY, *ciprofloxacin iv Dextra medica*®, Protein DNA *gyrase* yang diunduh dari situs resmi Protein Data Bank (www.rscb.org)

E. Cara Kerja

1. Determinasi Tanaman

Determinasi buah kemukus (*Piper cubeba L.f.*) dilakukan di laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM.

2. Penyiapan Bahan

Buah kemukus (*Piper cubeba L.f.*) sebanyak 500 gram yang sudah bersih dan kering dihaluskan dengan *blender* hingga halus merata, setelah halus dimasukkan dalam wadah tertutup rapat.

3. Penyulingan buah kemukus

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode destilasi rebus. Serbuk halus buah kemukus sebanyak 500 gram dan aquades sebanyak 2500 ml dimasukkan kedalam panci destilasi. Kemudian dipanaskan menggunakan kompor hingga didapatkan destilat yang ditampung dalam gelas ukur. Selanjutnya minyak atsiri yang berwarna bening kekuningan dipisahkan dengan air menggunakan pipet tetes dan dimasukkan dalam wadah.

4. Analisis Kandungan Kimia Metode GC-MS

Analisis ini dilakukan untuk mendeteksi keberadaan senyawa-senyawa dalam ekstrak buah kemukus (*Piper cubeba L.f.*) dapat digunakan sebagai antibakteri. Pemisahan senyawa dengan GC menggunakan kolom AGILENTJ % W DB-1 dengan panjang 30 meter. Fase gerak menggunakan gas pembawa helium dengan kecepatan 0,54 ml/menit. Sistem pemanasan diatur dari suhu 50 hingga 260°C dengan peningkatan sebesar 5°C setiap menit. Dalam instrumen MS digunakan energi ionisasi sebesar 70 Ev.

Hasilnya akan diamati melalui spektra yang diamati berdasarkan berat molekul dan waktu retensi senyawa yang diinginkan.

5. Uji *In Silico* dengan *Autodock Vina*

a. *Instalasi Aplikasi Autodock dan Aplikasi Pendukung*

Autodock Vina merupakan aplikasi untuk melakukan proses penambatan molekul. *DS Visualizer* untuk preparasi protein uji dan ligan asli, *Marvin Sketch* untuk preparasi ligan atau senyawa ligan yang akan diuji. *AutoDockTools* untuk melakukan penambatan molekuler agar dapat dieksekusi oleh aplikasi *Autodock Vina* untuk mengukur nilai RMSD dan *Open Babel* untuk mengkonversi hasil PDBQT menjadi PDB sehingga dapat divisualisasikan menggunakan *DS Visualizer*.

b. *Penyiapan Protein Target dan Ligan Uji*

Protein yang akan digunakan sebagai reseptor uji diunduh dari situs resmi *protein data bank* (www.rcsb.org) dalam format “.pdb”. Berkas protein/reseptor yang digunakan adalah DNA *gyrase* dengan kode protein 3TTZ. Setelah mendapatkan protein target dilakukan preparasi melakukan *DS Visualizer* dengan memastikan ligan bebas dari molekul air. Reseptor disimpan dalam format PDB. Hal tersebut juga dilakukan pada ligan asli sebagai ligan uji.

c. *Konversi Protein dan Ligan dalam Format PDBQT*

Untuk menjalankan fungsi aplikasi *Autodock Vina*, berkas reseptor target dan ligan uji harus dikonversi terlebih dahulu menggunakan aplikasi *Autodock Tools*. Dalam tahapan proses konversi berkas protein

yang sudah dipreparasi ditambahkan atom hidrogen dan disimpan dalam bentuk PDBQT dengan menggunakan menggunakan tahapan preparasi *Grid Parameter File*.

d. Preparasi *Grid Parameter File*

Proses ini merupakan proses lanjutan dari langkah sebelumnya. Aplikasi *Autodock Tools* yang masih terbuka kemudian dipilih bagian *Grid* dan dipilih ligan melalui fungsi *Set Map Types* dan dilanjutkan penyiapan *Grid Box*. *Grid Box* merupakan penentuan area untuk simulasi penambatan. Kemudian hasil *output* disimpan dalam bentuk PDBQT.

e. Penambatan Molekuler dengan *Autodock Vina*

Sebelum menjalankan fungsi penambatan molekul berkas *reseptor.pdbqt* dan *ligan.pdbqt* berada pada folder yang sama. Kemudian menu RUN dibuka dan klik CMD dan menunggu prosesnya selesai. Pada *folder* Vina akan muncul beberapa konformasi hasil penambatan.

f. Visualisasi Penambatan Molekul

Hasil penambatan molekul divisualisasikan menggunakan DS Visualizer. Sebelum visualisasi berkas hasil penambatan dengan format PDBQT dirubah menjadi berkas PDB menggunakan aplikasi Open Babel. Setelah didapatkan berkas PDB, berkas *reseptor.pdb* menggunakan DS Visualizer dan dipilih hasil penambatan dan dimasukan ligan hasil penambatan molekul dan melihat visualisasi menggunakan menu *define ligand* dan *ligan interaction* untuk

mengidentifikasi dengan lebih mudah *background* diganti warna putih dan dicantumkan label residu asam amino tempat hasil penambatan berikatan.

g. Validasi *Molecular Docking*

Validasi *molecular docking* bertujuan untuk menentukan apakah protein yang digunakan untuk *molecular docking* dapat digunakan atau tidak. Validasi *molecular docking* ini dilakukan dengan cara menentukan nilai RMSD. Nilai validitas RMSD yang dipersyaratkan adalah $<2.00 \text{ \AA}$.

6. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan terlebih dahulu disterilisasi, seperti alat-alat gelas disterilisasi menggunakan oven dengan suhu 170° C selama 2 jam. Ose dan pinset disterilkan menggunakan bunsen. Media nutrien agar disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit dan aquades disterilkan dengan penangas hingga mendidih selama 15 menit. Sampel yang telah dibuat variasi konsentrasi, semua alat, dan bahan kecuali suspensi bakteri sebelum pengujian dilakukan sterilisasi menggunakan sinar UV selama 30 menit.

b. Pembuatan kontrol positif

Kontrol positif yang digunakan adalah larutan *Ciprofloxacin* 0,2% yang akan diubah konsentrasinya menjadi $5 \mu\text{g/ml}$. Larutan kontrol positif

dibuat dengan cara diambil 25 uL larutan *Ciprofloxacin* injeksi ditambahkan *Aqua Pro Injection* hingga 10 ml.

c. Pembuatan kontrol negatif

Kontrol negatif yang digunakan adalah n-heksana.

d. Pembuatan larutan uji

Konsentrasi minyak atsiri buah kemukus dibuat larutan induk dengan 100% dengan melakukan n-heksana. Selanjutnya dibuat variasi konsentrasi 10%, 20%, 40%, 80% dengan cara membuat 0,5 ml; 1 ml; 2 ml; 4 ml minyak atsiri buah kemukus ditambahkan pelarut n-heksana hingga volume 5 ml.

e. Pembuatan media agar

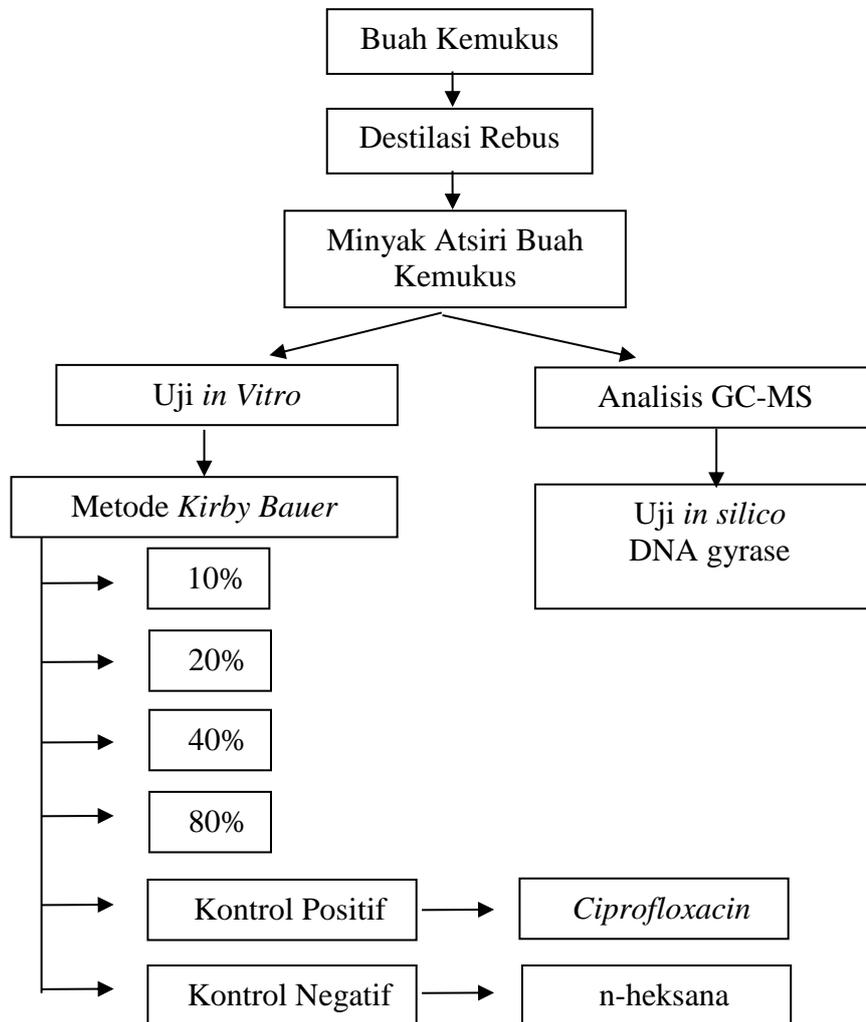
Mac Conkey Agar 20,6 gram dimasukkan ke dalam 2 erlenmeyer 250 mL. Ditambahkan air suling masing-masing sebanyak 200 mL. Dipanaskan diatas pemanas sampai larut sempurna kemudian ditutup dengan *bundle*. Disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit, dituangkan ke dalam *plate*, dimasukkan dalam almari pendingin dan siap untuk digunakan.

f. Preparasi Bakteri

Bakteri *Shigella flexneri* diambil dan dimasukkan ke dalam larutan NaCl fisiologis dan diinkubasi selama 2-4 jam pada suhu 37°C. Setelah itu larutan suspensi bakteri diambil sebanyak 1 ml dan ditambahkan dengan menggunakan *nutrient* BHI dengan perbandingan BHI dibanding suspensi bakteri (9:1) sambil dihomogenkan.

g. Uji Kadar Hambat Antibakteri

Suspensi bakteri yang terbentuk kemudian diusap secara merata pada cawan petri yang telah berisi media nutrisi agar menggunakan kapas lidi steril. Cakram kertas direndam dengan larutan uji sesuai dengan masing-masing konsentrasi. Cakram kertas yang berisi masing-masing konsentrasi minyak atsiri kemukus, kontrol positif, kontrol negatif kemudian ditempelkan pada permukaan media agar. Perlakuan ini dilakukan replikasi. Selanjutnya diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Hasilnya dapat dilihat dengan terbentuknya diameter hambatan secara radial (DZI) di sekitar cakram kertas dan diukur diameternya dengan satuan milimeter (mm). Selanjutnya dibandingkan diameter hambatan kontrol positif, kontrol negatif dan minyak atsiri.

F. Skema Langkah Kerja**Gambar 6.** Skema Cara Kerja

G. Analisis Data

1. Analisis Kandungan Kimia Metode GC-MS

Analisis kandungan senyawa buah kemukus (*Piper cubeba L.f.*) dilakukan dengan cara melihat spektra dan mengamati waktu retensi setiap senyawa yang timbul dalam bentuk puncak-puncak (*peak*) kemudian dibandingkan dengan standar yang bersumber pada WILEY 229 dan NIST 62.

2. Hasil Uji Penambatan Molekul

Hasil akhir yang akan diperoleh dari uji *in silico* adalah skor penambatan molekul pada masing-masing variabel. Dari data penelitian ini dianalisis perbandingan antara skor penambatan masing-masing senyawa uji dengan senyawa pembanding dan perbandingan hasil visualisasi dalam bentuk 3D dengan menggunakan aplikasi VMD (*Visual Molecular Dynamics*).

3. Analisis Uji Aktivitas Antibakteri

Data yang diperoleh pada pengujian ini adalah nilai DZI pada masing-masing konsentrasi. Perbedaan data penelitian antara masing-masing konsentrasi minyak atsiri kemukus dan antibiotik standar *Ciprofloxacin* dilakukan analisis parametrik dengan uji *one way ANOVA* menggunakan program SPSS.