

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan penelitian

Desain penelitian ini adalah eksperimental laboratoris yang terdiri dari pengujian kandungan senyawa dengan metode KLT, uji *In vitro* ekstrak etanolik kulit jeruk mandarin dan daun teh dengan metode DPPH untuk mengetahui aktivitas antioksidan dan secara *In silico* dengan *molecular docking*, serta formulasi sediaan tablet.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi senyawa dengan KLT

Variabel bebas = variasi konsentrasi ekstrak kulit jeruk mandarin dan daun teh.

Variabel tergantung = harga Rf

Variabel terkendali = fase gerak dan fase diam

2. Uji antioksidan

Variabel bebas = konsentrasi ekstrak etanolik Kulit jeruk mandarin dan daun teh

Variabel tergantung = Nilai IC₅₀

Variabel terkendali = Waktu inkubasi

3. *Molecular docking*

Variabel bebas = Bentuk konformasi

Variabel tergantung = Skor *docking*

Variabel terkendali = Perangkat komputer

4. Definisi Oprasional

a. IC_{50}

Nilai IC_{50} merupakan suatu bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak dalam ($\mu\text{g/ml}$) yang mampu menghambat oksidasi sebesar 50%.

b. Harga *Retardation Factor* (Rf)

Harga Rf merupakan jarak yang ditempuh oleh senyawa dari titik asal dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut dari titik asal.

c. Skor *docking*

Skor *docking* memperlihatkan energi total dari ikatan protein dengan ligan, semakin kecil skor *docking* maka semakin poten suatu senyawa.

C. Tempat dan waktu penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium penelitian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan laboratorium teknologi farmasi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Pada bulan november 2017 sampai agustus 2018.

2. Instrumen penelitian

1. Alat penelitian

Seperangkat komputer (Acer®), timbangan analitik (sartorius®), oven (memmert®), spektrofotometer (shimadzu®), alumunium foil (brand®), vortexs (labinco®), alat-alat gelas (pyrex®), autoklaf (hirayama®),

inkubator (heraceus®), *centrifuge* (sorvall®), mikropipet (gilson®), *shaker* (gemmy®), blue tip (brand®), blender (miyako®), evaporator (shimadzu®), *chamber* (falcon®), water bath (sorvall®), cawan porselin (pyrex®), kertas saring (brand®), *yello tip* (brand®), pipa kapiler (brand®), kuvet (brand®), *disintegration tester* (veego®), *hardness tester* (graiger®), *friability tester* (veego®), mortir, stemper.

2. Bahan Penelitian

Daun teh (*Camellia sinensis*) yang diperoleh dari daerah Merapi Kaliurang Yogyakarta dan kulit jeruk mandarin (*Citrus reticulata*) dari daerah Bantul Yogyakarta. Etanol 70% (Bratachem®), aquadest (Bratachem®), DPPH, lempeng KLT silika gel GF₂₅₄, struktur protein reseptor Bcl-x1, amoniak (Bratachem®), butanol (Bratachem®), kontrol rutin, larutan NaHCO₃ (Merck®), HCL encer 1 N (Merck®), asam sitrat (Bratachem®), Vitamin C (Bratachem®), heksan (Bratachem®), laktosa (Bratachem®), Mg stearat (Bratachem®), PVP (Bratachem®), asam formiat (Bratachem®), amilum (Bratachem®), talk (Bratachem®), rutin (Bratachem®).

D. Prosedur penelitian

1. Determinasi dan Ekstraksi

Ekstrak kulit jeruk mandarin dan daun teh dideterminasi di laboratorium Farmakognosi, bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

Kulit jeruk mandarin dan daun teh dicuci, dikeringkan kemudian digiling halus. Serbuk simplisia dimaserasi menggunakan etanol 70%

selama 5 hari dan diremaserasi selama 2 hari di ekstrak dengan Etanol 70%. Ekstrak dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C lalu ditimbang untuk dihitung rendemennya.

2. Uji KLT

Analisis kandungan kimia metode KLT dengan fase gerak berupa butanol : asam asetat dan air perbandingan 7:2:1 yang dijenuhkan di dalam *chamber*. Sampel ekstrak etanolik kulit jeruk mandarin dan daun teh dengan pembanding rutin dilarutkan dan kemudian ditotolkan diplat KLT dengan fase diam silika gel GF₂₅₄. Plat KLT dimasukkan ke dalam *chamber* dan ditunggu hingga fase gerak terelusi sempurna. Setelah proses elusi, plat dikeringkan lalu diamati dibawah sinar tampak, UV 254 dan 366 nm. Untuk reaksi warna, uji identifikasi flavonoid dilanjutkan dengan plat KLT diberi uap amoniak, tunggu hingga 15 menit. Amati perubahan warna bercak pada KLT.

3. *Molecular Docking*

1. Pengunduhan aplikasi *Autodock Vina* untuk *molecular docking* dan aplikasi pendukung, yaitu *DS Visualizer* untuk preparasi protein target maupun ligand uji dan dapat digunakan untuk visualisasi hasil *docking*. *Autodock Tools* untuk mengolah protein target maupun ligan uji sehingga bisa di *docking* dengan aplikasi *Autodock Vina*. Python digunakan untuk menjalankan aplikasi yang biasanya menggunakan bahasa pemrograman python. Open Babel mengkonversi hasil *docking* dari format PDBQT ke format PDB.

2. Pengambilan struktur protein melalui *Protein Data Bank* (PDB) (www.rscb.org) dengan PDB ID untuk Bcl-xL adalah 1YSG dan 4TUH.
3. Preparasi protein target dan ligan uji dapat dilakukan dengan menggunakan aplikasi *DS Visualizer*. Untuk ligand asli (*native ligand*) dapat diambil langsung dari file protein target.
4. Konversi file protein dan ligan keformat file PDBQT dengan *Autodock Tools* dan *Open Babel*.
5. *Molecular Docking* dengan *Autodock Vina* Sebelum menjalankan fungsi *docking*, pastikan file 1ysg.pdbqt dan ligand.pdbqt telah berada di folder *Vina*. Kemudian buat text file baru dan beri nama *conf.txt*. Untuk menentukan nilai RMSD pilih konformasi dengan nilai RMSD kurang dari 2 Å.
6. Visualisasi hasil *docking* untuk melihat ikatan antara Bcl-xL dengan ligan uji (*tangeretin* dan *kaemferol*, *native ligand*) dapat dilakukan dengan aplikasi *DS Visualizer*.

4. Uji Antioksidan dengan Metode DPPH

a. Penyiapan larutan baku DPPH

Sebanyak 15,8 mg serbuk DPPH dimasukkan kedalam labu takar, kemudian tambahkan 100 ml metanol p.a lalu dilarutkan hingga homogen dan didapatkan konsentrasi 0,4 Mm. Larutan di *vortex* selama 30 detik kemudian dibungkus menggunakan aluminium foil.

b. Pembuatan Larutan Vitamin C

Sebanyak 5 mg vitamin C analisis dimasukkan kedalam 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 kulit jeruk mandarin dan daun teh ditambahkan dengan 2 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. Pengukuran Absorbansi

Larutan uji kemudian dipipet sebanyak 0,2 ml kemudian ditambahkan 3,8 larutan DPPH 0,05 Mm dalam metanol. Campuran kemudian dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit dalam ruang gelap. Serapan kemudian diukur dengan alat spektrofotometer UV-tampak pada panjang gelombang 515 nm. Sebagai kontrol positif digunakan larutan uji vitamin C dengan perlakuan yang sama dengan sampel uji.

e. Perhitungan IC_{50}

Untuk menghitung IC_{50} dengan cara mengelola data absorbansi sampel menjadi bentuk persen antioksidan. nilai IC_{50} bisa diperoleh dengan memasukkan nilai 50 sebagai y dalam persamaan regresi linier yang diperoleh dari hubungan $x = \text{kadar}$ dan $y = \% \text{ antioksidan}$.

5. Uji Formulasi sediaan tablet

Metode yang paling umum digunakan pada pembuatan formulasi sediaan tablet yaitu metode granulasi basah. Dibuat dengan cara memasukkan atau menambahkan bahan-bahan pengikat pada campuran-campuran bahan berkhasiat dan bahan tambahan kemudian bahan-bahan tersebut dicampur sehingga terbentuk adonan lembab yang siap dibuat granul. Pembuatan tablet dengan metode granulasi basah ada beberapa tahap yaitu dimulai dengan menimbang bahan-bahan dan menyiapkan alat yang akan digunakan.

Yang pertama pembuatan fase dalam yaitu dengan mencampurkan amilum, laktosa, dan zat aktifnya diaduk sampai homogen. Selanjutnya pembuatan larutan pengikat yaitu PVP dimasukkan ke dalam lumpang tambahkan etanol 70% sedikit demi sedikit gerus sampai larut atau membentuk masa seperti lem diaduk sampai larut sempurna menggunakan batang pengaduk aduk hingga jernih. Selanjutnya proses granulasi serbuk yang telah melalui proses *mixing* (fase dalam) ditambahkan larutan pengikat sedikit demi sedikit sambil diaduk perlahan. Mengayak serbuk yang sudah dicampur pengikat dengan ayakan no 12 sampai membentuk granul, lakukan granulasi sampai serbuk habis. Selanjutnya proses pengeringan granul ditempatkan dalam wadah yang permukaannya luas masukkan ke dalam *oven* dengan temperatur 40⁰C, kemudian proses *mixing* dengan fase luar yaitu amilum, talk dan Mg stearat aduk sampai homogen ditambahkan sedikit

demis sedikit. Langkah selanjutnya yaitu proses pencetakan tablet granul dimasukkan ke dalam *hopper* mesin tablet *single punch*, dilakukan pencetakan tablet secara manual hingga granul dalam *hopper* habis. Selanjutnya dilakukan kontrol kualitas sediaan tablet.

Tabel 1. Formula Tablet ekstrak kulit jeruk mandarin dan daun teh

Bahan	Formulasi
Ekstrak etanolik daun teh dan kulit jeruk	7,5
PVP	3,15
Amilum 10%	10,5
Laktosa	75,45
Mg stearat	0,786
Amilum 6 %	4,71
Talk	0,786
Alkohol 70 %	qs

Kontrol Kualitas sediaan tablet:

1. Uji keseragaman Bobot

Ditimbang 20 tablet dari masing-masing formula dan dihitung bobot rata-ratanya, jika ditimbang satu per satu tidak boleh lebih dari dua tablet yang masing-masing bobotnya menyimpang dari bobot rata-rata yang telah ditetapkan, sesuai syarat yang tercantum pada Farmakope Indonesia III.

2. Uji kadar air granul

Pengujian selanjutnya adalah pengujian kadar air. Kadar air dinyatakan sebagai LOD (*Lost on Drying*) atau susut pengeringan.

Uji kadar air dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu manual dan otomatis. Cara manual dilakukan dengan cara mengurangi bobot granul basah dengan bobot granul kering sebelum granul dikeringkan dengan oven. Sedangkan pada penelitian ini dilakukan dengan cara otomatis yaitu dengan mengukur kelembabannya yang menguap dari bahan uji dengan menggunakan alat *moisture analyzer* dengan suhu 70⁰ C.

3. Uji Pemampatan

Uji ini dimaksudkan untuk mengetahui kemampuan campuran granul selama dikempa. Pengukuran uji pengetapan dilakukan dengan mengamati perubahan volume sebelum pengetapan dan volume sesudah pengetapan dan dinyatakan dalam indeks pemampatan persen, dimana semakin kecil indeks pengetapan semakin baik sifat alirnya. Serbuk dikatakan memiliki sifat alir baik jika indeks pemampatannya kurang dari 20%.

4. Uji kerapuhan

Alat yang digunakan ialah *friability tester*. Caranya ditimbang 20 tablet, dicatat beratnya, lalu dimasukkan kedalam alat dan alat dijalankan selama 4 menit (100 kali putaran). Setelah batas waktu yang ditentukan, tablet dikeluarkan dan dibersihkan dari serbuk-serbuk halus lalu ditimbang lagi. Friabilitas (F) = $\frac{A-B}{A} \times 100 \%$. Syarat kehilangan bobot $\leq 1\%$ (Soekemi dkk,1987).

Semakin besar kekerasan tablet maka semakin kecil persen kerapuhannya (Kurniawati, 2009)

5. Uji waktu hancur

Alat yang digunakan ialah *disintegration tester*. Caranya yaitu satu tablet dimasukkan pada masing-masing tabung dari keranjang lalu dimasukkan cakram pada tiap tabung dan alat dijalankan. Sebagai medium digunakan air dengan suhu 37°C, pada akhir batas waktu, angka keranjang dan amati semua tablet dan Semua tablet harus hancur sempurna. Serta tidak ada 1 atau 2 tablet tidak hancur sempurna (Anonim, 1995)

6. Analisis Data

- a. Analisis kandungan kimia metode KLT dengan membandingkan nilai Rf dibawah UV 254 dan 366 kemudian diamati warna bercak setelah disemprotkan amoniak antara sampel dengan pembanding.
- b. Analisis uji antioksidan dengan metode DPPH ditentukan oleh besarnya hambatan serapan dari radikal DPPH melalui perhitungan persentase inhibisi serapan DPPH dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Abs kontrol negatif} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs kontrol negatif}} \times 100\%$$

Nilai persen inhibisi yang telah dihitung dari setiap konsentrasi selanjutnya digunakan untuk perhitungan IC₅₀. Nilai konsentrasi dari larutan yang telah diencerkan dari ekstrak dan persen inhibisi diplotkan masing-masing pada sumbu x dan y. Kemudian nilai IC₅₀

dihitung dengan regresi linier $y = b(x) + a$, dengan menyatakan nilai y sebesar 50 dari nilai x sebagai IC_{50} .

- c. Analisis *molecular docking*, dilakukan analisis data *score docking* pada sisi binding *pocket* terhadap senyawa *tangeretin* dan *kaempferol* dimana afinitas yang baik dinyatakan dengan nilai *score* terendah pada suatu molekul.