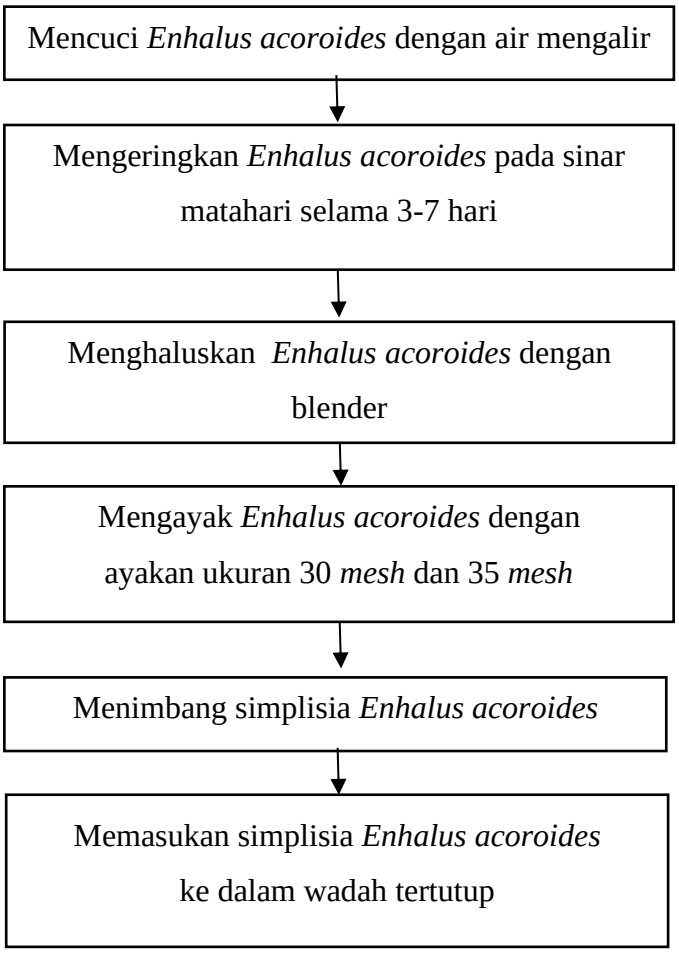
BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tahapan Penelitian

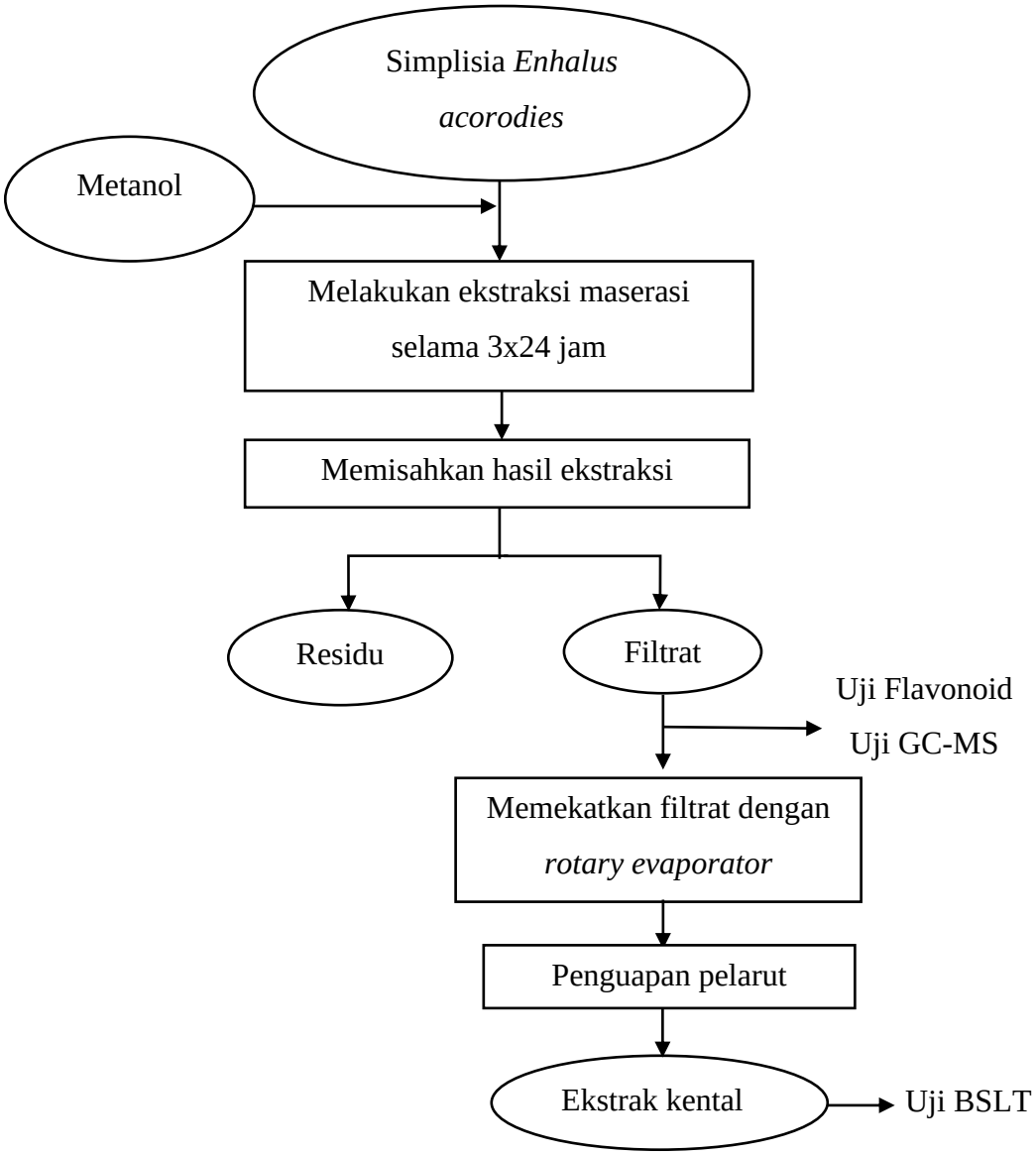
Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahap diantaranya sebagai berikut:

3.1.1 Pembuatan Simplisia *Enhalus acoroides*



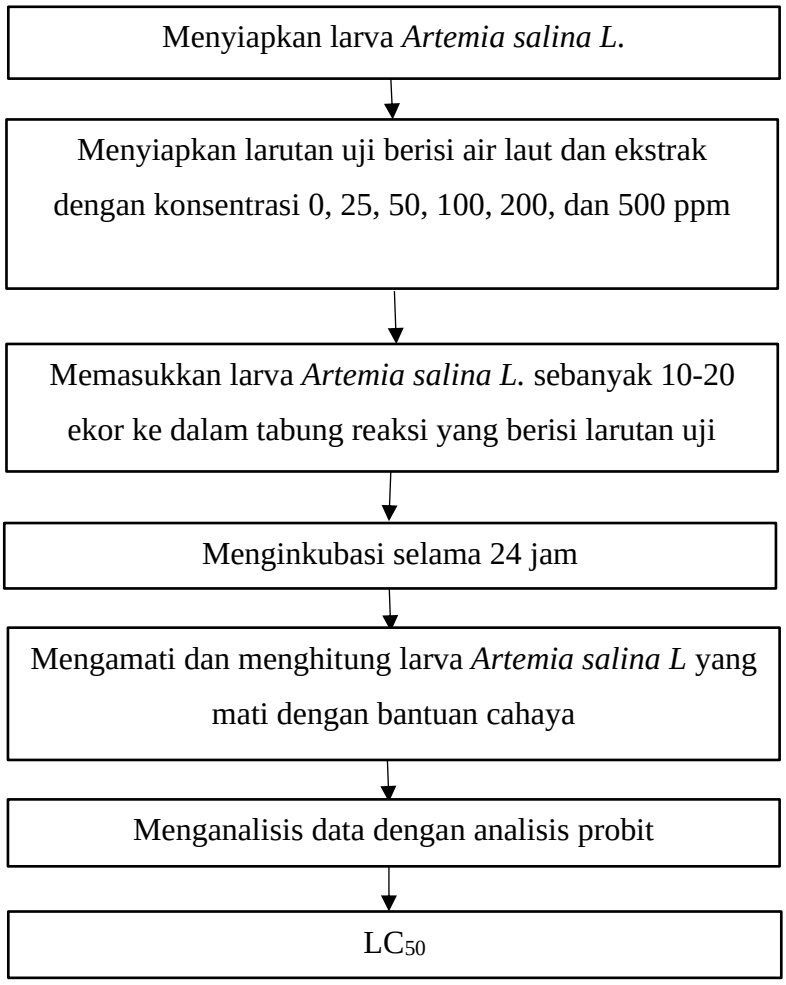
Gambar 3.1 Diagram Alir Pembuatan Simplisia *Enhalus acoroides*

3.1.2 Pembuatan Ekstrak sampel *Enhalus acorodies*



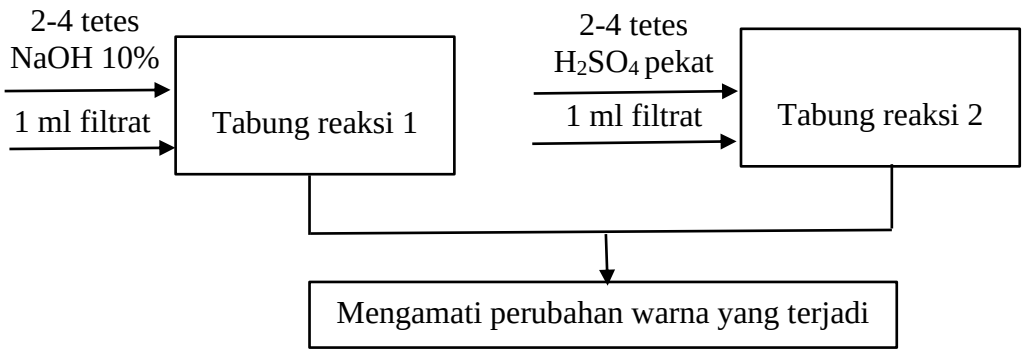
Gambar 3.2 Diagram Alir Pembuatan Ekstrak sampel *Enhalus acorodies*

3.1.3 Uji Toksisitas (BSLT-*Brine Shrimp Lethality Test)*

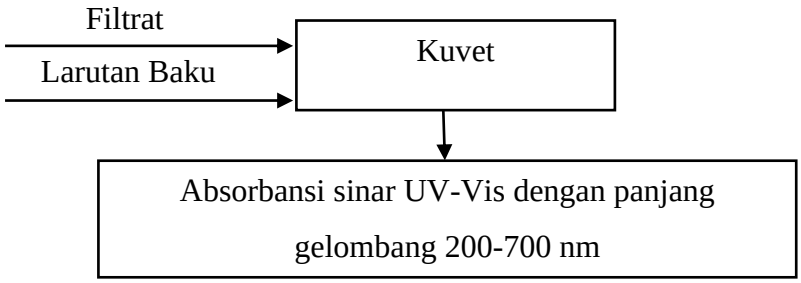


Gambar 3.3 Diagram Alir Uji Toksisitas (BSLT-*Brine Shrimp Lethality Test)*

3.1.4 Uji Kualitatif Flavonoid

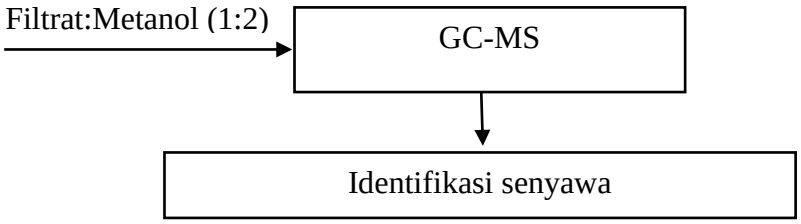


Gambar 3.4 Diagram Alir Uji Fitokimia Senyawa Flavonoid



Gambar 3.5 Diagram Alir Uji Kualitatif Flavonoid dengan Spektrofotemetri UV-Vis

3.1.5 Uji Identifikasi Senyawa Menggunakan GC-MS

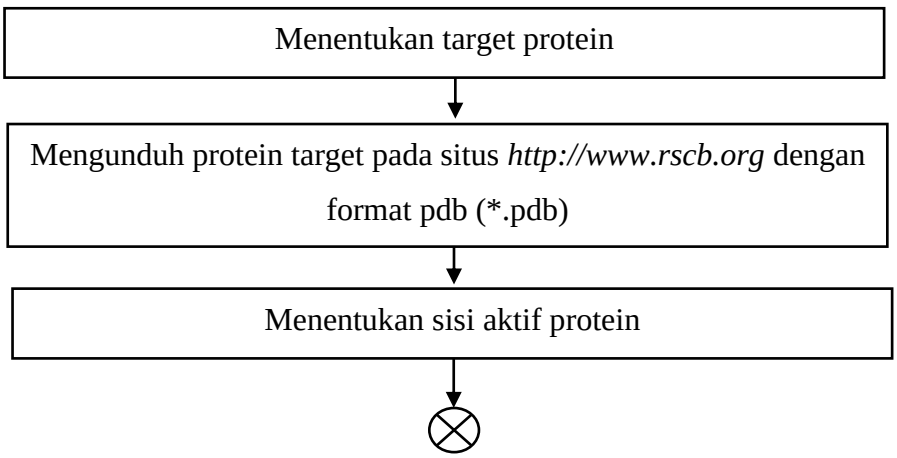


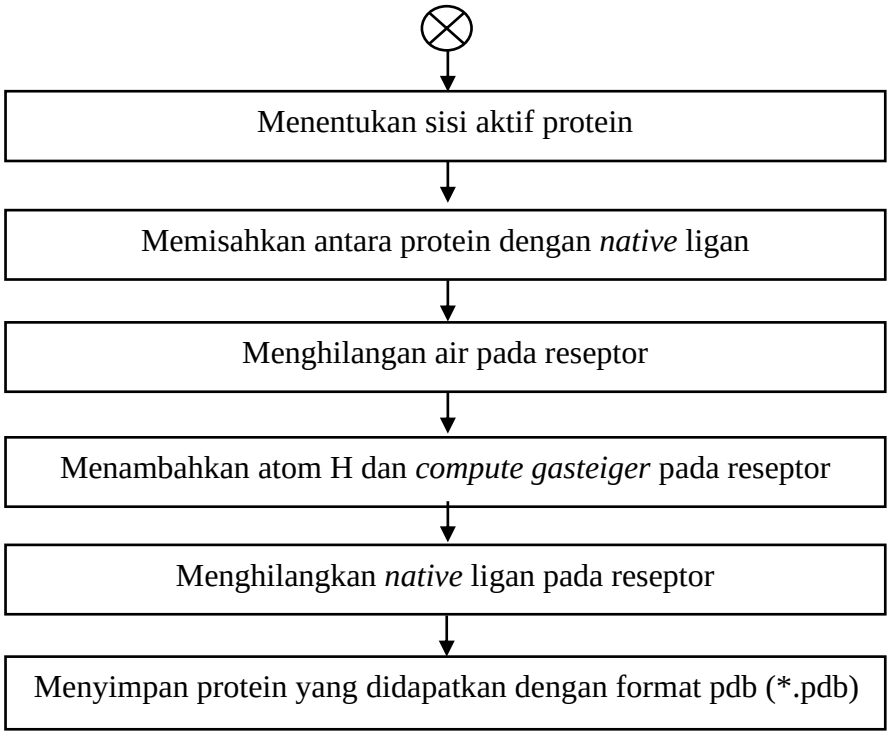
Gambar 3.6 Diagram Alir Identifikasi Senyawa Menggunakan GC-MS (Prakash et al., 2010)

3.1.6 Penambatan Molekul secara *in Silico*

Terdapat tiga tahapan pada proses *docking in silico*, yaitu sebagai berikut:

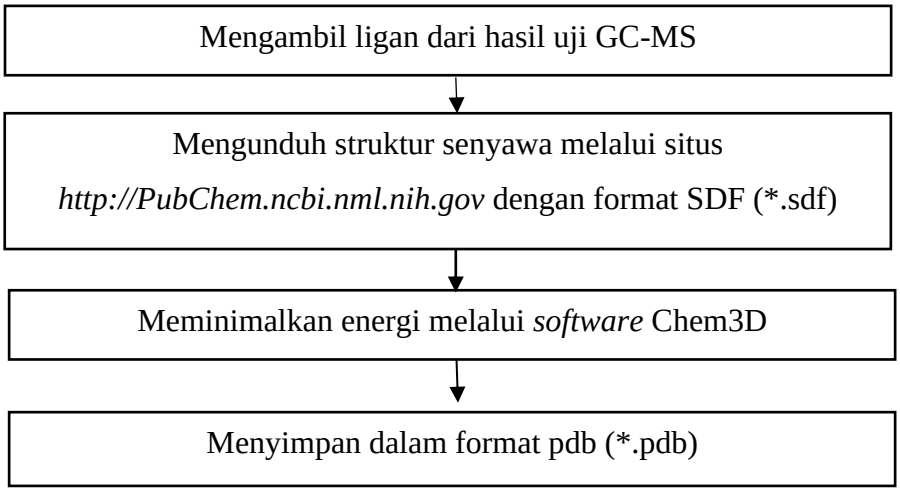
a. Preparasi protein





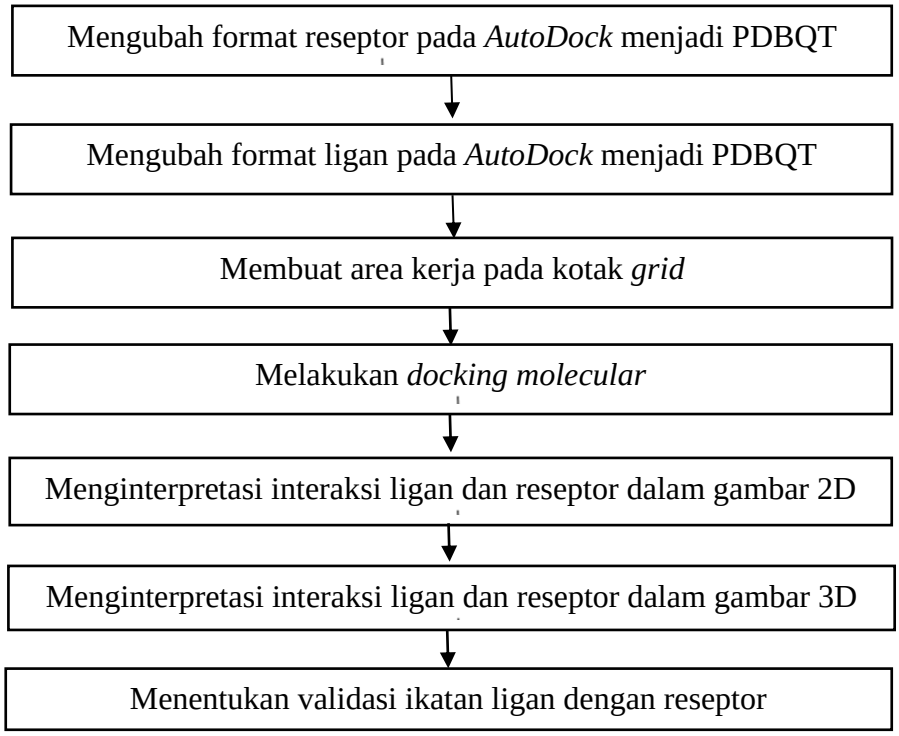
Gambar 3.7 Diagram Alir Preparasi Protein

b. Preparasi Ligan



Gambar 3.8 Diagram Alir Preparasi Ligan

c. *Docking Molecular*



Gambar 3.9 Diagram Alir *Docking Molecular*

3.2 Prosedur Penelitian

Prosedur yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

3.2.1 Pembuatan Simplisia *Enhalus acoroides*

Enhalus acoroides dicuci dengan menggunakan air mengalir, lalu dikeringkan di bawah sinar matahari selama 3-7 hari hingga tidak terjadi perubahan massa sampel. Setelah itu, *Enhalus acoroides* dihaluskan dengan menggunakan blender dan diayak dengan menggunakan ayakan ukuran 30 *mesh* dan 35 *mesh*. Lalu simplisia *Enhalus acoroides* yang telah seragam ukurannya ditimbang dan dimasukkan ke dalam wadah tertutup untuk menghindari kontak dengan udara yang dapat mempengaruhi kelembaban dari simplisia.

3.2.2 Ekstraksi Maserasi

Simplisia *Enhalus acoroides* direndam dalam pelarut metanol dengan perbandingan 1:10 pada gelas beker 1000 ml yang dilakukan secara berulang selama 3x24 jam. Kemudian memisahkan antara filtrat dan residu (padatan). Kemudian pada sedikit filtrat dilakukan pengujian kualitatif flavonoid dan GC-MS. Setelah itu filtrat yang didapatkan selama 3 hari dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* untuk diperoleh ekstrak kental. Kemudian dilakukan pengujian toksisitas (BSLT- *Brine Shrimp Lethality Test*).

3.2.3 Uji Toksisitas (BSLT-*Brine Shrimp Lethality Test*)

a. Persiapan larva *Artemia salina L*

Telur *Artemia salina L*. dibuat dengan cara merendamnya dalam air laut. Telur atau benur *Artemia salina L* sebanyak 50 g ditetaskan dalam wadah berisi 3/4 air laut yang separuh bagian wadahnya tertutup. Kemudian telur diinkubasi selama 24 jam di bawah lampu bohlam dan dilengkapi dengan aerator. Telur *Artemia salina L* akan menetas dan menjadi larva setelah 24 jam.

b. Analisis Toksisitas

Larutan uji yang berisi pelarut (air laut) dan ekstrak dengan konsentrasi 0, 25, 50, 100, 200, dan 500 ppm dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Setelah itu memasukkan sebanyak 10-15 larva *Artemia salina L* dalam setiap tabung reaksi. Kemudian diinkubasi selama 24 jam. Pengamatan dan perhitungan dilakukan setelah 24 jam. Jumlah kematian larva *Artemia salina L* dihitung untuk menentukan nilai *Lethal Concentration* 50 (LC_{50}). LC_{50} merupakan penilaian tingkat toksisitas suatu zat terhadap 50% kematian larva. Larva *Artemia salina L* yang didefinisikan telah mati saat tidak bergerak selama 10 detik. Data dianalisis menggunakan analisis Probit untuk mendapatkan nilai LC_{50} dengan *Microsoft Excel for*

Windows. Analisis dilakukan dengan membandingkan LC_{50}, jika nilai LC_{50} lebih kecil dari 1000 ppm maka dikategorikan beracun.

3.2.4 Uji Kualitatif Flavonoid

Adapun analisis berikutnya yaitu uji flavonoid dengan fitokimia dan spektrofotometri UV-Vis. Proses fitokimia dilakukan dengan mencampurkan 1 ml filtrat dengan 2-4 tetes NaOH 10% dan 2-4 tetes H_2SO_4. Lalu dikocok dan diamati perubahan warna yang terjadi. Timbulnya warna kuning, jingga, merah, dan coklat tua menunjukkan hasil flavonoid positif. Adapun proses spektrofotometri UV-Vis dilakukan dengan memasukan filtrat dan larutan baku (1:2) ke dalam kuvet untuk dilewatkan pada alat spektrofotometer UV-Vis. Kemudian akan diperoleh nilai absorbansi sinar UV-Vis dengan pajang gelombang 200-700 nm.

3.2.5 Uji Identifikasi Senyawa Menggunakan GC-MS

Filtrat diambil 10 µl dilarutkan dengan 240 µl pelarutnya. Kemudian diinjeksikan ke dalam sistem GC-MS. Identifikasi senyawa dilakukan dengan menggunakan *software Wiley/NIST Library* (Prakash et al., 2010).

3.2.6 Penambatan Molekul secara *In Silico*

a. Preparasi protein

Menentukan dan mengunduh target protein pada situs *http://www.rscb.org* dengan format pdb (*.pdb). Lalu menentukan sisi aktif protein dan memisahkan antara protein dengan *native* ligan. Kemudian menghilangkan air pada reseptor, menambahkan atom H dan *compute gasteiger* pada reseptor, dan menghilangkan *native* ligan pada reseptor. Setelah itu menyimpan protein yang didapatkan dengan format pdb (*.pdb).

b. Preparasi ligan

Mengambil ligan dari hasil uji GC-MS lalu mengunduh struktur senyawa melalui situs *http://PubChem.ncbi.nml.nih.gov* dengan format SDF (*.sdf). Selanjutnya meminimalkan energi melalui *software* Chem3D dan menyimpan dalam format pdb (*.pdb).

c. *Docking molecular*

Mengubah format reseptor dan format ligan pada *AutoDock* menjadi PDBQT. Lalu membuat area kerja pada kotak *grid* dan mulai melakukan *docking molecular*. Setelah itu menginterpretasi interaksi ligan dan reseptor dalam gambar 2D dan gambar 3D. Kemudian menentukan validasi ikatan ligan dengan reseptor.

3.3 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah Aerator, *Autodock*-1.5.6, Ayakan 30 *mesh* dan 35 *mesh*, Blender, Botol vial 20 ml, Corong, Gelas beker 100 ml, Gelas beker 1000 ml, Gelas ukur 50 ml, Gelas ukur 10 ml, Kaca arloji, Kapas, Kertas saring Kuvet, Laptop 8 GB SSD 125, Lampu bohlam 25 *Watt*, Perangkat lunak *biovia discovery* studio 2021, Perangkat lunak *ChemOffice* 2015, Perangkat lunak Pyrx, Pipet tetes, Rak tabung reaksi, *Rotary evaporator*, Spatula, Spektrofotometri UV-Vis *Thermo Genesys* 150, Tabung reaksi, dan Timbangan analitik.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Air laut, *Aquades*, H_2SO_4 pekat, Benur udang *Artemia salina leach, Enhalus acoroides*, Metanol, dan NaOH 10%.

3.4 Metode Pengumpulan dan Analisis Data

Metode dan Analisis yang digunakan dalam percobaan ini adalah sebagai berikut:

1. Uji kualitatif flavonoid dengan fitokimia untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa flavonoid dalam sampel *Enhalus acoroides* dan uji spektrofotometri Uv-Vis untuk menentukan kromofor dalam sampel *Enhalus acoroides.*
2. Uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) untuk menganalisis toksisitas dari *Enhalus acoroides*.
3. *Docking in silico* untuk memprediksi interaksi senyawa obat dari *Enhalus acoroides* dengan protein target atau reseptor.