

BAB 3 PROSEDUR PENELITIAN

3.1 Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian kualitatif deskriptif (Hartono, Fadli, and Bintari 2021; Hermawan, Studi, and Biologi 2023; Julia and Komari 2022; Mahmudah 2019; Malikhana et al. 2021; RD et al. 2021) secara *in silico* dengan metode *molecular docking*. Sampel penelitian ini merupakan senyawa metabolit sekunder pisang ranggap yang berpotensi sebagai antidiabetes berdasarkan hasil ekstraksi pisang ranggap menggunakan Teknik *Gas Chromatography Mass Spectrometry* (GCMS) secara *in vitro* dan kajian literatur. Terdapat 11 senyawa metabolit sekunder pisang ranggap yang menjadi sampel yaitu *1-hexadecanol-2-methyl, 5-hydroxymethylfurfural, desulphosinigrin, dihydroxyacetone, Dodecanoic acid, 3-hydroxy, tetradecanoic acid, uric acid, campesterol, pentadecanoic acid, Trans-13-Octadecanoic acid* dan *squalene*. Sedangkan untuk senyawa kontrol yang digunakan adalah *acarbose* yang didapatkan berdasarkan kajian literatur. Protein yang digunakan yaitu enzim *Alpha Amylase* (PDB ID: 1HNY) (Akhtar et al. 2018; Bharathi, Valentina, and Ramalakshmi 2022; Himalayas et al. 2022; Oso and Olaoye 2020; Yasmin et al. 2023; Zulfi Zakaria et al. 2023). Pengujian *in silico* menggunakan aplikasi Pyrex dan *Biovia Discovery Studio Visualizer* 2019.

3.2 Ruang Lingkup Penelitian

Hal yang menjadi fokus penelitian yang akan dilakukan ini adalah melakukan analisis *in silico* dengan metode *molecular docking* pada senyawa metabolit sekunder kulit dan daging buah pisang ranggap dengan *alpha amylase* penyebab diabetes melitus. Hasil yang akan dianalisis adalah afinitas energi, fisikokimia, farmakokinetik, dan tingkat toksisitas senyawa metabolit sekunder kulit dan daging buah pisang ranggap sebagai antidiabetes. Sehingga akan mendapatkan kesimpulan apakah senyawa metabolit sekunder pisang ranggap (*Musa troglodytarum*) berpotensi sebagai inhibitor diabetes melitus dan dapat dijadikan kandidat obat antidiabetes secara oral atau tidak.

3.3 Sumber Data Penelitian

Sumber data utama dalam penelitian ini adalah senyawa metabolit sekunder pisang ranggap (*Musa troglodytarum*) yang berpotensi sebagai antidiabetes berdasarkan data analisis GCMS dan artikel ilmiah yang sudah dipublikasikan pada jurnal nasional maupun internasional dengan kata kunci penelitian *in silico* antidiabetes, senyawa metabolit sekunder *Musa troglodytarum* sebagai antidiabetes, *secondary metabolism of Fe'i Banana (Musa troglodytarum)*, *kind of bioactive compounds from fe'i banana (Musa troglodytarum)*. senyawa metabolit sekunder kulit dan daging buah pisang ranggap maupun *acarbose* yang digunakan diunduh dari laman PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sedangkan reseptor diunduh dari laman RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>). Oleh karena itu, sumber data yang digunakan dalam penelitian ini adalah sumber data sekunder (Sugiyono 2013).

3.4 Langkah-langkah Penelitian

3.4.1 Alat dan Bahan

1. Alat dan Bahan untuk Pengujian Kandungan Metabolit Sekunder Pisang Ranggap menggunakan GCMS

Adapun alat dan bahan yang digunakan untuk proses identifikasi senyawa metabolit sekunder melalui GCMS dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 3.1 Alat dan bahan untuk pengujian GCMS

No	Alat dan bahan	Spesifikasi dan Kegunaan	Jumlah	Gambar
1	Pisang ranggap	Pisang ranggap dibeli dari pedagang pisang ranggap di Kawasan gunung galunggung, Tasikmalaya jawa barat dengan karakteristik yaitu, kulit buah berwarna oranye kemerahan dan terdapat	1,5 kg	

		banyak bintik coklat serta memiliki daging buah yang berwarna oranye kekuningan.		
2	Ethanol	Kadar ethanol 96%, berperan sebagai pelarut saat proses maserasi	1L	
3	Pisau dan talenan	Pisau yang digunakan adalah pisau dapur biasa yang digunakan untuk mengiris pisang dan kulitnya dalam proses pengeringan (pembuatan simplisia) dan talenan digunakan sebagai alat untuk pemotongan	1 buah	
4	Oven	Tipe Menmert digunakan untuk mengeringkan pisang ranggap (pembuatan simplisia)	1 buah	
5	Blender	Digunakan untuk menghaluskan sampel pisang dan kulit pisang yang sudah kering (pembuatan simplisia)	1 buah	

6	Saringan	Digunakan untuk menyaring pisang dan kulit pisang yang sudah dihaluskan (pembuatan simplisia)	1 buah	
7	Autoklaf	<i>Autoclave all American</i> digunakan untuk mensterilkan alat	1 buah	
8	Labu Erlenmeyer	Tipe pyrex ukuran 250 ml digunakan sebagai wadah untuk proses maserasi	4 buah	
9	Labu Erlenmeyer	Tipe pyrex ukuran 500 ml digunakan sebagai wadah untuk proses maserasi	2 buah	
10	Thermoshaker	Thermoshake 500 Gerhardt digunakan untuk menghomogenkan simplisia dan pelarut ethanol	1 buah	

11	Timbangan	Untuk mengukur berat simplisia pada proses maserasi	1 buah	
12	Baki alumunium	Untuk wadah serbuk simplisia	1 buah	
13	Alumunium foil	Digunakan untuk membungkus alat yang akan di sterilisasi	1 roll	
14	<i>Plastic wrap</i>	Digunakan untuk membungkus bagian yang sudah terbungkus alumunium foil	12 buah	
15	Plastik piala dan karet	Digunakan untuk membungkus alat yang akan di sterilisasi	12 buah	
16	Kertas Saring	Digunakan untuk menyaring hasil maserasi	6 buah	

17	Alkohol	Digunakan untuk mensterilkan beberapa alat dan bahan yang akan digunakan	1 liter	
18	Sarung tangan	Digunakan untuk melindungi tangan selama proses penelitian	5 pasang	
19	<i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i> (GCMS).	Digunakan untuk proses identifikasi senyawa metabolit sekunder pisang ranggap	1 buah	

Sumber: Dokumentasi Pribadi

2. Alat dan Bahan untuk Pengujian *In silico*

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari hardware, software dan webserver. Hardware yang digunakan adalah laptop asus dengan spesifikasi sebagai berikut Processor intel® Celeron ® [CPU N3060 @ 1.60GHz](#), RAM 2,00 GB, system type 64-bit, Windows 10 Pro. Untuk software yang digunakan antara lain aplikasi pyrex dan aplikasi *Biovia Discovery Studio Visualizer 2019*. Sedangkan untuk webserver yang digunakan diantaranya adalah *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>), *Swiss Model* (<https://swissmodel.expasy.org/interactive/ZhjW6V/models/>), *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), *Swiss ADME* (<http://www.swissadme.ch/>) *ProTox II online tools* (https://tox-new.charite.de/protox_II/index.php?site=home), dan ERRAT (<https://saves.mbi.ucla.edu/>).

Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah senyawa metabolit sekunder pisang ranggap yang berpotensi sebagai antidiabetes berdasarkan data hasil pengujian GCMS dan kajian literatur, serta senyawa kontrol yaitu *acarbose* yang strukturnya diunduh dari Pubchem serta reseptor diabetes yaitu *alpha amylase* dengan kode PDB 1HNY yang diperoleh dari *Protein Data Bank*.

3.4.2 Pembuatan Ekstrak Ethanol Buah Pisang Ranggap (*Musa triglodytarum*)

Terdapat beberapa tahapan dalam pembuatan ekstrak pisang ranggap yaitu penyiapan sampel, sterilisasi, pembuatan simplisia dan proses ekstraksi. Adapun sampel yang digunakan adalah 1,5 kg buah pisang ranggap yang dibeli dari pedagang pisang ranggap di Kawasan Gunung Galunggung, Tasikmalaya Jawa Barat. Selanjutnya yaitu proses sterilisasi alat yang bertujuan untuk meminimalisasi kontaminasi organisme pengganggu yang dapat mempengaruhi hasil penelitian. Adapun tahap sterilisasi yang dilakukan adalah sebagai berikut:

- a. Alat-alat yang digunakan dicuci terlebih dahulu kemudian dikeringkan menggunakan *tissue*, kemudian dilakukan penyemprotan menggunakan alkohol
- b. Alat yang akan di sterilisasi dibungkus menggunakan aluminium foil pada bagian tutupnya
- c. Bagian yang sudah di tutup tersebut kemudian dilapisi dengan *plastic wrap*
- e. Alat yang sudah siap kemudian dimasukkan kedalam plastik piala dan iikat menggunakan karet
- f. Alat-alat tersebut kemudian dimasukkan kedalam autoklaf selama 30 menit dengan suhu 121°C dengan tekanan 2atm
- g. Kemudian, matikan pemanas dan tunggu tekanan autoklaf sampai dititik 0
- h. Alat yang telah di strerilisasi kemudian di keluarkan dan ditiriskan
- i. Alat siap digunakan



(a)

(b)

(c)

Gambar 3.1 Proses sterilisasi (a). Proses penyemprotan alat yang akan digunakan (b). Proses pembungkusan alat dengan alumunium foil dan *plastic wrap* (c). Proses sterilisasi menggunakan autoclave.

Pembuatan simplisia pisang ranggap dan kulit pisang ranggap dengan rincian sebagai berikut:

- a. Pisang ranggap dan kulit pisang ranggap yang telah diperoleh dari Gunung Galunggung Tasikmlaya Jawa Barat diiris tipis menggunakan pisau
- b. Pisang dan kulit pisang yang sudah diiris kemudian dikeringkan menggunakan oven di laboratorium dengan suhu 60°C hingga kering (4 hari untuk pengeringan kulit dan 2 minggu untuk pengeringan daging buah)
- c. Setelah kering, pisang dan kulit pisang tersebut dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk
- d. Dilakukan penyaringan dengan menggunakan saringan hingga yang tersisa adalah bubuk halus



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Gambar 3.2 Proses pembuatan simplisia. (a). Proses pemotongan kulit dan daging buah (b). Proses pengeringan (c). Kulit buah yang sudah kering (d). Daging buah yang sudah kering (e). Proses penghalusan dengan blender (f).

Proses penyaringan

Proses pembuatan ekstrak dengan metode ekstraksi maserasi dengan rincian langkah sebagai berikut:

- a. Masing masing serbuk simplisia pisang dan kulit pisang ditimbang dengan berat 50 gram dimasukkan kedalam 2 labu Erlenmeyer yang berukuran 250 ml
- b. Masing-masing labu Erlenmeyer berisi serbuk simplisia 25 gram dan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10
- c. Labu Erlenmeyer kemudian ditutup dengan alumunium foil dan dilapisi dengan *plastic wrap* untuk mencegah terjadinya penguapan

- d. Masing masing labu Erlenmeyer dihomogenisasi selama 6 jam menggunakan thermoshaker dengan suhu 27 °C
- e. Larutan yang sudah homogen kemudian dipindahkan kedalam Erlenmeyer baru berukuran 500 ml dengan melalui proses penyaringan menggunakan kertas saring
- f. Erlenmeyer tersebut kemudian di tutup dengan alumunium foil dan plastic wrap
- g. Proses maserasi dilakukan selama 1 hari dengan dilakukan proses penyaringan sebanyak 2 kali menggunakan kertas saring
- h. Setelah maserasi selesai kemudian masing masing ekstrak dimasukan kedalam botol ukuran 500 ml dan ditutup dengan dilapisi alumunium foil dan plastic wrap.
- i. Identifikasi senyawa metabolit sekunder pisang ranggap pada bagian daging dan kulit pisang ranggap yaitu dengan menggunakan filtrat akhir meserasi yang selanjutnya dilakukan uji *Gas Chromatography Mass Spectrometry* (GCMS).



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Gambar 3.3 Proses ekstraksi (a). Perhitungan simplisia kulit buah (b). Perhitungan simplisia daging buah (c). Proses pemasukan serbuk simplisia, (d). Proses homogenisasi, (e). Ekstrak ethanol kulit buah (f). Ekstrak ethanol daging buah

3.4.3 Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder menggunakan GCMS

Proses Identifikasi menggunakan alat GCMS yang kemudian akan menghasilkan senyawa yang di dalamnya terdapat campuran gas dan berat molekul masing-masing senyawa bioaktif yang akan disajikan dalam bentuk kromatogram. Pengujian ini akan dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada (LPPT UGM).

3.4.4 Tahap Pencarian dan Pengunduhan Senyawa Metaboli Sekunder dan *acarbose*

Pencarian senyawa metabolit sekunder pisang ranggap (*Musa troglodytarum*) berdasarkan hasil pengujian GCMS yang berpotensi sebagai antidiabetes dan pencarian senyawa acarbose dilakukan dengan cara studi pustaka terhadap artikel-artikel yang telah dipublikasikan pada jurnal nasional maupun internasional. Selanjutnya mengunduh berkas senyawa-senyawa tersebut menggunakan *website* PubChem dengan bentuk struktur 3D dan kemudian di unduh dalam format SDF. Adapun detail tahapannya dapat dilihat pada lampiran 1.

3.4.5 Tahap Pencarian dan Pengunduhan *Alpha Amylase*

Pencarian *alpha amylase* dilakukan dengan cara studi literatur terhadap artikel-artikel yang sudah melakukan kajian *in silico* terhadap penyakit diabetes. Berdasarkan hasil studi tersebut didapatkan *alpha amylase* sebagai reseptor dengan kode PDB ID 1HNY . Selanjutnya *alpha amylase* diunduh pada laman RCSB PDB dengan format PDB. Adapun detail tahapannya dapat dilihat pada lampiran 2.

3.4.6 Pemodelan dan Validasi *Alpha amylase*

Reseptor yang sudah diunduh dari RCSB PDB kemudian dilakukan pemodelan menggunakan Swiss Model. Nilai yang tertera pada hasil pemodelan menunjukkan persentasi kemiripan dari protein tersebut dengan kondisi aslinya di dalam tubuh. Setelah dilakukan pemodelan langkah selanjutnya adalah dengan melakukan validasi protein menggunakan webserver saves dengan melihat nilai Errat secara keseluruhan. Adapun detail tahapannya dapat dilihat pada lampiran 3.

3.4.7 Tahap Preparasi Senyawa Metaboli Sekunder, *Acarbose* dan *Alpha Amylase*

Preparasi senyawa metaboli sekunder dan *acarbose* dilakukan menggunakan aplikasi PyRx dengan membuka file SDF senyawa metabolit sekunder dan *acarbose* yang telah di unduh dari PubChem dari menu open bibel, kemudian di minimize all. Lalu di simpan kedalam bentuk PDB. Sedangkan untuk preparasi *alpha amylase* dilakukan dengan menggunakan aplikasi *Biovia Discovery Studio Visualizer 2019*. Proses preparasi *alpha amylase* dilakukan dengan membuka file PDB protein yang telah diunduh, kemudian di seleksi bagian ligan dan air nya agar tidak mengganggu proses penambatan ligan terhadap sisi aktif reseptor. Kemudian ditambahkan atom hidrogen polar untuk menstabilkan proses pengikatan senyawa metaboli sekunder dan *acarbose* dengan reseptor. Adapun detail tahapannya dapat dilihat pada lampiran 4.

3.4.8 Tahap *molecular docking* senyawa metaboli sekunder dan *acarbose* dengan *alpha amylase*

Proses *molecular docking* dilakukan dengan aplikasi PyRx dengan membuka *alpha amylase*, senyawa metaboli sekunder dan *acarbose* yang telah di preparasi. Selanjutnya masing-masing senyawa metaboli sekunder dan *acarbose* di klik kanan lalu buat sebagai ligan. Sedangkan *alpha amylase* dijadikan sebagai makromolekul. Setelah itu di forward lalu di maximize pada bagian grid box hingga semua senyawa metaboli sekunder, *acarbose* dan reseptor berada pada wilayah *square*. Setelah itu, di forward kemudian akan terjadi proses *running* dan muncul skor *binding affinity*. Adapun detail tahapannya dapat dilihat pada lampiran 5.

3.4.9 Tahap Visualisasi Hasil Docking

Visualisasi hasil docking dilakukan dengan menggunakan aplikasi *Biovia Discovery Studio Visualizer 2019* dengan membuka file *alpha amylase* sebelum *molecular docking* dan file senyawa metabolit sekunder serta senyawa *acarbose* yang sudah di docking. Setelah itu, file hasil docking di salin dan ditempelkan pada file *alpha amylase* tersebut. Kemudian klik interaksi ligan dan klik tampilkan diagram 2D. setelah itu, akan terlihat ikatan yang terbentuk. Adapun detail tahapannya dapat dilihat pada lampiran 6.

3.4.10 Tahap Analisis Fisikokimia dan Farmakokinetik (*Swiss ADME*)

Analisis fisikokimia dan farmakokinetik dilakukan dengan bantuan website *Swiss ADME*. Dalam proses analisis ini smile senyawa metabolit sekunder dan *acarbose* disalin dan ditempelkan pada kolom yang tersedia di website. Setelah itu klik run dan akan muncul hasil fisikokimia dan farmakokinetik senyawa metabolit sekunder. Adapun detail tahapannya dapat dilihat pada 7.

3.4.11 Tahap Prediksi Toksisitas

Prediksi toksisitas dilakukan dengan menggunakan laman *protoc II online tools*. Analisis ini sama dengan *Swiss ADME* yaitu menggunakan smile senyawa metabolit sekunder kemudian pilih opsi *hepatotoxicity, immunotoxicity, mutagenicity, dan cytotoxicity*. Lalu di start tox-prediction kemudian akan terlihat hasil prediksinya. Adapun detail tahapannya dapat dilihat pada lampiran 8.

3.5 Teknik Pengumpulan Data

Secara umum teknik pengumpulan data dengan jenis penelitian kualitatif menurut Sugiyono (2013) terdiri dari observasi, wawancara, dokumentasi dan gabungan dari berbagai teknik pengumpulan data (triangulasi). Teknik pengumpulan data yang dilakukan dalam penelitian ini adalah teknik pengumpulan data dokumentasi meliputi studi pustaka dan analisis artikel penelitian, dan

screening melalui website. Dokumen dalam teknik pengumpulan data diartikan sebagai catatan peristiwa yang sudah berlalu. Dokumen yang dimaksud dapat berupa tulisan, gambar, karya monumen, termasuk karya tulis akademik (Sugiyono 2013).

3.6 Teknik Analisis Data

Afinitas senyawa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antidiabetes pada pisang ranggap (*Musa troglodytarum*) terhadap reseptor target dengan kode PDB ID 1HNY diukur berdasarkan nilai energi afinitas, RMSD (*Root Mean Square Deviation*), ikatan yang terbentuk dan kesamaan residu asam amino (Azkiyah et al. 2023). Energi afinitas merupakan energi ikatan antara ligan (senyawa metabolit sekunder) dengan reseptor (protein), semakin negative nilai afinitas energi maka ikatan antara ligan dan reseptor semakin kuat terbentuk (Azkiyah et al. 2023; Pratiwi 2022; Syahputra, Ambarsari L, and T 2014). RMSD merupakan parameter yang menggambarkan nilai penyimpangan terhadap interaksi struktur kristal sebelum dan sesudah docking, hasil docking dikatakan valid jika nilai RMSD $\leq 2 \text{ \AA}$ (Azkiyah et al. 2023; Pratiwi 2022). Ikatan yang terbentuk dan residu asam amino yang dibandingkan adalah residu asam amino antara ligan uji dengan ligan pembanding (Azkiyah et al. 2023; Pratiwi 2022).

Menurut Adinda (2020) dalam Hartono *et al.* (2021) untuk menganalisis hasil prediksi fisikokimia dan farmakokinetik dapat menggunakan aturan *Lipinski*. Langkah analisis ini menggunakan website Swiss ADME. Kemudian data yang dihasilkan akan dianalisis secara deskriptif. Sedangkan untuk menganalisis tingkat toksisitas digunakan website *protox II online tools* yaitu dengan melihat nilai toksisitasnya, serta parameter *hepatotoxicity*, *carcinogenicity*, *Immunotoxicity*, *Mutagenicity* dan *Cytotoxicity*. Kemudian data yang dihasilkan akan dianalisis secara deskriptif.

Teknis analisis data pada penelitian ini akan dilakukan dengan tiga langkah sesuai dengan teknik analisis data pada penelitian kualitatif menurut Miles and Huberman (1984) dalam (Sugiyono 2013) yaitu:

1. Reduksi data

Reduksi data merupakan kegiatan merangkum, memilih hal-hal pokok, memfokuskan pada hal-hal yang penting, mencari tema dan pola tertentu (Sugiyono 2013). Dalam penelitian ini penulis memilih data yang berasal dari artikel penelitian dan senyawa metabolit sekunder pisang ranggap hasil pengujian GCMS untuk dipilah data mana yang sesuai dan dibutuhkan dalam penelitian.

2. Penyajian data

Berdasarkan penjelasan sugiyono (2013), penyajian data merupakan kegiatan untuk menyusun informasi yang berkaitan dengan hal-hal yang difokuskan pada tahap reduksi data baik melalui wawancara, observasi ataupun dokumentasi. Penyajian data dalam penelitian kualitatif dapat menggunakan teks yang bersifat naratif, grafik, matrik, dan *chart*. Penyajian data yang akan dilakukan oleh penulis berupa penjelasan deskriptif (teks naratif) dan disajikan dalam bentuk tabel melalui dokumentasi.

3. Penarikan kesimpulan

Penarikan kesimpulan merupakan tahap terakhir yang dilakukan penulis dalam menganalisis data penelitian. Pada penarikan kesimpulan, penulis akan menyimpulkan hasil dari penyajian data yang sudah dilakukan. Kesimpulan dalam penelitian kualitatif mungkin dapat menjawab rumusan masalah ataupun tidak karena rumusan masalah dalam penelitian kualitatif masih bersifat sementara dan akan berkembang setelah penelitian (Sugiyono 2013).

3.7 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada (LPPT UGM) untuk pengujian senyawa metabolit sekunder dengan Teknik GCMS, telah dilakukan penelitian di Laboratorium Botani, Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Siliwangi untuk Pembuatan ekstraksi dan Pengujian secara *In silico* pada bulan Januari-Maret 2024.

