

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Instrumentasi Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian dilaksanakan dari bulan Februari hingga Juli 2017.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini secara *in silico* terdiri dari perangkat keras dan perangkat lunak. Perangkat keras yang digunakan berupa laptop Lenovo dengan spesifikasi *Processor AMD A8-6410 APU with AMD Radeon R5 Graphics* ~2,00 GHz dan RAM 4.00 GB. Perangkat lunak yang digunakan seperti *Open Babel 2.3.1*, *HyperChem 8.0*, *Discovery Studio Visualizer 2.5*, *AutoDock Tools 1.5.6* dan *Discovery Studio 2016*. Peralatan dalam penelitian secara *in vitro* terdiri dari gelas kimia 250 mL, pipet ukur 10 mL, pipet tetes, labu ukur 100 mL, mikro pipet 10-100 μ L, mikro pipet 100-1000 μ L, bola hisap, botol sampel, wadah ulat dengan kurungan kain kasa, *handsprayer* dan *Gas Chromatograph-Mass Spectrometer*.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian secara *in silico* adalah struktur reseptor 3D protein pertumbuhan ulat grayak (*Spodoptera litura*) yang diunduh dari www.rcsb.org dengan kode akses pdb 2DJC. Ligan yang digunakan adalah ligan komponen penyusun utama minyak serai wangi (sitronelal, geraniol, sitronelol) dan minyak cengkeh (eugenol) dengan struktur 3D diunduh dari www.chemspider.com. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian secara *in vitro* adalah minyak serai wangi, minyak cengkeh, aseton, *tween 80* dan aquades.

3.3 Tahapan Penelitian

Adapun tahapan penelitian yang dilakukan diantaranya:

1. Karakterisasi minyak atsiri menggunakan GC-MS
2. Penentuan nilai K_i dengan metode *In Silico*
3. Pembuatan larutan formulasi insektisida alami berbasis minyak atsiri
4. Uji aktivitas insektisida alami berbasis minyak atsiri

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Karakterisasi Minyak atsiri menggunakan GC-MS

Karakterisasi minyak atsiri yaitu minyak serai wangi dan minyak cengkeh menggunakan instrumen GC-MS. Larutan yang dianalisis diinjeksikan 0,05 µL per sampel menggunakan syringe pada instrumen GC-MS QP2010S/shimadzu. Karakterisasi dengan GC-MS diperoleh data TIC (*Total Ion Chromatogram*) dan spektra massa. Adapun kondisi instrumen GC-MS yang digunakan sebagai berikut:

Tipe GC-MS	: GC-MS QP2010S/shimadzu
Gas pembawa	: Helium
Temperatur kolom	: 40°C
Temperatur injector	: 310°C
Kecepatan aliran gas	: 94,8 mL/menit
Tekanan	: 20,8 kPa

3.4.2 Penentuan Nilai Ki dengan Metode *In Silico*

3.4.2.1 Persiapan Ligan

Ligan yang digunakan adalah ligan komponen penyusun utama minyak serai wangi (geraniol, sitronelal dan sitronelol) dan minyak cengkeh (eugenol) diunduh dari www.chemspider.com dalam bentuk struktur tiga dimensi dengan format file “.mol”. Selanjutnya ligan dioptimasi menggunakan perangkat lunak *HyperChem Professional* agar diperoleh struktur geometri ligan lebih stabil. Buka program *HyperChem Professional*, klik *File* → *Open* (buka file ligan dengan format file “.mol”). Penambahan hidrogen pada struktur ligan (klik *Build* → *Add Hydrogens*). Penentuan model struktur ligan (klik *Build* → *Add H & Model Build*). Klik *File* → *Start Log* (Beri nama di folder yang sama). Klik *Setup* → *Semi-empirical* → AM1. Klik *Compute* → *Geometry Optimization* → *Conjugate Direction*. Tunggu hingga status menjadi “Yes”. Klik *File* → *Stop Log*. Klik *File* → *Save As* (Beri nama dengan format “.hin” dan disimpan dalam folder yang sama). Kemudian perubahan format file ligan “.hin” menjadi “.pdb” menggunakan perangkat lunak *Open Babel* agar ligan dapat dibaca di program *docking* yaitu *AutoDock Tools*. Buka perangkat lunak *Open Babel*, pilih input format file “.hin” di sebelah kiri. Cari file

ligan dengan format file “.hin”. Buka file ligan yang telah dioptimasi. Pilih output format file “.pdb” di sebelah kanan. Beri nama file pada kolom output file dengan format “.pdb” dan klik *Convert*.

3.4.2.2 Persiapan Makromolekul

Makromolekul yang digunakan adalah reseptor protein penghambat pertumbuhan ulat grayak dengan kode akses pdb 2DJC diunduh dari www.rcsb.org dengan format file “.pdb”. Makromolekul dioptimasi menggunakan perangkat lunak *Discovery Studio Visualizer* untuk menghilangkan kandungan air agar dapat berinteraksi secara ideal dengan ligan. Buka program *Discovery Studio Visualizer*. Klik *File* → *Open* (buka File makromolekul dengan format “.pdb”). Klik *Ctrl + H* pada keyboard dan hapus water. Klik *Script* → *Ligand Interactions* → *Remove Ligand Groups* (Beri nama dan simpan dalam folder yang sama).

3.4.2.3 Docking Molekuler

Makromolekul dan ligan didocking dengan menggunakan perangkat lunak *AutoDock Tools* untuk mengetahui interaksi molekuler antara ligan dan makromolekul sehingga diperoleh nilai K_i dan diketahui formula untuk pembuatan insektisida. Proses *docking* terdiri dari 4 tahapan yaitu persiapan ligan dan reseptor protein (format file “.pdb” diubah menjadi “.pdbqt”), *running Autogrid* (perubahan format file menjadi “.gpf”), *running AutoDock* (format file diubah menjadi “.dpf”) dan analisa hasil *docking*. *Running grid* dilakukan untuk menentukan ukuran dan posisi *grid box* pada makromolekul yang *didocking* dengan digunakan perangkat lunak *cmd.exe* dengan *script* sebagai berikut:
cd(spasi)/d(lokal folder lengkap)[enter]
dir[enter]

Autogrid4(spasi)-p(spasi)[namafile].gpf(spasi)-1(spasi)[nama file] .glg (spasi)&[enter]

Tahap selanjutnya, *running AutoDock* dilakukan agar diperoleh konformasi ligan dengan energi terendah. Pengelompokkan konformasi ini berdasarkan persamaan yang ada sehingga terjadi pengikatan sisi aktif ligan pada makromolekul. Tahap *running AutoDock* meliputi penentuan rigiditas makromolekul (*Docking* →

Macromolecule → *Set Rigid File Name*), pemilihan ligan untuk proses *docking* (*Docking* → *Ligan* → *Choose*), penentuan parameter *docking* dengan digunakan *Genetic Algorithm* (*Docking* → *Search Parameters* → *Genetic Algorithm* → *Accept*), penentuan output *docking* dengan menggunakan *Lamarcking GA* (*Docking* → *Output* → *Lamarcking GA*). File disimpan dengan format file “.dpf” digunakan perangkat lunak cmd.exe dengan *script* sebagai berikut:

```
Autodock4(spasi)-p(spasi)[namafilename].dpf(spasi)-1(spasi)[namafile] .dlg (spasi)&[enter]
```

Tahap keempat adalah analisa hasil *docking*, sehingga diperoleh nilai K_i untuk minyak serai wangi dan minyak cengkeh. Tahap analisa hasil *docking* untuk mengetahui nilai K_i , klik tanda & (open panel to change play options) → *Show Info*.

Proses *docking* yang dilakukan yaitu *single* dan *multiple ligand docking*. *Single ligand docking* merupakan *docking* molekuler antara satu ligan dengan satu reseptor, sedangkan *multiple ligand docking* merupakan *docking* molekuler antara dua ligan dengan satu reseptor. Masing-masing ligan komponen penyusun utama minyak serai wangi (geraniol, sitronelal dan sitronelol) dan minyak cengkeh (eugenol) *didocking* dengan reseptor 2DJC. Berdasarkan nilai K_i hasil *docking* masing-masing ligan komponen utama minyak serai wangi, dipilih salah satu ligan dengan nilai K_i terendah yang selanjutnya *didocking* secara *multiple ligand docking* dengan ligan eugenol. Pemodelan interaksi *multiple ligand docking* yang dilakukan secara dua tahap yang menghasilkan nilai K_{i1} dan K_{i2} . Pertama, *docking* makromolekul dengan ligan 1 dihasilkan nilai K_{i1} . Kemudian hasil *docking* disimpan dengan format file “.pdbqt” untuk *didocking* kembali dengan ligan 2 sehingga dihasilkan K_{i2} .

3.4.3 Pembuatan Larutan Formulasi Insektisida Alami berbasis Minyak Atsiri

Pembuatan larutan formulasi berdasarkan hasil yang diperoleh dari uji *in silico*. Pada uji *in silico* dihasilkan nilai K_i dengan satuan mM (mili Molar) sehingga dapat ditentukan IC_{50} , kemudian formula minyak serai wangi dan minyak cengkeh dapat diketahui.

3.4.4 Uji Aktivitas Insektisida Alami berbasis Minyak Atsiri

Teknik uji aktivitas Insektisida ini mengadopsi penelitian dari Pinheiro, dkk (2013). Minyak serai wangi diformulasikan dengan melarutkan minyak serai wangi di dalam minyak cengkeh, aseton, tween 80. Dimasukan ke dalam labu takar 100 mL. Kemudian ditandabatkan dengan aquades dan dikocok hingga homogen. Konsentrasi uji insektisida alami yang digunakan adalah 0%, 0,0625%, 0,125%, 0,25%, 0,5% dan 1%. Pengujian dilakukan dengan 2 metode yaitu kontak daun dan kontak racun. Metode kontak daun yaitu metode yang dilakukan dengan cara ulat grayak berumur instar 2 dimasukkan ke dalam wadah uji (19 x 19 x 30 cm) yang terdapat daun jarak pagar berdiameter ± 15 cm yang sebelumnya disemprotkan insektisida alami sebanyak 1,5 mL per sisi daun. Sedangkan metode kontak racun dilakukan dengan cara insektisida alami langsung disemprotkan ke ulat grayak di dalam gelas kimia 250 mL (diameter 8 cm, tinggi 10 cm). Pengamatan kematian ulat grayak setelah 1 jam aplikasi selama 24 jam.

3.4.5 Analisis Data

Uji *in silico* menggunakan perangkat lunak *AutoDock Tools* menunjukkan nilai K_i hasil interaksi antara ligan-protein. Data energi tersebut digunakan sebagai acuan penentuan formulasi insektisida alami dengan dikonversi menjadi nilai K_i dan IC_{50} . Bahan insektisida alami dikarakterisasi dengan menggunakan GC-MS untuk mengetahui kadar komponen dari masing-masing senyawa. Selanjutnya dilakukan uji *in vitro* untuk mengetahui aktivitas insektisida sebagai mortalitas hama.

