

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari hingga Juni 2025. Lokasi penelitian dilakukan di:

- a. Laboratorium Riset FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia untuk proses ekstraksi, pemisahan, pemurnian senyawa dan analisis UV-Vis
- b. Institut Teknologi Bandung untuk analisis spektroskopi NMR

3.2 Alat dan Bahan

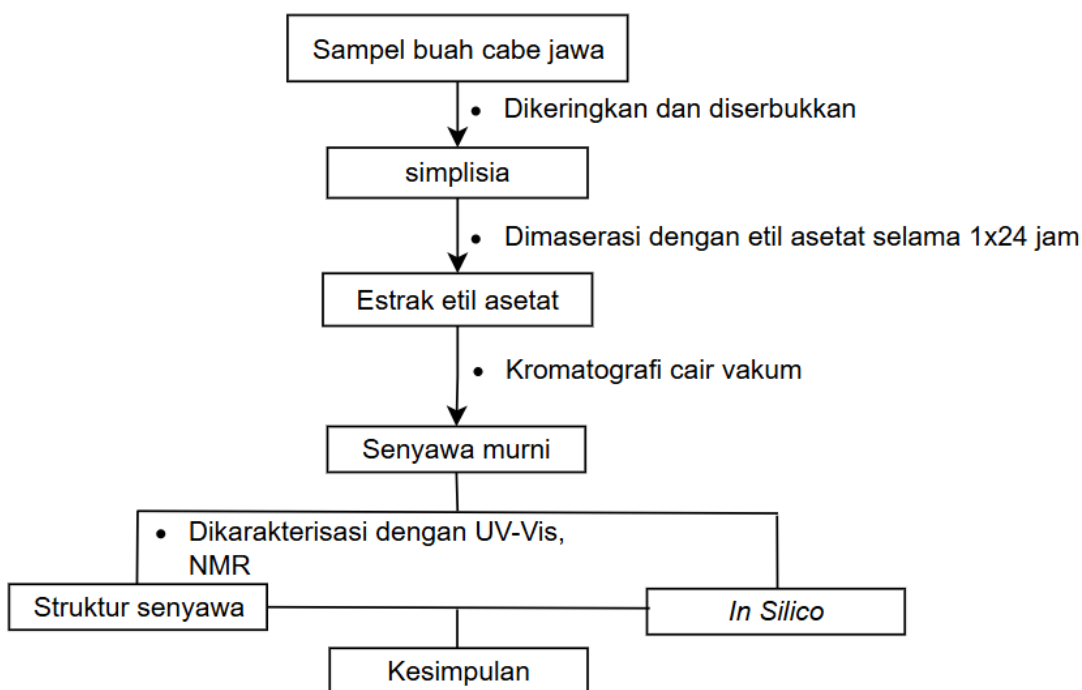
Alat – alat yaitu digunakan dalam penelitian ini meliputi: alat-alat gelas, set peralatan destilasi, corong *Büchner*, *rotary* evaporator vakum, set peralatan Kromatografi Lapis Tipis, set peralatan Kromatografi Cair Vakum dengan kolom berdiameter 7 cm dan 4 cm, spektrofotometer UV-Visible dan spektrometer NMR. Perangkat keras yang digunakan adalah berupa laptop. Adapun beberapa situs dan perangkat lunak yang digunakan selama proses studi in-silico ini antara lain : Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) yang digunakan untuk mengunduh struktur protein reseptor, aplikasi ChemDraw Ultra 12.0 untuk menggambar struktur senyawa uji dan senyawa pembanding serta Chem3D Pro 12.0 untuk meminimalkan energi dari ligan uji, aplikasi BIOVIA Discovery Studio 2020 untuk preparasi ligan dan reseptor serta untuk visualisasi hasil penambatan molekuler dan aplikasi AutoDock Tools-1.5.6 untuk melakukan analisis penambatan molekuler.

Sampel yang digunakan berupa tanaman *P. retrofractum* (cabe jawa) yaitu bagian buahnya. Sedangkan bahan yang digunakan antara lain berbagai pelarut organik meliputi n-heksana dan etil asetat yang diperoleh dalam grade teknis (yang kemudian dilakukan destilasi) serta aseton dan kloroform yang diperoleh dalam grade pro analis

(pa), akuades dan kertas saring. Selain itu, digunakan berbagai jenis silika gel, antara lain silika gel Merck 60 (70-230 mesh), silika gel Merck 60 (35-70 mesh) dan plat KLT silika gel 60 F254 dengan ketebalan 0,25 mm. Bahan yang digunakan untuk molecular docking adalah protein target yang diperoleh dari PDB Database dalam format PDB dengan kode PDB ID 4EY7, ligan alami dan senyawa pembanding berupa Donepezil.

3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan utama yaitu,: penyiapan sampel, ekstraksi, fraksinasi, pemisahan dan pemurnian dan karakterisasi senyawa hasil isolasi. Alur kegiatan penelitian ditunjukkan pada Gambar 3.1



Gambar 3. 1 Diagram alir prosedur penelitian

3.4 Pengumpulan Sampel

Sampel berupa buah cabe jawa (*Piper retrofractum*). Buah cabe jawa yang telah diperoleh kemudian ditimbang untuk mengetahui massa awal, dikeringkan dan

diserbuk menjadi simplisia kering. Massa kering ditimbang kembali untuk mengetahui massa sampel dalam keadaan kering.

3.5 Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan terhadap serbuk buah *P. retrofractum* menggunakan metode maserasi, yaitu perendaman sampel dalam pelarut etil asetat selama 24 jam pada suhu kamar. Ekstrak hasil maserasi kemudian disaring menggunakan corong Büchner, kemudian diuapkan menggunakan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak etil asetat yang telah pekat kemudian dikeringkan dan ditimbang untuk mengetahui massa hasil ekstraksi. Selanjutnya, dilakukan fraksinasi cair-cair menggunakan pelarut n-heksana dan etil asetat untuk memisahkan senyawa berdasarkan kepolarannya. Setiap fraksi kemudian diuapkan dan ditimbang.

3.6 Pemisahan dan Pemurnian Senyawa Piperin

Sampel ekstrak dilarutkan dalam pelarut yang sesuai dan ditotolkan pada pelat KLT silika gel F254. Begitu eluen jatuh dengan n-heksana:etil asetat, pelat dapat eluen dengan berbagai komposisi untuk mencari rasio terbaik yang digunakan. Noda yang muncul dapat diamati dengan sinar UV pada 254 nm. Berdasarkan hasil KLT, pemisahan dilanjutkan dengan KCV. Vakum digunakan untuk mempercepat aliran eluen dan mempersingkat waktu pemisahan. Fraksi-fraksi hasil elusi dikumpulkan per 100 mL dan dianalisis menggunakan KLT untuk mengevaluasi kemurnian dan pola noda setiap fraksi. Fraksi yang mempunyai pola noda serta nilai R_f yang sebanding digabungkan untuk memperlancar proses pemurnian lebih lanjut.

Selanjutnya, dilakukan KCV lanjutan. Proses ini diulang sampai dihasilkan isolat yang diperoleh dengan satu noda dominan, yang menunjukkan senyawa tersebut telah cukup murni untuk dilakukan karakterisasi lebih lanjut menggunakan spektroskopi.

3.7 Karakterisasi Senyawa Piperin

Ratu Shava Nandyta Azzahra, 2025

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA PIPERIN DARI BUAH CABE JAWA (*Piper retrofractum*)
SERTA UJI POTENSI SEBAGAI INHIBITOR ASETILKOLINESTERASE MELALUI PENDEKATAN IN SILICO**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Karakterisasi senyawa hasil isolasi dilakukan untuk menentukan struktur kimia dari senyawa yang telah dipisahkan dan dimurnikan. Dalam penelitian ini, digunakan beberapa teknik spektroskopi, yaitu spektrofotometri UV-Vis, Spektroskopi Resonansi Magnetik Inti (NMR) satu dimensi (^1H -NMR dan ^{13}C -NMR) dan dua dimensi (HSQC dan HMBC).

3.8 Uji Aktivitas Biologis

Uji aktivitas *in silico* dilakukan untuk memprediksi potensi senyawa piperin sebagai inhibitor enzim asetilkolinesterase (AChE). Simulasi interaksi antara piperin dengan AChE dilakukan menggunakan metode *molecular docking* berbasis AutoDockTools 1.5.6. Struktur tiga dimensi senyawa piperin dibuat dengan aplikasi ChemDraw Ultra 12.0, kemudian dilakukan konversi ke format .pdb menggunakan software aplikasi BIOVIA Discovery Studio 2020.

Proses docking dilakukan dengan mendefinisikan grid box yang mencakup situs aktif enzim AChE. Parameter grid dan docking diatur melalui AutoGrid dan AutoDock. Hasil docking dianalisis berdasarkan nilai *binding affinity* (kcal/mol), serta jenis dan lokasi ikatan antara senyawa dan residu aktif pada enzim. Sebagai pembanding, digunakan ligan standar donepezil, yang merupakan inhibitor AChE yang telah disetujui dalam terapi klinis Alzheimer. Visualisasi hasil docking dilakukan menggunakan Discovery Studio Visualizer.