

## **BAB 4**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1. Desain Penelitian**

Penelitian ini bagian dari penelitian payung yang berjudul “Analisis Efek Daun Ekor Naga (*Epipremnum pinnatum* (L.) Engl.) Sebagai Antidiabetes: Studi *In silico* , *In vitro* dan *In vivo*”. Penelitian ini merupakan studi eksperimental menggabungkan pendekatan *in silico* dan *in vivo* untuk mengevaluasi potensi antidiabetes senyawa aktif dari ekstrak daun ekor naga (*Epipremnum pinnatum* (L.) Engl.). Pada tahap *in silico*, dilakukan simulasi *molecular docking* antara senyawa aktif yang diidentifikasi dari database *PubChem* dengan TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor-Aplha*). Tahap *in vivo* dilakukan melalui *pre test-post test control group design* menggunakan tikus jantan galur Wistar yang diinduksi aloksan.

#### **4.2. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Maret sampai dengan bulan Agustus 2025. Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Biomedis Non Infeksius Fakultas Kedokteran Universitas Andalas untuk melakukan ekstraksi dan pemeriksaan kadar TNF- $\alpha$ , Laboratorium Invilab Bio Indonesia Bogor Jawa Barat untuk melakukan uji LC-HRMS, Laboratorium Bioinformatika Fakultas kedokteran Jati Universitas Andalas untuk melakukan uji komputasi secara *in silico*, serta *Animal House* Fakultas Farmasi Universitas Andalas pada perlakuan tikus.

#### **4.3. Populasi Dan Sampel**

##### **4.3.1. Populasi**

Populasi penelitian adalah tikus putih jantan galur Wistar berumur 2-3 bulan dengan berat badan 150-250 gram. Sampel penelitian adalah tikus putih jantan galur wistar yang didapatkan dari Animal House, Fakultas Farmasi, Universitas Andalas.

##### **4.3.2. Sampel**

Sampel penelitian ini adalah yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

#### 4.3.3. Kriteria Inklusi

##### a. Kriteria Kontrol Sehat

- 1) Tikus putih berumur 2-3 bulan
- 2) Tikus putih galur wistar jantan yang sehat
- 3) Berat badan tikus yaitu 150-250 gram
- 4) Tikus yang tidak cacat anatomi

##### b. Kriteria Diabetes Melitus

- 1) Tikus putih galur wistar jantan yang sehat
- 2) Berat badan tikus yaitu 150-250 gram dan Gula darah  $> 200$  mg/dL
- 3) Tikus yang tidak cacat anatomi
- 4) Tikus yang telah melalui aklimasi 7 hari

#### 4.3.4. Kriteria Eksklusi

- 1) Gerakan tikus yang tidak aktif
- 2) Tikus yang tidak mau makan
- 3) Tikus yang mengalami penurunan berat badan yang drastis
- 4) Tikus yang sakit (karakteristik rambut rontok/botak, keluarnya eksudat dari mata, mulut, genital, maupun anus)
- 5) Tikus yang mati dalam masa penelitian

#### 4.3.5. Besar Sampel

Penentuan besar sampel berdasarkan kriteria yang dirumuskan dengan mengikuti kriteria WHO dengan rumus federer pada 6 kelompok perlakuan dengan rumus sebagai berikut :

$$(n-1) (t-1) \geq 15$$

Keterangan :

t : jumlah kelompok perlakuan penelitian

n : jumlah minimum sampel per kelompok

$$(n-1) (t-1) \geq 15$$

$$(n-1) \geq \frac{15}{(t-1)}$$

$$(n-1) \geq \frac{15}{(6-1)}$$

$$(6-1)(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$n-1 \geq 3$$

$$n \geq 4 \text{ (dibulatkan menjadi 5)}$$

Dalam menghindari terjadinya potensi *drop out* maka diperlukan koreksi besar sampel dengan proporsi *drop out* sebesar 10%. Rumus koreksi besar sampel dihitung berdasarkan rumus dibawah ini :

$$n' = \frac{n}{(1-f)}$$

Keterangan:

$n'$  = besar sampel yang dikoreksi

$n$  = besar sampel yang dihitung

$f$  = perkiraan proporsi *drop out*

Proporsi *drop out* sampel diperkirakan 10% sehingga didapat:

$$n' = \frac{n}{(1-f)} = \frac{4}{(1-0,15)} = 5,88 \text{ (dibulatkan menjadi 6 ekor)}$$

Berdasarkan dari rumus diatas, didapatkan jumlah tikus untuk masing-masing kelompok yaitu sebanyak 6 ekor tikus. Penelitian terdiri dari 6 kelompok sampel, sehingga dibutuhkan sebanyak 36 ekor tikus.

#### 4.4. Teknik Pengambilan Sampel

Sampel dipilih secara acak atau *simple random sampling* sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi.

#### 4.5. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

##### 4.5.1. Variabel Penelitian

Terdapat dua kategori variabel yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu:

1. Variabel bebas : Pemberian ekstrak daun ekor naga (*Epipremnum pinnatum* (L.) Engl.)
2. Variabel terikat : Kadar TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor-Aplha*)
3. Variabel kontrol : Umur, berat badan dan makanan tikus.

#### 4.5.2. Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara ukur	Alat ukur	Skala ukur
Ekstrak daun ekor naga ( <i>Epipremnum pinnatum</i> (L.) Engl.)	Daun ekor naga hasil ekstraksi dengan meserasi bertingkat menggunakan pelarut etanol (Sani K, Nazifah, et al., 2022).	Penimbangan	Timbangan digital	Nominal
Aloksan	Merupakan senyawa organik sintetik turunan urea dengan sifat karsinogen dan toksik sebagai pemicu hiperglikemia dan prodiabetes (Ighodaro et al., 2018)	Penimbangan	Timbangan elektrik skala ketelitian 0,01g	Rasio
Afinitas ikatan Ligan-Reseptor	Kekuatan interaksi pengikatan antara reseptor ligan atau pasangan pengikatnya	<i>Molecular docking</i>	<i>MOE</i>	Rasio
Kadar Glukosa Darah tikus	Glukosa darah adalah istilah yang mengacu kepada kadar glukosa di dalam darah (Endiyasa et al., 2019).	Kadar glukosa darah dilakukan dengan menggunakan glukometer	Glukometer	Rasio
Kadar TNF- $\alpha$ tikus	TNF- $\alpha$ adalah sitokin yang berperan penting dalam mengatur respons peradangan dan terlibat dalam perkembangan berbagai penyakit inflamasi dan autoimun (Jang et al., 2021).	Kadar <i>TNF-<math>\alpha</math></i> dilakukan dengan observasi kadar dalam serum darah tikus dengan menggunakan <i>TNF-<math>\alpha</math> Rat ELISA kit</i>	Prosedur ELISA <i>Reader</i> .	Rasio

#### 4.6. Instrumen Penelitian

##### 4.6.1. Ekstrak daun ekor naga (*Epipremnum pinnatum* (L.) Engl.)

Adapun instrumen dalam pembuatan ekstrak daun ekor naga adalah sebagai berikut:

- 1) Grinder

- 2) Timbangan analitik
- 3) Gelas ukur
- 4) Rotary evaporator
- 5) Gelas piala
- 6) Corong

#### 4.6.2. Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS)

Adapun instrumen dalam LC-HRMS adalah sebagai berikut:

- 1) Laptop Lenovo *Core Ultra 5* tahun 2024
- 2) *UHPLC Vanquish – Q Exactive Plus Orbitrap*
- 3) Kolom kromatografi
- 4) Sistem pompa HPLC/UPLC
- 5) Autosampler
- 6) Rotary evaporator
- 7) Ultrasonikator
- 8) Timbangan analitik
- 9) *Vortex mixer*
- 10) *Centrifuge*
- 11) pH meter
- 12) Syringe filter

#### 4.6.3. Molecular docking

Adapun instrumen dalam *Molecular docking* adalah sebagai berikut:

- 1) Laptop Lenovo *Core Ultra 5* tahun 2024
- 2) *Microsoft Excel*
- 3) Aplikasi MOE
- 4) *Pymol*
- 5) *Discovery Studio*
- 6) *PubChem*
- 7) PDB
- 8) *PASSOnline server*
- 9) *Lipinski Rule of Five*



#### **4.6.4. Instrumen Penelitian untuk Pemeliharaan Hewan Coba**

Adapun instrumen dalam Pemeliharaan Hewan Coba adalah sebagai berikut:

- 1) Timbangan.
- 2) Kandang hewan coba.
- 3) Tempat makan dan minum hewan coba.

#### **4.6.5. Instrumen untuk Pemberian Aloksan dan Ekstrak Daun Ekor Naga**

Adapun instrumen dalam Pemberian Aloksan dan Ekstrak Daun Ekor Naga adalah sebagai berikut:

- 1) Wadah/Tempat berukuran kecil.
- 2) Pengaduk.
- 3) Sonde.

#### **4.6.6. Instrumen Pengambilan Sampel Uji**

Adapun instrumen dalam Pengambilan Sampel Uji adalah sebagai berikut:

- 1) Spuit dan Jarum suntik.
- 2) *Rotary microtome*.

#### **4.6.7. Instrumen untuk Pemeriksaan Kadar Glukosa Darah Serum**

Adapun instrumen dalam Pemeriksaan Kadar Glukosa Darah Serum adalah sebagai berikut:

- 1) Tabung sentrifuges.
- 2) Mikropipet dan tip steril.
- 3) Microtube 1,5 ml steril.
- 4) *Spectrofotometer*.
- 5) *Centrifuge*
- 6) *Vortex mixer*.

#### 4.6.8. Instrumen untuk Pemeriksaan Kadar TNF- $\alpha$

Adapun instrumen dalam Pemeriksaan Kadar TNF- $\alpha$  adalah sebagai berikut:

- 1) Mesin *centrifuge*.
- 2) Tabung sampel darah dengan K2 EDTA 3,6 mg.
- 3) ELISA *washer*.
- 4) ELISA *reader multiscan*.
- 5) Tabung *microcentrifuge*

#### 4.6.9. Instrumen untuk Sanitasi dan Higiene

Adapun instrumen dalam Sanitasi dan Higiene adalah sebagai berikut:

- 1) Masker.
- 2) Alkohol.
- 3) Sabun Cuci tangan/Septik.
- 4) Jas labor.
- 5) Sarung tangan.

#### 4.6.10. Instrumen Pengambilan Data

Adapun instrumen dalam Pemeriksaan Pengambilan Data adalah sebagai berikut:

- 1) Kamera/ponsel.
- 2) Buku.
- 3) Pena atau pensil.
- 4) Penggaris.

### 4.7. Bahan Penelitian

#### 4.7.1. Ekstrak daun ekor naga (*Epipremnum pinnatum* (L.) Engl.)

- 1) Daun ekor naga yang sudah kering
- 2) Pelarut Etanol 96%
- 3) Aluminium foil
- 4) Kertas saring

#### **4.7.2. Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS)**

- 1) Ekstrak daun ekor naga
- 2) Fase gerak (*Mobile phase*)

#### **4.7.3. Molecular docking**

- 1) Reseptor TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor Alpha*) sebagai protein target
- 2) Senyawa metabolit yang teridentifikasi oleh LC-HRMS

#### **4.7.4. Bahan untuk Pemeliharaan Hewan Coba**

- 1) Sebanyak 36 tikus putih yang memenuhi kriteria inklusi.
- 2) Air.
- 3) Pakan standar.
- 4) Sekam Padi.

#### **4.7.5. Bahan untuk Pembuatan Alokasan**

- 1) Alokasan.
- 2) Aquades 10%.

#### **4.7.6. Bahan untuk Pemberian Ekstrak Daun Ekor Naga**

- 1) Ekstrak daun ekor naga
- 2) Aquades.

#### **4.7.7. Bahan Pemeriksaan Kadar Glukosa Darah**

Pemeriksaan kadar glukosa darah dilakukan sebagai *screening* awal dan akhir terhadap tikus dalam kondisi hiperglikemia dengan kriteria glukosa darah puasa  $\geq 126$  mg/dL.

- 1) Sampel *whole blood* (darah kapiler)
- 2) Jarum.
- 3) Strip.
- 4) Kapas dan alkohol.
- 5) *Handschoen*.



- 6) Wadah limbah infeksius
- 7) *Vortex mixer*

#### **4.7.8. Bahan Pemeriksaan Kadar TNF- $\alpha$**

- 1) Aquades
- 2) ELISA kit untuk pemeriksaan Rat TNF- $\alpha$

#### **4.8. Prosedur Penelitian**

##### **4.8.1. Ekstraksi Daun Ekor Naga (*Epipremnum pinnatum* (L) Engl.) dengan Metode Meserasi**

Proses pembuatan simplisia dilakukan melalui beberapa tahap sebagai berikut: (Sani K, Nazifah, et al., 2022).

- 1) Daun ekor naga sebanyak 18 kg disortir dalam keadaan basah untuk memisahkan kotoran atau benda asing lainnya termasuk dari batang daun yang keras.
- 2) Bahan dicuci menggunakan air mengalir agar kotoran yang masih menempel bisa hilang.
- 3) Daun ekor naga dipotong-potong agar proses pengeringan lebih cepat dan merata. Potongan daun kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di dalam ruangan yang teduh, tidak terkena sinar matahari langsung, hingga benar-benar kering.
- 4) Setelah kering, daun digiling hingga menjadi serbuk. Serbuk simplisia ini kemudian disimpan di suhu ruangan (Sani K, Nazifah, et al., 2022).
- 5) Ekstraksi serbuk simplisia daun ekor naga dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Serbuk simplisia dimasukkan ke dalam wadah bersih yang kedap cahaya, kemudian ditambahkan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10 hingga seluruh serbuk terendam sepenuhnya.
- 6) Campuran tersebut diaduk secara perlahan untuk memastikan homogenitas, kemudian dibiarkan pada suhu ruang selama 5 hari dengan pengadukan sesekali.
- 7) Campuran serbuk dan etanol disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan larutan filtrat dari ampas.

- 8) Filtrat yang diperoleh kemudian dikonsentrasikan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 45-50°C dengan tekanan 175 mbar untuk menghilangkan pelarut, sehingga menghasilkan ekstrak kental daun ekor naga. Ekstrak ini kemudian disimpan dalam wadah tertutup rapat dan disimpan hingga digunakan untuk analisis lebih lanjut.

#### **4.8.2. Analisis Kandungan Senyawa Ekstrak Daun Ekor Naga (*Epipremnum pinnatum* (L) Engl.) dengan Uji *Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry* (LC-HRMS)**

Analisa senyawa aktif dilakukan dengan menggunakan *Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry* (LC-HRMS) di Invilab Bio Indonesia, Bogor, Jawa Barat. Ekstrak daun ekor naga diencerkan dengan etanol 96% hingga mencapai konsentrasi yang pas. Ekstrak daun ekor naga yang telah diencerkan disaring menggunakan membran filter berukuran 0,22 µm untuk menjaga kebersihan dan mencegah tersumbatnya kolom kromatografi. Sebanyak 5 µL sampel yang telah disiapkan diinjeksikan ke dalam sistem kromatografi cair (LC). Fase gerak campuran air dan etanol 96% dialirkan melalui kolom kromatografi untuk memisahkan senyawa berdasarkan polaritas dan sifat kimianya.

Senyawa yang telah dipisah dimasukkan ke spektrometer massa resolusi tinggi (HRMS). Spektrometer massa mendeteksi ion-ion yang terbentuk dan menghasilkan spektrum massa yang mencakup nilai  $m/z$  (massa terhadap muatan) dari setiap senyawa. Data spektrum diproses menggunakan perangkat lunak analisis untuk mengidentifikasi senyawa kimia dan senyawa aktif berdasarkan nilai massa molekul dan pola fragmentasi ion. Identifikasi dilakukan dengan membandingkan data yang didapat dengan pustaka atau basis data senyawa yang tersedia. Hasil analisis berupa profil lengkap senyawa kimia dalam ekstrak dan senyawa aktif potensial.

### 4.8.3. Penerapan Data *Mining* Menggunakan Database

#### 4.8.3.1. *Screening* Senyawa

Senyawa yang teridentifikasi melalui uji LC-HRMS. Selanjutnya, struktur 3D senyawa dicari dengan mengakses *website PubChem* (<https://PubChem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Pengunduhan struktur 3D disimpan data format SDF, format data *SMILES* pada “*Name and Identifier*”.

#### 4.8.3.2. *Screening* Target Reseptor

Struktur tiga dimensi TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor Alpha*) diunduh dari *Protein Data Bank* dengan mengakses web (<http://www.rcsb.org/pdb/>).

### 4.8.4. Analisis Senyawa Ekstrak Daun Ekor Naga (*Epipremnum pinnatum* (L.) Engl.) Berdasarkan Parameter Farmakodinamik secara *In silico*

#### 4.8.4.1. *PASSOnline Server*

Salah satu layanan online yang mampu memprediksi aktivitas suatu senyawa dalam spektrum aktivitas biologis senyawa organik berdasarkan rumus strukturnya adalah *PASSOnline* server (<https://www.way2drug.com-/PASSOnline/>). Langkah yang dilakukan adalah registrasi terlebih dahulu. *Username* dan *password* akan diberikan melalui email. Siapkan sampel dalam format *SMILES* dari senyawa yang didapatkan pada *PubChem*, pilih jenis prediksi yang diinginkan, seperti aktivitas biologis. Hasil prediksi disajikan dalam bentuk tabel yang mencakup informasi tentang aktivitas biologis dan toksisitas senyawa. Hasil prediksi akurat jika  $P_a > P_i$ .

#### 4.8.4.2. *Lipinski Rule of Five*

Analisis *Lipinski Rule of Five* pada *Supercomputing Facility for Bioinformatics and Computational Biology* (SCFBio) dari IIT Delhi (<http://www.scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp#anchortag>) dengan memasukkan format struktur senyawa berupa format .sdf pada “Input PDB file” dan pengaturan pH 7.4 pada “pH value”, kemudian pilih opsi “submit”. Hasil dari analisis ini memberikan informasi suatu senyawa memenuhi kriteria *Lipinski* atau tidak. Menurut *Lipinski Rule of Five*,

senyawa yang berpotensi sebagai obat harus memenuhi beberapa parameter, yaitu memiliki berat molekul (*Molecular Weight*)  $\leq 500$  Dalton,  $\text{LogP} \leq 5$  (ukuran kelarutan dalam lemak vs. air), jumlah donor ikatan hidrogen  $\leq 5$  (jumlah -OH dan -NH) dan jumlah akseptor ikatan hidrogen  $\leq 10$  (jumlah atom O dan N).

#### **4.8.5. Analisis Senyawa Ekstrak Daun Ekor Naga (*Epipremnum pinnatum* (L.) Engl.) Berdasarkan Parameter Farmakokinetik secara *In silico***

##### **4.8.5.1. Prediksi ADME (*Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, Ekskresi*)**

Prediksi ADME dilakukan menggunakan website <http://www.swissadme.ch/> untuk mengevaluasi sifat farmakokinetik dan bioavailabilitas suatu senyawa prediksi yang diinginkan, seperti *GI Absorption*, *BBB permeant*, *LogS*, *Cytochrome P450*, *Transporter Interaction* (OCT2). Analisis dimulai dengan memasukkan SMILES senyawa lalu klik “Run”.

##### **4.8.5.2. Prediksi Toksisitas**

Prediksi toksisitas dilakukan menggunakan webserver ProTox 3.0 (<https://comptox.charite.de/protox3/>) dengan memasukkan kode SMILES senyawa pada *webserver*; pilih *Toxicity Class*, *Hepatotoxicity*, *Mutagenicity*, *hERG Inhibition*, *Nephrotoxicity*, lalu klik “*Start Tox-Prediction*”. Hasil prediksi mencakup informasi tentang sifat ADMET dari senyawa untuk setiap kategori.

#### **4.8.6. Analisis Potensi Antiinflamasi Senyawa Aktif Daun Ekor Naga (*Epipremnum pinnatum* (L.) Engl.) sebagai Inhibitor TNF- $\alpha$ Menggunakan Metode *Molecular docking* secara *In silico***

##### **4.8.6.1. Preparasi Ligan**

Senyawa aktif daun ekor naga diperoleh melalui proses profiling menggunakan metode LC-HRMS. Struktur tiga dimensi senyawa aktif ekstrak daun ekor naga yang didapat dari proses LC-HRMS diunduh dari website *PubChem* (<https://PubChem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Seluruh ligan kemudian di preparasi menggunakan aplikasi *Molecular Operating Environment* (MOE) version 2019. Setelah itu, energi senyawa diminimalkan



menggunakan fitur *energy minimization* pada MOE dan semua senyawa disimpan dalam format .pdbqt.

#### 4.8.6.2. Preparasi Protein Target

Struktur protein *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- $\alpha$ ) yang telah dipilih (PDB ID: 6OOY) diunduh dalam format.pdb dari *website* <http://www.rcsb.org>. Protein di preparasi dengan menggunakan aplikasi MOE dengan cara klik *QuickPrep*.

#### 4.8.6.3. Validasi Metode *Docking* (*Redocking*)

Validasi metode dilakukan melalui proses *redocking* dengan tujuan memastikan bahwa parameter dan protokol *docking* mampu mereproduksi posisi *native ligand* pada struktur kristal protein. File protein hasil unduhan (PDB ID: 6OOY) dibuka dan pembersihan awal dilakukan dengan mengabaikan molekul air. Selanjutnya, dilakukan pemeriksaan *sequence* protein dan penghapusan seluruh *chain* yang tidak mengandung *native ligand*. *Native ligand* kemudian disimpan secara terpisah untuk digunakan sebagai pembanding pada tahap *redocking*.

Prosedur *redocking* dilakukan dengan memuat kembali file protein *preparation*, memasukkan *native ligand* ke dalam kotak *docking*, serta mengubah keluaran menjadi mode *redocking*. Validasi dianggap memenuhi kriteria apabila nilai RMSD hasil *redocking* terhadap posisi ligan asli  $< 2 \text{ \AA}$  dengan nilai *binding affinity* tertinggi.

#### 4.8.6.4. *Molecular docking*

*Docking* molekuler dilakukan menggunakan aplikasi MOE (versi 2019). Situs pengikatan protein target diidentifikasi menggunakan alat *Site Finder tool* dari aplikasi MOE. Interaksi ligan-protein dianalisis dan dievaluasi berdasarkan nilai afinitas pengikatan (kcal/mol) dan *Root Mean Square Deviation* (RMSD). Validasi hasil *molecular docking* dievaluasi berdasarkan nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) antara pose hasil *docking* dengan konfirmasi referensi. Nilai RMSD  $< 2 \text{ \AA}$  menunjukkan bahwa prediksi ikatan ligan memiliki reliabilitas tinggi. Analisis visualisasi interaksi



dua dimensi kemudian dilakukan untuk menilai jenis dan kesesuaian posisi interaksi antara senyawa kandidat dengan residu asam amino pada situs aktif TNF- $\alpha$ .

Senyawa kandidat dari daun ekor naga dinyatakan berpotensi sebagai inhibitor TNF- $\alpha$  apabila memenuhi kriteria sebagai berikut:

- Sesuai dengan parameter *biological activity* serta *Lipinski's Rule of Five*,
- Memiliki profil ADMET yang mendukung bioavailabilitas dan keamanan
- Menunjukkan nilai *binding affinity* yang lebih rendah (lebih negatif) dibandingkan ligan kontrol
- Memiliki nilai RMSD < 2 Å
- Memperlihatkan kesamaan interaksi residu asam amino target dengan ligan kontrol pada situs aktif TNF- $\alpha$ .

Visualisasi struktural dalam format 2D dan 3D selanjutnya memvalidasi kedekatan spasial dan pola interaksi antara peptida dan target proteinnya, mendukung kandidatnya sebagai peptida selektif.

#### 4.8.7. Visualisasi Struktur 2D dan 3D Kompleks Ligan-Protein

Hasil *molecular docking* yang telah didapat pada langkah sebelumnya divisualisasikan menggunakan aplikasi MOE. Hasil *molecular docking* yang telah disimpan dalam format .moe dibuka dengan cara klik file > open, kemudian pilih file yang ingin dibuka. Setelah bentuk 3D kompleks ligan-protein terbuka, klik *show 2D interaction* untuk melihat struktur dan jenis ikatan interaksi antara ligan dan protein.

#### 4.8.8. Cara Pengolahan dan Analisis Data *in silico*

Senyawa yang terdapat pada ekstrak daun ekor naga (*Epipremnum pinnatum* (L.) Engl.) yang telah dilakukan analisis menggunakan LC-HRMS, selanjutnya senyawa dianalisis farmakodinamik menggunakan *PASSOnline* dan uji *Lipinski Rules of Five* SCFBio IIT Delhi, farmakokinetik dengan SwissADME toksisitas menggunakan ProTox 3.0 untuk menilai potensi senyawa sebagai agen terapi. Senyawa yang memenuhi kriteria tersebut

kemudian di preparasi dengan menghilangkan air dan menambahkan molekul hidrogen. Setelah preparasi, dilakukan *molecular docking* pada protein target TNF- $\alpha$ . Jika nilai *binding affinity* senyawa lebih rendah dari ligan asli atau pembanding, senyawa tersebut dianggap berpotensi sebagai kandidat antidiabetes. Hasil *docking* kemudian divisualisasikan dan dianalisis berdasarkan interaksi ikatan yang terbentuk antara senyawa dan protein target.

#### 4.8.9. Pemeliharaan dan Perlakuan Hewan Coba

Pada minggu pertama penelitian akan dilakukan aklimatisasi terhadap hewan coba. Kemudian, diambil 36 ekor hewan coba secara acak yang nantinya akan dipilih kembali agar sesuai dan memenuhi kriteria inklusi sebanyak 36 ekor tikus yang kemudian dibagi dalam empat kelompok percobaan yaitu, kelompok kontrol negatif (K-), kelompok kontrol positif (K+), kelompok pembanding (Kmet) dan kelompok perlakuan (P). Masing-masing kelompok percobaan terdiri dari 6 ekor hewan percobaan.

Tikus akan ditempatkan dalam kandang dengan suhu kamar yang gelap, yaitu tidak mendapat cahaya matahari dan dibersihkan setiap hari. Makanan dan minuman hewan coba akan diberikan secukupnya. Sebelum diberi perlakuan setiap hewan coba dilakukan penimbangan berat badan dan pengamatan kesehatan fisik mulai dari gerakan, makan, dan minum. Apabila pada saat penelitian terdapat tikus yang sakit atau mati saat beradaptasi maka, tikus akan diganti dengan yang baru. Penggantian hewan coba akan disesuaikan dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebelumnya dan akan diambil secara acak.

Setiap kelompok pada hewan coba akan diberi perlakuan dengan mengikuti prosedur yang sudah ditentukan. Berikut perlakuan dari masing-masing kelompok.

K- : Kelompok tikus kontrol negatif, akan diberikan diet berupa pakan standar tanpa diberikan aloksan dan ekstrak daun ekor naga selama 23 hari.

K+ : Kelompok kontrol positif, akan diinduksi aloksan 100 mg/kgBB selama 72 jam.

Kmet : Kelompok pembanding, diinduksi aloksan 100 mg/kgBB dan metformin 250 mg/kgBB selama 23 hari.

P1 : Kelompok tikus perlakuan, diinduksi aloksan 100 mg/kgBB dan ekstrak daun ekor naga 125 mg/kgBB selama 23 hari.

P2 : Kelompok tikus perlakuan, diinduksi aloksan 100 mg/kgBB dan ekstrak daun ekor naga 250 mg/kgBB selama 23 hari.

P3 : Kelompok tikus perlakuan, diinduksi aloksan 100 mg/kgBB dan ekstrak daun ekor naga 375 mg/kgBB selama 23 hari.

Dosis pemberian aloksan dan ekstrak daun ekor naga dapat dilihat pada Tabel 3 sebagai berikut.

Tabel 3. Dosis Pemberiann Aloksan dan Ekstrak Daun Ekor Naga

Kelompok	Dosis Aloksan (mg/kgBB)	Dosis Ekstrak Daun Ekor Naga (mg/kgBB)	Metformin (mg/kgBB)
K-	-	-	-
K+	100	-	-
Kmet	100	-	250
P1	100	125	-
P2	100	250	-
P3	100	375	-

Keterangan : K- : kelompok kontrol negatif, K+ : kelompok kontrol positif, Kmet : kelompok pembanding dan P : kelompok perlakuan. Dosis diacu dari (Bharath & Nikolajczyk, 2021; Lestari et al., 2021)

Proses induksi terhadap hewan coba (tikus jantan) akan dimulai dengan melakukan pembatasan pakan selama 30 jam sebelum di injeksi. Tikus tidak diberikan pakan namun, hanya diberi minum berupa air. Kemudian dilakukan pengukuran glukosa darah puasa sebelum dilakukan induksi aloksan. Setelah masa puasa, maka tikus secara manual akan ditahan dan menerima injeksi aloksan 100 mg/kgBB secara *intraperitoneal* pada perut kanan bawah tikus dengan benar. Selanjutnya, tikus ditempatkan kembali di kandang mereka dengan air dan ad libitum pakan komersial (Sheriff et al., 2019). Setelah 72 jam induksi aloksan, kami mengukur kadar

glukosa darah puasa lagi. Jika kadar glukosa darah puasa lebih dari 200 mg/dl tikus dianggap dalam kondisi diabetes (Rita et al., 2023).

#### 4.8.9.1. Pemberian Ekstrak Daun Ekor Naga *Epipremnum pinnatum* (L.) Engl.

Pemberian ekstrak daun ekor naga dicampur dengan aquades akan dilakukan dengan menggunakan alat bantu sonde per oral. Dalam melakukan intervensi, tikus akan dipegang dan posisinya diatur sedemikian rupa, kemudian ekstrak daun ekor naga dimasukkan melalui tepi palatum sambil didorong secara perlahan ke arah belakang hingga esofagusnya. Kegiatan akan dilakukan secara *kontinue* dengan mengutamakan keamanan dan keselamatan peneliti maupun sampel. Satu hari setelah menghentikan perlakuan, akan dilakukan anestesi secara inhalasi dengan menggunakan eter untuk kemudian dilanjutkan pemeriksaan kadar TNF- $\alpha$  dan glukosa darah dengan mengambil darah hewan coba.

Volume dan konsentrasi ekstrak daun ekor naga yang akan disonde secara per oral didapatkan dengan perhitungan sebagai berikut.

##### a) Menentukan konsentrasi

Volume suspensi senyawa uji yang diberikan secara oral pada hewan uji dihitung berdasarkan rumus *Mallone* (Thompson, 1985) didalam (Rahmawati et al., 2023).

$$VAO \text{ (mL)} = \frac{\text{Dosis } (\frac{mg}{kgBB}) \times BB \text{ (kg)}}{\text{Konsentrasi obat } (\frac{mg}{ml})}$$

$$\text{Dosis Ekstrak P1} = 125 \text{ mg/KgBB}$$

$$2ml = \frac{125 \frac{mg}{kgBB} \times 0,15 \text{ kg}}{\text{Konsentrasi obat } \frac{mg}{ml}}$$

$$\text{Konsentrasi obat} = 9,4 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Dosis Ekstrak P2} = 250 \text{ mg/KgBB}$$

$$2ml = \frac{250 \frac{mg}{kgBB} \times 0,15 \text{ kg}}{\text{Konsentrasi obat } \frac{mg}{ml}}$$

$$\text{Konsentrasi obat} = 18,75 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Dosis Ekstrak P3} = 375 \text{ mg/KgBB}$$



$$2\text{ml} = \frac{375 \frac{\text{mg}}{\text{kgBB}} \times 0,15 \text{ kg}}{\text{Konsentrasi obat} \frac{\text{mg}}{\text{ml}}}$$

Konsentrasi obat = 28,12 mg/ml

- b) Menentukan volume ekstrak daun ekor naga

$$\text{Volume} = \frac{\text{Dosis} \times \text{BB}}{\text{Konsentrasi}}$$

- 1) Berat badan tikus 150 gram

$$\text{Volume} = \frac{125\text{mg/kgBB} \times 150\text{gram}}{28,12 \text{ mg/ml}} = 0,67 \text{ ml}$$

$$\text{Volume} = \frac{250\text{mg/kgBB} \times 150\text{gram}}{28,12 \text{ mg/ml}} = 1,33 \text{ ml}$$

$$\text{Volume} = \frac{375 \text{ mg/kgBB} \times 150\text{gram}}{28,12 \text{ mg/ml}} = 2 \text{ ml}$$

- 2) Berat badan tikus 200 gram

$$\text{Volume} = \frac{125\text{mg/kgBB} \times 200\text{gram}}{28,12 \text{ mg/ml}} = 0,89 \text{ ml}$$

$$\text{Volume} = \frac{250\text{mg/kgBB} \times 200\text{gram}}{28,12 \text{ mg/ml}} = 1,78 \text{ ml}$$

$$\text{Volume} = \frac{375 \text{ mg/kgBB} \times 200\text{gram}}{28,12 \text{ mg/ml}} = 2,67 \text{ ml}$$

- 3) Berat badan tikus 250 gram

$$\text{Volume} = \frac{125\text{mg/kgBB} \times 250\text{gram}}{28,12 \text{ mg/ml}} = 1,11 \text{ ml}$$

$$\text{Volume} = \frac{250\text{mg/kgBB} \times 250\text{gram}}{28,12 \text{ mg/ml}} = 2,22 \text{ ml}$$

$$\text{Volume} = \frac{375 \text{ mg/kgBB} \times 250\text{gram}}{28,12 \text{ mg/ml}} = 3,33 \text{ ml}$$

Satu hari setelah dihentikan perlakuan, akan dilakukan pengambilan darah pada hewan coba kemudian dilanjutkan pemeriksaan kadar glukosa darah dan kadar *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- $\alpha$ ).

#### 4.8.10. Prosedur Pemeriksaan Kadar Glukosa Darah pada Tikus diinduksi Aloksan yang Mendapat Ekstrak Daun Ekor Naga *Epipremnum pinnatum* (L.) Engl.

Pemeriksaan kadar glukosa darah dilakukan dengan metode *point of care testing* (POCT) menggunakan alat *Accu-Chek*. *Point of care testing* (POCT) adalah alat yang digunakan untuk mengukur kadar glukosa darah total berdasarkan deteksi elektrokimia dengan dilapisi enzim *glukosa oxidase*



pada strip membran (Endiyasa et al., 2019). Darah diambil melalui ekor yang disayat 1 mm dengan menggunakan gunting yang sudah disterilisasi. Pemeriksaan kadar glukosa darah pada tikus dilakukan pada *screening* awal sebelum pemberian aloksan, setelah pemberian aloksan dan *screening* akhir terhadap pengaruh pemberian ekstrak daun ekor naga pada tikus.

#### **4.8.10.1. Preparasi**

- 1) Siapkan strip tes gula darah sesuai kebutuhan.
- 2) Lakukan perawatan harian pada alat glukosameter dengan metode POCT (*Point of Care Testing*).
- 3) Pastikan peralatan yang digunakan siap dan tidak bermasalah.

#### **4.8.10.2. Pengukuran kadar glukosa darah**

- 1) Tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 8 jam kemudian ditempatkan di tempat yang sudah di sediakan.
- 2) Ujung ekor tikus dibersihkan menggunakan alkohol 70%, kemudian dipotong sedikit.
- 3) Strip glukosa darah pada alat ditempelkan pada darah sampai ruang kosong pada strip terisi.
- 4) Kemudian ditunggu sebentar dan akan timbul angka pada layar monitor alat.

#### **4.8.11. Prosedur Pemeriksaan Kadar *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- $\alpha$ ) pada Tikus diinduksi Aloksan yang Mendapat Ekstrak Daun Ekor Naga *Epipremnum pinnatum* (L.) Engl.**

Pemeriksaan kadar TNF- $\alpha$  dilakukan dengan pengambilan serum darah dari tikus putih dan dibawa ke Laboratorium Biomedis Fakultas Kedokteran Universitas Andalas untuk proses pemeriksaan. Pemeriksaan kadar TNF- $\alpha$  pada tikus dilakukan pada *screening* awal setelah pemberian aloksan dan *screening* akhir terhadap pengaruh pemberian ekstrak daun ekor naga pada tikus. Penelitian ini menggunakan kit *Bioassay Technology Laboratory* (BT-Lab China, E1444Ra, [www.bt\\_laboratory.com](http://www.bt_laboratory.com)) dengan prosedur pemeriksaan sebagai berikut:

- 1) Siapkan semua reagen, larutan standar dan sampel. Simpan semua reagen dalam suhu ruang sebelum digunakan. Pengujian dilakukan pada suhu ruang.
- 2) Tentukan jumlah strip yang diperlukan untuk pengujian. Masukkan strip ke dalam *frame* untuk digunakan. Strip yang tidak digunakan harus disimpan pada suhu 2-8°C.
- 3) Masukkan 50 ul standar ke dalam *well standart*.
- 4) Masukkan 40 ul sampel ke dalam *well sampel* lalu tambahkan 10 ul antibodi Rat TNF- $\alpha$  ke dalam *well sampel*, kemudian tambahkan 50 ul streptavidin-HRP ke dalam *well sampel* dan *well standart* (Bukan *well control* kosong). Homogenkan. Tutup plat dengan *sealer*. Inkubasi 60 menit pada suhu 37°C.
- 5) Lepaskan *sealer* dan cuci plat 5 kali dengan *buffer* pencuci. Rendam *well* dengan *buffer* pencuci 300 ul selama 30 detik hingga 1 menit untuk setiap pencucian sebanyak 5 kali. Tepuk-tepuk plat di atas tisu atau bahan penyerap lainnya.
- 6) Tambahkan 50 ul larutan substrat A ke setiap *well*, lalu tambahkan 50 ul larutan substrat B ke setiap *well*. Tutup *plate* dengan *sealer* dan inkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C dalam tempat gelap.
- 7) Tambahkan 50 ul *Stop Solution* ke masing-masing *well*, warna biru akan segera berubah menjadi kuning.
- 8) Tentukan densitas optik (nilai OD) setiap *well* menggunakan ELISA reader merk Bio-Rad yang disetel ke 450 nm dalam waktu 10 menit setelah menambahkan larutan penghenti.

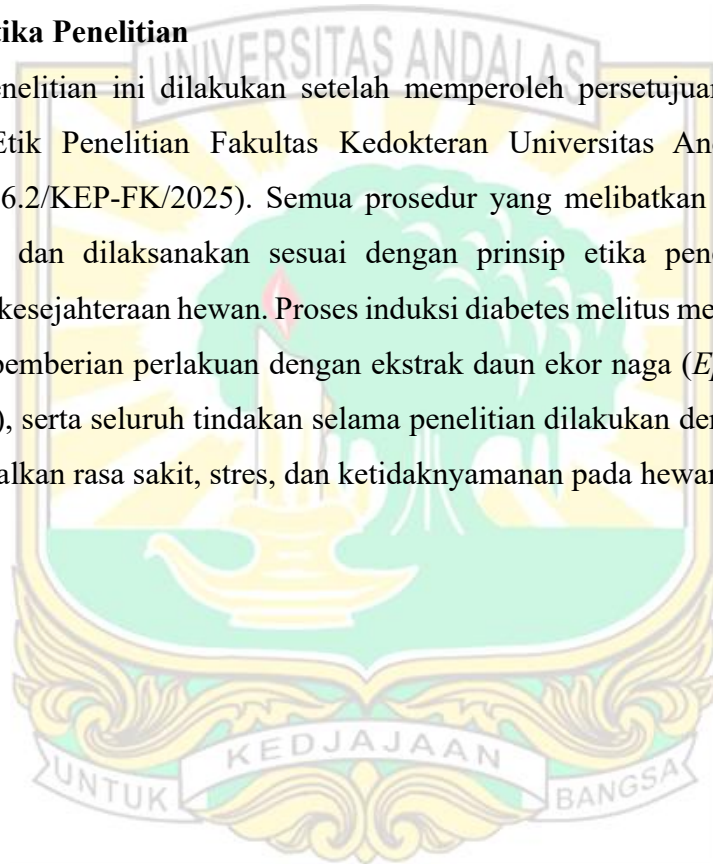
#### 4.9. Analisis Data

Seluruh data yang diperoleh dianalisis secara komputasi menggunakan perangkat lunak statistik SPSS Versi 25. Uji normalitas distribusi data dilakukan dengan uji *Shapiro-Wilk*, sedangkan uji homogenitas varians diukur dengan uji *Levene*. Analisis perbedaan antar kelompok perlakuan dilakukan menggunakan *Two-Way Repeated Measures Analysis of Variance* (ANOVA) untuk mengevaluasi pengaruh waktu (*pre* dan *post* perlakuan), kelompok perlakuan, serta interaksi antara waktu dan kelompok

terhadap kadar glukosa darah dan TNF- $\alpha$ , karena terdapat dua faktor yang dianalisis secara berulang. Apabila ANOVA menunjukkan perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ), maka dilakukan uji lanjut (*post-hoc*) *Bonferroni* untuk data yang memenuhi asumsi homogenitas varians. Apabila asumsi homogenitas varians tidak terpenuhi, digunakan uji lanjut *Games–Howell*. Seluruh pengujian statistik dilakukan dengan tingkat signifikansi  $p < 0,05$ . Penyajian grafik kadar glukosa darah dan TNF- $\alpha$  dibuat menggunakan perangkat lunak *GraphPad Prism* versi 10.

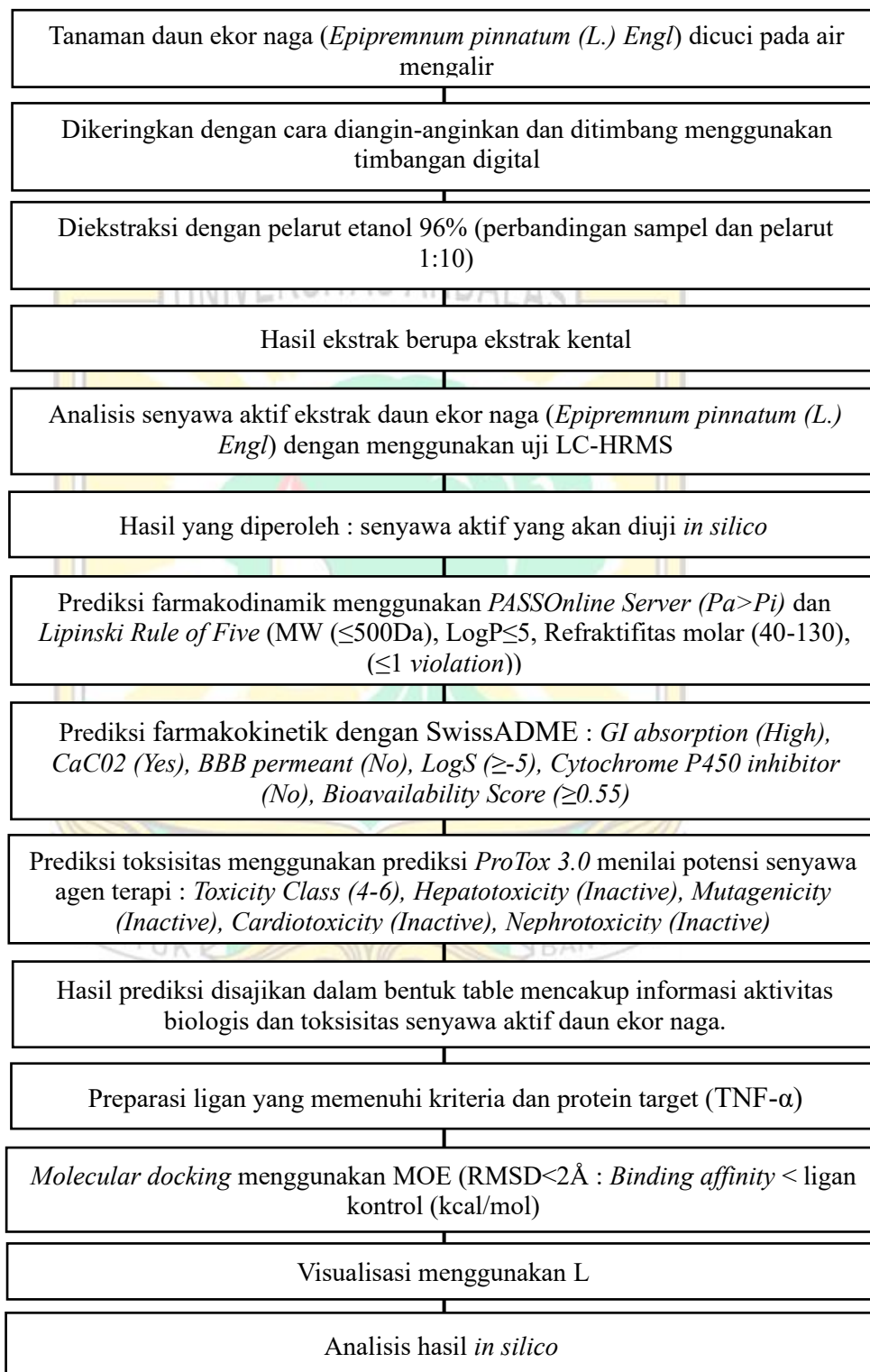
#### **4.10. Etika Penelitian**

Penelitian ini dilakukan setelah memperoleh persetujuan dari Tim Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Andalas (No: 581/UN.16.2/KEP-FK/2025). Semua prosedur yang melibatkan hewan uji, dirancang dan dilaksanakan sesuai dengan prinsip etika penelitian dan pedoman kesejahteraan hewan. Proses induksi diabetes melitus menggunakan aloksan, pemberian perlakuan dengan ekstrak daun ekor naga (*Epipremnum pinnatum*), serta seluruh tindakan selama penelitian dilakukan dengan upaya meminimalkan rasa sakit, stres, dan ketidaknyamanan pada hewan.



#### 4.11. Alur Penelitian

##### Uji *in silico*



### Uji *in vivo*

