

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah labu alas bulat leher tiga 100 ml, magnetic stirrer, thermometer 100 °C, gelas beker 100 mL, gelas beker 250 mL, pipet ukur 1 mL, pipet ukur 10 mL, pipet ukur 25 mL, neraca analitik, sendok sungsung, pengaduk kaca, kaca preparatif, kolom kromatografi, kaca arloji, pipa kapiler, botol vial 10 mL, mikroplate tipe flat, labu ukur 10 mL, labu ukur 250 mL, propipet, plat kromatografi lapis tipis (KLT) GF₂₅₄, aluminium foil, plastic wrap, cetakan kaca 20 x 20 cm, FTIR Thermo Nicolet Avatar 360, dan H-NMR JEOL 500 Hz.

4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain asam 2,5-Dihidroksi Benzoat, Phloroglucinol, akuades, es batu, reagen Eaton, kertas saring, etil asetat, dan n-heksan, kloroform, metanol, Na₂SO₄, kapas, dan silika gel G₆₀F₂₅₄, dan silika gel 60 (0,2-0,5mm).

4.3 Cara Kerja

4.3.1. Sintesis 1,3,7-Trihidroksi Xanton

Sebanyak 50 mmol (0,77 gram) senyawa asam 2,5-Dihidroksi Benzoat dan 50 mmol (0,63 gram) senyawa Phloroglucinol dicampurkan menjadi satu di labu leher tiga 250 mL. Kemudian dicampurkan reagen Eaton secara perlahan sebanyak 10 mL. Campuran tersebut dipanaskan dalam wadah berisi minyak goreng pada suhu 80±3 °C dengan pengadukan konstan selama 30 menit. Setelah itu campuran didinginkan pada suhu ruang. Campuran yang sudah dingin dimasukkan ke dalam gelas beker yang berisi es batu (dari akuades) dan diaduk secara konstan selama ±1 jam. Padatan yang terbentuk disaring dengan corong buchner

dan di keringkan didesikator selama ± 24 jam. Padatan kering ditimbang dan dicek kemurniannya dengan KLT.

4.3.2. Identifikasi Xanton Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Disiapkan plat KLT ukuran 4,5 x 4 cm dengan batas atas dan bawah sebesar 0,5 cm. Kemudian dibuat fase gerak n-heksan: etil asetat (2:1) dan dimasukkan dalam gelas beker kemudian ditutup menggunakan plastik wrap. Ditotolkan sampel hasil sintesis dibandingkan dengan asam 2,5-Dihidroksi Benzoat dan Pholoroglucinol sebagai standar kemudian dielusi dalam gelas beker sampai tanda batas atas. Diambil plat KLT dan dikeringkan kemudian dilihat dibawah sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm. Terdapatnya spot yang berbeda pada sampel dibandingkan dengan asam 2,5-Dihidroksi Benzoat dan Pholoroglucinol sebagai standar menunjukkan terbentuknya xanton.

4.3.3. Pemisahan Xanton Menggunakan Kromatografi Kolom

Disamping itu kolom yang digunakan terlebih dahulu dicuci dengan etil asetat (merupakan salah satu fase gerak yang akan digunakan). Kemudian dimasukkan bubuk silika dan eluen dari campuran etil asetat:n-heksan (1:2). Setelah itu senyawa xanton hasil sintesis diimpregnasi menggunakan silika gel dan dimasukkan ke dalam kolom melalui dinding kolom.

Kerana eluen dibuka dan tetesannya diatur sedemikian rupa agar tidak cepat dan tidak lambat. Fase gerak yang ada dalam kolom tingginya tidak menyerupai permukaan silika gel agar silika tidak kering dan retak. Fase gerak yang keluar dimasukkan kedalam botol-botol vial berdasarkan fraksi – fraksi senyawa, masing-masing fraksi dicek dengan KLT. Fraksi yang memiliki pola noda yang sama disatukan dalam fraksi yang sama. Setelah itu dimurnikan dengan KLTP.

4.3.4. Pemurnian Xanton Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif

Ditimbang silika gel seberat 7 gram dan dilarutkan dengan akuades sebanyak 17 mL di dalam labu alas bulat lalu diaduk hingga homogen. Kemudian dituangkan di dalam plat kaca secara perlahan, dan didiamkan selama 24 jam. Sebelum dipakai Plat KLTP dioven selama 10 menit pada suhu 105 °C lalu didinginkan dalam suhu ruang. Dipilih hasil fraksi yang terelusi dengan baik pada kromatografi kolom. Kemudian masing-masing fraksi yang telah dipilih dilarutkan dengan eluen dan ditotolkan pada plat KLTP pipet tetes. Selanjutnya dielusi dalam chamber yang berisi eluen kloroform : etil asetat (4:1) yang telah jenuh. Kemudian dibiarkan terelusi, selanjutnya diamati penampakan bercak noda pada lampu UV 254 dan 366 nm. Dan diamati dibawah lampu UV 254 dan UV 366. Setelah itu pita-pita yang terdeteksi diberi tanda dan kemudian di keruk yang selanjutnya di sebut isolate. Kemudian dikarakterisasi dengan FTIR, dan H-NMR

4.3.5. Uji In Vitro Antiplasmodium terhadap *Plasmodium Falciparum* galur FCR3

1. Pembuatan Larutan RPMI

Disiapkan gelas beker diatas stirer dan dimasukkan aquabides 200 mL. Hidupkan stirer lalu ditambahkan NaHCO₃, HEPES, RPMI kemudian diukur pH sampai 7,2. Jika pH > 7,2 maka ditambahkan HCL tetes demi tetes sampai pH 7,2. Sisa aquabides yang dituang dalam beker distirer hingga benar-benar tercampur dan pH mencapai 7,2. Kemudian larutan RPMI disterilisasi dengan filter 0,2 µm didalam LAF dan ditambahkan gentamicin setiap 100 mL RPMI setelah itu ditambahkan 50 µm gentamicin kemudian disimpan dikulkas.

2. Pengambilan Darah dari Donor

Donor diperiksa tekanan darahnya. Donor duduk didalam ruang steril, didekat LAF. Diusap bagian yang akan diambil darahnya dengan

kapas beralkohol, pasang tourniquete dan pasang wing needle. Dari wing needle, tarik darah dengan squirt 12 cc untuk dibuat RBC lalu dengan split 50 cc sebanyak 4x untuk dibuat serum. Untuk pembuatan RBC, darah dimasukkan kedalam tabung conical 15cc yang sudah diberi larutan ACD 1 mL sebagai zat antikolagen. Untuk pembuatan serum, darah dimasukkan kedalam botol duran dan alirkan darah melalui melalui botol agar tidak berbuih. Setelah volume darah yang dikehendaki cukup, lepas toniquete, lepas wing needle. Bekas tusukan diusap dengan kapas beralkohol 70% dan ditekan. Botol yang berisi darah ditutup rapat dan didiamkan pada suhu ruang ± 4 jam , kemudian disimpan dikulkas.

3. Pembuatan RBC (*Red Blood Cell*)

Disiapkan 2 tabung conicol 15 cc steril didalam LAF. Dimasukkan 1 mL larutan ACD steril kedalam salah satu tabung tersebut. Dan dimasukkan darah dari donor kedalam conical tube yang ada larutan CAD-nya. Resuspensi, kemudian sentrifus pada 8000 rpm selama 10 menit. Buang supernatan secara reseptis dengan pipet pasteur kedalam gelas beker. Kemudian ditambahkan sedikit RPMI, diresuspensi, dibagi kedalam 2 cinical. Masing-masing tabung ditambahkan RPMI 10 mL diresuspensi, sentrifus 8000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang secara aseptis dengan pipet pasteur kedalam gelas beker. Pengulangan langkah tersebut merupakan pencucian dengan RPMI sampai 3x. Masing-masing RBC yang diperoleh ditambahkan RPMI (RPMI : RBC) dengan perbandingan 1:1. Kemudian disimpan dikulkas.

4. Pembuatan Serum

Botol berisi darah dari donor ± 200 mL didiamkan pada suhu kamar selama ± 4 jam, sampai terbentuk lapisan. Kemudian disimpan di almari es selama 24 jam. Setelah 24 jam dimasukkan botol kedalam LAF, ambil serumnya secara aseptis dengan pipet pasteur secara hati-hati.

Dimasukkan serum kedalam botol conical 15cc secara steril, kemudian sentrifus pada 7000 rpm selama 10 menit. Bagian atas berwarna kuning (supernatan/serum) diambil dengan pipet pasteur, dimasukkan kedalam botol duran secara steril. Isi kembali tabung conical dengan serum dari botol darah, lalu disentrifus. Ulangi kegiatan tersebut sampai serum dari botol darah habis. Inaktivitasi serum sebelum digunakan dan alkuat ke tabung conical jika digunakan.

5. Inaktivasi Serum

Nyalakan oven pada suhu 56 °C. Siapkan gelas beker yang diisi dengan air sebagian, kemudian dimasukkan kedalam oven. Setelah itu oven stabil pada suhu 56 °C, dimasukkan botol serum kedalam gelas beker didalam oven dan tutup kembali. Tunggu sampai suhu oven kembali stabil. Setelah suhu stabil pada 56 °C, maka perhitungan waktu dimulai. Hitung waktu sampai 1 jam. Beri label botol serum dan disimpan di freezer.

6. Pembuatan Larutan ACD

Siapkan gelas beker diatas stirer dan ditambahkan 50 mL akuades kemudian hidupkan stirer. Gelas beker tersebut dimasukkan trisodium citrate 2,2 gr , asam citrate 0,8 gr, dan dextrose 2,45 gr secara berturut-turut. Kemudian dimasukkan aquadest sampai dengan 100 mL, tunggu sampai semu larut. Matikan stirer. Setelah itu dimasukkan kedalam botol duran untuk sterilisasi.

7. Pembuatan Freezing Solution

Langkah pembuatan 100 mL freezing solution dengan bantuan magtetic stirer 3 gr sorbitol dilarutkan dalam NaCl 0,9% hingga volume larutan 72 mL. Setelah semua sorbitol larut ditambahkan 28 mL gliserol dan dicampur hingga homogen. Kemudian dilakukan sterilisasi didalam

LAF menggunakan syringe filter 0,22 μm dan disimpan didalam kulkas dengan suhu 4 $^{\circ}\text{C}$.

8. Penyimpanan Plasmodium di Nitrogen Cair

Sebagian plasmodium dipindahakan dari flask kultur kedalam conocal 15 mL dengan pipet pasteur secara aseptis. Kemudian disentrifus pada 7000rpm selama 10 menit. Suoernation dibuang (diambil secara aseptis dengan pipet pasteur, pipet pasteur yang sama dapat digunakan untuk mengambil supernatan pada conical tube yang lain, jika plasmanya ada 2 tabung conical). Setelah itu ditambahkan freezing solution : endapan (1:1) dan disuspensi dengan pipet pasteur. Suspensi plasmodium dipindahkan ke cryotube (1,8 mL) dengan volume maksimal 1,5 mL atau diisi dengan $\frac{1}{2}$ cryotube. Cryotube tidak boleh dipegang pada saat suspensi plasmodium dimasukkan, tetapi diletakkan di atas meja LAF deket bunsen. Cryotube dan tutupnya dilewatkan diatas api bunsen. Kemudian cryotube ditutup dan diberi label. Setelah itu disimpan dalam tabung N_2 di lab. Parasitologi.

9. Thawing

Plasmodium simpanan (cyo) diambil dari tabung N_2 cair. Kemudian segera dihangatkan dengan bantuan *waterbath* pada suhu 37,5 $^{\circ}\text{C}$ digoyang-goyang dan ditambahkan RPMI sampai 10 cc. Setelah itu disuspensi dan sentrifus 7000 rpm selama 10 menit. Dibuang supernatan dengan pipet pasteur dan terbentuklah endapan. Endapan diambil sedikit untuk dibuat preparat apusan dan sisanya dipindahkan ke flask kultur kemudian ditambahkan RPMI 8 mL, HS 2 mL, dan RBC 200 μL . Setelah itu diinkubasi selama 48 jam dalam condle jar.

10. Ganti Media dan penghitungan Parasitemia

Kultur di condle jar dikeluarkan dari inkubasi ke LAF dan dilakukan juga flask kultur secara perlahan. Buang media secara

perlahan dengan pipet pasteur dan usahakan jangan terambil RBC-nya. Setelah terbuang semua dimasukkan media yang dibutuhkan dan ditambahkan RPMI 8 mL, HS 500 μ L, dan RBC 50 μ L. Tutup Flask kultur dan dimasukkan kedalam condle jar. Kemudian dimasukkan lilin yang nyala dan dibiarkan mati. Setelah itu dimasukkan ke dalam inkubator.

Untuk perhitungan parasitemia yaitu dengan pembuatan preparat apusan tipis. Endapan plasmodium dimasukkan kedalam mikrotube dan disentrifuse 7000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang (endapan dibuat apusan darah tipis diatas objek glass). Kemudian apusan dikeringkan (di fiksasi dengan metanol PA lalu dikeringan). Apusan yang sudah dikeringkan ditetesi cat giemsa 10% (*fresh*) ditunggu selama 10 menit. Setelah itu dicuci dibawah air mengalir dan dikeringkan dengan hair dryer. Untuk dilakukan pengamatan ditetesi minyak emersi dan dilihat dibawah mikrososp perbesar 100x. Pengamatan dilakukan dengan menghitung setiap 1000 sel darah ditemukan berapa sel plasmodium yang menginfeksi. Sel plasma yang ditemukan atau sel RBC yang ditemukan dikali 100% dan dihasilkan presentase parasitemia.

11. Metode sinkronisasi

Kultur Plasmodium dimasukkan ke tabung conical 15 cc steril dengan pipet pasteur. Kemudian disentrifue pada 7000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dengan pipet pasteur. Endapan plasmodium ditambahkan sorbitol 5% tetes demi tetes lalu diresuspensi (setiap 1 mL endapan ditambahkan 5 mL sorbitol 5%) . Kemudian dimasukkan ke inkubator CO₂ selama 10 menit dan di sentrifus 7000 rpm selama 10 menit. Setelah itu dibuang supernatan. Endapan ditambahkan 5 mL RPMI, 250 μ L HS. Setelah itu diresuspensi. Hasil dari resuspensi diambil sedikit untuk dibuat apusan dan dimasukkan kedalam tabung epp kemudian disentrifus selama 10 menit dan dibuat apusan. Sisanya

disentrifus selama 10 menit dan dibuang supernatan. Endapan bisa dipakai kembali dan bisa dikultur kembali dengan ditambahkan 8 mL RPMI dan 500 μ L HS.

12. Treatment Uji Invitro antiplasmodium terhadap *Plasmodium falciparum* galur FCR3

Sebanyak 100 μ L medium RPMI yang mengandung *P. falciparum* pada stadium cincin dengan parasitemia 0,5-1% (hematokrit 1%) dimasukkan ke dalam plat 36 sumuran. Selanjutnya sebanyak 100 μ L medium yang mengandung senyawa 1,3,7-Trihidroksi Xanton pada berbagai peringkat konsentrasi ditambahkan pada kultur. Kemudian diinkubasikan selama 72 jam. Pertumbuhan Plasmodium ditentukan berdasarkan nilai parasitemia yang dihitung dengan membuat sediaan apus tipis yang diwarnai dengan Giemsa 5%. Sebagai kontrol digunakan kultur Plasmodium tanpa bahan uji dan dianggap mempunyai pertumbuhan 100%. Aktivitas antiplasmodium dinyatakan sebagai IC_{50} (*Inhibitory Concentration 50%*) yang menyatakan konsentrasi yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan Plasmodium sebesar 50%, dihitung dengan analisis probit.