

## **BAB IV**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **4.1. Alat dan Bahan Penelitian**

##### **4.1.1. Alat Penelitian**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas beker 50 mL, gelas beker 100 mL, gelas beker 250 mL, gelas beker 500 mL, pipet ukur 1 mL, pipet ukur 10 mL, labu ukur 10 mL, labu ukur 250 mL, propipet, pengaduk kaca, sendok sungs, kolom kromatografi, statif dan klem, kaca arloji, pipa kapiler, botol vial 10 mL, neraca analitik, plastic wrap, cetakan kaca 20x20 cm, plat kromatografi lapis tipis (KLT) GF<sub>254</sub>, alat penyemprot, pompa vacuum, rotary evaporator, mikropipet, incubator, microtube, blue tip, yellow tip, white tip, microplate tipe flat, sentrifugator, Elisa reader (*Benchmark*), Fourier Transform Infra Red (FTIR) *UATR Spectrum Two Penkin Elmer*, Liquid Chromatography-Tendem Mass Spectroscopy (LC-MS/MS).

##### **4.1.2. Bahan**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kayu songga (*Strychnos ligustrida*), Etanol 96%, n-heksana, etil asetat, HCl 1 N, aquadest, methanol, silica gel 60 PF<sub>254</sub> Containing Gypsun, pereaksi Dragondraff, pereaksi FeCl<sub>3</sub>, natrium hidroksida (NaOH), hematin, kloroquin, dan asam asetat glasial.

#### **4.2. Prosedur Penelitian**

##### **4.2.1. Pengumpulan Bahan Tanaman**

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kayu songga (*Strychnos ligustrina*) yang berasal dari Bima, Nusa Tenggara Barat. Kayu Songga yang diterima di lokasi penelitian merupakan kayu songga dalam bentuk bongkahan yang kemudian dipisahkan dari kulitnya dan diserbukkan.

##### **4.2.2. Ekstraksi Serbuk Kayu Songga**

Proses penyarian dilakukan pada serbuk kayu songga kering hasil penyerbukan kemudian ditimbang berat total 250 gram, diekstraksi dengan etanol 96% dengan teknik ekstraksi maserasi, dilakukan remeserasi sebanyak 3 kali.

Filtrat yang diperoleh berwarna kecoklatan dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental kayu songga. Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang dan disimpan dalam desikator.

#### **4.2.3. Fraksinasi Ekstrak Etanol Serbuk Kayu Songga**

Ekstrak kental kayu songga difraksinasi menggunakan metode *Vacuum Liquid Chromatography* (VLC). Pelarut yang digunakan dalam proses fraksinasi adalah n-heksana dan etil asetat yang dialirkan secara gradient dari pelarut yang bersifat non polar hingga polar. Fraksinasi dilakukan dengan mengambil ekstrak kental kayu songga 6,5 gram. Ekstrak kental diimpregnasi dengan serbuk silika gel 60 GF<sub>254</sub> dengan perbandingan 1:2 hingga homogen. Ekstrak yang telah diimpregnasi kemudian dimasukkan kedalam kolom yang memiliki diameter 5 cm. Elusi dilakukan dengan menambahkan n-heksana, etil asetat, masing-masing sebanyak 300 mL secara bergantian sehingga diperoleh fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat kayu songga. Fraksi-fraksi yang telah diperoleh kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* yang berfungsi untuk menghilangkan pelarut. Fraksi kental yang diperoleh disimpan dalam desikator.

#### **4.2.4. Pemisahan Senyawa Fraksi Etil Asetat Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)**

Pemisahan senyawa menggunakan KLT preparatif yaitu dengan meneteskan senyawa secara linier pada salah satu sisi plat KLT preparatif, kemudian plat dimasukkan kedalam *chamber* yang sudah berisi eluen berupa campuran etanol : etil asetat (1:5). Lalu dielusi hingga batas atas, plat KLT preparatif dikeluarkan dari *chamber* dan didiamkan selama 10 menit untuk menguapkan eluen, kemudian beberapa spot senyawa dapat diamati menggunakan sinar UV ( $\lambda$ : 256 nm). Pemisahan dilakukan dengan cara diambil menggunakan spatula pada spot yang diinginkan, senyawa hasil yang diperoleh ditambahkan campuran pelarut etanol : etil asetat (1:5) yang berfungsi untuk melarutkan senyawa organik tersebut, kemudian dipisahkan menggunakan kertas saring dan larutan yang diperoleh diuapkan yang berfungsi untuk menghilangkan pelarut, selanjutnya diperoleh senyawa hasil serta ditimbang dan dihitung rendemen.

#### **4.2.5. Uji Golongan Senyawa Hasil KLTP Fraksi Etil Asetat Kayu Songga**

Identifikasi flavonoid dilakukan menggunakan KLT dengan plat KLT sebagai fase diam dan campuran etanol : etil asetat (1:5) sebagai fase gerak. Fase gerak yang digunakan dilakukan optimasi terlebih dahulu untuk menemukan fase gerak yang dapat memisahkan senyawa dengan baik berdasarkan hasil optimal diperoleh perbandingan fase gerak campurannya yaitu etanol : etil asetat (1:5). Isolat hasil KLTP fraksi etil asetat ditotolkan pada plat KLT, dimasukkan dalam bejana kromatografi yang telah jenuh oleh fase gerak, kemudian dielus sampai tanda batas pada fase diam. Noda yang dihasilkan diamati di bawah lampu UV pada 256 nm untuk mengetahui nilai Rf senyawa yang kemudian dibandingkan dengan standar.

Uji golongan senyawa dilakukan dengan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  untuk mengetahui senyawa flavonoid dan pereaksi Dragendroff untuk mengetahui adanya senyawa alkaloid.

#### **4.2.6. Uji Penghambatan Polimerisasi Heme Hasil Fraksi Etil Asetat**

##### **4.2.6.1. Pembuatan Larutan NaOH 0,1 M sebanyak 250 mL**

Kristal NaOH ditimbang sebanyak 1 gram kemudian dilarutkan menggunakan akuades dalam labu ukur 250 mL hingga tanda tera. Maka diperoleh NaOH dengan konsentrasi 0,1 M.

##### **4.2.6.2. Pembuatan Larutan Hematin 1000 $\mu\text{M}$ sebanyak 10 mL dalam Larutan NaOH 0,1 M**

Hematin sebanyak 0,006335 mg ditimbang kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL. Larutan NaOH 0,1 M sebanyak 5 mL ditambahkan untuk melarutkan hematin, NaOH 0,1 M ditambahkan hingga tanda batas labu ukur 10 mL.

##### **4.2.6.3. Pembuatan Kurva Baku Hematin**

###### **a. Pembuatan larutan hematin 125 $\mu\text{M}$**

Sebanyak 50  $\mu\text{L}$  larutan hematin 1000  $\mu\text{M}$  dimasukkan ke dalam tabung mikrotube ukuran 1,5 mL kemudian ditambahkan 350  $\mu\text{L}$  larutan NaOH 0,1 M dan dihomogenkan.

**b. Pembuatan larutan hematin 62,5  $\mu\text{M}$** 

Sebanyak 25  $\mu\text{L}$  larutan hematin 1000  $\mu\text{M}$  dimasukkan ke dalam tabung mikrotube ukuran 1,5 mL kemudian ditambahkan 375  $\mu\text{L}$  larutan NaOH 0,1 M dan dihomogenkan.

**c. Pembuatan larutan hematin 31,25  $\mu\text{M}$** 

Sebanyak 12,5  $\mu\text{L}$  larutan hematin 1000  $\mu\text{M}$  dimasukkan ke dalam tabung mikrotube ukuran 1,5 mL kemudian ditambahkan 387,5  $\mu\text{L}$  larutan NaOH 0,1 M dan dihomogenkan.

**d. Pembuatan larutan hematin 15,6  $\mu\text{M}$** 

Sebanyak 6,25  $\mu\text{L}$  larutan hematin 1000  $\mu\text{M}$  dimasukkan ke dalam tabung mikrotube ukuran 1,5 mL kemudian ditambahkan 393,75  $\mu\text{L}$  larutan NaOH 0,1 M dan dihomogenkan.

**e. Pembuatan larutan hematin 7,8  $\mu\text{M}$** 

Sebanyak 3,125  $\mu\text{L}$  larutan hematin 1000  $\mu\text{M}$  dimasukkan ke dalam tabung mikrotube ukuran 1,5 mL kemudian ditambahkan 396,875  $\mu\text{L}$  larutan NaOH 0,1 M dan dihomogenkan.

**f. Pembuatan larutan hematin 3,9  $\mu\text{M}$** 

Sebanyak 1,5625  $\mu\text{L}$  larutan hematin 1000  $\mu\text{M}$  dimasukkan ke dalam tabung mikrotube ukuran 1,5 mL kemudian ditambahkan 398,4375  $\mu\text{L}$  larutan NaOH 0,1 M dan dihomogenkan.

**4.2.6.4. Pembuatan seri konsentrasi sampel**

- a. Stok larutan sampel dibuat dengan konsentrasi 5 mg/mL sebanyak 1000  $\mu\text{L}$  dengan cara : 5 mg sampel ditimbang dimasukkan dalam tabung mikrosentrifus 1,5 mL, dihomogenkan dengan ditambahkan sebanyak 100  $\mu\text{L}$  DMSO 100%, selanjutnya ditambahkan 900  $\mu\text{L}$  akuades dan homogenkan kembali.
- b. DMSO 10% dibuat dengan cara: 1 mL DMSO 100% dimasukkan dalam labu ukur 10 mL. Akuades ditambahkan hingga tanda batas kemudian dihomogenkan.
- c. Pembuatan konsentrasi larutan sampel 5,00; 2,50; 1,25; 0,625; 0,3125; dan 0,156 mg/mL :

**i. Sampel konsentrasi 5,00 mg/mL**

Larutan sampel dengan konsentrasi 5,00 mg/mL dibuat dengan cara mengambil larutan sebanyak 300  $\mu$ L dari larutan stok sampel.

**ii. Sampel konsentrasi 2,50 mg/mL**

Larutan sampel dengan konsentrasi 2,50 mg/mL dibuat dengan cara mengambil larutan sebanyak 150  $\mu$ L dari larutan stok sampel. Kemudian dimasukkan dalam tabung mikrosentrifus 1,5 mL dan ditambahkan 150  $\mu$ L DMSO 10% kemudian dihomogenkan.

**iii. Sampel konsentrasi 1,25 mg/mL**

Larutan sampel dengan konsentrasi 1,25 mg/mL dibuat dengan cara mengambil larutan sebanyak 75  $\mu$ L dari larutan stok sampel. Kemudian dimasukkan dalam tabung mikrosentrifus 1,5 mL dan ditambahkan 225  $\mu$ L DMSO 10% kemudian dihomogenkan.

**iv. Sampel konsentrasi 0,625 mg/mL**

Larutan sampel dengan konsentrasi 0,625 mg/mL dibuat dengan cara mengambil larutan sebanyak 37,5  $\mu$ L dari larutan stok sampel. Kemudian dimasukkan dalam tabung mikrosentrifus 1,5 mL dan ditambahkan 262,5  $\mu$ L DMSO 10% kemudian dihomogenkan.

**v. Sampel konsentrasi 0,3125 mg/mL**

Larutan sampel dengan konsentrasi 0,3125 mg/mL dibuat dengan cara mengambil larutan sebanyak 18,75  $\mu$ L dari larutan stok sampel. Kemudian dimasukkan dalam tabung mikrosentrifus 1,5 mL dan ditambahkan 281,25  $\mu$ L DMSO 10% kemudian dihomogenkan.

**vi. Sampel konsentrasi 0,156 mg/mL**

Larutan sampel dengan konsentrasi 0,156 mg/mL dibuat dengan cara mengambil larutan sebanyak 9,375  $\mu$ L dari larutan stok sampel. Kemudian dimasukkan dalam tabung microsentrifus 1,5

mL dan ditambahkan 290,63  $\mu$ L DMSO 10 % kemudian dihomogenkan.

#### **4.2.6.5 Pembuatan Seri Konsentrasi Kontrol Positif (Kloroquin)**

##### **a. Pembuatan Larutan Stok Kloroquin 5 mg/mL**

Ditimbang sebanyak 5 mg sampel klorokuin kemudian dimasukkan dalam tabung *microtube* 1,5 mL. Ditambahkan 100  $\mu$ L DMSO 100% dan 900  $\mu$ L akuades kedalam tabung *microtube* kemudian dihomogenkan.

##### **b. Pembuatan Larutan DMSO 10 % dalam Labu Ukur 10 ml**

Sebanyak 1 mL DMSO 100% dimasukkan dalam labu ukur 10 mL kemudian ditambahkan akuades hingga tanda batas miniskus dan dihomogenkan.

##### **c. Pembuatan Konsentrasi Larutan Kontrol Positif 5 mg/mL; 2,5 mg/mL; 1,25 mg/mL; 0,625 mg/mL; dan 0,3125 mg/mL.**

###### **i. Konsentrasi Kloroquin 5 mg/mL**

Larutan sampel dengan konsentrasi 5 mg/mL dibuat dengan cara mengambil larutan sebanyak 300  $\mu$ L dari larutan stok sampel kontrol positif.

###### **ii. Konsentrasi Kloroquin 2,5 mg/mL**

Larutan sampel dengan konsentrasi 2,5 mg/mL dibuat dengan cara mengambil larutan sebanyak 150  $\mu$ L dari larutan stok sampel kontrol positif. Kemudian dimasukkan dalam tabung *mikrotube* 1,5 mL dan ditambahkan 150  $\mu$ L DMSO 10% kemudian dihomogenkan.

###### **iii. Konsentrasi Kloroquin 1,25 mg/mL**

Larutan sampel dengan konsentrasi 1,25 mg/mL dibuat dengan cara mengambil larutan sebanyak 75  $\mu$ L dari larutan stok sampel kontrol positif. Kemudian dimasukkan dalam tabung *microtube* 1,5 mL dan ditambahkan 225  $\mu$ L DMSO 10% kemudian dihomogenkan.

**iv. Konsentrasi Kloroquin 0,625 mg/mL**

Larutan sampel dengan konsentrasi 0,625 mg/mL dibuat dengan cara mengambil larutan sebanyak 37,5  $\mu$ L dari larutan stok sampel kontrol positif. Kemudian dimasukkan dalam tabung *microtube* 1,5 mL dan ditambahkan 262,5  $\mu$ L DMSO 10 % kemudian dihomogenkan.

**v. Konsentrasi Kloroquin 0,3125 mg/mL**

Larutan sampel dengan konsentrasi 0,3125 mg/mL dibuat dengan cara mengambil larutan sebanyak 18,75  $\mu$ L dari larutan stok sampel kontrol positif. Kemudian dimasukkan dalam tabung *microtube* 1,5 mL dan ditambahkan 281,25  $\mu$ L DMSO 10 % kemudian dihomogenkan.

**4.2.7. Uji Penghambatan Polimerisasi Heme**

Uji polimerisasi heme merupakan salah satu metode *in vitro* untuk mengetahui aktivitas antimalaria. Metode ini dilakukan dengan menggunakan metode yang dilakukan oleh Basilico, *et al.*, (1998) dengan modifikasi pada kadar sampel dan kadar hematin yang digunakan. Kelompok uji penghambatan polimerisasi heme dibagi menjadi kelompok kontrol positif yaitu kloroquin, kelompok kontrol negatif yaitu DMSO 10% kelompok perlakuan yaitu ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi etanol serta akuades digunakan sebagai blanko.

Polimerisasi heme dilakukan dengan mengambil 100  $\mu$ L hematin (1000  $\mu$ M) dalam NaOH 0,1 M dimasukkan dalam tabung mikrosentrifus kemudian ditambahkan 50  $\mu$ L bahan uji dengan berbagai tingkat kadar 5,00; 2,50; 1,25; 0,625; 0,3125 mg/mL. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali untuk masing-masing kadar.

Reaksi polimerisasi heme dimulai dengan penambahan 50  $\mu$ L larutan asam asetat glasial pada tabung mikrosentrifus yang sudah berisi hematin dan sampel uji. Hasil pencampuran bahan-bahan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam, setelah inkubasi berakhir tabung mikrosentrifus disentrifus pada 6000 rpm selama 15 menit, dan endapan dicuci sebanyak tiga kali dengan menggunakan DMSO sebanyak 200  $\mu$ L. Endapan yang diperoleh ditambah 200  $\mu$ L NaOH 0,1 M

dan dihomogenkan, setiap 100  $\mu$ L larutan yang diperoleh dimasukkan ke dalam mikroplate dibaca pada *Elisa Reader* pada panjang gelombang 405 nm. Kemudian dihitung  $IC_{50}$  dibandingkan dengan kontrol negatif menggunakan analisis probit yaitu dengan cara menggunakan kurva hubungan antara nilai probit prosentasi penghambatan dengan logaritma kadar dalam persamaan regresi linier.

#### **4.2.8. Karakterisasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dalam Fraksi Etil Asetat.**

Penentuan struktur molekul dilakukan melalui beberapa langkah atau tahap uji spektroskopi untuk mendapatkan data spektra untuk selanjutnya ditentukan struktur molekulnya, langkah-langkah tersebut adalah sebagai berikut :

##### **4.2.8.1. Karakterisasi Senyawa Menggunakan Fourier Transform InfraRed (FTIR) Spectroscopy**

Isolat dari hasil KLTP diambil sedikit untuk diletakkan di bawah kristal yang sebelumnya telah dibilas dengan etanol kemudian dilakukan analisis hingga menghasilkan spektra serapan FTIR yang bertujuan untuk mengetahui gugus fungsi.

##### **4.2.8.2. Karakterisasi Senyawa Menggunakan *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectroscopy* (LC-MS/MS)**

Isolat dari hasil KLTP dikarakterisasi dengan LC-MS/MS. LC-MS/MS Xevo G2-XS QToF digunakan untuk menentukan sidik jari LC-MS/MS dan berat molekul. LC terhubung ke spectrometer massa QTOF yang digabungkan ke ESI. MS yang digunakan adalah Xevo G2-XS QToF dengan mode ionisasi positif. Parameter ESI menggunakan suhu 120 °C, alat penyemprot gas 50 L/jam, dan sumber tegangan 30 V. Pelarut A adalah 0,1% Asam Format dalam Akuadest; pelarut B adalah Asetonitril dan 0,1 Asam Format. Tujuan karakterisasi ini untuk mengetahui senyawa flavonoid yang terkandung dalam fraksi etil asetat, berat molekul, dan hasil fragmentasi senyawa.