

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Ekstraksi Serbuk Kayu Songga

Ekstraksi serbuk kayu songga dilakukan dengan menggunakan metode maserasi yaitu ekstraksi dengan metode perendaman. Pelarut yang digunakan pada proses maserasi ini adalah etanol 96% karena etanol merupakan pelarut universal yang dapat menarik senyawa yang diinginkan. Metode maserasi disini dilakukan selama 1 hari yang kemudian divakum dan dilakukan remaserasi. Remaserasi yaitu pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya (Ditjen POM, 2000), remaserasi disini dilakukan sebanyak 3 kali. Proses remaserasi dapat dihentikan ketika hasil maserat yang didapat mulai jernih, karena pada proses tersebut umumnya sampel/senyawa yang diinginkan telah terekstrak seluruhnya.

Maserat yang diperoleh dari hasil maserasi dilakukan penguapan pelarut dengan menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian disimpan dalam desikator. Ekstrak kental yang diperoleh pada penelitian ini sebanyak 31 gram. Rendemen ekstrak batang kayu songga yang diperoleh adalah 12,4%.



Gambar 9. Ekstrak Kental Kayu Songga

5.2. Hasil Fraksinasi Ekstrak Etanol Kayu Songga

Fraksinasi adalah proses pemisahan senyawa berdasarkan tingkat kepolarannya. Metode yang digunakan untuk fraksinasi adalah metode VLC menggunakan fase diam serbuk silica gel 60 GF₂₅₄ dan 2 jenis pelarut yang berbeda kepolarannya yaitu n-heksana dan etil asetat. Kolom yang digunakan dilengkapi dengan pipa gelas, kran dan penyaring di dalamnya. Ukuran tinggi fase diam yang digunakan berukuran 3 cm dengan diameter kolom berukuran 4 cm. Tinggi silica dan diameter kolom yang digunakan berpengaruh terhadap pemisahan senyawa yaitu semakin tinggi silica maka pemisahannya semakin bagus tetapi membutuhkan waktu yang lebih lama.

Ekstrak kental kayu songga sebanyak 6,5 gram kemudian dimasukkan untuk VLC. Elusi dilakukan dengan cara mengalirkan beberapa pelarut, dimulai dari pelarut n-heksana, kemudian etil asetat hingga terjadi pemisahan sempurna. Fraksi etil asetat yang diperoleh menunjukkan adanya pemisahan senyawa secara visual warna pelarut dari tidak berwarna menjadi berwarna hijau muda. Pada saat pengaliran pelarut menggunakan pelarut non polar n-heksana eluan dari fraksi yang dihasilkan tidak berwarna hal ini dikarenakan kemungkinan senyawa dalam ekstrak etanol batang kayu songga tidak ada ataupun hanya sedikit jumlahnya yang dapat tertarik oleh pelarut n-heksana. Dari hasil fraksinasi diperoleh fraksi etil asetat sebanyak 0,3325 gram, dengan rendemen sebesar 5,12% dari 6,5 gram ekstrak kental yang diperoleh.

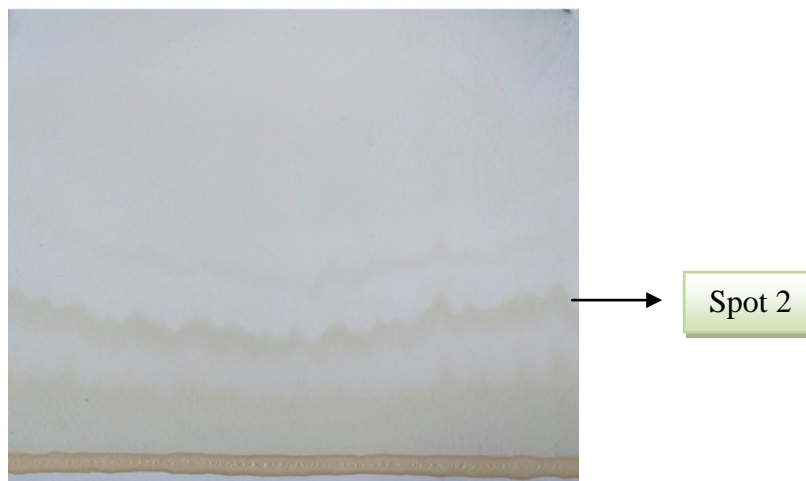
Prinsip dari fraksinasi yaitu *like dissolve like*, dimana senyawa akan mudah larut dalam pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang sama, maka dari hasil rendemen fraksi etil asetat yang bersifat semi polar tersebut mendapatkan hasil yang kecil.

5.3. Hasil Pemisahan Senyawa Fraksi Etil Asetat Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Untuk mendapatkan senyawa flavonoid yang diinginkan, maka perlu dilakukan pemisahan senyawa dari campurannya. Beberapa metode pemisahan seperti Kromatografi Kolom dan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP),

dapat digunakan dalam penelitian ini. Penelitian ini digunakan metode Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) untuk mendapatkan target senyawa flavonoid.

Pemisahan senyawa menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) bertujuan untuk memisahkan senyawa dan mengambil senyawa tunggal pada fraksi etil asetat, pelarut yang dipilih yaitu campuran etil asetat : etanol (5:1) karena pelarut tersebut cocok sebagai fasa gerak sehingga dapat menurunkan senyawa murni yang diinginkan. Prinsip dari KLTP sama dengan Kromatografi Lapis Tipis yaitu pemisahan senyawa berdasarkan pada perbedaan kepolaran senyawa terhadap fasa gerak dan fasa diamnya. Pada KLTP fasa diam yang digunakan yaitu silika gel PF₂₅₄ pada plat kaca ukuran 20 cm x 20 cm sedangkan fasa geraknya berupa campuran pelarut etanol : etil asetat dengan perbandingan (1:5). Hasil dari pemisahan senyawa fraksi etil asetat menggunakan KLTP ditunjukkan pada gambar 10 berikut ini.



Gambar 10. Hasil Pemisahan Senyawa Fraksi Etil Asetat Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Dari gambar tersebut, terlihat 4 noda dengan noda ke dua dari bawah merupakan senyawa target. Pemisahan dilakukan dengan cara diambil menggunakan spatula kemudian dilarutkan dengan campuran pelarut etanol : etil asetat (1:5) dan disaring. Hasil penelitian diperoleh senyawa target 20 mg dari sampel sebanyak 2000 mg dan diperoleh persentase rendemen sebesar 1%.

5.4. Hasil Uji Golongan Senyawa Hasil KLTP Fraksi Etil Asetat Kayu Songga

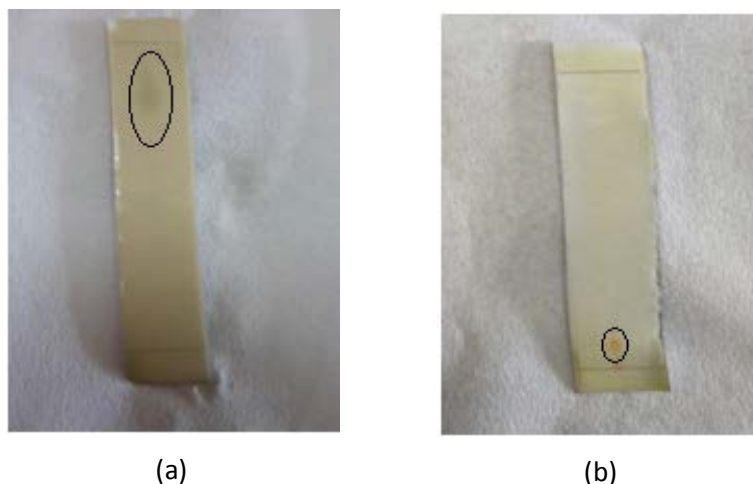
Uji kualitatif senyawa golongan dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) terhadap fraksi etil asetat bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa yang berada di dalam fraksi etil asetat batang kayu songga yang berperan sebagai antimalaria. KLT dilakukan dengan menggunakan fase diam plat silika gel dan fase gerak campuran etanol : etil asetat dengan perbandingan (1:5) v/v dengan sampel yang digunakan merupakan hasil dari pemurnian Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP). Pengamatan bercak sebelum disemprot dilakukan di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm. Pengamatan perubahan spot setelah disemprot menggunakan pereaksi FeCl_3 dan *dragondraff* dilihat pada cahaya tampak. Data hasil identifikasi golongan senyawa fraksi etil asetat hasil pemurnian KLTP dapat dilihat pada tabel 2 berikut ini.

Tabel 4. Data Hasil Identifikasi Golongan Senyawa Spot 2 Fraksi Etil Asetat Hasil KLTP.

Pereaksi	Golongan Senyawa	Hasil
FeCl_3	Flavonoid	(+)
<i>Dragendorff</i>	Alkaloid	(+)

Keterangan : (+) positif mengandung senyawa tersebut

Pada tabel 4 menunjukkan bahwa dalam noda kedua hasil pemurnian dengan KLTP, positif mengandung flavonoid dan alkaloid. Hasil ini diperoleh setelah dilakukan penyemprotan menggunakan pereaksi FeCl_3 dan *dragondraff*. Hasil penyemprotan dapat dilihat pada gambar 11 berikut ini.



Gambar 11. a. Plat KLT Setelah Disemprot Pereaksi FeCl_3 dan
b. Setelah Disemprot *Dragendroff*

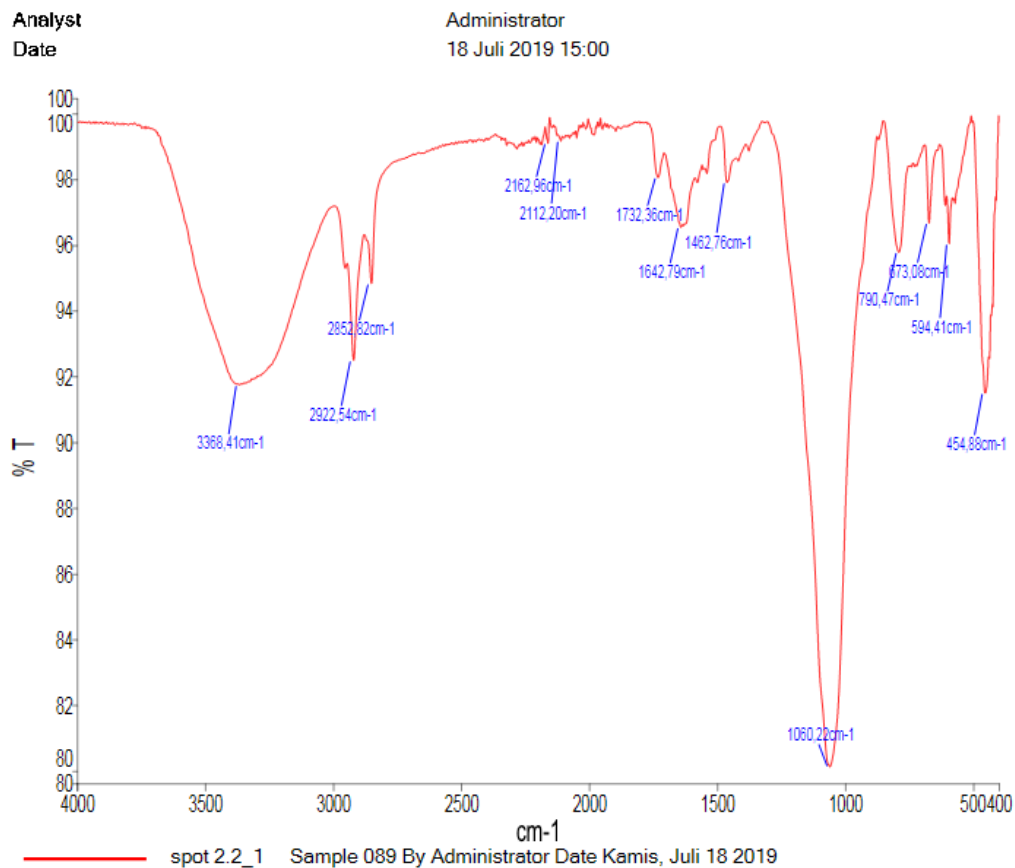
Pada gambar 11 menunjukkan bahwa didalam spot kedua fraksi etil asetat positif mengandung senyawa golongan flavonoid dan alkaloid. Senyawa flavonoid pada fraksi etil asetat batang kayu songga dinyatakan positif dengan munculnya spot berwarna hijau gelap hingga ungu dengan bercak jingga setelah disemprot menggunakan pereaksi FeCl_3 . Dari hasil identifikasi senyawa golongan dapat disimpulkan bahwa senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat kayu songga hasil pemisahan noda kedua menggunakan KLTP mengandung senyawa flavonoid. Persamaan reaksi yang terbentuk adalah sebagai berikut :



5.5. Karakterisasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dalam Fraksi Etil Asetat

5.5.1 Karakterisasi Senyawa menggunakan *Fourier Transform InfraRed (FTIR) Spectroscopy*

Identifikasi senyawa menggunakan spektroskopi inframerah bertujuan untuk menentukan gugus fungsi yang terdapat pada senyawa hasil isolasi yang memberikan pita serapan pada rentang bilangan gelombang $4000 \text{ cm}^{-1} - 400 \text{ cm}^{-1}$. Hasil spectra IR senyawa flavonoid ditunjukkan pada gambar 12 berikut ini.



Gambar 12. Spektum IR Hasil KLTP Fraksi Etil Asetat

Berdasarkan gambar tersebut menunjukkan bahwa spot kedua fraksi etil asetat kayu songga yang mengandung senyawa flavonoid hasil pemisahan menunjukkan adanya gugus OH pada bilangan gelombang $3368,41\text{ cm}^{-1}$, gugus C-H alifatik pada bilangan gelombang $2922,54\text{ cm}^{-1}$, adanya gugus C=C aromatik pada bilangan gelombang $1462,76\text{ cm}^{-1}$ dan $1642,79\text{ cm}^{-1}$. Pada bilangan gelombang $1732,66\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus C=O dan menunjukkan serapan gugus C-O pada bilangan gelombang $1060,22\text{ cm}^{-1}$. Adanya gugus fungsi OH, CH alifatik, C=C aromatik, C=O, dan C-O mengidentifikasi bahwa isolate ini mengandung senyawa flavanoid. Hal ini diperkuat berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh (Akbar, 2010) sesuai dengan hasil spectrum infra merah adanya gugus fungsi O-H, C=O, C-O, C=C aromatik, dan C-H alifatik yang mendukung bahwa isolatnya positif suatu senyawa flavonoid.

4.2.1.1. Karakterisasi Senyawa menggunakan *Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectroscopy* (LC-MS/MS)

Identifikasi senyawa menggunakan *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectroscopy* (LC-MS/MS) dilakukan untuk membandingkan hasil skrining fitokimia secara kualitatif dengan hasil uji kuantitatif yang menggunakan LC-MS/MS. Hasil analisis tersebut menunjukkan 5 senyawa yang teridentifikasi dalam spot 2 fraksi etil asetat kayu songga (*Strychnos ligustrida*) yang ditunjukkan pada tabel 5. Senyawa tersebut antara lain Isomaltose, Meliadoside A, Secoxiloganin, Kaempferol-3,7-diglucoside, dan Candidate Mass $C_{13}H_{23}NO_2$.

Pada hasil kromatogram dapat di analisis senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak kayu songga fraksi etil asetat pada spot 2 yaitu Kaempferol-3,7-diglucoside yang muncul pada waktu retensi 10,55 menit dengan luas area sebesar 33510. Senyawa flavonoid ini merupakan golongan senyawa fenolik yang diidentifikasi dari BM yang terbaca pada MS yaitu sebesar 633,1498 dengan BM senyawa Kaempferol-3,7-diglukosida pada literatur sebesar 610,5 g/mol yang ditunjukkan pada tabel 5. Perbedaan BM antara hasil dengan literatur dikarenakan adanya serapan ion Na^+ yang ikut terbaca dalam pengujian, seperti yang diketahui bahwa ion Na^+ ini berasal dari solvent yang digunakan dalam pengujian LC-MS/MS. Telah dilaporkan potensi anti oksidan terkait dengan aktivitas antimalaria di beberapa ekstrak tanaman. Selain itu flavonoid, quercetin, dan kaempferol telah dilaporkan memiliki aktivitas antimalaria ampuh melawan *P.berghei* (Sannella AR1 *et al.*, 2007; Berliana MI *et al.*, 2014; dan Berdella N *et al.*, 2011). Berdasarkan penelitian tersebut memperkuat bahwa senyawa kaempferol-3,7-diglukosida yang merupakan flavonoid yang terkandung dalam kayu songga memiliki aktivitas antimalaria.

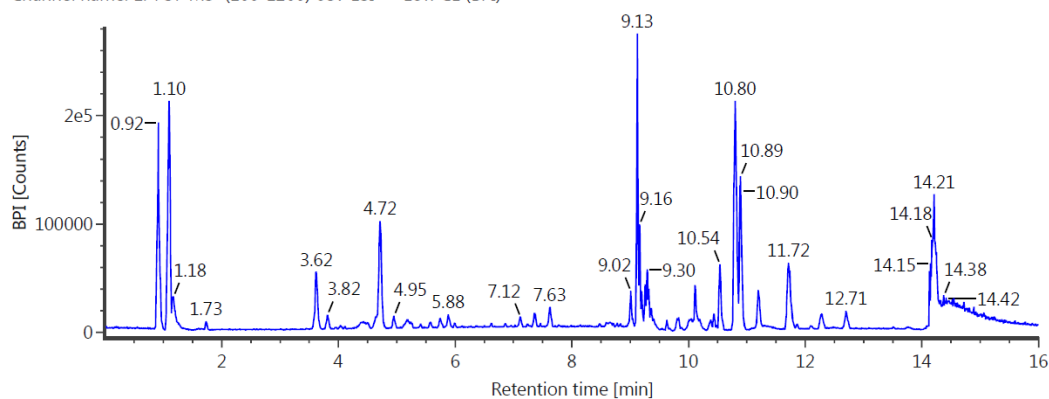
Tabel 5. Komponen Fitokimia yang Teridentifikasi Pada Fraksi Etil Asetat Kayu Songga (*Strychnos ligustrida*) dengan Analisis LC-MS/MS

No	Observed RT (min)	Nama Senyawa	Rumus Kimia	Observed m/z	Neutral mass (Da)	Adducts	Detector counts
1	1,10	Isomaltose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	365,1050	342,11721	+Na	275331
2	3,36	Meliadanoside A	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	399,1255	376,13695	+Na	41396
3	4,72	Secoxyloganin	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	427,1207	404,13186	+Na	86546
4	7,63	Candidate Mass C ₁₃ H ₂₃ NO ₂	C ₁₃ H ₂₃ NO ₂ 2	226,1797	225,17288	+H	55730
5	10,55	Kaempferol-3,7-diglucoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	633,1498	610,15338	+Na	335130

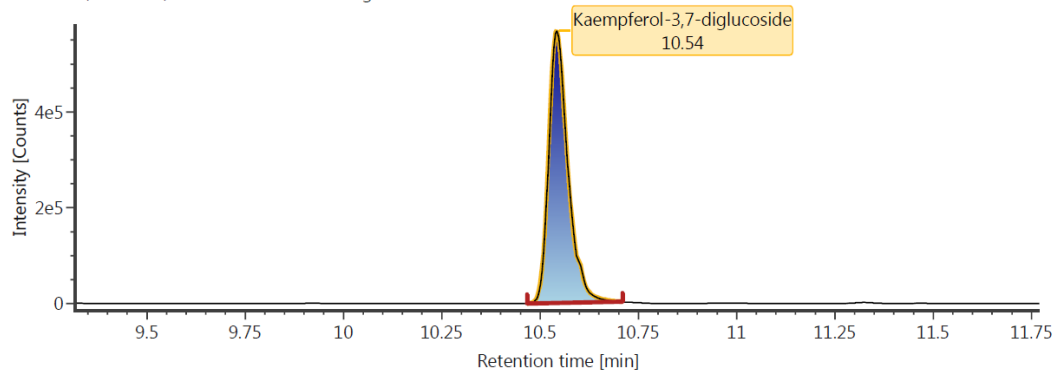
Terdapat perbedaan hasil kandungan senyawa metabolit sekunder dari spot kedua fraksi etil asetat yang diuji dengan skrining fitokimia dengan analisis *Liquid Chromatography-Tendem Mass Spectroscopy* (LC-MS/MS). Hal ini dapat disebabkan karena dalam uji LC-MS/MS hanya dianalisis beberapa senyawa, sehingga dimungkinkan masih ada senyawa-senyawa lain yang tidak terdeteksi. Dari hal tersebut memungkinkan senyawa alkaloid yang terdeteksi pada uji KLT tidak teridentifikasi dalam uji LC-MS/MS.

Item name: 190809-2106

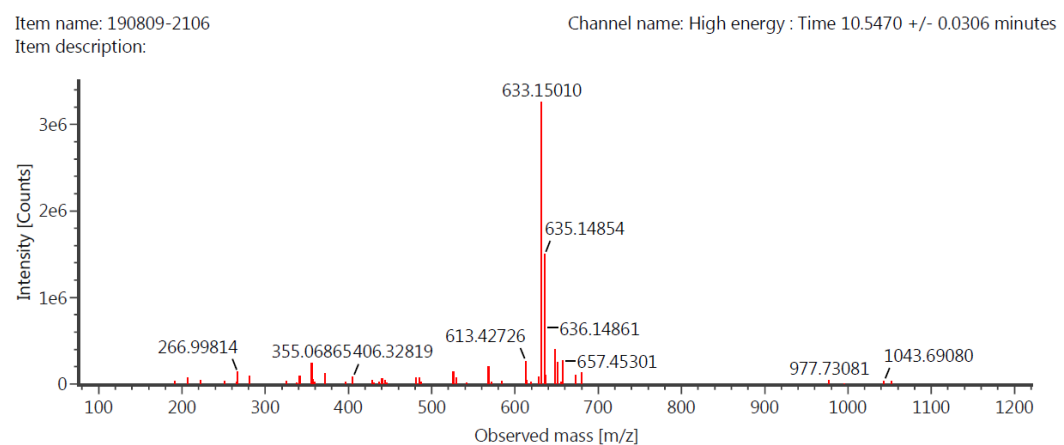
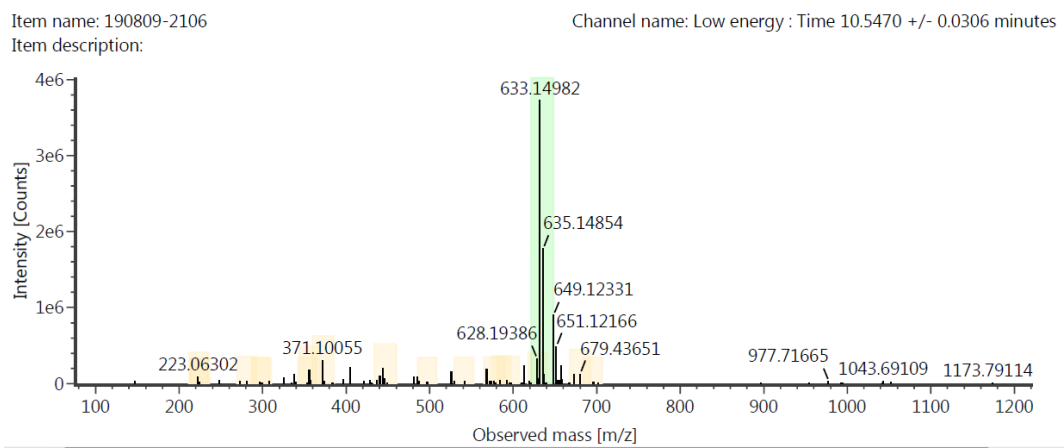
Channel name: 1: TOF MS^E (100-1200) 6eV ESI+ - Low CE (BPI)



Gambar 13. Kromatogram LC-MS/MS Spot 2 Fraksi Etil Asetat Kayu Songga *Strychnos ligustrida*.



Gambar 14. Kromatogram Senyawa Kaempferol-3,7-diglukosida.



Gambar 15. Tandem Mass Spectroscopy (MS/MS) Senyawa Kaempferol-3,7-diglukosida.

5.6. Hasil Uji Penghambatan Polimerisasi Heme Hasil KLTP Fraksi Etil Asetat

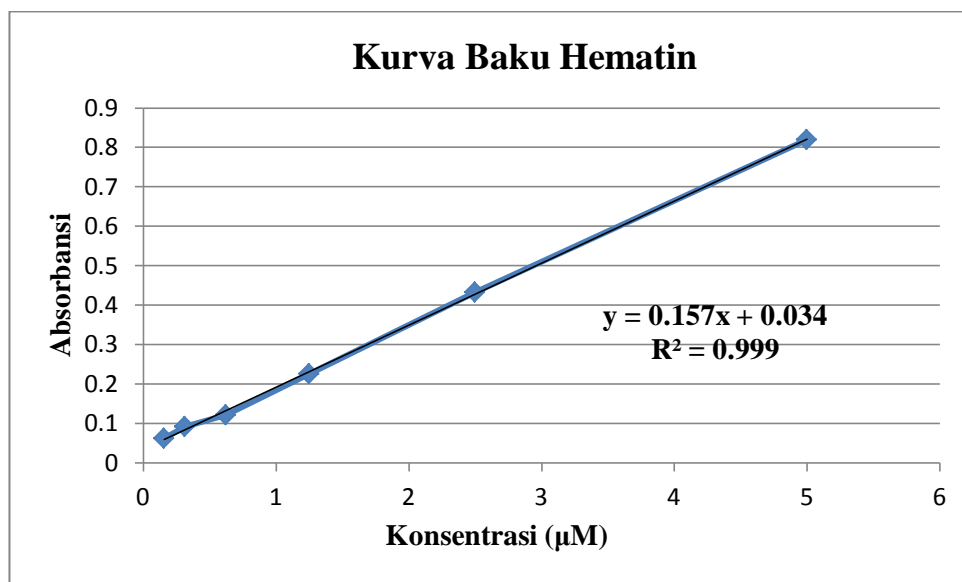
Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas penghambatan polimerisasi heme secara *in vitro* dengan mengembangkan metode yang digunakan oleh *Basilico et al.* (2015) dengan modifikasi kadar larutan hematin dan kadar sampel uji.

Sampel yang akan diuji dibagi menjadi enam kadar yaitu 5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,625 mg/mL, 0,3125 mg/mL, dan 0,15625 mg/mL. Kemudian dilakukan replikasi sebanyak 3 kali pada masing-masing kadar. Selanjutnya dilakukan polimerisasi heme dengan menambahkan asam asetat glasial sebagai pengatur tingkat keasaman pada reaksi polimerisasi hematin yang akan diubah menjadi hemozoin. Dalam suasana asam ini juga digunakan untuk menyamakan kondisi uji dengan kondisi asam dalam vakuola. Kemudian sampel uji diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37

□C karena pada

tersebut β -hematin terbentuk secara optimal (*Basilico et al.*, 1998). Setrifugasi larutan dilakukan dengan menggunakan sentrifugator pada kecepatan 6000 rpm selama 15 menit berfungsi untuk memisahkan kristal β -hematin sehingga kristal akan berada dibagian bawah karena memiliki berat molekul yang lebih besar dibanding hematin. Kristal β -hematin yang terbentuk dilakukan pencucian dengan menggunakan DMSO 100% berfungsi untuk mencuci hematin yang terdapat dalam β -hematin. Proses pencucian ini sangat berpengaruh terhadap serapan yang dibaca pada *Elisa reader*. Kristal β -hematin yang terbentuk dilarutkan dalam NaOH 0,1 M hingga larut dan di baca serapannya menggunakan *Elisa reader* pada panjang gelombang 405 nm.

Uji aktivitas antimalaria diawali dengan menentukan kadar β -hematin yang terbentuk dengan kurva baku hematin yang dibaca absorbansinya menggunakan *Elisa reader* pada panjang gelombang 405 nm. Kurva baku hematin ditunjukkan pada gambar 16 berikut ini.



Gambar 16. Kurva Baku Hematin

Pada gambar 16 menunjukkan persamaan kurva baku hematin yang diperoleh yaitu $y = 0,157x + 0,034$ dengan nilai koefisien relasi kuadrat (R^2) yang diperoleh sebesar 0,999. Penentuan kadar β -hematin dilakukan dengan cara memasukkan nilai absorbansi yang diperoleh dengan nilai y pada persamaan linier kurva baku hematin sehingga diperoleh nilai x sebagai β -hematin.

Pada penelitian ini kontrol positif yang digunakan yaitu kloroquine karena kloroquine merupakan obat yang memiliki aktivitas sebagai antimalaria. Penambahan spot kedua sebagai senyawa uji dalam uji penghambatan polimerisasi heme digunakan untuk menghambat pembentukan β -hematin. Kadar β -hematin yang diperoleh berbanding terbalik dengan besarnya konsentrasi yang digunakan. Semakin rendah konsentrasi sampel maka semakin tinggi kadar β -hematin. Kadar β -hematin yang diperoleh kemudian digunakan untuk menentukan nilai presentase penghambatan polimerisasi heme. Hasil dari pengukuran absorbansi β -hematin setelah penambahan senyawa uji ditunjukkan pada tabel 6.

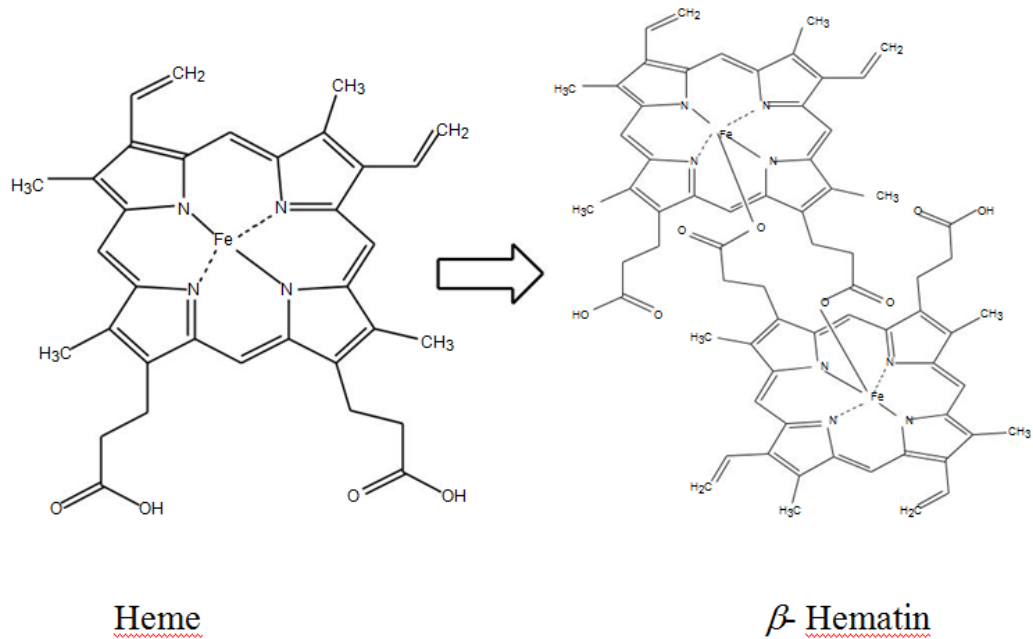
Semakin sedikit β -hematin yang terbentuk maka serapan hematin yang terbaca semakin kecil serapannya dan memiliki nilai IC_{50} kecil. IC_{50} adalah konsentrasi suatu zat yang dapat memberikan penghambatan 50% pada bahan uji. Nilai IC_{50} yang rendah menunjukkan aktivitas penghambatan yang tinggi.

Tabel 6. Hasil Uji Polimerisasi Heme

Bahan Uji	Konsentrasi mg/mL	Rerata Absorbansi	% inhibisi (%)	SD	IC ₅₀ (mg/mL)
Spot 2	5,00	0,081	83,54	1,567	0,002
	2,50	0,084	83,61	1,935	
	1,25	0,088	80,30	0,401	
	0,625	0,095	78,79	3,316	
	0,3125	0,099	77,40	4,009	
	0,15625	0,124	68,59	4,014	
Kloroquine	5,00	0,106	74,73	11,499	1,584
	2,50	0,156	57,47	3,154	
	1,25	0,203	41,01	4,629	
	0,625	0,247	25,84	8,630	
	0,3125	0,233	30,82	4,214	

Tabel 6 menunjukkan nilai IC₅₀ spot 2 dan kloroquin hasil uji polimerisasi heme yang telah dilakukan replikasi sebanyak 3 kali pada masing-masing kadar. Pada hasil KLTP spot 2 fraksi etil asetat diperoleh IC₅₀ sebesar 0,002 mg/mL, dan nilai IC₅₀ kloroquin sebesar 1,584 mg/mL. Data keseluruhan hasil uji polimerisasi heme dapat dilihat pada lampiran 7.

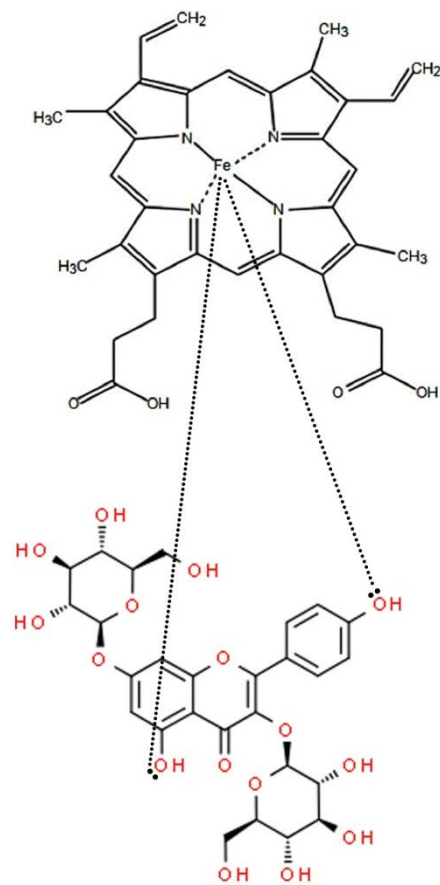
Pada penelitian ini klorokuin digunakan sebagai kontrol positif, karena klorokuin dapat menghambat terbentuknya hemozoin. Senyawa uji yang memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi heme dibandingkan dengan kontrol positif (klorokuin). Senyawa uji memiliki IC₅₀ 0,002 mg/mL lebih kecil dibandingkan IC₅₀ klorokuin maka dapat dikatakan bahwa spot 2 fraksi etil asetat tersebut memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi heme. Semakin rendah nilai IC₅₀ maka semakin tinggi aktivitas penghambatan polimerisasi heme. Struktur heme dan β -hematin ditunjukkan oleh gambar 17 berikut ini.



Gambar 17. Struktur Heme dan β - Hematin

Senyawa β -Hematin merupakan suatu kristal heme sintesis mempunyai struktur kimiawi yang sama dengan hemozoin, begitupun hematin memiliki kemiripan struktur dengan heme.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Basilico *et al.* (1998) penghambatan polimerisasi heme dapat terjadi jika adanya interaksi antara senyawa fenol dengan system elektronik hem. Mekanisme kerja fraksi etil asetat batang kayu songga yang di duga berperan dalam penghambatan polimerisasi heme yaitu dengan adanya interaksi senyawa Kaempferol-3,7-diglukosida yang merupakan flavonoid yang terkandung dalam batang kayu songga dengan sistem elektronik hem, yaitu interaksi antara gugus hidroksil yang terdapat pada senyawa Kaempferol-3,7-diglukosida yang berikatan dengan ion feri pada hematin. Berikut mekanisme aksi heme dengan senyawa Kaempferol-3,7-diglukosida akan ditunjukkan pada gambar 18 berikut ini.



Gambar 18. Interaksi Antara Heme dengan Senyawa Kaempferol-3,7-diglukosida.