

BAB III.

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama lima bulan, dimulai dari bulan Februari 2025 sampai Juni 2025. Tahap isolasi dilakukan di Laboratorium Riset Kimia, FPMIPA, Universitas Pendidikan Indonesia, sedangkan tahap karakterisasinya dilaksanakan di Institut Teknologi Bandung.

3.2. Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1. Alat

Alat yang digunakan pada tahap isolasi dan karakterisasi untuk penelitian ini adalah gelas ukur, gelas kimia, pipet tetes, pengaduk kaca, spatula, pipa kapiler, pinset, dan botol vial, seperangkat alat kromatografi cair vakum (KCV) dengan kolom berdiameter 10 cm dan 7 cm, *rotary evaporator*, seperangkat alat kromatografi kolom gravitasi (KKG), *chamber* kromatografi lapis tipis (KLT), neraca analitik, lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, dan NMR.

Alat yang digunakan pada tahap molecular *docking* adalah perangkat keras berupa seperangkat laptop dengan spesifikasi Intel Core i5-HD Graphics 620 dan RAM 8 GB. Perangkat lunak yang digunakan adalah aplikasi Discovery Studio Visualizer (BIOVIA) 2021, AutoDock Tools, dan ChemDraw.

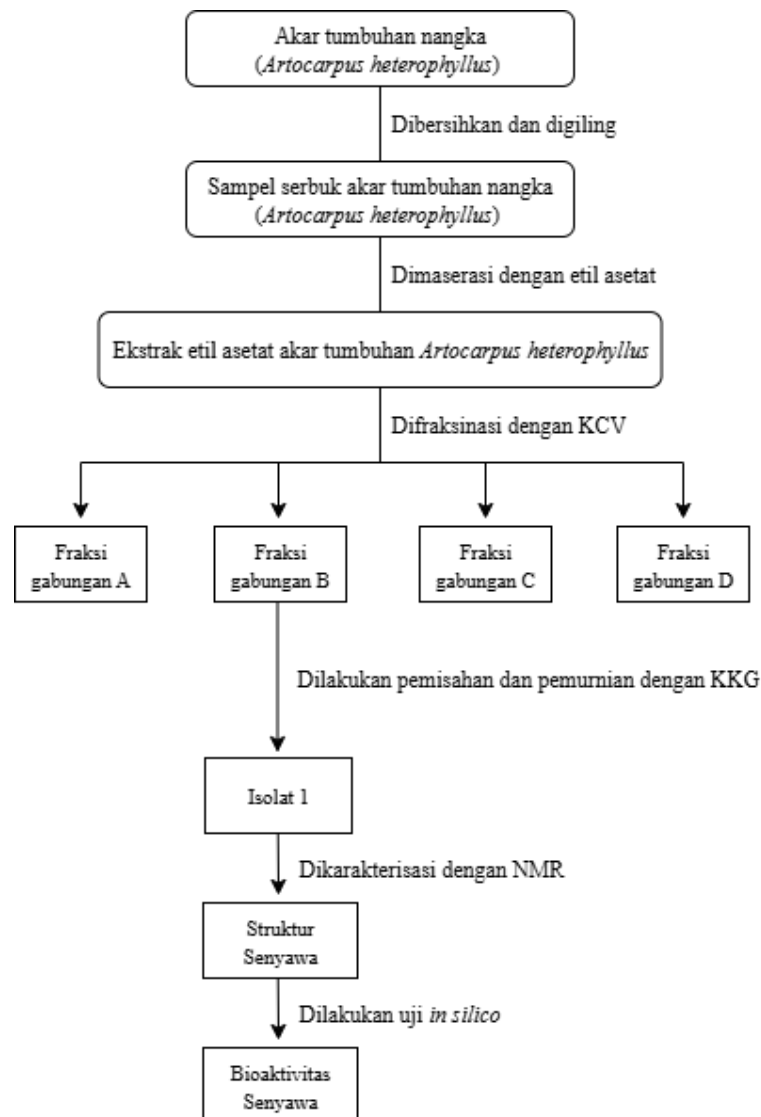
3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah akar tumbuhan nangka (*Artocarpus heterophyllus*), silika gel 60 G untuk KCV, silika gel 60 (70-230 mesh) untuk KKG dan impregnasi, plat KLT 20 x 20 cm, kertas saring,

aluminium foil, *plastic wrap*, pelarut teknis *n*-heksana (C₆H₁₂), etil asetat (EtOAc), kloroform, aseton, dan metanol (MeOH).

3.3. Prosedur Penelitian

Tahap ekstraksi, pemurnian, dan karakterisasi secara singkat ditunjukkan dengan diagram alir pada Gambar 3.1. di bawah ini:



Gambar 3.1. Diagram alir penelitian

3.3.1. Ekstraksi

Sebanyak 600 gram sampel akar tumbuhan *Artocarpus heterophyllus* yang sudah halus dimaserasi dengan 2,5 liter etil asetat selama 1×24 jam. Hasil ekstrak disaring, kemudian dimonitoring dengan KLT, dan dipekatkan menggunakan alat *rotary evaporator*.

3.3.2. Isolasi

Ekstrak pekat yang dihasilkan kemudian difraksinasi dengan metode Kromatografi Cair Vakum (KCV). Proses fraksinasi KCV diawali dengan menggunakan eluen *n*-heksana 100%, *n*-heksana : etil asetat yang ditingkatkan kepolarannya (9:1, 8:2, dan 7:3), etil asetat 100%, dan metanol masing-masing sebanyak 100 mL. Hasil dari proses KCV dimonitoring dengan KLT menggunakan eluen *n*-heksana:etil asetat (9:1) untuk fraksi 1-9 dan *n*-heksana : etil asetat (6:4) untuk fraksi 9-18. Fraksi-fraksi tersebut kemudian digabungkan berdasarkan kemiripan profil noda senyawa.

Tahapan fraksinasi menghasilkan 4 fraksi gabungan yaitu fraksi A, B, C, dan D yang kemudian masing-masing dipekatkan dengan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak pekat. Fraksi B dilakukan pemisahan dengan KKG menggunakan eluen *n*-heksana:etil asetat (8,5:1,5). Hasil pemisahan dengan KKG ditampung dan dimonitoring dengan KLT, kemudian dikelompokkan berdasarkan kemiripan profil noda senyawanya. Pada tahapan pemisahan ini didapatkan 62 fraksi yang kemudian digabung menjadi 4 fraksi gabungan, yaitu B1, B2, B3, dan B4. Fraksi gabungan B3 kemudian dicuci menggunakan *n*-heksana dan dilarutkan kembali dengan aseton untuk memperoleh isolat 1 (B3) ketika sudah kering.

3.4. Karakterisasi Struktur Senyawa

3.4.1. Spektrofotometer NMR

Padatan isolat 1 sebanyak $\pm 15,00$ mg dilarutkan dalam pelarut aseton. Larutan sampel dimasukkan ke dalam tabung injeksi kemudian dianalisis menggunakan instrumen NMR (500 MHz untuk ^1H -NMR).

3.5. Studi Molekular *Docking*

Makromolekul yang merupakan reseptor enzim asetilkolinesterase dan ligan yang merupakan senyawa donepezil dengan kode akses pdb 4EY7 dipersiapkan dengan mengunduh berkas dalam bentuk PDB dari situs RCSB PDB. Makromolekul dioptimasi menggunakan perangkat lunak Discovery Studio Visualizer (BIOVIA) untuk menghilangkan kandungan air dan ligan lainnya. Sebaliknya, ligan dioptimasi untuk menghilangkan kandungan air dan proteinnya. Kedua berkas tersebut disimpan dalam bentuk .pdb dan disimpan di dalam satu folder yang sama.

Docking makromolekul (reseptor) dan ligan dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak AutoDock Tools untuk mengetahui interaksi molekuler antara ligan dengan makromolekul. Proses *docking* terdiri dari beberapa tahap, yaitu perubahan berkas ligan dan reseptor protein dari bentuk PDB menjadi PDBQT, running *grid box* dengan mengunduh berkas dalam bentuk GPF, running hasil AutoDock dengan *command prompt*, dan analisis hasil docking. Tahapan-tahapan tersebut juga dilakukan untuk *redocking* dengan mengganti ligan lainnya, dari senyawa donepezil menjadi senyawa isolat 1.