

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada awal bulan Februari 2025 hingga akhir bulan Juli 2025. Adapun lokasi pelaksanaan penelitian isolasi dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Hayati Program Studi Kimia, FPMIPA, Universitas Pendidikan Indonesia. Sedangkan untuk karakterisasi senyawa murni dilakukan di Institut Teknologi Bandung.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi neraca analitik, corong kaca, corong Buchner, labu erlenmeyer, labu dasar bulat, pipa kapiler, pipet tetes, batang pengaduk, spatula, botol vial kaca, gelas ukur, chamber kromatografi lapis tipis, pinset, set *rotary vacuum evaporator*, set Kromatografi Cair Vakum (KCV) dengan kolom berdiameter 7 cm dan 3 cm, set Kolom Kromatografi Gravitasi (KKG) dengan kolom berdiameter 3 cm, set alat kromatografi radial, lampu ultraviolet (UV) 254 nm dan 366 nm, spektrofotometer UV-Vis, spektrofotometer *Fourier Transform InfraRed* (FTIR), dan spektrofotometer *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR). Perangkat yang digunakan untuk pengujian secara *in silico* diantaranya perangkat keras laptop spesifikasi prosesor Intel i5-13420H 2.10GHz dengan kartu grafis Nvidia GeForce RTX 2050 4GB dan perangkat lunak yang digunakan untuk uji *in silico* meliputi ChemDraw Ultra 12.0, Biova v.21, AutoDockTools 1.5.7, dan Command Prompt (Windows 11).

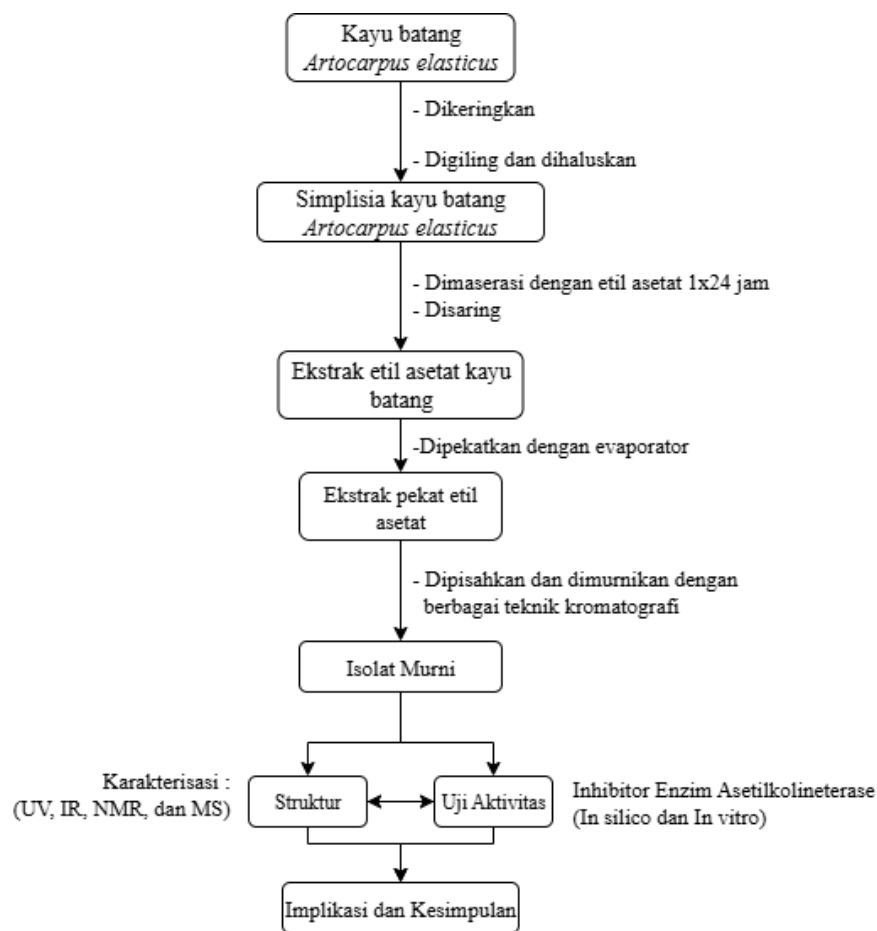
3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kayu batang *Artocarpus elasticus* asal Bandung, Jawa Barat, yang dideterminasi di Institut Teknologi Bandung (ITB). Bahan-bahan kimia yang diperlukan diantaranya adalah pelarut metanol teknis dan pro analis, etil asetat teknis, kloroform pro analis, *n*-heksana teknis, aseton teknis, aquades, kertas saring, silika gel 60 dengan ukuran 70-230

mesh untuk KCV, dan plat silika 60 F₂₅₄ untuk uji KLT. Struktur ligan dan enzim asetilkolinesterase (AChE) uji in silico didapat dari protein data bank (rcsb.org).

3.3 Alur Penelitian

Alur penelitian dapat dilihat pada bagan alir penelitian yang ditunjukkan pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1 Bagan alir penelitian

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Preparasi Sampel

Kayu batang *Artocarpus elasticus* yang digunakan pada penelitian ini berasal dari Bandung, Jawa Barat. Bagian yang digunakan berupa ranting pohon, kemudian dipisahkan antara kulit dengan kayu batang. Kayu batang dipotong-potong kecil dan dikeringkan dengan diangin-anginkan dan tidak terkena sinar matahari.

Didapatkan kayu batang kering sebanyak 3,2 kg, kayu batang kering kemudian digiling menjadi simplisia yang siap untuk diekstraksi.

3.4.2 Ekstraksi dan Fraksinasi

Simplisia sebanyak 1,5 kg kemudian dimaserasi menggunakan etil asetat selama 1x24 jam. Ekstrak etil asetat yang didapat dilakukan penyaringan dengan kertas saring menggunakan corong buchner, kemudian dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator*. Ekstrak etil asetat pekat yang didapat selanjutnya ditimbang untuk mendapatkan massa total hasil ekstrak.

Ekstrak kental etil asetat yang didapat, sebelum berlanjut ke proses pemisahan dan pemurnian selanjutnya, terlebih dahulu dilakukan uji kromatografi lapis tipis (KLT) untuk mendapatkan eluen yang sesuai dan pemisahan senyawa dengan baik.

3.4.3 Pemisahan dan Pemurnian

Pemisahan merupakan proses memisahkan dua atau lebih senyawa yang saling bercampur. Sebanyak 10 gram ekstrak kental etil asetat kayu batang kemudian dilarutkan dalam aseton dan diimpregnasi dengan silika gel 60 untuk dilanjutkan proses pemisahan menggunakan kromatografi cair vakum (KCV). Kolom kromatografi yang digunakan berdiameter 7 cm. Penggunaan eluen pada kromatografi cair vakum (KCV) mengacu pada hasil kromatografi lapis tipis, dilakukan dengan sistem eluen bergradien secara meningkat dari *n*-heksana 100% sampai dengan etil asetat 100%. Hasil dari kromatografi cair vakum (KCV) ditampung dalam vial dan dilakukan uji kromatografi lapis tipis (KLT) untuk melihat noda dari setiap perbandingan eluen, noda yang memiliki kemiripan pola kemudian dapat digabungkan membentuk satu fraksi dan dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator*. Selanjutnya, hasil gabungan atau subfraksi dipilih berdasarkan noda senyawa target.

Tahapan selanjutnya, fraksi yang berpotensi dan memiliki pola noda yang terpisah dengan baik dan jumlah yang mencukupi kemudian dilakukan pemisahan secara lanjut dengan berbagai teknik pemisahan hingga didapat isolat murni. Pemurnian merupakan proses pemisahan senyawa target dari pengotornya. Tahapan

pemurnian perlu dapat dilakukan dengan cara rekristalisasi. Isolat murni hasil pemurnian dilakukan uji kemurnian dengan kromatografi lapis tipis (KLT) untuk menentukan eluen yang sesuai dan memastikan hingga didapatkan isolat murni.

3.4.4 Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi

Senyawa yang didapatkan dari berbagai teknik pemisahan dan pemurnian, kemudian dikarakterisasi dengan berbagai spektrofotometer diantaranya spektrofotometri UV-Vis, spektrofotometri *Fourier Transform InfraRed* (FTIR), 1D NMR (^1H dan ^{13}C NMR), 2D NMR (HSQC dan HMBC), dan Spektrofotometri massa (MS). Data hasil karakterisasi dapat digunakan untuk menentukan struktur senyawa hasil isolasi.

3.4.5 Uji *In Vitro* Inhibitor enzim Asetilkolinesterase (AChE)

Uji inhibisi kolinesterase dilakukan dengan menggunakan pembaca lempeng mikro yang dimodifikasi dari metode kolorimetri Ellman. Secara singkat, 25 μL sampel dalam 50 mM Tris-HCl buffer A (pH 8.0), 50 μL 50 mM Tris-HCl buffer A (pH 8.0), 125 μL 3 mM DTNB dalam buffer C, dan 25 μL 1,5 mM ATCI dalam air Milli-Q ditambahkan ke dalam sumur. Kemudian, 25 μL enzim 0,3 U / mL (AChE) dalam 50 mM Tris-HCl buffer B ditambahkan dan diinkubasi selama 10 menit. Reaksi diukur pada 405 nm menggunakan pembaca lempeng mikro dalam rangkap tiga.

Untuk setiap konsentrasi, persentase penghambatan ditentukan dengan mengurangi aktivitas enzim yang terdeteksi dari nilai 100%. Aktivitas enzim sendiri dihitung dalam bentuk persentase dengan membandingkan laju reaksi sampel terhadap kontrol negatif. Selanjutnya, nilai persentase penghambatan kolinesterase ditentukan melalui persamaan berikut:

$$\text{Inhibisi (\%)} = 1 - \left(\frac{A_{\text{sampel}}}{A_{\text{kontrol}}} \right) \times 100$$

Di mana A sample adalah laju reaksi sampel, A control adalah laju reaksi kontrol negatif, dan IC_{50} dihitung menggunakan persentase penghambatan versus konsentrasi. Galantamin digunakan sebagai kontrol positif.

3.4.6 Uji *In Silico* Inhibitor enzim Asetilkolinesterase (AChE)

Protein reseptor AChE didapatkan dari web Protein Data Bank (rcsb.org) dengan ID PDB 4EY6. Protein AChE dan ligan galantamin dipisahkan menggunakan BIOVIA v.21. Senyawa hasil penentuan struktur dari isolat digambar menggunakan ChemDraw Ultra 12.0 kemudian dioptimalkan dengan Chem3D.

Masing – masing reseptor AChE sebagai makromolekul, ligan galantamin sebagai ligan kontrol dan isolat sebagai ligan uji dipreparasi menggunakan AutoDockTools-1.5.7 dengan menambahkan protein dan ligan ke dalam AutoDockTools-1.5.7. Selanjutnya, dilakukan deteksi Grid “reseptor”, Grid “ligan”, dan Grid Box “center on ligan”. Simulasi docking dilakukan dengan Command Prompt dengan Grid pada file .txt disesuaikan berdasarkan hasil preparasi. Hasil docking dianalisis berdasarkan nilai energi afinitas ikatan (kkal/mol) dan interaksi ikatan antara ligan dengan protein AChE yang divisualisasikan menggunakan BIOVIA v.21 dalam bentuk 2D dan 3D.