BAB I
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Malaria merupakan penyakit infeksi penyebab kematian kelima di dunia setelah infeksi pernapasan, HIV/AIDS, diare, dan tuberkulosis. Malaria telah menyerang 106 negara di dunia. Komitmen global pada Suistainable Development Goals (SDGs) menjamin kehidupan yang sehat dan mengupayakan kesejahteraan bagi semua orang, salah satunya yaitu dengan mengakhiri epidemi malaria (Alemu et al., 2013). Di Indonesia pada tahun 2015 terdapat 256.602.872 penduduk berisiko Malaria, dan termasuk tiga negara ASEAN dengan morbiditas malaria tertinggi, dan menurut World Health Organization (WHO) tahun 2021 diperkirakan terdapat 800.000 ribu kasus dan merupakan jumlah tertinggi kedua di Asia Tenggara setelah India, hal ini karena Indonesia adalah negara tropis yang sesuai untuk perkembangan 25 spesies nyamuk Anopheles yang reseptif malaria (Budiarti & Jokopriyambodo, 2020a; Sugiarto et al., 2022).

Berbagai Upaya pengendalian malaria sesuai rekomendasi WHO telah dilaksanakan secara global, tetapi peningkatan jumlah dan penyebaran parasit yang resisten terhadap obat antimalaria menjadi salah satu hambatan tersendiri (Wicht et al., 2020) Salah satunya ialah parasit Plasmodium falciparum yang cenderung dapat menjadi resisten terhadap obat antimalaria, bahkan P.falciparum cenderung dapat resisten terhadap hampir seluruh obat malaria konvensional yang ada seperi klorokuin dan primakuin (Rasmussen et al., 2022). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian terkait upaya penemuan obat baru dalam eliminasi malaria.

Indonesia merupakan negara dengan keanekaragaman hayati tertinggi di dunia, dengan jumlah 31.750 jenis tumbuhan dan berdasarkan hasil penelitian Riset Tumbuhan Obat dan Jamu oleh Kementrian Kesehatan terdapat 19.738 tumbuhan yang berpotensi dan dapat digunakan dalam pengobatan. Meskipun memiliki keberlimbahan tanaman berkhasiat, potensi tersebut belum dimanfaatkan secara optimal, sehingga perlu dilakukan pengembangan obat herbal yang berasal dari kekayaan alam Indonesia (von Rintelen et al., 2017).

Salah satu jenis tumbuhan obat yang digunakan dalam pengobatan tradisional malaria pada database RISTOJA adalah Paliasa (*Kleinhovia hospita* L) yang banyak tersebar di Indonesia khususnya di Sulawesi Selatan (Wahyuno, et a//l.2017). Paliasa digunakan sebagai bahan pengobatan antimalaria pada 5 ramuan dari beberapa etnis seperti etnis Alfuru, Buru, dan Danar di Provinsi Maluku serta etnis Kedang di Provinsi Nusa Tenggara Timur. Beberapa etnis dan daerah lain juga menggunakan tumbuhan paliasa sebagai obat kencing manis, demam, hepatitis, ung, dan kolesterol (Wahyuno, et al.2017). Pada beberapa unjukkan aktivitas tanaman Paliasa (*Kleinhovia hospita* L) rhadap sel leukimia murin (P-388), sel karsinoma korektal (HCT oma gaster (SGC 7901) (Arung et al., 2012), juga sebagai toprotektor (Tayeb et al., 2019a).

Optimized using
trial version
www.balesio.com

Dalam penelitian yang pernah dilakukan, paliasa mengandung senyawa alkaloid, terpenoid, triterpenoid, kumarin, steroid, dan asam lemak, Salah satu senyawa golongan triterpenoid yang ditemukan yaitu senyawa sikolartan (Rahim et al., 2018). Senyawa eleutherol dan kaemferol 3-O-B-D-glukosida juga telah diisolasi dari daun K.hospita L. yang memiliki aktivitas antioksidan (Tayeb et al., 2019b). Beberapa senyawa juga telah berhasil diisolasi dari paliasa, diantaranya senyawa asam lemak dengan cincin siklopropenilik (scopoletin, kaempferol, dan kuarsetin), pentasiklin triterpenoid, steroid C29, sikloartan triterpenoid alkaloid, eleutherol, 2,30 dihidroksi-12 oleanen-28-oat dan 2-hidroksi-12-oleanen-28 oat (Paramita, 2016; Zhou et al., 2013a) Kandungan senyawa alkaloid, triterpenoid dan steroid diduga memegang peranan aktif sebagai antiplasmodium (Budiarti & Jokopriyambodo, 2020b). Dengan efek farmakologi tersebut, paliasa menunjukkan potensi besar untuk dapat dijadikan sebagai antiplasmodium untuk kandidat obat baru malaria.

Ekstraksi adalah langkah pertama dan terpenting dalam mendapatkan zat aktif dari bahan baku tumbuhan, beberapa metode ekstraksi secara konvensional telah dilakukan yaitu maserasi, sokhlet, reflux, dan infusa. Namun, metode ini memerlukan waktu esktraksi yang lama, hasil rendemen yang rendah dan Sebagian besar menggunakan prinsip pemanasan yang dapat dengan mudah merusak zat aktif yang bersifat termosensitif (Jha & Sit, 2022; Q. W. Zhang et al., 2018a). Total rendemen serta kadar senyawa yang ada didalam tumbuhan sangat bergantung pada pemilihan pelarut dan metode yang digunakan. Menurut beberapa penelitian mendapatkan hasil ekstraksi dari daun paliasa menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% didapatkan hasil rendemen sebesar 4.17 % (Desiana,2018), dan persen rendemen pada pelarut N-Heksan, etil asetat dan etanol secara berturut-turut ialah 2.686%, 7.033% dan 7.933% (Solihah et al., 2019). Jumlah rendemen tersebut jauh dari rendemen yang baik dengan nilai persen rendemen untuk ekstrak daun paliasa *(Kleinhovia hospita)* adalah tidak kurang dari 11,3 % (Depkes RI,2017).

Untuk memperoleh metabolit sekunder dan persen rendemen yang tinggi diperlukan metode ekstraksi yang sesuai, karena metode ekstraksi daun paliasa yang digunakan sampai sekarang ialah metode konvensional yang membutuhkan waktu ekstraksi lama dan jumlah rendemen yang sedikit. Oleh karena itu, perlu dilakukan metode lain salah satunya yaitu ekstraksi dengan tekanan tinggi yang telah dikembangkan untuk mengekstraksi bahan-bahan bioaktif dengan waktu ekstraksi yang singkat, persen rendemen yang lebih tinggi, pengotor yang lebih sedikit, panas yang minimal sehingga dapat menghindarasi degradasi termal pada aktivitas dan struktur bioaktif pada tanaman, dan sebagainya (Jun, 2013)

ın variasi tekanan 50-150 Mpa ektraksi pemrosesan tekanan ıkan aktivitas mikroba dan meningkatkan perolehan senyawa pada tekanan lebih dari 200 MPa dapat diperoleh hasil ivitas yang tinggi (Agcam et al., 2021). Berdasarkan perbedaan pengaruh perbedaan tekanan perlu dilakukan analisis profil lan persen rendemen dari daun paliasa, salah satunya ialah *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) yang

Optimized using
trial version
www.balesio.com

merupakan sebuah instrument analisis dengan menggabungkan Teknik kromatografi gas dan spektroskopi massa. Kromatografi gas digunakan untuk mengidentifikasi senyawa yang mudah menguap pada kondisi vakum tinggi dan sepktroskopi massa digunakan untuk menentukan bobot molekul, rumus molekul, dan hasil molekul bermuatan (Hotmian et al., n.d.) Analisis menggunakan GC-MS memiliki sensitivitas yang tinggi, bahkan dapat menentukan suatu komponen senyawa pada tingkat konsetrasi yang sangat rendah sehingga sangat dibutuhkan dalam melakukan penentuan terhadap komponen metabolit sekunder dan senyawa bioaktif pada tanaman (Al-Rubaye et al., 2017).

Berdasarkan uraian diatas, maka perlu dilakukan penelitian untuk melihat pengaruh variasi tekanan pada ekstraksi bertekanan tinggi terhadap profil metabolit sekunder dari daun paliasa *(Kleinhovia hospitalinn)* secara GC-MS dan melihat potensi biaoktivitas metabolit sekunder dari daun paliasa *(Kleinhovia hospital L)* sebagai antiplasmodium terhadap parasit P.falciparum melalui pengujian secara *In Silico.*

1.2 Teori

1.2.1 Uraian tanaman Paliasa *(Kleinhovia hospita* L*)*

Klasifikasi tanaman paliasa. Adapun klasifikasi tanaman paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) adalah sebagai berikut (USDA, 2023):

Kingdom : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Ordo : Malvales
Suku : Malvaceae
Marga : Kleinhovia
Jenis : *Kleinhovia hospita* L.

Gambar 1. Tanaman Paliasa (Kleinhovia hospita L.)

Morfologi tanaman. Paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) merupakan tumbuhan yang hidup dengan tinggi pohon berkisar antara 5 – 20 meter. Kulit kayu pohon ini berwarna abu-abu dengan cabang dan ranting berwarna abu-abu kehijauan. Tangkai daun berukuran 3 – 5,5 cm, helaian daunnya berbentuk bulat telur dengan ukuran 5,5 - 18 cm. Bunga paliasa berkumpul pada malai di ujung ranting berbentuk lebar dan mempunya rambut halus dan daun pelindungnya berbentuk oval, kelopak bunganya berwarna merah muda dengan ukuran 6 – 19 mm. Biji paliasa berbentuk hampir bulat berwarna hitam atau coklat gelap dengan diameter 1,5 – 2 mm (eFloras, 2023).

Kandungan senyawa tanaman. Tumbuhan paliasa *Kleinhovia hospita* L
va kimia berupa saponin, bufadienol, antrakinon, scopoletin,
ı, serta senyawa sianogenik. Selain itu, daun dan kulit paliasa
senyawa sianogen. Menurut penelitian Zhou et al., (2013)
npat macam sikloartan triterpenoid yang berhasil diisolasi dari
nhospitines A, B, C dan D. Selain itu, telah diisolasi senyawa
ferol 3-O-B-D-glukosida dari daun paliasa (Arung et al., 2012).

Optimized using
trial version
www.balesio.com

Penelitian terbaru oleh Rahim et al., (2018) berhasil mengisolasi senyawa kleinhospitine E dan senyawa sikloartan triterpenoid yang juga berasal dari daun Paliasa (Arung et al., 2012; Rahim et al., 2018; Zhou et al., 2013b)

Manfaat tanaman. Tanaman paliasa banyak digunakan oleh masyarakat sebagai obat untuk berbagai penyakit. Masyarakat Sulawesi Selatan menggunakan daun dari tanaman ini untuk pengobatan sakit kuning atau hepatitis (Djabir, 2019). Data RISTOJA menunjukkan bahwa secara empiris paliasa digunakan sebagai bahan pengobatan antimalaria pada 5 ramuan dari beberapa etnis seperti etnis Alfuru *(kinar),* Buru *(kinar),* dan Danar *(ay kivut)* di Provinsi Maluku serta etnis Kedang *(angar)* di Provinsi Nusa Tenggara Timur. Beberapa etnis lain juga diketahui menggunakan tumbuhan paliasa sebagai obat kencing manis, demam, hepatitis, ginjal, penyakit lambung dan kolestrol (Budiarti & Jokopriyambodo, 2020a)

Tanaman paliasa juga memiliki aktivitas antikanker terhadap sel leukimia murin IP 388), sel karsinoma kolrektral (HCT 116), dan sel karsinoma gaster (SGC 7901) juga sebagai antioksidan dan hepatoprotekror (Arung et al., 2012; Tayeb et al., 2019a)

1.2.2 Ekstraksi

Pengertian ekstraksi dan ekstrak. Ekstraksi secara bahasa berasa dari kata *ex* : *out* dan traksi : tindakan menarik. Jadi ekstraksi dapat diartikan sebagai teknik pemisahan secara kimiawi dengan memisahkan atau menarik komponen atau senyawa dari suatu sampel menggunakan pelarut yang sesuai (Naibaho et al., 2023).

Ekstrak merupakan sediaan kering, kental, atau cair yang dibuat dengan menyari simplisia nabati menurut cara yang cocok, di luar pengaruh cahaya matahari secara langsung (Depkes RI, 2017). Ekstrak juga dapat diartikan sebagai sediaan pekat yang diperoleh dengan cara mengekstraksi zat aktif dari simplisia menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian sehingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI, 2020).

Prinsip ekstraksi. Prinsip dari ekstraksi adalah adanya penarikan dan pelarutan senyawa menggunakan pelarut yang tepat dimana terdapat tiga tahapan pada saat proses ekstraksi yaitu (Rinidar et al., 2017) :

- Penetrasi pelarut masuk ke dalam sel tanaman yang menyebabkan pengembangan sel
- Disolusi pelarut ke dalam sel tanaman dan pengembangan sel
- Difusi bahan yang terlarut/terekstraksi ke luar sel

si. Terdapat dua metode ekstraksi yang dikenal yaitu metode ıvensional (cara panas dan dingin) serta metode ekstraksi ɔnal :

e Extraction

e extraction merupakan metode ekstraksi dengan pemrosesan ik tinggi (HHP), atau tekanan ultra tinggi (UHP) yang ditujukan

Optimized using
trial version
www.balesio.com

untuk sampel cair dan padat, dengan kemasan ataupun tanpa kemasan, hingga tekanan antara 100 dan 800 MPa. HPE merupakan proses non-termal yang dapat secara efektif menonaktifkan mikroorganisme pada suhu rendah (bisa dibawah 0°C), untuk meminimalisir efek dari panas adiabatik hingga suhu di atas 100°C (Gokul Nath et al., 2023). Sistem HPE memiliki empat komponen penting yaitu bejana bertekanan, fluida bertekanan, intensifier, dan pompa. Komponen utamanya adalah bejana, yang dirancang khusus untuk mempertahankan tekanan tinggi. Cairan mengisi bejana sebagai media transmisi, yang berinteraksi dengan produk. Sampel ditempatkan di dalam wadah dan diisi dengan media transmisi. Bejana dirancang secara unik untuk menahan tekanan ini dengan aman selama beberapa siklus proses tekanan tinggi (Irna et al., 2018)

b. Maserasi

Maserasi adalah proses ekstraksi dengan cara merendam simplisia dan pelarut selama kuang lebih tiga hari dengan adanya pengadukan secara kontinu. Pelarut yang digunakan adalah pelarut dingin dimana tidak diperlukan panas pada metode ini. Prinsip dari maserasi adalah adanya kesetimbangan konsentrasi antara bahan yang diekstraksi pada bagian dalam sel dengan pelarut yang digunakan (Elisa et al., 2022).

Maserasi memiliki beberapa kelebihan diantaranya dapat digunakan untuk mengekstraksi sampel dalam jumlah banyak karena wadah ekstraktor dapat disesuaikan dengan kebutuhan serta tidak menggunakan peralatan khusus dan metode ini aman untuk senyawa yang bersifat termolabil karena pada pengerjaanya tidak digunakan suhu tinggi (Saidi et al., 2018).

c. Ekstraksi berbantu gelombang mikro (*Microwave Assisted Extraction* /MAE)

Microwave Assisted Extraction merupakan metode ekstraksi menggunakan pelarut cair dengan bantuan gelombang mikro. Gelombang mikro adalah medan elektromagnet dengan rentang frekuensi anata 300 Mhz – 300 GHz. Prinsip pemanasan menggunakan gelombang mikro adalah didasarkan karena adanya tumbukan secara langung pada bahan-bahan polar, tekni MAE ini merupakan salah satu teknik yang ramah lingkungan karena menggunakan jumlah pelarut yang sedikit (Endarini, 2016). Pada metode ekstraksi konvensional, panas menembus perlahan – lahan dari luar ke dalam suatu bahan, sedangkan pada metode MAE, pemanasan muncul tepat pada inti bahan yang sedang dipanaskan sehingga panas menyebar dari dalam ke luar bahan tersebut (Hamid Nour et al., 2021a)

1.2.3 Gas Chromatography (GC) Mass Spectrometer (MS)

Gas chromathography (GC) adalah metode pemisahan yang digunakan senyawa yang mudah menguap atau senyawa yang mudah yang mudah terdegradasi oleh panas tidak dapat dianalisis Suatu senyawa harus memiliki tekanan uap yang cukup besar 350–400°C dan harus diuapkan dengan cepat tanpa mengalami eaksi dengan komponen fase diam dan fase gerak (Forgács & Spectrometer (MS) berfungsi sebagai detektor untuk GC yang togram yang menunjukkan jumlah masing-masing senyawa

Optimized using
trial version
www.balesio.com

sebagai fungsi waktu retensi. Dimensi yang mendasari data khusus untuk MS disebut spektrum massa, yang merupakan histogram kelimpahan setiap ion sebagai fungsi m/z dan berfungsi untuk mengidentifikasi senyawa yang diwakili oleh puncak pada kromatogram. Gas Chromathography-Mass Spectrometer merupakan gabungan metode analisis antara GC dan MS. Dalam hal ini GC hanya berfungsi sebagai sarana pemisah tanpa dilengkapi dengan detektor sebagaimana GC pada umumnya, tetapi yang berfungsi sebagai detektornya adalah MS ((Stuart, 2004).

Instrumen komponen GC-MS terdiri dari sistem gas pembawa, injektor, kolom kromatografi gas, detektor, dan unit pemrosesan data. Gas pembawa umumnya merupakan gas permanen dengan kapasitas adsorpsi rendah atau dapat diabaikan, yaitu hidrogen, helium, argon, atau nitrogen. Injektor berfungsi mengirimkan sampel ke kolom GC dan dapat dibedakan menjadi dua kelompok yaitu injektor penguapan dan injektor pada kolom, Injektor penguapan menggunakan suhu tinggi untuk menguapkan sampel cairan dengan cepat, Injektor pada kolom menyimpan sampel langsung ke dalam kolom tanpa bergantung pada penguapan sampel dan diteruskan ke dalam kolom. Kolom digunakan sebagai tempat pemisahan komponen dari sampel, kolom yang digunakan untuk kromatografi gas dapat dibagi menjadi dua kelompok yaitu kolom kemas dan kolom kapiler. Detektor berinteraksi dengan molekul zat terlarut saat mereka keluar dari kolom. Interaksi ini diubah menjadi sinyal listrik yang dikirim ke alat perekam atau penyimpanan data. Kromatogram, yaitu plot intensitas sinyal versus waktu yang berlalu, kemudian dibuat. Perbedaan utama antara detektor adalah pada jumlah terendah senyawa yang dapat dideteksi (sensitivitas) dan senyawa yang menghasilkan respons detektor terkuat (selektivitas) (Forgács & Cserháti, 2003).

1.2.4 Molecular Docking

Proses mengikat antara dua molekuler secara bersama disebut dengan docking. Docking merupakan pilihan utama untuk modeling 3D struktur dari reseptor-ligan kompleks dan mengevaluasi stabilitas dari kompleks tersebut yang nantinya menentukan respon biologis. Secara garis besar terdapat dua Langkah dalam moleculer docking, yang pertama yaitu mencari jarak konformasi dari ligan yang berikatan dengan molekuler target, dan yang kedua yaitu scoring atau mengurutkan hasil docking yang memenuhi persyaratan afinitas ikatan. Diperlukan protein kompleks dan komoleks antara protein dan asam nukleik, dan dua atau lebih molekul baik itu hasil dari sintesis ataupun hasil virtual screening. Dari hasil komputasi dan docking ditemukanlah senyawa yang berpotensi memiliki aktivitas biologis dengan milihat *binding affinity* dan jenis ikatan yang terjadi. Namun, perlu dilakukan berbagai macam evaluasi untuk melanjutkan ke tahap berikutnya (A. Srinivas Reddy et al.,

Optimized using
trial version
www.balesio.com

arkan melalui gigitan nyamuk betina Anopheline yang telah pat memasuki sirkulasi darah dan berdiam di hepatosit, tempat rtransformasi, memperbanyak diri, dan berkembang menjadi n jaringan kemudian pecah, melepaskan merozoit yang masuk enginvasi eritrosit, dan memulai siklus eritrosit. Dalam eritrosit,

kebanyakan parasit mengalami perkembangan aseksual dari bentuk muda sampai tropozoit dan akhirnya menjadi skizon dewasa. Eritrosit yang mengandung skizon akan pecah, menimbulkan serangan klinis berupa demam (Kalsum et al., 2018; Sugiarto et al., 2022)

Merozoit berikatan dengan ligan pada permukaan sel darah merah. P. falciparum mengenali beberapa molekul dan menyerang semua tahapan eritrosit, oleh sebab itu, infeksi ini dapat mencapai parasitemia yang tinggi. P. vivax mengenali protein spesifik-retikulosit, sehingga Plasmodium ini menyerang retikulosit dan jarang melebihi 1% parasitemia di aliran darah. Merozoit berikatan dengan ligan pada permukaan sel darah merah. P. falciparum mengenali beberapa molekul dan menyerang semua tahapan eritrosit, oleh sebab itu, infeksi ini dapat mencapai parasitemia yang tinggi. P. vivax mengenali protein spesifik-retikulosit, sehingga Plasmodium ini menyerang retikulosit dan jarang melebihi 1% parasitemia di aliran darah (Amengor et al., 2024a; Talapko et al., 2019; Wicht et al., 2020)

Plasmepsin II merupakan salah satu enzim protease yang berperan penting dalam kelansungan hidup parasit Plasmodium falciparum, Plasmepin II berperan dalam proses pemecahan hemoglobin menjadi peptida yang lebih kecil yang kemudian digunakan oleh parasit sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan dan reproduksi. Selain itu, plasmepsin II bersama dengan enzim plasmepsin lainnya berperan dalam menjaga lingkungan asam di vakuola makanan, yang diperlukan untuk aktivitas optimal dari berbagai enzim perncernaan lainnya. Sehingga, plasmpesin II sangat sesuai untuk menjadi target untuk pengembangan obat anti malaria karena inhibitor plasmepsin II dapat mengganggu proses pencernaan hemoglobin dan dapat merusak homeostatis paratis, yang dapat membunuh ataupun menghambat kelansungan hidup parasit (Liu, 2017; Nasamu et al., 2020).

1.3 Rumusan Masalah

1. Apakah metode ekstraksi bertekanan tinggi dengan tekanan berbeda dapat menghasilkan persen rendemen daun paliasa (*Klenhovia hospital* linn) yang tinggi ?
2. Bagimana pengaruh tekanan terhadap metabolit sekunder daun paliasa (*Kleinhovia hospita*linn) secara GC-MS ?
3. Apakah metabolit sekunder dari daun paliasa (K.hospita L) berpotensi sebagai Anti Plasmodium falciparum yang diuji secara *In Silico*.

1.4 Tujuan dan Manfaat Penelitian

1.4.1 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui pengaruh ekstraksi bertekanan tinggi terhadap persen rendemen daun paliasa (*Kleinhovia hospita*linn)
2. ...getahui tekanan yang paling optimal pada pemrosesan ...inggi terhadap perolehan metabolit sekunder daun paliasa ...*ospita*linn)
3. ...tahui efek metabolit sekunder daun paliasa *(Kleinhovia hospita)* ... Plasmodium falciparum secara *In Silico*.

Optimized using
trial version
www.balesio.com

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan menjadi landasan yang kuat dalam pengembangan ilmu pengetahuan di bidang ilmu farmasi khususnya dalam ekstraksi bertekanan tinggi sebagai metode yang lebih efektif dan efisien terhadap metabolit sekunder dari daun paliasa (*Kleinhovia hospita*linn) dan bioaktivitasnya sebagai Anti Plasmodium falciparum yang diuji secara *In Silico*.

BAB II
METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakognosi- Fitokimia, Fakultas Farmasi, Pusat Kegiatan Penelitian Universitas Hasanuddin, Laboratorium Kimia Politeknik Negeri Ujung Pandang, dan PT. Ismut Fitomedika Indonesia yang dimulai bulan Januari sampai Mei 2024

2.2 Bahan dan Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: alat KLT-Densitometri (CAMAG), alat gelas (Pyrex®), ayakan no. 4/18, bejana, blender, cawan porselin, chamber (CAMAG), eksikator, lampu UV 254 nm, lampu UV 366 nm, mikropipet (Socorex), mikrotube, oven, pemrosesan tekanan tinggi, pipa kapiler, rotary evaporator (Heidolph®), timbangan analitik, vial, dan waterbath (Memmer®)

Adapun bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah aluminium foil, asam sulfat (H_2SO_4), aquades, baku senyawa sikloartan yang diisolasi dari daun *Kleinhovia hospita* linn (koleksi Abdul Rahim), daun paliasa (*Kleinhovia hospita* linn), kloroform p.a, kertas saring, lempeng KLT Silica gel GF254, metanol,N-heksan, tisu, dan white tip.

2.3 Metode Penelitian

2.3.1 Pengambilan dan Penyiapan Sampel

Sampel daun Paliasa *Kleinhovia hospita*linn diperoleh dari lingkungan Kampus Universitas Hasanuddin, Kota Makassar, Provinisi Sulawesi Selatan (GPS 5º07'54.4" LU, 119º29'07.4" BT). Sampel kemudian disortasi basah dan dicuci secara berulang menggunakan air mengalir untuk menghilangkan tanah dan pengotor lainnya yang melekat pada sampel. Selanjutnya dilakukan perajangan, sampel daun paliasa dipotong kecil-kecil lalu dikeringkan menggunakan oven simplisia pada suhu 55^{O}C selama 2-3 hari lalu dilakukan penghalusan sampel menggunakan blender dan dilakukan pengayakan dengan menggunakan ayakan nomor 4/18 sehingga dihasilkan simplisia daun paliasa (*Kleinhovia hospita* linn).

2.3.2 Metode Ekstraksi Bertakanan Tinggi

Proses ekstraksi simplisia daun Paliasa *K.hospita* dilakukan dengan pemrosesan metode maserasi dan ekstraksi bertekanan tinggi, serbuk simplisia ditimbang sebanyak 100 gram dan direndam ke dalam larutan air R.O *(Reserve Osmosis)*. Pelarut dimasukkan pada tabung ekstraksi bertekanan tinggi, kemudian ditambahkan volumenya hingga menutupi tabung. Ekstraksi bertekanan dilakukan masing-masing pada tekanan 200 Mpa, 400 Mpa, dan 600 Mpa dengan 3 kali siklus. Selanjutnya, hasil ekstraksi disaring menggunakan mesin filtrasi. Ekstrak yang diperoleh dilewati pada membran ultra filtrasi. Hasil ekstrak dikeringkan menggunakan *freeze drying* selama 1x24 jam sehingga

Optimized using
trial version
www.balesio.com

didapatkan ekstrak kering, kemudian ditimbang untuk dihitung persen rendemennya.

Tabel 1. Variasi pelarut, dan tekanan pada ekstraksi bertekanan tinggi daun paliasa *K.hospita*

No.	Pelarut	Tekanan (MPa)
1	Air RO	200
2	Air RO	400
3	Air RO	600

2.3.3 Metode Ekstraksi MAE (Microwafe Assisted Extraction)

Ekstraksi dengan metode MAE dilakukan dengan cara sampel simplisia daun paliasa *(Kleinhovia hospita)* ditimbang sebanyak 10 gram lalu dimasukkan kedalam pelarut air reverse osmosis (RO) 100 mL, kemudian ditempatkan pada vessel MAE dan diekstraksi selama 10 menit dengan daya low (100 Watt). Hasil ekstrak kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman, filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan dan dikeringkan menggunakan *Freeze drying* selama 1x16 jam hingga menjadi ekstrak kering. Ekstrak kering yang diperoleh kemudian ditimbang untuk dihitung persen rendemennya (Hamid Nour et al., 2021b).

2.3.4 Metode Ekstraksi Infusa

Ekstraksi dengan metode infusa dilakukan dengan menimbang simplisia daun paliasa *(Kleinhovia hospita)* sebanyak 10 gram, lalu dibasahi menggunakan aquadest sebanyak 10 mL, kemudian ditambahkan aquadest sebanyak 100 mL hingga sampel terendam sepenuhnya. Sampel dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit, dihitung saat suhu dalam panci 90°C dengan sesekasi diaduk. Hasil ekstrak kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman, filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan dan dikeringkan menggunakan *Freezedrying* selama 1x16 jam hingga menjadi ekstrak kering. Ekstrak kering yang diperoleh kemudian ditimbang untuk dihitung persen rendemennya (Abubakar & Haque, 2020).

2.3.3 Skrining Fitokimia

Masing-masing ekstrak dilarutkan menggunakan metanol, kemudian ditotolkan pada lempeng KLT silica gel GF 254 ukuran 4 cm x 6 cm dan dielusi menggunakan fase gerak N-Heksan: Etil asetat (8:3) setelah proses elusi selesai, [illegible]ti pada lampu UV 254 dan 366 nm. Noda atau bercak yang [illegible]u dilanjutkan dengan penyemprotan yang menggunakan [illegible]udian dihitung nilai Rf-nya dan hasil positif ditandai dengan [illegible]engan baku pembanding senyawa sikloartan.

Optimized using
trial version
www.balesio.com

2.3.4 Analisis *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS)

Preparasi Sampel. Sampel sebanyak 1 gram dilarutkan menggunakan metanol : kloroform (1:1) sebanyak 100 mL. Dilakukan ekstraksi menggunakan Ultrasonic selama 30 menit pada suhu 55°C. Sampel disentrifuse hingga terbentuk 2 fase dan supernatant dimasukkan kedalam vial sebanyak 3 mL dan dilakukan analisis GC MS.

Kondisi Kromatografi. Kondisi instrumen GC-MS: Suhu injektor 250°C dengan mode Splitless, tekanan 76,9 kPa dan laju alir 14 mL/min dan rasio 1:10. Suhu sumber ion dan interface 200°C dan 280°C, waktu solvent cut 3 menit, 400-700 m/z. Jenis kolom SH-Rxi-5Sil MS panjang kolom 30 m dengan diameter dalam 0,25 mm. Suhu awal kolom 700°C dengan waktu tahan 2 menit dan suhu dinaikkan hingga 200°C dengan laju 100°C/min dan suhu akhir 280°C dengan waktu tahan 9 menit dengan laju 50°C/min sehingga total waktu analisa 36 menit. Data kromatogram yang diperoleh dibaca dengan menggunakan *library* NIST 17 dan Wiley 9.

Pengumpulan dan Analis Data. Data yang diperolah dari hasil analisis *Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)* berupa data kromatogram akan dianalisis dan dibandingkan dengan library NIST dan Wiley 9. NIST *(Nasional Institute of Standard and Technology)* merupakan produk aplikasi perangkat lunak yang mengembangkan *library* spectral massa, aplikasi ini berfungsi untuk membantu mengidentifikasi senyawa dengan menyediakan referensi spektra massa untuk instrument GC-MS melalui ionisasi electron dan LC/MS melalui spektrometri massa tandem serta menyediakan indeks retensi fase gas untuk *gass chromatography (GC)* (Anonim,2021). Sedangkan Wiley merupakan database GC-MS spectral yang digunakan untuk membantu mengidentifikasi jenis metabolit ataupun senyawa selama proses identifikasi (Anonim,2022).b

Data hasil kromatogram yang telah dibandingkan dengan NIST dan Wiley 9, kemudian dikelompokkan ke dalam *Microsoft excel* berdasarkan jenis metabolit sekunder yang telah didapatkan, kemudian dilakukan pembahasan berdasarkan data yang diperoleh.

2.3.5 Analisis *In Silico*

Persiapan Reseptor. Proses penambatan molekul di awali dengan menyiapkan reseptor yang akan digunakan. Pada tahap penyiapan reseptor, struktur makromolekul yang digunakan diunduh dari PDB Protein Data Bank dengan Alamat situs http://www.rcsb.org/. Pada Penelitian ini menggunakan in-2 (1LF3) dengan resolusi 3,00 Å. Struktur tersebut membuat file makromolekul dan ligan pdb yang terpisah ngkat lunak *Chimera.* Pada umumnya struktur protein pada molekul pelarut berupa air dan residu lainnya, sehingga ngan molekul air agar tidak mengganggu pada saat simulasi

Optimized using
trial version
www.balesio.com

docking dilakukan dan untuk memastikan bahwa yang benar-benar berinteraksi adalah ligan dan reseptor. Selain itu juga perlu ditambahkan hidrogen Penambahan atom hidrogen juga dilakukan untuk menyesuaikan suasana docking agar mendekati pada pH 7 (Saputri,2016).

Setelah reseptor selesai dipreparasi, reseptor tersebut disimpan dengan format pdb. Selanjutnya persiapan ligan dilakukan dilakukan dengan pengaturan merge non polar sehingga atom H polar saja yang diharapkan akan berinteraksi dengan residu protein. Kemudian dilanjutkan proses penambatan molekul menggunakan program *Chimera* (Sari,2020).

Proses simulasi penambatan molekuler. Tahap penambatan (docking) dimulai pada perangkat lunak Perangkat lunak Chimera untuk menyiapkan protein dan ligan struktur menggunakan alat Dockprep. Docking untuk semua ligan uji dilakukan menggunakan grid box yang sama dengan grid box native ligan yang telah divalidasi dari penelitian sebelumnya (Amengor et al., 2024b) dengan nilai dimensi Center Size (Å) (x=16.22, y = 6.85, dan z= 27.61) dan Box Size (Å) (x= 20.50, y=23.64, dan z=24.74). Moleculer docking diamati dan diperiksa menggunakan bantuan Discovery Studio Visualizer, hasil visualisasi setiap ligan uji dibandingkan kemiripiannya dengan native ligan dan control positive

Analisis data. Hasil penambatan molekuler dianalisis menggunakan *Autodock 4.2.6.* Interaksi dengan residu asam amino, konstanta inhibisi, dan energi bebas ikatan merupakan parameter-parameter yang diperhatikan. Penetuan konformasi ligan hasil penambatan molekuer terbaik dilihat dan dipertimbangkan berdasarkan parameter-parameter tersebut (Oladejo,2023).

Optimized using
trial version
www.balesio.com