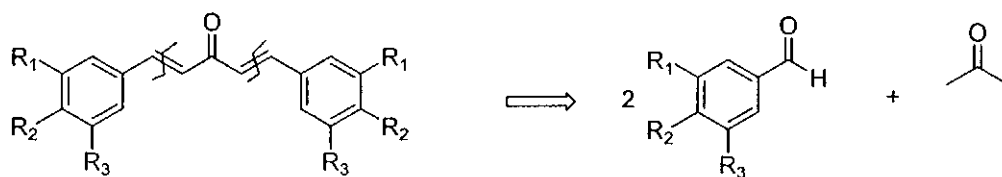


BAB IV. METODE PENELITIAN

4.1. Desain Penelitian

Pembentukan senyawa turunan kurkumin dilakukan sesuai dengan skema retrosintesis di bawah ini:



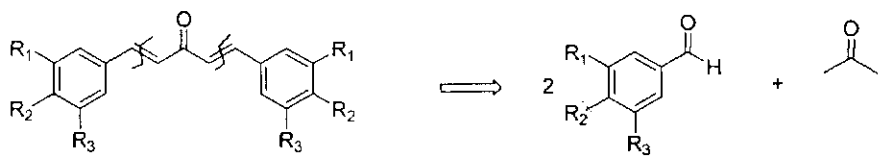
Skema 1. Analisis retrosintetik senyawa kurkumin

Metoda yang dipakai pada penelitian ini merupakan metoda eksperimen di laboratorium yang dilakukan berdasarkan tahapan kerja sebagai berikut :

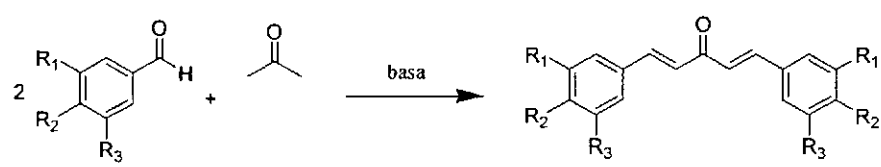
1. Sintesis senyawa kurkumin melalui reaksi kondensasi aldol menggunakan katalis basa.
2. Pemurnian senyawa yang diperoleh secara khromatografi dan kristalisasi
3. Karakterisasi senyawa secara fisikokimia yaitu UV, IR ¹H-NMR dan ¹³C-NMR.
4. Uji antioksidan, toksisitas dan antiinflamasi dari senyawa yang diperoleh dengan metode berturut-turut metode DPPH dan NO scavenging activity, metode *Brine Shrimp Lethality* dan menggunakan RAW 264,7 cell line dengan metode *griess assay*.

Sintesis senyawa analog kurkumin dilakukan dalam satu tahap reaksi melalui kondensasi aldol antara turunan aseton dan benzaldehid. Pendekatan yang

dilakukan adalah menggunakan pendekatan kimia kombinatorial dengan senyawa awal aseton 1a, siklopentanon 1b, sikloheksanon 1c dan turunan aldehyd benzaldehid 2a, sinamaldehyd 2b, 4-hidroksibenzaldehid 2c, 4-dimetilamino benzaldehid 2d.



Skema 2. Analisis retrosintetik senyawa kurkumin



Skema 3. Sintesis senyawa analog kurkumin

Tabel 1. Perpustakaan molekul kombinatorial hipotetik.

	 (2a)	 (2b)	 (2c)	 (2d)
 (1a)	 (3a)	 (3b)	 (3c)	 (3d)
 (1b)	 (3e)	 (3f)	 (3g)	 (3h)
 (1c)	 (3i)	 (3j)	 (3k)	 (3l)

Hasil senyawa yang diperoleh selanjutnya diuji aktivitas biologisnya sebagai antioksidan, toksisitas dan antiinflamasi.

4.2. Metode

Penelitian ini merupakan eksperimen di laboratorium. Pelaksanaannya memerlukan waktu dua tahun. Untuk mencapai tujuan akhir, penelitian terbagi dalam beberapa tahap. Secara rinci tahap-tahap penelitian digambarkan sebagai berikut.

TAHAP-TAHAP KEGIATAN	
I (TAHUN I)	II (TAHUN II)
• Persiapan bahan • Sintesis senyawa turunan kurkumin • Pemurnian senyawa yang diperoleh • Uji kemurnian	• Karakterisasi senyawa murni secara fisiko-kimia (perekaman spektrum UV, IR dan NMR) • Uji antioksidan • Uji toksisitas • Uji antiinflamasi

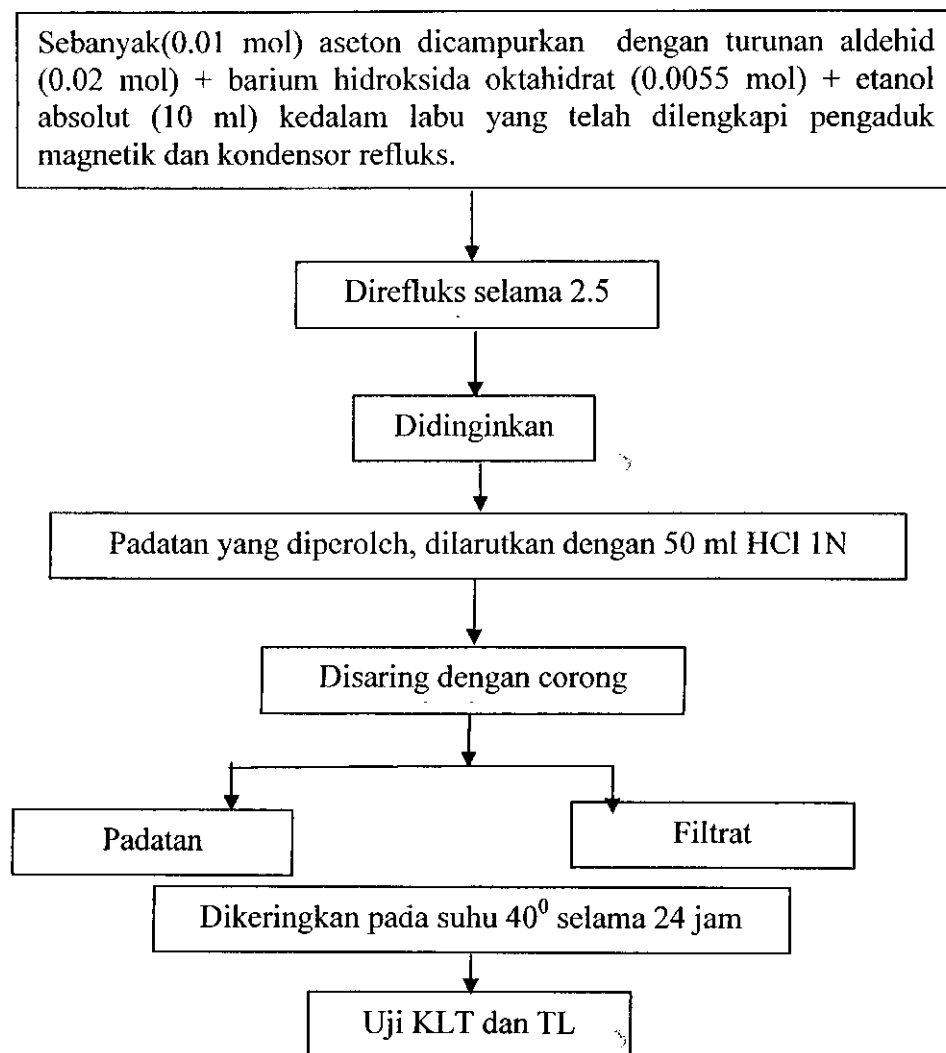
Tahun Pertama

4.2.1. Sintesis salah satu turunan kurkumin

4.2.1.1. Sintesis senyawa (1E,3E,6E,8E)-1,9-difenilnona-1,3,6,8-tetraen-5-on (3b)

Sebanyak (0,01 mol) aseton dicampurkan dengan sinamaldehyd (0,02 mol), barium hidroksida oktahidrat (0,0055 mol), dan 10 mL etanol absolut kedalam labu bulat yang telah dilengkapi magnetik stirer dan kondensor. Campuran reaksi diatas dibiarkan selama 2,5 jam hingga didapatkan padatan yang sulit diaduk oleh magnetik stirer. Padatan yang diperoleh kemudian didinginkan dan ditambahkan 50 mL HCl 1 N selanjutnya disaring dengan menggunakan corong buchner,

dicuci dengan 50 mL aquadest, kemudian 50 mL heksana dan dikeringkan pada suhu 40°C selama 24 jam.



Gambar 1. Diagram alir sintesis turunan kurkumin

4.2.1.2. Pemurnian dan uji kemurnian senyawa

Pemurnian senyawa hasil sintesis dengan cara pencucian dan rekristalisasi, kemudian dilakukan KLT dengan beberapa eluen, kalau senyawa sudah murni dilanjutkan dengan penentuan Titik Leleh, karakterisasi senyawa secara fisiko kimia (UV, IR $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$) dan uji bioaktivitas. Apabila senyawa tidak murni atau masih beberapa noda pada kromatogram, maka

dilakukan pemisahan dengan metoda kolom kromatografi atau kromatografi lainnya, setelah itu dilakukan rekristalisasi.

Tahun kedua

4.2.2. Karakterisasi senyawa murni.

Karakterisasi dilakukan di LIPI Serpong, dengan menggunakan alat sebagai berikut, spektrofotometer IR merk Shimadzu tipe IR Prestige-21, spektrofotometer UV-Visible merk Hitachi U-2001, spektrofotometer NMR merk JOEL tipe ECA 500 dengan frekwensi 500 MHz untuk proton dan 125 MHz untuk karbon.

4.2.3. Metode Uji bioaktivitas sebagai berikut:

4.2.3.1. Metode antioksidan

Free radical scavenging activity berdasarkan Lee et al., 2009

Sampel dilarutkan dengan menggunakan DMSO 100% pada konsentrasi 200 µg/ml. Larutan sampel diencerkan dengan konsentrasi berbeda di dalam 96-well microtiter plate dari 6.25-200 200 µg/ml sebanyak 100 µl. Tiap-tiap well ditambahkan 5 µl dari diphenylpicrylhydrazine (DPPH) (1 mg/ml dalam methanol). Microtiter plate di vortex dan di inkubasi selama 30 menit di dalam keadaan gelap. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 517 nm dan persentase total radical scavenging activity di hitung berdasarkan formula:

$$[(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100\%$$

4.2.3.2. Metode Toksisitas

Untuk menentukan LC_{50} , data yang diperoleh diamati dengan menggunakan Metode Analisa Probit dengan selang kepercayaan 95% dengan pembobotan menurut Busvine (1960) yang terdiri dari beberapa langkah yaitu: Penentuan konsentrasi bahan uji, Jumlah hewan uji (Tiap wadah diberikan 10 ekor hewan uji, sehingga setiap konsentrasi perlakuan terdapat $10 \times 3 = 30$ ekor), Menentukan konsentrasi kematian (pada masing-masing konsentrasi uji/perlakuan dihitung persentasi hewan uji yang mati. Log konsentrasi (x) (sesudah ditentukan konsentrasi yang digunakan dalam uji toksitas, untuk perhitungan selanjutnya dalam bentuk Log. Bila konsentrasinya rendah, maka tambahkan nilai guna menghindari tanda negatif pada log konsentrasi, sehingga perhitungan probitnya lebih mudah), Probit empiris (Tranformasi % kematian kepada nilai probit berdasarkan tabel tranformasi probit), Probit harapan (y) (Nilai kematian yang diharapkan sesuai dengan konsentrasi perlakuan. Dalam menentukan probit harapan ini dengan jalan menghubungkan % kematian dengan dosis bahan uji yaitu memplotkan angka % kematian yang diperoleh dari uji biologis dengan grafik yang tersedia yaitu probit morality), Probit kerja (digunakan untuk melihat daya kerja dari bahan uji) $Y = y_0 + kp$

4.2.3.3. Metode Antiinflamasi

Antiinflamasi dari sampel dilakukan secara in vitro dengan menggunakan murine monocytic macrophage cell line RAW 264.7 di dalam Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) (2mM L-glutamine, 45 g/L glucose, 1 mM sodium pyruvate, 50 U/ml penicillin; 50 µg/ml streptomycin) dengan 10% foetal

bovine serum (FBS). Sel di inkubasi pada 37 °C dengan 5% CO₂. Aktivitas daya hambat sampel terhadap nitric oxide di analisis berdasarkan, metode griess (Ahmad et al., 2005). 1x10⁶ sel/ml RAW 264.7 sel ditanamkan ke dalam 96-well tissue culture plate dan diinkubasi selama 4 jam pada suhu 37°C dengan 5% CO₂. Sel kemudian di inkubasi dengan menggunakan DMEM yang mengandung 100 µl sampel di dalam DMSO dan memberikan konsentrasi pada 200 µg/ml dalam 0.1% DMSO. Sel distimulasi dengan 200 U/ml IFN-γ dan 10 µg/ml LPS selama 17 jam. Produksi NO di dalam sel media dianalisis dengan menggunakan reagen griess dan absorbansi dibaca pada panjang gelombang 550 nm menggunakan microplate reader (Spectra Max Plus 384, Molecular Devices Inc., USA). Konsentrasi nitrat pada supernatant dihitung dengan membandingkan dengan kurva baku dari natrium nitrate. Persentase dari cell viability di analisis dengan menggunakan metode MTT. L-NAME digunakan sebagai control positif.