

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tinjauan Tentang *Cratoxylum sumatranum* (Jack) Bl.

Division	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Subclass	: Dilleniidae
Ordo	: Malpighiales
Family	: <i>Hypericaceae</i>
Genus	: <i>Cratoxylum</i>
Species	: <i>Cratoxylum sumatranum</i> (Jack) Blume

(Backer and Bakhuizen Van Den Brink, 1965)



(a)

(b)

Gambar 2.1 Simplisia (a) dan kulit batang (b) *Cratoxylum sumatranum*

#### 2.1.1 Deskripsi Tanaman

Habitat : Tumbuhan pepohonan di daerah pegunungan, tinggi dapat mencapai 50 m

Batang : Diameter batang mencapai 80 cm, batang tua berwarna coklat tua dan kulit kayunya pecah-pecah, batang muda berwarna hijau

- Daun : Daun duduk (hanya memiliki helaian daun saja dan pangkal daun memeluk batang), bentuk daun bulat panjang, bagian atas hijau mengkilat dan bagian bawah hijau pucat dan kasar
- Bunga : Bunga tumbuh di ujung tangkai, berbentuk homostili (memiliki putik dan benang sari yang sama panjangnya), kelopak bunga berwarna pink-ungu pangkalnya berwarna hijau pucat
- Buah : Buah muda berwarna kuning dan buah tua berwarna coklat

(Soepadmo and Wong, 1995)

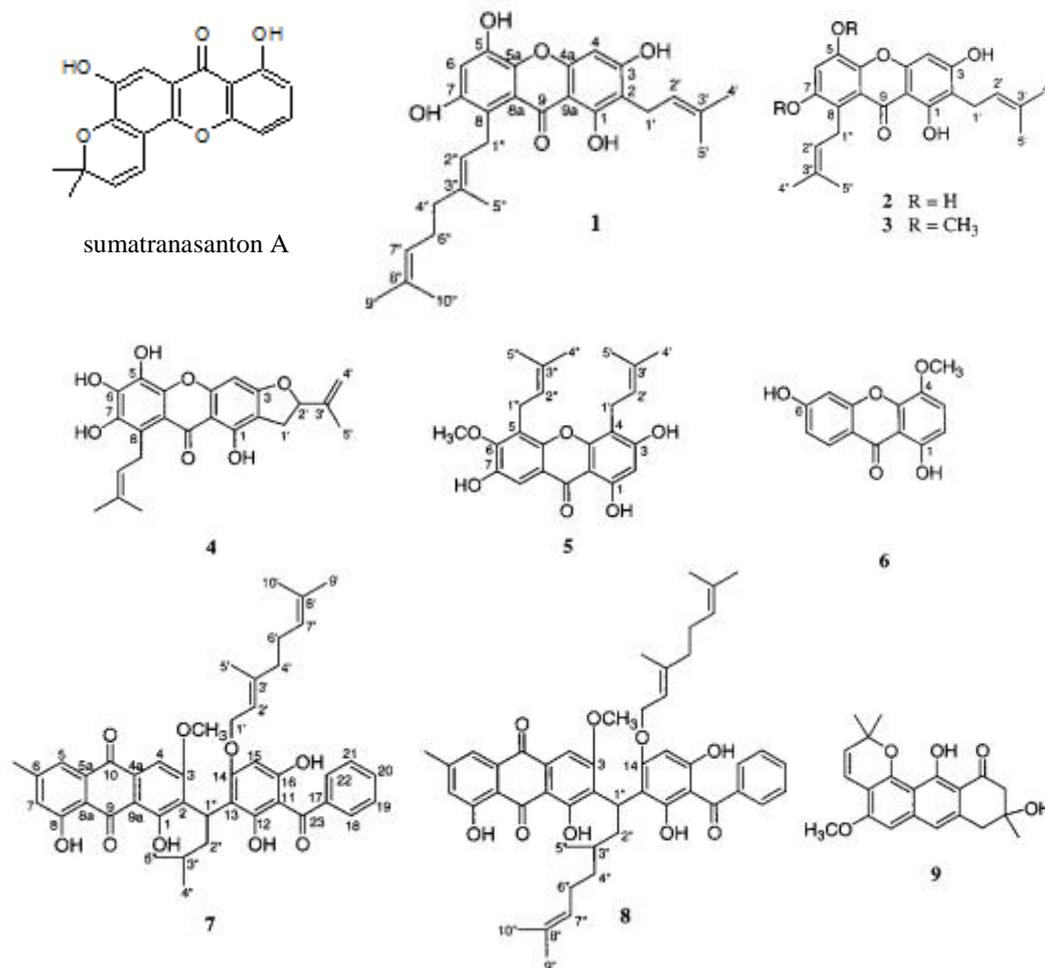
### 2.1.2 Penyebaran Tanaman

Merupakan tanaman pepohonan yang banyak tumbuh dan tersebar di hutan tropis pada daerah dengan ketinggian 800 m sampai 1200 m di atas permukaan laut. Tanaman ini terdistribusi luas di daerah Sumatera, Semenanjung Malaysia, Thailand, Jawa, Kalimantan dan Filipina. Nama lokal termasuk Kansilay, Lakansilay dan Guyong-guyong di Filipina, sedangkan di Kalimantan disebut sebagai Irat, Geronggang, Manding, Mentaling, Serungan dan Serungan mampat. Kayu dari tanaman ini banyak digunakan untuk konstruksi ringan, furnitur, ukiran, kayu bakar dan produksi arang (Soepadmo and Wong, 1995).

### 2.1.3 Kandungan Kimia dalam Tanaman

Beberapa senyawa hasil isolasi dari *C. sumatranum* diperoleh senyawa isolat baru seperti sumatranasanton A (Buana *et al.*, 2009). Hasil isolasi dari *C. sumatranum* juga mengandung metabolit dari jenis santon seperti cratoxyarborenon A-F (1-6) dan vismion B (9), serta juga jenis

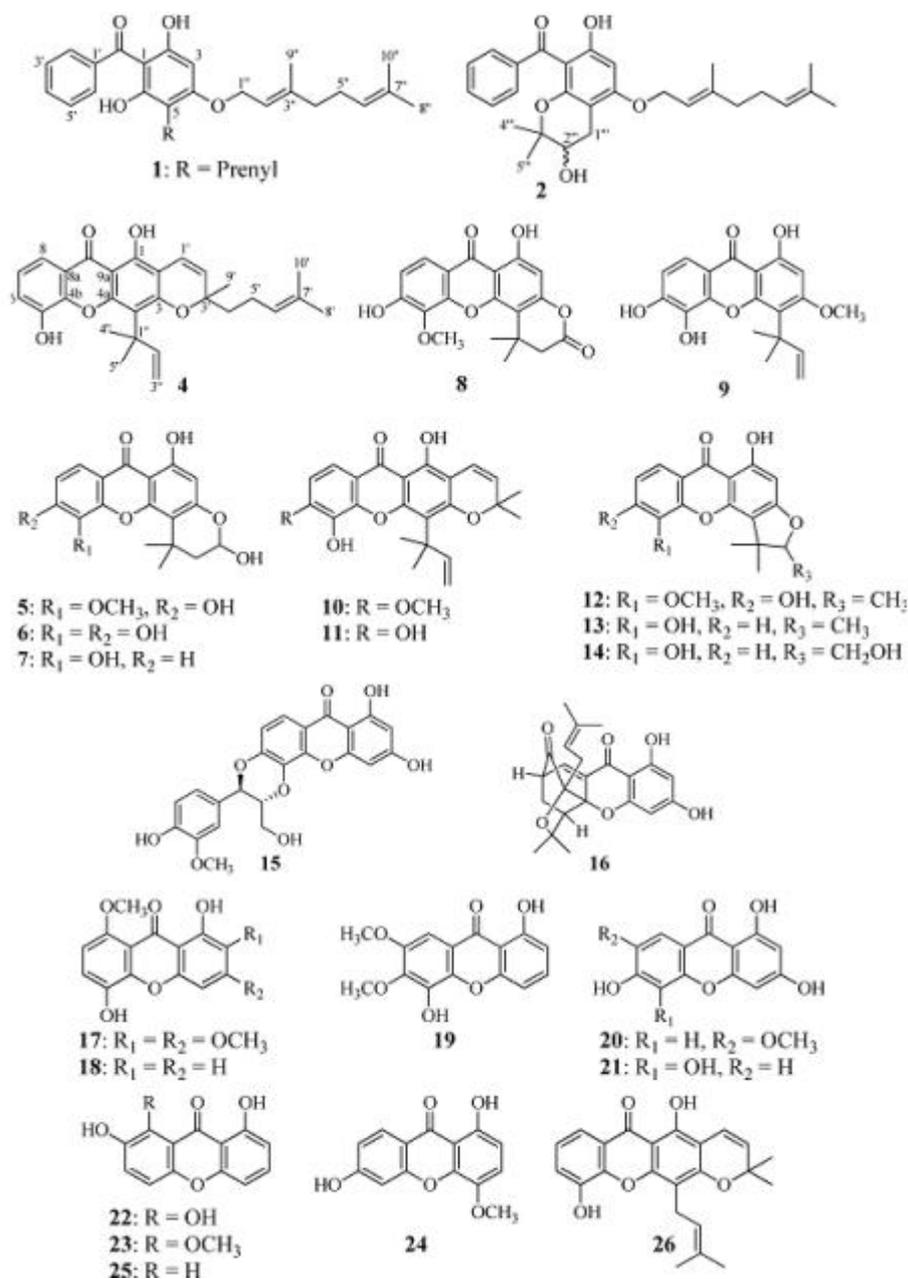
antrakuino-benzofenon seperti cratoxyarborekuinon A (7) dan B (8) (Seo *et al.*, 2002).



Gambar 2.2 Kandungan senyawa kimia dari *C. sumatranum* (1)  
(Buana *et al.*, 2009; Seo *et al.*, 2002)

Menurut penelitian Tantapakul *et al.*, (2016) diperoleh dua benzofenon baru dari *C. sumatranum*, yaitu cratosumatranon A (1) dan B (2). Selain itu juga diperoleh beberapa senyawa santon, yaitu cratosumatranon C (4), D (5), E (6) dan F (17); prunifloron N (7); nerifolon B (8); isocudraniasanton B (9); 10-O-metilmaclurasanton (10); maclurasanton (11); 5-O-metil-2-deprenilrhedia-santon B (12); pancisanton B (13); prunifloron M

(14); 5'-demetoksicadensin G (15); cochinchinosanton (16); 1,5-dihidroksi-8-metoksisanton (18); 1,5-dihidroksi-6,7-dimetoksisanton (19); 1,3,6-trihidroksi-7-metoksisanton (20); 1,3,5,6-tetrahidroksisanton (21); 1,2,8-trihidroksisanton (22); 2,8-dihidroksi-1-metoksisanton (23); cratoxyarborenone F (24); 1,7-dihidroksisanton (25); trapezifolisanton (26).



Gambar 2.3 Kandungan senyawa kimia dari *C. sumatranum* (2)  
 (Tantapakul *et al.*, 2016)

#### 2.1.4 Bioaktivitas *Cratoxylum sumatranum*

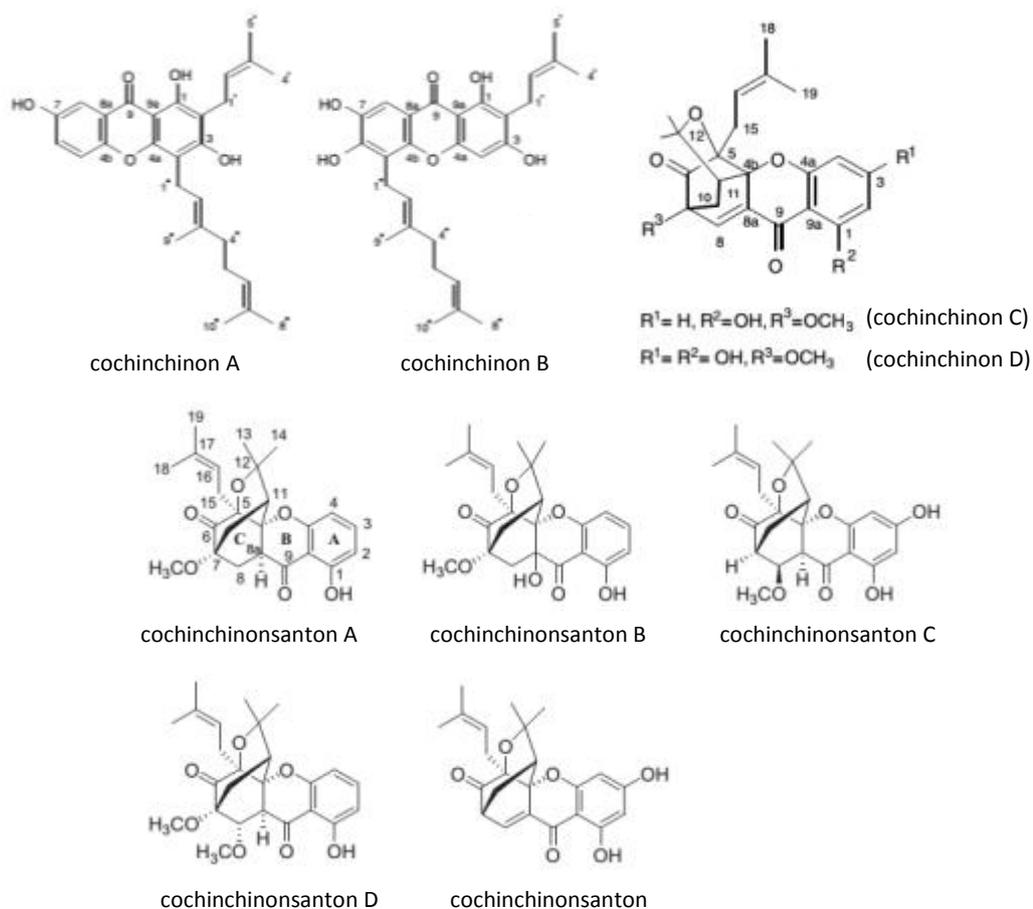
Berdasarkan penelitian Tantapakul *et al.* (2016) kandungan senyawa santon pada tanaman *C. sumatranum* mempunyai aktivitas antioksidan dengan menghambat radikal bebas DPPH dengan  $IC_{50}$  7  $\mu$ M. Selain itu senyawa santon juga memiliki aktivitas mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan  $IC_{50}$  8  $\mu$ g/mL, *Salmonella typhimurium* dengan  $IC_{50}$  4  $\mu$ g/mL dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan  $IC_{50}$  4  $\mu$ g/mL. Sedangkan Seo *et al.* (2002), telah melaporkan bahwa golongan senyawa santon dari *Cratoxylum sumatranum* memiliki aktivitas sitotoksik terhadap *KB human cancer cell*.

#### 2.2 Tinjauan Tentang Genus *Cratoxylum*

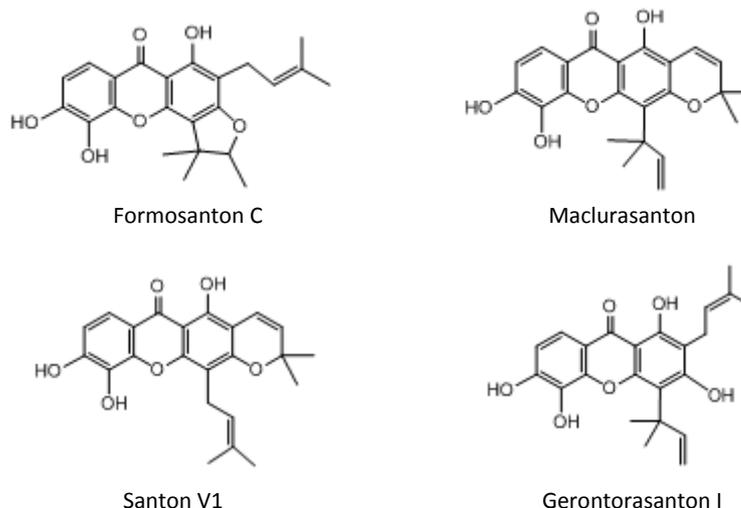
Tanaman dari genus *Cratoxylum* banyak tumbuh di beberapa negara Asia Tenggara. Mereka ditemukan di Kamboja, Cina, India, Indonesia, Laos, Malaysia, Myanmar, Filipina, Thailand dan Vietnam. Menurut referensi kajian taksonomi, genus *Cratoxylum* memiliki enam spesies yaitu *C. arborescens*, *C. cochinchinense*, *C. formosum*, *C. formosum* ssp. *pruniflorum*, *C. maingayi*, *C. glaucum* dan *C. sumatranum* (Soepadmo and Wong, 1995). Dari hasil beberapa penelitian yang telah dilakukan, diketahui genus *Cratoxylum* memiliki kandungan antrakuinon, benzofenon, flavonoid, santon dan triterpenoid (Boonnak *et al.*, 2006; Bennett *et al.*, 1993; Iinuma *et al.*, 1996; Buana *et al.*, 2009).

Secara etnomedisin genus *Cratoxylum* juga telah banyak digunakan sebagai tanaman obat oleh masyarakat lokal. Rebusan daun dari tanaman *C.*

*arborescens* dengan nama lokal Geronggang dan *C. formosum* dengan nama lokal Mampat, banyak digunakan oleh masyarakat dikawasan Asia Tenggara untuk pengobatan dan pencegahan ulkus lambung (Sidahmed *et al.*, 2013; Sripanidkulchai *et al.*, 2010). Tanaman *C. cochinchinense* dengan nama lokal Huang niu mu telah lama digunakan dalam pengobatan tradisional Vietnam, bagian kulit kayu, akar dan daun telah dipakai untuk mengobati berbagai penyakit, seperti demam, batuk, perut kembung, diare, sakit perut, kudis dan eksim. Sementara bagian ranting dari tanaman *C. cochinchinense* digunakan untuk mengobati kudis, luka bakar dan cedera (Nguyen *et al.*, 2011).



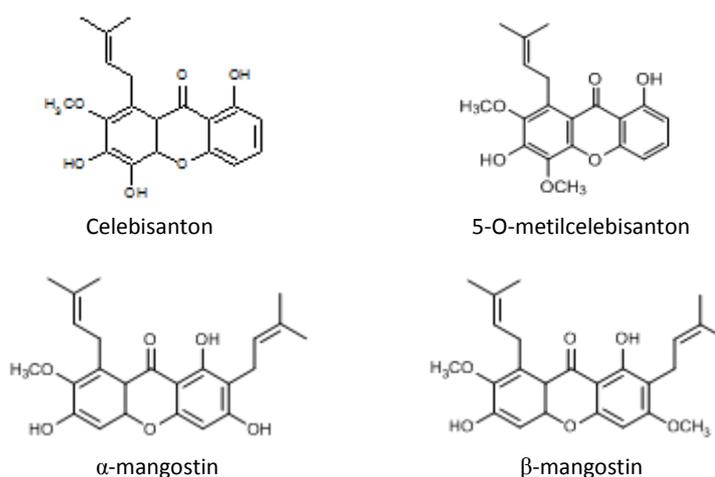
Gambar 2.4 Kandungan senyawa kimia di *C. cochinchinense* (Mahabusarakam *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2018)



Gambar 2.5 Kandungan senyawa kimia di *C. formosum* (Boonsri *et al.*, 2006; Sidahmed *et al.*, 2013)

Banyak senyawa santon dari genus *Cratoxylum* telah dievaluasi untuk melihat potensi bioaktivitasnya. Formosanton C, maclurasanton, santon V<sub>1</sub> dan gerontosanton I yang diisolasi dari akar tanaman *C. formosum* telah dilaporkan memiliki aktivitas sebagai penghambat pertumbuhan *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* dan *Salmonella typhi* dengan nilai MIC sebesar 1,1 - 4,6 µg/mL (Boonsri *et al.*, 2006). Beberapa senyawa kimia yang diisolasi dari buah tanaman *C. cochinchinense* dan kulit batang tanaman *C. maingayi* telah dilaporkan memiliki aktivitas sebagai antimalaria dan sitotoksik terhadap sel kanker. Senyawa celebisanton, cochinchinon A, α-mangostin, β-mangostin dan cochinchinon C menunjukkan efek sitotoksik terhadap sel kanker paru-paru dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 0,65 - 5,2 µg/mL. Sedangkan senyawa 5-O-metilcelebisanton, celebisanton, β-mangostin dan cochinchinon C menunjukkan aktivitas yang kuat sebagai antimalaria dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 2,6 - 7,2 µg/mL (Laphookhieo *et al.*, 2009).

Senyawa  $\alpha$ -mangostin yang diisolasi kulit batang tanaman *C. arborescens* telah dilaporkan menunjukkan aktivitas sebagai anti-ulserogenik yang efektif. Dimana senyawa  $\alpha$ -mangostin dengan dosis 10 mg/kg dan 30 mg/kg berat badan tikus, mampu menghambat lesi lambung yang diinduksi etanol secara signifikan ( $P < 0,05$ ) dengan masing-masing nilai sebesar 66,04% dan 74,39%. Senyawa tersebut juga menginduksi ekspresi Hsp70 dan menghambat aktivitas COX-2 (Sidahmed *et al.*, 2013). Sedangkan senyawa  $\beta$ -mangostin dari kulit batang tanaman *C. arborescens* juga dilaporkan memiliki aktivitas gastroprotektif dengan cara mengurangi pembentukan ulkus, edema submukosa dan infiltrasi leukosit (Sidahmed *et al.*, 2016).



Gambar 2.6 Kandungan senyawa kimia di *C. maingayi*, *C. arborescens*, *C. glaucum* (Laphookhieo *et al.*, 2006; Sim *et al.*, 2011; Sidahmed *et al.*, 2016)

Senyawa  $\alpha$ -mangostin dan  $\beta$ -mangostin yang diisolasi dari kulit batang tanaman *C. glaucum* telah dilaporkan menunjukkan aktivitas penghambatan yang tinggi terhadap sel kanker MCF7 dengan nilai  $IC_{50}$  masing-masing sebesar 10  $\mu$ g/mL dan 13,5  $\mu$ g/mL. Selain itu, kedua senyawa tersebut juga menunjukkan aktivitas penghambat jalur sel HL-60 dengan nilai  $IC_{50}$  masing-masing sebesar 5  $\mu$ g/mL dan 12  $\mu$ g/mL (Sim *et al.*, 2011).

### 2.3 Tinjauan Tentang Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh yang diperoleh dengan cara mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati maupun hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa dipakatkan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI, 1995).

### 2.4 Tinjauan Tentang Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang dapat larut dengan pelarut cair. Simplisia yang diekstrak mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut seperti karbohidrat, serat, protein dan lain-lain. Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat digolongkan menjadi minyak atsiri, alkaloid, flavonoid dan lain-lain. Struktur kimia yang berbeda-beda akan mempengaruhi kelarutan serta stabilitas senyawa-senyawa tersebut terhadap pemanasan, udara, cahaya, logam berat dan derajat keasaman. Dengan diketahuinya senyawa aktif yang dikandung simplisia, maka akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat.

Proses pembuatan ekstrak diawali dari pembuatan serbuk simplisia kering (penggilingan) yang memiliki derajat kehalusan tertentu. Semakin halus serbuk simplisia, maka proses ekstraksi yang terjadi semakin efektif, namun semakin halus serbuk simplisia yang diekstraksi akan menyebabkan semakin sulitnya proses penyarian yang diperlukan.

Cairan pelarut dalam proses pembuatan ekstrak adalah pelarut yang baik (optimal) untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau yang aktif, dengan demikian senyawa tersebut dapat terpisahkan dari bahan dan dari senyawa kandungan lainnya serta ekstrak hanya mengandung sebagian besar senyawa kandungan yang diinginkan (Depkes RI, 2000).

Proses ekstraksi pada umumnya menggunakan pelarut berupa senyawa organik yang dapat melarutkan senyawa tanpa merubah senyawa yang ada di dalam tanaman. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi dipilih berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan jumlah maksimum dari zat yang diinginkan. Pada umumnya pelarut yang digunakan adalah pelarut nonpolar, semipolar, dan polar. Pelarut nonpolar yang sering digunakan, misalnya petroleum eter, dan heksana. Pelarut yang bersifat semi polar misalnya eter, kloroform, diklorometana. Sedangkan pelarut yang bersifat polar misalnya eter, etanol dan air. Zat-zat kimia yang dapat diekstraksi dengan pelarut nonpolar adalah steroid, lemak dan karetenoid. Zat yang terekstraksi dengan pelarut semipolar adalah senyawa alkaloid, asam fenolat, fenilpropanoid, flavonoid dan antrakuinon, sedangkan zat kimia yang terekstraksi dengan pelarut polar adalah alkaloid, glikosida, saponin dan tannin (Depkes RI, 1987).

Berdasarkan bentuk campuran yang diekstrasi, dapat dibedakan dua macam ekstraksi sebagai berikut:

1. Ekstraksi padat-cair, jika substansi yang diekstraksi terdapat di dalam campuran yang berbentuk padat. Proses ini paling banyak ditemui di

dalam usaha untuk mengisolasi suatu substansi yang terkandung di dalam suatu bahan alam.

2. Ekstraksi cair-cair, jika substansi yang diekstraksi terdapat di dalam campuran yang berbentuk cair.

Berdasarkan proses pelaksanaannya, ekstraksi dibedakan menjadi berikut :

1. Ekstraksi berkesinambungan, dalam ekstraksi ini pelarut dengan kepolaran yang sama digunakan secara berulang-ulang.
2. Ekstraksi bertahap, dalam ekstraksi ini tiap tahap selalu menggunakan pelarut dengan kepolaran yang berbeda-beda pada proses ekstraksinya.

## **2.5 Tinjauan Tentang *Bioassay Guided Isolation***

Sebagian besar senyawa bioaktif yang berasal dari alam adalah metabolit sekunder, yaitu senyawa kimia khusus yang dapat dikelompokkan ke dalam berbagai kategori. Protokol yang khas untuk mengisolasi senyawa kimia murni dari bahan alam adalah pemisahan yang dipandu *bioassay*, dimana proses pemisahannya dilakukan langkah demi langkah dari komponen yang diekstraksi berdasarkan perbedaan sifat fisikokimianya dan menentukan aktivitas biologis diikuti oleh kegiatan berikutnya dari pemisahan dan pengujian. Biasanya, pekerjaan *bioassay guided isolation* dimulai dari bahan dasar yang mau diidentifikasi (biasanya disiapkan dengan cara ekstraksi dari bahan alami) dianggap "aktif" dalam uji *in vitro* tertentu. Jika tujuan akhir dari pekerjaan adalah untuk mengidentifikasi dari ratusan senyawa yang bertanggung jawab untuk aktivitas *in vitro* yang telah diamati, tahapan yang dilakukan adalah:

1. Fraksinasi ekstrak, misalnya partisi oleh kromatografi,
2. Uji aktivitas fraksi secara *in vitro*,
3. Ulangi langkah 1) dan 2) hingga senyawa aktif murni diperoleh,
4. Menentukan struktur senyawa aktif, biasanya dengan menggunakan metode spektroskopi.

Uji aktivitas secara *in vitro* tidak selalu memiliki aktivitas terhadap manusia, tetapi juga dapat memiliki aktivitas terhadap sistem kehidupan dari berbagai organisme lainnya (Choudhary *et al.*, 2001).

Cara yang paling umum untuk fraksinasi adalah partisi pelarut-pelarut dan teknik kromatografi seperti *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), kromatografi cair tekanan sedang, kromatografi "flash", kromatografi kolom terbuka, Kromatografi Vakum Cair (KVC), Kromatografi Lapis Tipis (KLT), dengan masing-masing teknik yang paling sesuai untuk jumlah tertentu dari bahan awal. Kromatografi *Couter Current* (CCC) sangat cocok untuk pemisahan senyawa yang dipandu *bioassay*, karena sebagai teknik pemisahan serba cair, maka terdapat kekhawatiran tentang kehilangan dari sampel aktif yang tidak dapat dilarutkan atau denaturasi komponen sampel dapat diminimalkan. Setelah diperoleh isolat zat murni, proses menentukan struktur kimianya dapat diatasi. Untuk tujuan ini, metodologi yang paling kuat yang tersedia adalah spektroskopi *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) dan Spektrometri Massa (MS). Dalam kasus upaya penemuan obat, struktur elusidasi semua komponen yang aktif secara *in vitro* biasanya adalah tujuan akhir (Choudhary *et al.*, 2001).

## 2.6 Tinjauan Tentang Kromatografi

### 2.6.1. Pengertian Kromatografi

Kromatografi merupakan teknik pemisahan yang paling umum dan paling sering digunakan dalam bidang kimia analisis kualitatif dan kuantitatif. Kromatografi didefinisikan sebagai prosedur pemisahan zat terlarut oleh suatu proses migrasi diferensial dinamis dalam sistem yang terdiri dari dua fase, salah satu diantaranya bergerak secara berkesinambungan dengan arah tertentu dan di dalamnya zat-zat itu menunjukkan perbedaan mobilitas disebabkan adanya perbedaan dalam absorpsi, partisi, kelarutan, tekanan uap, ukuran molekul, atau kerapatan muatan ion. Dengan demikian zat dapat diidentifikasi atau ditetapkan dengan metode analitik.

Teknik kromatografi umumnya membutuhkan zat terlarut terdistribusi di antara dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Fase gerak membawa zat terlarut melalui media hingga terpisah dari zat terlarut lainnya, yang tereluasi lebih awal atau lebih akhir (Sastromidjojo, 2001).

### 2.6.2. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan bentuk kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektroforesis. Berbeda dengan kromatografi kolom yang mana fase diamnya diisikan atau dikemas di dalamnya, pada kromatografi lapis tipis, fase diamnya berupa lapisan yang seragam (*uniform*) pada permukaan bidang datar yang didukung lempeng kaca, pelat aluminium, atau pelat plastik (Rohman dan Gholib, 2007).

Pada Kromatografi Lapis Tipis (KLT), zat penyerap merupakan lapisan tipis serbuk halus yang dilapiskan pada lempeng kaca, plastik atau logam secara merata, umumnya digunakan lempeng kaca. Lempeng yang dilapisi dapat dianggap sebagai kolom kromatografi terbuka dan pemisahan yang tercapai dapat didasarkan pada adsorpsi, partisi, atau kombinasi kedua efek, yang tergantung dari jenis lempeng, cara pembuatan, dan jenis pelarut yang digunakan. Analisis KLT dengan penukar ion dapat digunakan untuk pemisahan senyawa polar. Perkiraan identifikasi diperoleh dengan pengamatan bercak dengan harga  $R_f$  yang identik dan ukuran hampir sama, dengan menotolkan bahan uji dan pembanding pada lempeng yang sama.

Harga  $R_f$  merupakan parameter karakteristik kromatografi lapis tipis. Harga ini merupakan ukuran kecepatan migrasi suatu senyawa pada kromatogram pada kondisi konstan merupakan besaran karakteristik dan reproduksibilitas. Harga  $R_f$  didefinisikan sebagai perbandingan antara jarak senyawa dari titik awal dan jarak tepi muka pelarut dari titik awal (Roth and Blaschke, 1985). Penetapan letak bercak yang dihasilkan KLT dapat ditetapkan dengan pengamatan langsung jika senyawa tampak pada cahaya ultraviolet gelombang pendek (254 nm) atau gelombang panjang (366 nm), pengamatan dengan cahaya tampak atau ultraviolet setelah disemprot dengan larutan penampak bercak (Depkes RI, 2008).

Pendeteksian bercak hasil pemisahan dapat dilakukan dengan beberapa cara. Untuk senyawa tak berwarna cara yang paling sederhana adalah dilakukan pengamatan dengan sinar ultraviolet. Beberapa senyawa organik bersinar atau berfluorosensi jika disinari dengan sinar ultraviolet

gelombang pendek (254 nm) atau gelombang panjang (366 nm), jika dengan cara itu senyawa tidak dapat dideteksi maka harus dicoba disemprot dengan pereaksi yang membuat bercak tersebut tampak yaitu pertama tanpa pemanasan, kemudian bila perlu dengan pemanasan (Gritter, *et al.*, 1991; Stahl, 1985).

### **2.6.3 Kromatografi Kolom**

Kromatografi kolom adalah teknik pemisahan dan pemurnian dari suatu campuran baik itu dalam fasa cair maupun padat untuk menghasilkan senyawa yang diinginkan secara individu. Pemisahan dalam kromatografi kolom didasarkan pada perbedaan interaksi setiap senyawa yang ingin dipisahkan dengan media kromatografi kolom yang digunakan. Pada kromatografi kolom, fasa diam dan fasa gerak dibuat berdasarkan kepolarannya dimana keduanya dibuat berlawanan seperti fasa diam yang bersifat polar dan fasa gerak yang cenderung lebih non polar. Kromatografi kolom menggunakan alat berupa kolom gelas atau kaca yang ditempatkan secara vertikal sehingga zat dapat turun secara perlahan dengan bantuan gravitasi. Kelemahan dari kromatografi kolom adalah membutuhkan waktu yang cukup lama pada prosesnya karena kita perlu melakukan elusi secara bertahap sehingga semua fasa gerak yang digunakan habis dan ditampung dalam wadah yang berbeda. Prinsip kerja dari kromatografi kolom yaitu memisahkan komponen campuran berdasarkan perbedaannya dalam fasa diam dan fasa gerak. Jika suatu campuran terdiri dari beberapa komponen, maka setiap komponen tersebut memiliki struktur masing-masing

dengan sifat yang khas untuk setiap senyawanya. Salah satu sifat yang berpengaruh dalam kromatografi kolom adalah kepolaran senyawa serta berat dan ukuran molekul (Stahl, 1985).

#### **2.6.4 Kromatografi Cair Vakum (KCV)**

Kromatografi Cair Vakum (KCV) merupakan kromatografi kolom yang dipercepat dan bekerja pada kondisi vakum. Teknik ini didasarkan pertimbangan pada kromatografi lapis tipis preparatif yang dijalankan dalam bentuk kolom kromatografi dengan menggunakan vakum untuk mempercepat aliran eluen (Sticher, 2008).

Prinsip kerja yang digunakan dalam metode kromatografi lapis adalah adsorpsi atau serapan, sedangkan pemisahannya didasarkan pada senyawa-senyawa yang akan dipisahkan yang terdistribusi antara fase diam dan fase gerak dalam perbandingan yang berbeda. Kolom kromatografi yang digunakan biasanya dikemas kering (biasanya dengan penjerap 10-40  $\mu\text{m}$ ) dalam keadaan vakum agar diperoleh kerapatan kemasan maksimum. Pompa vakum dihentikan dan pelarut yang kepolarannya rendah di tuangkan ke permukaan penjerap lalu divakum kembali. Kolom dihisap sampai kering dan telah siap dipakai. Cuplikan dilarutkan dalam pelarut yang cocok, dimulai dengan pelarut yang kepolarannya rendah kemudian kepolarannya ditingkatkan secara perlahan-lahan. Kolom dihisap sampai kering pada setiap permukaan fraksi. Oleh karena itu, kromatografi vakum cair menggunakan tekanan rendah untuk meningkatkan laju aliran fase gerak (Sticher, 2008).

### **2.6.5 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

Instrumen *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) merupakan pengembangan dari kromatografi kolom klasik. Ada empat perubahan utama yang dilakukan pada cara kolom klasik yaitu :

1. Dipakai penyerap yang lebih halus dengan kisaran ukuran mesh lebih sempit agar tercipta kesetimbangan yang lebih baik di dalam sistem.
2. Sistem tekanan, biasanya pompa mekanis dipakai untuk mendorong pelarut pelarut melalui penjerap yang halus. Ini perlu karena ukuran partikel kecil, tetapi pompa itu juga menyebabkan kromatografi lebih cepat, jadi memperkecil difusi.
3. Detektor telah dikembangkan sehingga diperoleh analisis senyawa yang berkesinambungan ketika senyawa itu keluar dari kolom. Data analisis ini dapat dipakai untuk membagi-bagi fraksi ketika keluar dan jika diperlukan dengan tepat dapat memberikan data kuantitatif mengenai banyaknya senyawa yang ada.
4. Penyerap baru dan cara pengemasan kolom baru dikembangkan sehingga memungkinkan derajat daya pisah yang tinggi tercapai.

HPLC merupakan metode kualitatif dan kuantitatif yang sangat baik, namun kurang memuaskan untuk cuplikan yang banyak (Gritter *et al.*, 1991).

## **2.7 Tinjauan Tentang Spektroskopi**

### **2.7.1 Spektroskopi UV-Visible**

Molekul selalu mengabsorpsi cahaya elektromagnetik jika frekuensi suatu cahaya sesuai dengan frekuensi getaran molekul tersebut. Elektron yang

terikat dan elektron yang tidak terikat akan tereksitasi pada suatu daerah frekuensi yang sesuai dengan cahaya ultra violet dan cahaya tampak. Spektrum absorpsi daerah ini memiliki rentang panjang gelombang antara 220 nm sampai 800 nm. Spektrum tersebut dinyatakan sebagai daerah ultra violet dan daerah sinar tampak (Roth and Blaschke, 1998).

Transisi terjadi antara orbital ikatan atau orbital pasangan bebas dan orbital non ikatan tak jenuh atau orbital anti ikatan. Panjang gelombang serapan merupakan ukuran dari pemisahan tingkatan-tingkatan tenaga dari orbital-orbital yang bersangkutan. Pemisahan energi yang paling tinggi diperoleh bila elektron-elektron dalam ikatan  $\sigma$  tereksitasi yang menimbulkan serapan pada daerah 120-200 nm. Daerah ini dikenal sebagai daerah ultraviolet vakum dan relatif tidak banyak memberikan keterangan. Di atas 200 nm eksitasi dari orbital-orbital p dan d serta orbital  $\pi$  dapat diukur dan spektra yang diperoleh memberikan banyak keterangan. Dalam prakteknya spektroskopi ultraviolet digunakan terbatas pada sistem-sistem terkonjugasi.

Bagian molekul yang mengabsorpsi dalam daerah ultra violet dan daerah sinar tampak dinyatakan sebagai gugus kromofor. Dalam satu molekul dapat dikandung beberapa kromofor. Jika kromofor dipisahkan satu sama lain paling sedikit oleh dua atom karbon jenuh, maka tidak ada kemungkinan adanya konjugasi antara gugus kromofor. Kurva absorpsi ikatan ini dengan demikian dilihat dari kromofor yang berdekatan, tersusun secara aditif dari kurva masing-masing absorpsi gugus kromofor. Jika sebaliknya beberapa gugus kromofor terkonjugasi sesamanya, maka akan didapat spektrum

absorpsi yang sangat berbeda dari spektrum absorpsi masing-masing gugus tunggal (Roth and Blaschke, 1998).

### 2.7.2 Spektroskopi *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)

Spektroskopi RMI didasarkan pada penyerapan gelombang radio inti tertentu dalam molekul yang berada di medan magnet yang kuat. Spektrum dari NMR memberikan gambaran mengenai jumlah atom hidrogen dan karbon dalam suatu molekul. Di alam terdapat inti atom yang mempunyai spin, misalnya  $^1_1\text{H}$ ,  $^2_1\text{H}$ ,  $^{13}_6\text{C}$ ,  $^{14}_7\text{N}$ ,  $^{17}_8\text{O}$ , dan  $^{19}_9\text{F}$  dan inti atom yang tidak mempunyai spin, misalnya  $^{12}_6\text{C}$ , dan  $^{16}_8\text{O}$ . Inti atom yang dimanfaatkan pada NMR adalah inti yang mempunyai spin dan yang lazim dipelajari  $^1\text{H}$  (proton).

Medan magnet pada NMR memiliki kedudukan spin yang memiliki energi yang berbeda, karena intinya merupakan partikel yang bermuatan dan setiap inti yang berputar akan menghasilkan medan magnet. Inti hidrogen memiliki spin  $+1/2$  dan  $-1/2$ , moment magnet inti pada hal ini terjadi dalam arah yang berlawanan. Dalam medan magnet, semua proton memiliki momen magnetik searah atau berlawanan terhadap medan magnet luar. Di dalam NMR, inti hidrogen akan berada dalam satu orientasi jikan mengenai medan magnet. Energi spin lebih rendah pada posisi spin  $+1/2$  karena searah dengan medan magnet dan posisi  $-1/2$  memiliki energi yang lebih tinggi karena berlawanan dengan medan magnet (Pavia *et al.*, 2001).

Fenomena resonansi magnetik terjadi bila inti atom berorientasi searah dengan medan magnet akan menyerap energi dan mengubah orientasi spinnya terhadap medan magnet luar. Absorpsi energi oleh inti atom dapat dihitung

dan jumlah energi yang diabsorpsi harus sama dengan perbedaan energi antara dua posisi spin. Pada resonansi inti, setiap proton dalam molekul akan beresonansi pada frekuensi yang berbeda-beda, karena setiap proton dalam molekul dikelilingi oleh elektron dan menunjukkan adanya perbedaan lingkungan. Untuk dapat mengukur resonansi dari proton secara tepat sangat sulit sehingga digunakan senyawa standar yang ditambahkan dalam larutan senyawa yang akan diukur dan frekuensi resonansi setiap proton diukur relatif terhadap frekuensi resonansi dari proton-proton senyawa standar (Pavia *et al.*, 2001; Sastromidjojo, 2001).

### **2.7.3 Liquid Chromatography – Mass Spectrometer (LCMS)**

LCMS merupakan salah satu metode pemisahan dan identifikasi pada senyawa obat atau organik. Metode ini sangat sensitif dan selektif dibandingkan metode deteksi dengan sinar UV biasa (Ortelli *et al.*, 2005). Setelah pemisahan analit pada kolom *Liquid Chromatography*, analit akan masuk ke detektor massa. Di dalam detektor ini, analit akan mengalami ionisasi menjadi ion dalam fase gas. Ion-ion tersebut akan terpisah berdasarkan rasio *mass to charge* ( $m/z$ ) dan akan terdeteksi berdasarkan kelimpahan masing-masing ion. Salah satu metode ionisasi dalam spektrofotometer massa adalah *electrospray ionization* (ESI).

Prinsip kerja dari LC-MS adalah terbentuk droplet campuran pelarut-pelarut (fase gerak *Liquid Chromatography*) dan analit yang bermuatan listrik karena dilewatkan melalui celah sempit yang berpotensi listrik tinggi (4-5 KV). Metode pengionan ESI adalah metode yang sederhana karena hanya

menghasilkan sedikit fragmentasi analit dan proses dapat dilakukan pada tekanan atmosfer. Metode ESI dapat menggunakan pilihan pengionan positif atau negatif akan membuat analit menjadi ion atau mengalami deprotonasi (Kazakevich and LoBrutto, 2006). Kation-kation yang terbentuk dalam metode ESI adalah ion pseudomolekul hasil adisi antara analit dengan proton ( $H^+$ ). Oleh karena itu, nilai berat molekul ( $m/z$ ) dalam spektra yang dihasilkan akan sering bernilai  $[M+H]^+$  atau  $[2M+H]^+$ , dengan M adalah bobot molekul analit (Kazakevich and LoBrutto, 2006).

## 2.8 Tinjauan Tentang Amebiasis

Amebiasis merupakan penyakit infeksi usus besar yang disebabkan oleh parasit usus golongan protozoa yaitu *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*). Parasit ini sering ditemukan dalam usus besar manusia, primata tertentu dan beberapa hewan lain. Penyakit ini tersebar hampir di seluruh dunia terutama di negara sedang berkembang yang berada di kawasan daerah tropis. Parasit ini awalnya hidup komensal (apatogen) di dalam lumen usus besar, namun pada kondisi tertentu dapat berubah menjadi patogen dengan cara membentuk koloni di dinding usus dan menembus dinding usus sehingga menimbulkan ulserasi. Protozoa *E. histolytica* dapat menyebabkan beberapa manifestasi klinis berupa amebiasis intestinal, amebiasis ekstra-intestinal (terutama di hati) dan amebiasis lain yang lebih jarang ditemukan misalnya amebiasis kulit, paru, otak dan organ lainnya (Cahill, 1996).

Secara umum amebiasis dapat terjadi di intestinal (amebiasis intestinal) dan di luar intestinal (amebiasis ekstra-intestinal). Amebiasis intestinal

menunjukkan bahwa organisme ini hanya terdapat pada traktus gastrointestinal, tanpa invasi secara makroskopis maupun mikroskopis ke batas mukosa. Amebiasis intestinal dapat berupa infeksi yang simtomatik atau asimtomatik. Infeksi simtomatik memiliki gejala berupa diare dengan tinja yang berlendir atau disertai darah, tenesmus anus (nyeri ketika buang air besar), serta perasaan tidak enak di perut dan mules. Infeksi asimtomatik tidak menimbulkan gejala yang jelas sehingga sering kali tidak disadari. Sebanyak 90% infeksi *E. histolytica* pada manusia bersifat asimtomatik (Jawetz, *et al.*, 1986).

Pada amebiasis ekstra-intestinal organisme *E. histolytica* telah melakukan invasi ke batas mukosa traktus gastrointestinal dan masuk ke dalam peredaran darah, kemudian terbawa aliran darah ke bagian tubuh lainnya, terutama hati. Infeksi ekstra-intestinal bersifat metastatik dan jarang terjadi dengan penyebaran langsung dari usus. Bentuk yang paling sering terjadi adalah hepatitis amuba atau abses hati, yang dianggap disebabkan oleh mikroemboli tropozoit. Diagnosis amebiasis ekstraintestinal sulit untuk diidentifikasi, tinja yang diperiksa sering negatif terhadap adanya trofozoit dan kista. Pada pemeriksaan fisik yang paling sering ditemukan adalah kondisi abdomen yang lunak pada kuadran atas kanan, diagnosis yang pasti adalah dengan melakukan aspirasi jarum rongga abses yang akan menemukan bahan berwarna coklat atau merah coklat. Amebiasis ekstraintestinal dapat juga dijumpai di penis, vulva, perineum, kulit dekat hati, kulit dekat kolon atau di tempat lain yang berupa ulkus dengan bagian tepi yang tegas, sakit dan mudah berdarah. Jika ditemukan di otak biasanya menunjukkan berbagai

tanda dan gejala seperti abses atau tumor otak, hanya hal ini baru dapat terdiagnosis pada saat otopsi otak (Jawetz, *et al.*, 1986).

Pemeriksaan mikroskopik langsung pada spesimen tinja merupakan metode diagnostik yang paling awal ditemukan dan hingga kini merupakan cara yang paling banyak dilakukan dalam mendiagnosis infeksi berbagai parasit usus. Namun pemeriksaan ini dapat memberikan hasil positif palsu jika terdapat kesalahan identifikasi makrofag sebagai trofozoit dan polimorfonuklear sebagai kista. Pemeriksaan mikroskopik juga kurang dapat membedakan *E. histolytica* dari *E. dispar*. Pemeriksaan mikroskopik terhadap kista dan bentuk trofozoit menggunakan minimal 3 sampel tinja dalam periode 10 hari direkomendasikan karena dapat meningkatkan deteksi dari 85% menjadi 95% (Gandahusada, *et al.*, 1998).

Terdapat beberapa faktor yang dapat berpengaruh terhadap hasil dari metode pemeriksaan mikroskopik. Faktor-faktor tersebut diantaranya: keterlambatan sampainya spesimen (motilitas *E. histolytica* dapat berkurang dan trofozoit dapat lisis dalam 20-30 menit), kesulitan dalam membedakan trofozoit yang non-motil dengan leukosit polimorfonuklear, makrofag, dan sel-sel dalam jaringan, kondisi pengumpulan spesimen yang tidak adekuat, substansi pengganggu (antibiotik, laksatif, anatasid), jumlah spesimen yang tidak kuat, gangguan pada pengawetan spesimen, dan kehadiran amoeba lainnya pada spesimen (Gandahusada, *et al.*, 1998). Kondisi higienis perorangan dan sanitasi lingkungan merupakan faktor utama pencegahan terjadinya disentri oleh amuba.

## 2.9 Tujuan Tentang Morfologi dan Siklus Hidup *E. histolytica*

Dalam siklus hidupnya, *E. histolytica* mempunyai 2 stadium, yaitu stadium trofozoit (bentuk histolitika dan bentuk minuta) dan stadium kista. Bentuk histolitika dan bentuk minuta merupakan bentuk trofozoit (Jawetz, *et al.*, 2004).

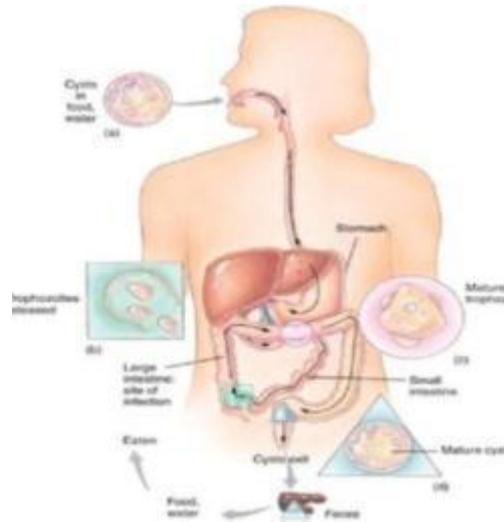
Bentuk histolitika bersifat patogen dengan ukuran yang lebih besar dibandingkan bentuk minuta. Bentuk histolitika memiliki diameter 12-60 mikron, ukuran yang lebih besar ditemukan pada jaringan dan ukuran yang lebih kecil ditemukan pada karier asimtomatik. Endoplasma mengandung butiran halus, biasanya tidak mengandung bakteri atau sisa makanan, tetapi mengandung sel darah merah. Ektoplasmanya tidak berwarna dan terdapat pada bagian terluar sel. Terdapatnya pseudopodium yang dibentuk oleh ektoplasma memudahkan *E. histolytica* untuk bergerak secara cepat. Bentuk ini berkembang biak dengan pembelahan biner dalam jaringan yang ditempatinya dan bersifat merusak jaringan sekitarnya melalui sekresi enzim proteinase. Bentuk minuta merupakan bentuk pokok (esensial) dalam daur hidup *E. histolytica*. Bentuk minuta berukuran 10-20 mikron, memiliki inti entamoeba dengan endoplasma berbutir-butir halus. Pada bagian endoplasmanya tidak terdapat SDM tetapi mengandung bakteri serta sisa makanan. Pseudopodium yang ada, dibentuk secara perlahan-lahan sehingga pergerakannya relatif lambat (Jawetz, *et al.*, 2004).

Bentuk kista dibentuk di rongga usus besar, ukurannya 10-20 mikron, dengan bentuk bulat hingga lonjong, mempunyai dinding kista sebagai pelindung diri dan berinti entamuba. Dalam tinja, bentuk ini biasanya

memiliki inti sebanyak 1, 2, atau 4. Pada endoplasma terdapat benda kromatoid berukuran besar yang sebenarnya merupakan kumpulan ribosom. Selain itu, juga terdapat vakuola glikogen sebagai penyimpanan cadangan makanan. Pada kista yang lebih matang, benda kromatoid dan vakuola glikogen biasanya sudah tidak terdapat lagi. Bentuk kista memiliki viabilitas yang tinggi, yakni dapat bertahan hingga 3 bulan pada lingkungan yang sesuai (Jawetz, *et al.*, 2004).

Infeksi terjadi dengan menelan kista yang matang. Bila kista yang matang tertelan, kista tersebut akan tetap utuh ketika sampai di lambung. Terdapatnya dinding kista yang kuat menyebabkan kista dapat bertahan terhadap asam lambung. Dalam rongga usus halus terjadi ekskistasi dengan keluarnya bentuk-bentuk minuta yang kemudian menuju usus besar. Bentuk minuta ini kemudian dapat berubah menjadi bentuk histolitika yang patogen dan hidup di mukosa usus besar serta dapat menimbulkan gejala. Melalui aliran darah, bentuk histolitika ini dapat menyebar hingga ke jaringan hati, paru dan otak (Jawetz, *et al.*, 2004).

Dalam keadaan *an-aerob*, *E. histolytica* tumbuh optimal dan memperbanyak diri. Jika menginvasi dinding usus, trofozoit mencapai ukuran yang paling besar dan sering ditemukan adanya sel darah merah. Trofozoit mampu menghancurkan sel darah merah ketika terjadi kontak galur yang patogen biasanya menelan jumlah sel darah merah lebih banyak dan mempunyai gambaran elektroforetik isoenzim berbeda dari strain yang non-patogen. Pra-kista akan terbentuk ketika keadaan metabolik menjadi tidak cocok sehingga dimulai lagi awal dari siklus hidup (Suriptiastuti, 2010).



Gambar 2.7 Siklus hidup *Entamoeba histolytica* (Suriptiastuti, 2010)

Faktor yang mempengaruhi proses invasi amuba adalah jumlah amuba yang masuk ke dalam tubuh, kemampuan patogenik strain parasit, dan faktor inang, seperti pergerakan usus, kemampuan imunitas dan adanya bakteri enterik yang cocok yang dapat meningkatkan pertumbuhan amuba. Sebagian besar orang yang terinfeksi tidak sakit, tetapi hanya menyimpan amuba yang mendiami lumen dan membentuk kista yang dikeluarkan dalam tinja (Suriptiastuti, 2010).

### 2.10 Tujuan Enzim NAD kinase pada *E. histolytica*

Nikotinamida adenina dinukleotida ( $\text{NAD}^+$ ), adalah koenzim yang ditemukan di semua sel hidup. Dalam metabolisme,  $\text{NAD}^+$  terlibat dalam reaksi redoks, dengan membawa elektron dari satu reaksi ke reaksi lainnya. Koenzim ini oleh karenanya ditemukan dalam dua bentuk yang berbeda, yaitu  $\text{NAD}^+$  sebagai oksidator dan  $\text{NADH}$  sebagai reduktor.  $\text{NAD}^+$  menerima elektron dari molekul lain dan menjadi tereduksi ( $\text{NADH}$ ), dan begitu pula

sebaliknya. Reaksi transfer elektron ini merupakan salah satu fungsi  $\text{NAD}^+$ . Namun ia juga memiliki fungsi lain pada proses seluler lainnya, utamanya adalah sebagai substrat enzim yang menambah maupun mengurangi gugus fungsi pada protein dalam modifikasi pascatranslasional. Karena fungsinya yang penting, enzim-enzim yang terlibat dalam metabolisme sering menjadi target pengembangan obat-obatan.

Enzim NAD kinase adalah enzim yang bertanggung jawab untuk sintesis pembentukan  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  dari  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  pada proses metabolisme sel. Pada *E. histolytica*, enzim NAD kinase memainkan peran penting dalam memelihara terjadinya reaksi redoks intraseluler dan membantu parasit dalam menanggapi stres oksidatif dari lingkungan sekitarnya. Jika kerja dari enzim ini dihambat maka reaksi oksidatif yang berlebihan pada jaringan intraseluler dan akan menyebabkan kerusakan pada sel (Jeelani *et al.*, 2013).