

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengisolasi senyawa aktif dari tanaman *C. sumatranum* (Jack) Blume. Pemilihan tanaman ditentukan berdasarkan hasil skrining uji aktivitas antiamuba dari beberapa tanaman hasil eksplorasi dari Kebun Raya Balikpapan. Teknik sampling dalam penelitian ini dilakukan dengan mengumpulkan simplisia kulit batang *C. sumatranum* dari Kebun Raya Balikpapan. Simplisia diekstraksi dan selanjutnya diuji aktivitas antiamuba secara *in vitro*. Dalam penelitian ini dilakukan beberapa tahap penelitian antara lain ekstraksi, fraksinasi, isolasi dari kulit batang *C. sumatranum* dan selanjutnya diuji aktivitas antiamuba secara *in vitro*. Proses isolasi dan identifikasi senyawa aktif yang akan dilakukan pada penelitian ini didasarkan pada konsep *bioassay guided isolation*. Senyawa aktif yang akan ditentukan dari tanaman tersebut didasarkan pada bioaktivitasnya dalam menghambat pertumbuhan *E. histolytica*.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah ekstrak, fraksi dan isolat dari kulit batang *Cratoxylum sumatranum* (Jack) Blume dari Kebun Raya Balikpapan, Kalimantan Timur.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini antara lain:

1. Variabel bebas adalah konsentrasi ekstrak, fraksi, dan isolat dari kulit batang *C. sumatranum*.
2. Variabel tergantung adalah aktivitas antiamuba berdasarkan nilai IC_{50} dan toksisitasnya berdasarkan nilai CC_{50} .

4.4 Definisi Operasional

1. Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan cara mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati maupun hewani.
2. Fraksi adalah hasil fraksinasi dari ekstrak tanaman *C. sumatranum* dengan cara kromatografi kolom.
3. Isolat adalah senyawa murni yang diperoleh dari proses fraksinasi dan pemurnian.
4. Aktivitas antiamuba adalah kemampuan ekstrak, fraksi dan isolat sampel dalam menghambat pertumbuhan *E. histolytica* berdasarkan uji *cell-based assay* dan *enzymatic assay*.
5. IC_{50} adalah konsentrasi sampel yang dapat menghambat pertumbuhan *E. histolytica* sebanyak 50%.
6. CC_{50} adalah konsentrasi sampel yang dapat menyebabkan kematian sel Huh7it sebanyak 50%.

4.5 Bahan Penelitian

Bahan simplisia yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang *Cratoxylum sumatranum* (Jack) Bl. yang diperoleh dari Kebun Raya

Balikpapan, Kalimantan Timur pada Nopember 2015. Sebelum digunakan, bahan disimpan dalam bentuk rajangan kering. Determinasi tanaman dilakukan oleh Herbarium Kebun Raya Purwodadi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Biologi, Pasuruan, Jawa Timur. No. Determinasi : 0074/IPH.06/HM/XII/2015.

4.6 Bahan untuk Ekstraksi, Fraksinasi dan Isolasi

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah bahan kimia dengan kualitas pro-analisis (p.a) yang diperoleh dari Merck, yaitu heksana p.a, diklorometana p.a, etil asetat p.a, kloroform p.a, asetonitril p.a, metanol p.a. aquadestilata, penampak noda H₂SO₄ 10%, metanol pro HPLC (Merck), air pro HPLC (Merck), plat KLT silika gel 60 F₂₅₄ nm (Merck 0,25 mm), plat KLT RP-18 (Merck 0,5 mm).

4.7 Bahan Uji Aktivitas Antiamuba dan Uji Toksisitas

Sel *E. histolytica* strain HM-1:IMSS clone 6 (diisolasi dari fases atau cairan abses hati pada pasien amebiasis invasif dan kista asimtomatik), *Dimethyl sulfoxide* (DMSO), media *Bisate-Iron-Serum* (BI-S, Sigma), media *Minimal Essential Medium* (Opti-MEM, GIBCO), reagen WST-1 (Roche). Enzim NAD kinase, media INT, *miliQ water*, tris HCL pH 7,5.

Sel Huh7it yang dikembangkan pada *Dulbeco's Modified Eagle Medium* (Wako, Osaka, Japan), *Dimethyl sulfoxide* (DMSO), *Non-Essential Amino Acids* (NEAA, GIBCO–Invitrogen), 0,15 mg/mL larutan kanamycin

(SIGMA), *Phosphate Buffered Saline* (PBS, GIBCO-Invitrogen), reagen 3-(4',5'-dimethylthiazol-2'-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT).

4.8 Instrument Penelitian

4.8.1 Instrument Penelitian untuk Ekstraksi, Fraksinasi dan Isolasi

Alat untuk ekstraksi, fraksinasi dan isolasi tanaman antara lain: ultrasonic SONICA, rotavapor BUCHI, timbangan analitik, bejana kromatografi, pipa kapiler, vial penyemprot noda, TLC visualize (Camag), corong pisah dan alat-alat gelas.

Alat untuk identifikasi senyawa aktif: spektrofotometer NMR (JEOL, 400 MHz), LC-QTOF-MS/MS (Agilent), HPLC (Shimadzu, LC-06) dengan spesifikasi kolom RP-18 *shimpack* 4,6 x 250 mm, detektor PDA SPD-M20A dan pump LC-6AD.

4.8.2 Instrument Penelitian untuk uji Aktivitas Antiamuba dan uji Toksisitas

GloMax Microplate Multidetector Reader (Promega), TC disk, tube (15 mL, dan 50 mL), pipet disposable 10 mL, *96-well plate*, *multichannel-pipette*, *pipette-man*, *micropipette*, vortex, *sentrifuge*, *CO₂ incubator*, *microscope inverted*.

4.9 Lokasi dan Waktu Penelitian

- a. Ekstraksi, fraksinasi dan isolasi tanaman dilakukan di Laboratorium NPMRD, Lembaga Penyakit Tropis, Universitas Airlangga Surabaya
- b. Uji aktivitas antiamuba dan uji toksisitas di Laboratorium NPMRD, Lembaga Penyakit Tropis, Universitas Airlangga Surabaya

c. Penelitian dilakukan mulai bulan Juli 2017 - Juli 2019

4.10 Prosedur Penelitian

4.10.1 Ekstraksi Bertingkat Kulit Batang *C. sumatranum*

Proses ekstraksi dari kulit batang *Cratoxylum sumatranum* dilakukan secara bertingkat dari pelarut non-polar menuju pelarut polar menggunakan heksana dan diklorometana. Sebanyak 400 gram sampel simplisia yang telah dihaluskan, kemudian direndam dengan 2 liter pelarut heksana dan disonikasi selama 2x3 menit. Setelah itu, ekstrak disaring untuk memisahkan filtrat dan residunya. Residu simplisia hasil ekstraksi dengan heksana, selanjutnya direndam lagi dengan 2 liter pelarut diklorometana dan disonikasi selama 2x3 menit. Setelah itu, ekstrak disaring untuk memisahkan filtrat dan residunya. Masing-masing filtrat yang diperoleh dari hasil ekstraksi dengan heksana dan diklorometana, kemudian dipisahkan dengan rotavapor sampai didapatkan ekstrak kental dan ditimbang berat rendemennya.

4.10.2 Pemisahan Ekstrak Diklorometana Kulit Batang *C. sumatranum* dengan Kromatografi Kolom

Ekstrak diklorometana difraksinasi menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam silika gel dan fase gerak gradien pelarut campuran heksana, etil asetat, kloroform dan metanol untuk memperoleh fraksi-fraksi. Tahapan kerja fraksinasi dengan kromatografi kolom adalah menimbang silika gel 60 sebagai fase diam sebanyak 60 gram, kemudian fase diam dimasukkan ke dalam kolom dengan cara dilarutkan terlebih dahulu dalam fase gerak. Sampel ekstrak kering diklorometana *C. sumatranum* ditimbang sebanyak 1

gram, dilarutkan dengan 5 mL diklorometana dan ditambahkan 1 gram silika mess kemudian dirotavapor hingga diperoleh serbuk kering. Selanjutnya sampel ekstrak diletakkan di atas kolom (fase diam) yang telah disiapkan dan ditutup menggunakan kapas. Kolom diekspansi dengan fase gerak gradien dimulai dari campuran pelarut heksana dan etil asetat dengan perbandingan 80/10 v/v, 60/40 v/v, 40/60 v/v, 20/80 v/v dan etil asetat 100%, kemudian dilanjutkan dengan campuran pelarut kloroform dan metanol dengan perbandingan 95/5 v/v, 90/10 v/v, 60/40 v/v, 30/70 v/v dan terakhir metanol 100%. Hasil filtrat ditampung, kemudian dilihat profilnya dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Hasil pemisahan tahap ini diperoleh 12 fraksi yaitu fraksi F1-F12.

4.10.3 Pemisahan Fraksi Aktif F4 dengan HPLC Semipreparatif

Sebanyak 10 mg fraksi F4 dilarutkan dalam 1 mL metanol. Pemisahan dilakukan menggunakan HPLC Shimadzu LC-06 dengan fase diam kolom semipreparatif RP-18 9,4 x 250 mm, dan fase gerak gradien metanol-air dengan perbandingan 50/50 v/v menuju ke 90/10 v/v dan kembali lagi ke 50/50, detektor PDA, kecepatan alir 1,5 mL/menit. Volume tiap injeksi sampel adalah 150 µL. Hasil pemisahan ditampung dan dikeringkan dengan rotavapor, kemudian ditimbang. Hasil pemisahan tahap ini diperoleh 6 subfraksi yaitu F4.H1-F4.H6, dimana 2 subfraksi F4.H3 dan F4.H4 adalah senyawa isolat murni.

4.10.4 Identifikasi Struktur Kimia dari Isolat F4.H3 dan F4.H4

1. Identifikasi dengan KLT

Untuk melihat profil kandungan senyawa dari sampel dilakukan pengujian KLT dengan fase diam RP-18, fase gerak metanol-air (70/30 v/v), kemudian disemprot dengan penampak noda H₂SO₄ 10%.

2. Identifikasi dengan HPLC

Identifikasi terhadap kemurnian sampel dilakukan menggunakan HPLC dengan kolom RP-18 *shimpack* 4,6 x 250 mm, shimadzu LC-06, detektor PDA, kecepatan alir 0,5 mL/menit, fase gerak gradien metanol-air. Sebanyak 1 mg sampel dilarutkan dalam metanol dan diinjeksikan sebanyak 40 µL.

3. Identifikasi dengan spektroskopi NMR

Untuk mengidentifikasi struktur kimia dari sampel dilakukan pengukuran terhadap profil ¹H-NMR dan ¹³C-NMR menggunakan spektrofotometer NMR JEOL 400 MHz. Sebanyak 5 mg sampel dilarutkan dalam CDCl₃, lalu diukur profil ¹H-NMR, ¹³C-NMR dan NMR 2 dimensi.

4. Identifikasi dengan LCMS

Sebanyak 1 mg sampel dilarutkan dalam metanol, kemudian disaring dengan *nylon membrane filter* Whatman 0,22 µm. Sampel dalam bentuk larutan jernih diinjeksi ke *injector system* LCMS (*ESI system*; kolom: Agilent poroshell 120, RP-18, ukuran 3,0 x 50, 2,7 µm), kemudian dieluasi dengan menggunakan fase gerak yang sudah dioptimasi sebelumnya yaitu metanol-air (80/20 v/v). Identifikasi dilakukan pada kecepatan aliran 0,25 mL/menit selama 10 menit.

4.11 Uji Aktivitas Antiamuba

4.11.1 Uji Aktivitas Antiamuba Berdasarkan *cell-based assay*

Sel *E. histolytica* strain HM-1:IMSS (klon 6) dibudidayakan dalam media BI-S yang dilengkapi dengan 10% (v/v) serum *Albumin Bovine Serum* dalam 1% (v/v) larutan *Diamond Vitamin-Tween*, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 2 hari untuk mencapai pertumbuhan sel 80%.

Sampel hasil ekstraksi, fraksinasi dan isolasi, masing-masing dilarutkan dalam DMSO dan dibuat seri variasi konsentrasi : 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 µg/mL. Suspensi sel *E. histolytica* dalam media BI-S dimasukkan kedalam 96 *well-plate* dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 35,5 °C. Setelah 30 menit inkubasi media dalam plate uji diganti dengan media baru yang sudah ditambahkan 2,5 µL sampel. Selanjutnya sel diinkubasi lagi selama 48 jam pada suhu 35,5 °C. Setelah 48 jam inkubasi, media sel diganti dengan 100 µL reagen WST-1 yang dipanaskan dalam media Opti-MEM dan diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37 °C. Kemudian hasil uji dibaca pada *GloMax Microplate Multidetector Reader* (Promega) pada panjang 560 nm. Setiap uji sampel ekstrak dilakukan dengan dua kali replikasi.

4.11.2 Uji Aktivitas Antiamuba Berdasarkan *enzymatic assay*

Sampel hasil ekstraksi, fraksinasi dan isolasi, masing-masing dilarutkan dalam DMSO dan dibuat seri variasi konsentrasi : 100; 50; 25; 12,5; 6,25 µg/mL. Kemudian disiapkan larutan Master Mix (campuran antara ATP, INT media, tris HCl, miliQ water dan enzim NAD kinase/NO1). Sebanyak 96 µL (tiap sumuran) larutan Master Mix ditambahkan ke dalam 96

well-plate. Selanjutnya pada setiap sumuran ditambahkan dengan 5 μL sampel, 14 μL larutan NADH dan tris HCl pH 7,5. Sampel enzim yang diuji kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruangan. Selesai proses inkubasi, sampel enzim hasil pengujian dibaca pada *GloMax Microplate Multidetection Reader* (Promega) pada panjang 490 nm. Setiap pengujian sampel ekstrak dilakukan dengan dua kali replikasi.

4.12 Uji Toksisitas (*MTT Cell Proliferation Assay*)

Uji toksisitas ekstrak, fraksi dan isolat dilakukan menggunakan metode *MTT assay*. Sel Huh7it dipapar dengan bahan uji ekstrak, fraksi dan isolat pada pengenceran 1000; 500; 250; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 $\mu\text{g/mL}$ dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37 °C. Medium dibuang setelah inkubasi dan ditambah 150 μL medium yang mengandung MTT (15 μL) dan diinkubasi kembali selama 4 jam. Selanjutnya ditambah 100 μL DMSO untuk melarutkan endapan yang terbentuk dari hasil reaksi MTT. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 560 dan 750 nm menggunakan *GloMax Microplate Multidetection Reader* (Promega) (Adianti *et al.*, 2014).

Prinsip pengujian dengan *MTT assay* adalah uji pewarnaan yang mengukur reduksi MTT (kuning) melalui *mitochondrial succinate dehydrogenase*. MTT masuk ke sel melewati mitokondria dan tereduksi menjadi formazan (sifatnya tidak larut) yang berwarna ungu. Sel tersebut kemudian dilarutkan dengan pelarut organik (yaitu isopropanol) dan reagen formazan yang terbentuk diukur absorbansi dengan spektrometri (panjang

gelombang 560 dan 750 nm). Reduksi MTT hanya dapat muncul di sel yang hidup (metabolisme aktif).

4.13 Analisis Data

Pada penelitian ini, hasil dari uji aktivitas antiamuba akan didapatkan data persen hambatan (inhibisi) terhadap pertumbuhan amuba dari masing-masing dosis. Perhitungan persentase penghambatan ditentukan dengan rumus :

% Hambatan =

$$\left\{ \frac{(\text{Abs kontrol} - \text{Abs blanko}) - (\text{Abs hasil (sampel)} - \text{Abs blanko})}{(\text{Abs kontrol} - \text{Abs blanko})} \right\} \times 100\%$$

Keterangan: Abs = Absorbansi hasil pembacaan *GloMax Microplate Reader*

Selanjutnya hasil persentase hambatan tersebut digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} menggunakan analisa Probit Log dengan SPSS. Suatu senyawa bahan alam dikatakan potensial sebagai antiamuba bila memiliki nilai konsentrasi penghambatan (IC_{50}) $< 50 \mu\text{g/mL}$ (Singh *et al.*, 2009).

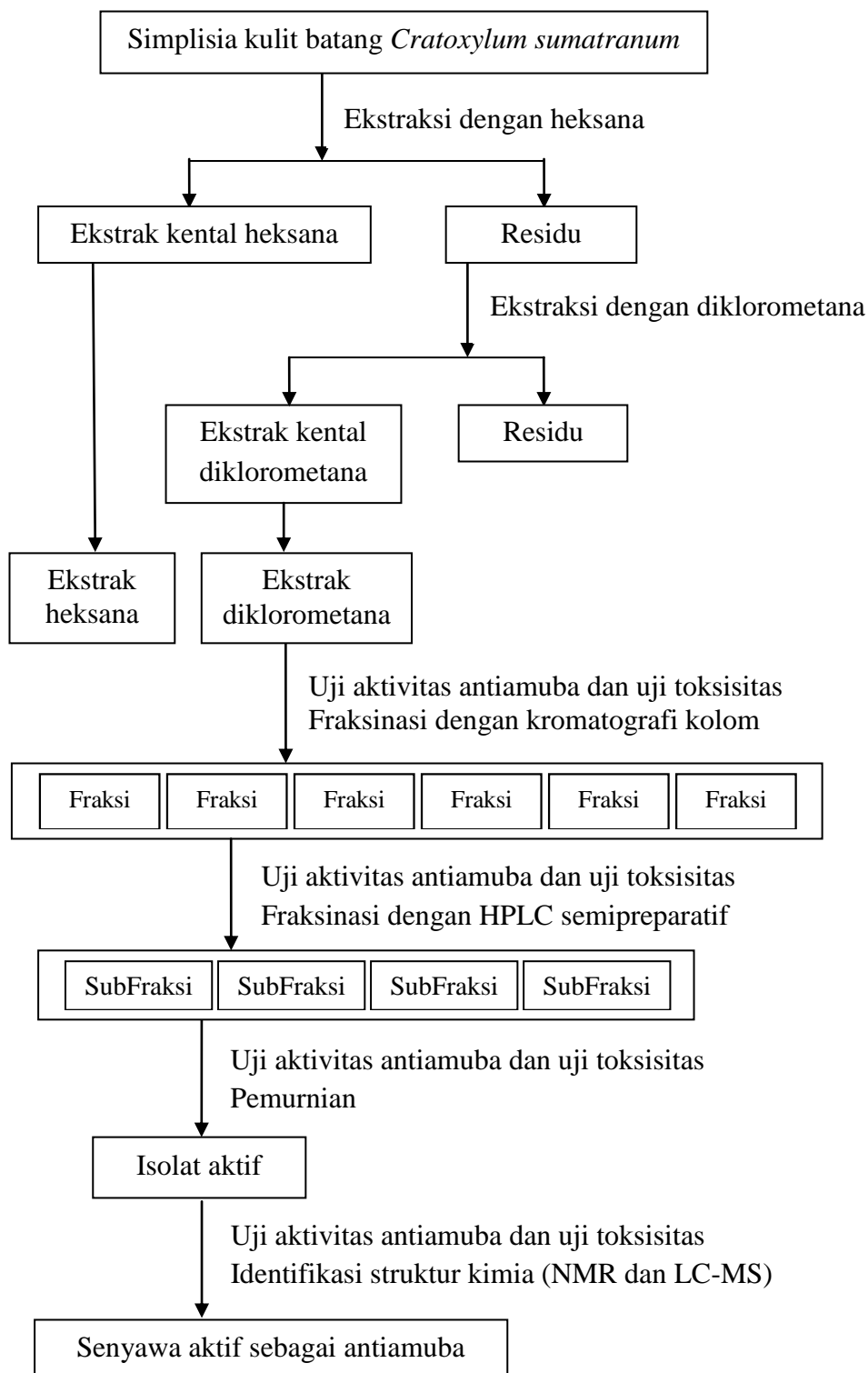
Sedangkan dari hasil uji toksisitas akan didapatkan data persentase viabilitas pertumbuhan sel Huh7it pada masing-masing dosis. Perhitungan persentase viabilitas ditentukan dengan rumus :

% Viabilitas sel =

$$\left\{ \frac{\text{Absorban hasil (sampel)}}{\text{Absorban kontrol}} \right\} \times 100\%$$

Selanjutnya hasil persentase viabilitas tersebut digunakan untuk menentukan nilai CC_{50} menggunakan analisa Probit Log dengan SPSS.

4.14 Skema Rancangan Penelitian



Gambar 4.1 Skema operasional penelitian