

**PROFIL KROMATOGRAM
EKSTRAK METANOL CABE JAWA (*Piper retrofractum* Vahl.)
MENGUNAKAN SEPACORE YANG TERJERAP PADA
GLI-DYNABEADS**

**NUR HASANAH
N111 08 112**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

**PROFIL KROMATOGRAM
EKSTRAK METANOL CABE JAWA (*Piper retrofractum* Vahl.)
YANG TERJERAP PADA GLI-DYNABEADS MENGGUNAKAN
SEPACORE**

SKRIPSI

**Untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana**



**NUR HASANAH
N111 08 112**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

PERSETUJUAN

**PROFIL KROMATOGRAM
EKSTRAK METANOL CABE JAWA (*Piper retrofractum* Vahl.)
MENGUNAKAN SEPACORE YANG TERJERAP PADA
GLI-DYNABEADS**



Pembimbing Utama,

Pembimbing Pertama,

Drs. Burhanuddin Taebe, M.Si., Apt.
NIP. 19480727 197903 1 001

Yusnita Rifai, S.Si.,M. Pharm.,Ph.D.,Apt.
NIP. 19751117 200012 2 001

Pada tanggal, 31 Juli 2013

PENGESAHAN

**PROFIL KROMATOGRAM
EKSTRAK METANOL CABE JAWA (*Piper retrofractum* Vahl.)
MENGUNAKAN SEPACORE YANG TERJERAP PADA
GLI-DYNABEADS**

Oleh :
Nur Hasanah
N 111 08 112

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
Pada Tanggal 31 Juli 2013

Panitia Penguji Skripsi

1. Ketua
Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt. :
2. Sekretaris
Usmar, S.Si., M.Si., Apt. :
3. Ex Officio
Drs. Burhanuddin Taebe, M.Si., Apt. :
4. Ex Officio
Yusnita Rifai, S.Si., M.Pharm., Ph.D., Apt. :
5. Anggota
Abd. Rahim, S.Si., M.Si., Apt. :

Mengetahui :
Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin

Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA., Apt.
NIP. 19560114 198601 2 001

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah karya saya sendiri, tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila dikemudian hari terbukti bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh, batal demi hukum.

Makassar, 31 Juli 2013

Penyusun,

Nur Hasanah

UCAPAN TERIMA KASIH



Subhanallahu Wal Hamdulillahu Wa Laa Ilaaha Illallahu Wallahu

Akbar. Tiada kata terinda yang patut keluar dari lisan penulis, selain kata “syukur” ke hadirat Allah Subhanahu Wa Ta’ala yang telah melimpahkan rahmat dan inayah-Nya kepada penulis sehingga skripsi ini bisa terselesaikan. Shalawat serta salam selalu tercurahkan kepada junjungan kita, Nabiullah Muhammad Shallallahu ‘alaihi Wasallam. Terima kasihku terucap dari hati yang paling dalam, serta rasa sayang penulis haturkan kepada ayahanda **H. Appe** dan ibunda **Hj. Nur Asiah** atas segala pengorbanan yang telah dilakukan, baik itu pengorbanan moril maupun materil, demi untuk melihat penulis bisa merengkuh keberhasilan. Penulis sadar bahwa tidak ada yang dapat penulis lakukan untuk membalas pengorbanan tersebut, tetapi penulis hanya dapat memanjatkan do’a kepada Allah SWT, sesungguhnya Allah Maha Tahu dan Maha Bijaksana. *“Sayangilah kedua orang tua hamba, sebagaimana mereka telah menyayangi hamba pada waktu kecil. Ampunilah pula dosa mereka, ya Allah.*

1. Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada Bapak Drs. Burhanuddin Taebe, M.Si., Apt. selaku pembimbing utama penulis, Yusnita Rifai S.Si.,M.Pharm.,Ph.D.,Apt.

selaku pembimbing pertama penulis, yang telah bisa mengayomi sebagai orang tua kedua penulis, bisa sebagai sahabat yang bersedia menerima segala bentuk curhatan penulis, semoga Allah SWT membalas segala kebaikan itu, amin.

2. Saudara-saudaraku; Fatmawatie, Achmad Afandy, Yusuf, Ratna Ningsih dan Nursamsi serta seluruh keluargaku yang telah memberiku semangat untuk menggapai asa dan cita demi keberhasilanku di dunia, penulis haturkan terima kasih.
3. Kepada ibu Dekan Fakultas Farmasi, Prof. Dr. Elly Wahyuddin, DEA; ibu Prof. Dr.Hj.rer.nat Marianti A Manggau, Apt. selaku penasehat akademik penulis; dan bapak/ibu dosen Fakultas Farmasi UNHAS; terima kasih atas ilmu, nasehat, dan saran yang telah diberikan selama penulis menjalani perkuliahan ini.
4. Kepada teman seperjuangan penelitian penulis, Defi Liestiwati P., S.Si. dan Ramdhayani, S.Si. terimakasih untuk kesabaran dan rasa memahami yang lebih selama ini. Kepada kak Ismail S.si,Apt, kak Aminullah S.si,Apt dan ibu Beti Sapada, terimakasih telah mengizinkan penulis melakukan penelitian di PKP dan membantu dalam mengoperasikan Sepacore.
5. Kepada teman-teman terbaik penulis, Sazidha F. Abay, S.Si., Fitri rejky amelia, S.Si., Hartanti Probo Rini, S.Si., Sri wahyuningsih, S.Si.,

dan Amirah Pratiwi, S.Si.; terimakasih telah menjadi bagian dalam cerita hidup penulis.

6. Kepada Izwar Ismail, terima kasih untuk pengertian, perhatian dan kasih sayang yang tiada henti-hentinya diberikan kepada penulis di saat suka maupun duka hingga penulis dapat melalui semuanya dengan senyuman.
7. Kepada saudara/i angkatan 2008 dan warga Kemafar Fakultas Farmasi UNHAS. Terima kasih banyak atas semua persaudaraan dan persahabatan yang telah kalian tanamkan selama ini, begitu juga canda dan tawa yang telah kalian tuliskan dalam setiap episode perjalanan hidup penulis.
8. Seluruh Pegawai Akademik, staff pegawai dan seluruh laboran Fakultas Farmasi UNHAS yang telah banyak membantu penulis dalam dunia kampus ini.
9. Terimakasih kepada semua pihak yang tidak dapat disebut satu per satu dan telah banyak membantu penulis, baik didalam menyusun skripsi ini ataupun dalam kehidupan sehari-hari. Semoga diberi kemudahan oleh Allah SWT dalam menjalani hidup kalian.

Penulis sangat menyadari, dalam penyusunan skripsi ini masih banyak kekurangan dan jauh dari bentuk kesempurnaan, sehingga saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan oleh penulis kedepannya.

Makassar, 31 Juli 2013

Penulis,

Nur Hasanah

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian profil kromatogram ekstrak metanol cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.) yang aktif pada protein Glioma (GLI) menggunakan Sepacore. Penelitian ini bertujuan untuk menambah informasi profil kromatogram kandidat obat anti kanker yang bekerja spesifik terhadap protein target *GLI* dengan menggunakan alat Sepacore dengan waktu retensi dari senyawa-senyawa hasil isolasi tanaman cabe jawa. Sampel tanaman cabe jawa yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dan dideterminasi oleh UPT Materia Medika, Kota Batu, Jawa Timur. Ekstrak metanol cabe jawa ditambahkan dengan suspensi GLI-dynabeads dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit dan dijaga suhunya pada -4°C . Endapan yang terbentuk kemudian ditambahkan pelarut metanol lalu dirangkaikan dengan alat Sepacore menggunakan *catridge PP 12/150* dengan kecepatan alir 10 ml/menit dan komposisi eluen mulai 0% sampai 100% dan menggunakan pelarut etil asetat dan n-heksan. Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah waktu peak (puncak) dan waktu retensi (t_R) (menit). Hasil analisis menunjukkan bahwa pada kromatogram cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.) terdapat sembilan puncak.

ABSTRACT

Study on chromatogram profiles of methanol extract from Long piper (*Piper retrofractum* Vahl.) which active in protein glioma (GLI) using Sepacore has been done. This study aimed to inform chromatogram profile anti-cancer drug candidates that work specific on the target protein GLI using the Sepacore based on retention time of the compounds isolated from long piper. Long piper samples used in this study were obtained and determined by UPT Materia Medika, Batu, East Java. Long piper methanol extract added with GLI-dynabeads suspension and centrifuged at 12,000 rpm for 10 minutes and maintained at -4 ° C. Precipitated form was then added and the methanol solvent was coupled with tool use cartridge Sepacore PP 12/150 with a flow rate of 10 ml / min and composition of solvent from 0% to 100% by using solvent ethyl acetate and n-hexane. The parameters used in this study was the peak time (peak) and the retention time (tR) (min). The analysis showed that in the chromatogram long piper (*Piper retrofractum* Vahl.) there werw nine peaks.

DAFTAR ISI

	halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	iv
ABSTRAK	x
ABSTRACT	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
II.1 Uraian Tanaman	5
II.1.1 Klasifikasi Tanaman	5
II.1.2 Nama Daerah	5
II.1.3 Morfologi Tanaman	6
II.1.4 Kandungan Kimia	6
II.1.5 Kegunaan Tanaman	6
II.2 Metode Ekstraksi Bahan Alam	7
II.2.1 Definisi Ekstrak	7
II.2.2 Definisi Ekstraksi	7
II.2.3 Tujuan Ekstraksi	8

II.2.4	Jenis-jenis Ekstraksi	8
II.2.5	Metode Ekstraksi Secara Maserasi	8
II.3	Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).....	9
II.3.1	Pengertian KCKT	9
II.3.2	Prinsip Kerja KCKT	10
II.3.3	Penggunaan Metode KCKT	11
II.3.4	Instrumentasi KCKT	13
II.3.5	Waktu Retensi (t_R)	19
II.4	Bioassay	20
II.5	Kanker	20
II.6	Hedgehog	22
II.7	Dynabeads	23
II.8	GLI-GST (<i>Gluthatione Sepharose Transferase</i>)	24
BAB III	PELAKSANAAN PENELITIAN	26
III.1	Penyiapan Alat dan Bahan Penelitian	26
III.2	Penyiapan Sampel Penelitian.....	26
III.3	Ekstraksi.....	26
III.4	Penyiapan dan Pengaktifan GLI-Dynabeads	27
III.5	Kromatografi Ekstrak Menggunakan Sepacore	27
III.6	Analisis dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	28
III.7	Pengumpulan dan Analisis Data	28

BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	29
IV.1 Hasil Penelitian	29
IV.2 Pembahasan	33
BAB V PENUTUP	37
V.1 Kesimpulan	37
V.2 Saran	37
DAFTAR PUSTAKA	38
LAMPIRAN I.....	41
LAMPIRAN II.....	42
LAMPIRAN III.....	43

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Jenis kolom kromatografi cair kinerja tinggi berdasarkan ukurannya	17
2. Data bobot fraksi hasil fraksinasi sepacore untuk tiap puncak	30
3. Data hasil profil kromatogram terhadap Cabe Jawa (<i>Piper retrofractum</i>) pada UV-254	30
4. Data hasil profil kromatogram terhadap Cabe Jawa (<i>Piper retrofractum</i>) pada UV-366	31

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Diagram blok sistem KCKT secara umum.....	13
2. Sampel cabe jawa yang terjerap pada GLI- <i>dynabeads</i> yang ditandai oleh terbentuknya endapan	29
3. Kromatogram ekstrak metanol Cabe jawa (<i>Piper retrofractum</i> Vahl.) menggunakan Sepacore.....	29
4. Kromatogram ekstrak metanol Cabe jawa (<i>Piper retrofractum</i> Vahl.) menggunakan UFLC detektor UV-254 dengan fase gerak metanol dan fase diam ODS	30
5. Kromatogram ekstrak metanol Cabe jawa (<i>Piper retrofractum</i> Vahl.) menggunakan UFLC detektor UV-366 dengan fase gerak metanol dan fase diam ODS.....	31
6. Kromatografi lapis tipis hasil sepacore ekstrak metanol cabe jawa (<i>Piper retrofractum</i> Vahl.)	32
7. Kromatografi lapis tipis hasil sepacore ekstrak metanol cabe jawa (<i>Piper retrofractum</i> Vahl.)	32
8. Cabe jawa (<i>Piper retrofractum</i> Vahl.)	43
9. Buah Cabe jawa (<i>Piper retrofractum</i> Vahl.)	43
10. Serbuk Cabe jawa (<i>Piper retrofractum</i> Vahl.)	44
11. Alat Sepacore (Buchi®)	44
12. Fraksi-fraksi ekstrak metanol cabe jawa (<i>Piper retrofractum</i> Vahl.) setelah di partisi menggunakan Sepacore	45
13. <i>Catridge PP 12/150</i>	45

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
I. Skema kerja	41
II. Isi tiap buffer untuk penyiapan <i>GLI-Dynabeads</i>	42
III. Foto pelaksanaan penelitian	43

BAB I

PENDAHULUAN

Cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.), suku piperaceae (sirih - sirihan) adalah tanaman obat asli Indonesia yang mempunyai kekerabatan dekat dengan tanaman lada. Buah cabe jawa mengandung kavicin, asam palmatik, asam tetrahidropiperik, piperidin, minyak atsiri, dan sesamin dan zat pedas piperin. Pada bagian akar mengandung piperin, pipartin, dan piperlongumin. Piperidin merupakan salah satu senyawa yang memiliki aktivitas sebagai antikanker (1).

Kanker merupakan penyakit degeneratif yang ditandai dengan keadaan sel yang membelah secara terus menerus (proliferasi) dan tidak terkontrol. Pertumbuhan ini akan mendesak dan merusak pertumbuhan sel-sel normal. Sel normal tumbuh dengan suatu tujuan yang jelas yaitu membentuk jaringan tubuh dan mengganti jaringan yang rusak. Sedangkan pertumbuhan sel-sel kanker akan menyebabkan jaringan menjadi besar yang disebut tumor. Jika tidak diobati sel-sel kanker yang tumbuh dengan cepat ini akan menyusup dan menyebar ke jaringan sekitarnya melalui pembuluh darah dan pembuluh getah bening (2).

Beberapa penyebab kanker adalah sel DNA dan beberapa signal, diantaranya *TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)*, dan *Headgehog*. Signal *Headgehog* ini mengambil nama dari ligan polipeptida, suatu signal

molekul antar sel disebut juga *Hedgehog (Hh)* yang ditemukan pada *Drosophila*. *Hedgehog (Hh)* adalah salah satu produk segmen dari gen polaritas *Drosophila*, yang terlibat dalam membangun embrio. Sangat berperan penting pada tahap akhir dari embriogenesis dan metamorfosis (3).

Signal dalam poliferasi kanker *hedgehog* adalah yang mengatur perkembangan embrio dan pemeliharaan jaringan otot dewasa . Ekspresi berlebihan dari *hedgehog* akan terjadi beberapa penyakit yaitu kanker dan kekurangannya dapat menyebabkan cacat lahir bawaan (4). Ligan protein Hh pertama-tama diikat oleh signal pada membran reseptor *patched (PTCH)*, sehingga terjadi penekanan aktivitas *proto-oncogen-smoothed (SMO)* dan pelepasan gen *GLI*. Jika terjadi kelebihan *GLI* dapat memicu terjadinya karsinoma, medula blasoma, kanker pankreas, kanker prostat (5). Sehingga *GLI* target protein dapat digunakan untuk penemuan obat anti kanker.

Magnetic beads berfungsi sebagai magnet yang dapat menjerap senyawa-senyawa aktif dari ekstrak metanol tanaman, sehingga dapat terjerap pada target protein terimmobilisasi yang diinginkan. Alat Sepacore dapat digunakan untuk mengisolasi secara cepat senyawa-senyawa murni dari immobilisasi target protein *GLI* yang telah didapatkan. Isolasi hasil sepacore ekstrak metanol cabe jawa yang aktif akan menghasilkan bahan baku obat anti kanker yang bekerja spesifik pada protein *GLI* (6).

Sepacore merupakan salah satu metode yang termasuk dalam kromatografi cair kinerja tinggi. Keuntungan dari penggunaan alat Sepacore adalah mempercepat proses pemurniaan dengan cara mengoptimasi pemisahan hanya dengan sekali proses, pemisahan menggunakan resolusi yang tinggi dengan kualitas silika yang baik dan mengoptimalkan proses pengumpulan.

Target oriented approach merupakan salah satu metode yang baru akan dikembangkan. Jika dibandingkan dengan *bioassay guided separation*, *target oriented approach* memiliki beberapa keuntungan diantaranya bahan yang bekerja spesifik pada organ target, rendamen yang dihasilkan lebih dari 2 mg, tidak memungkinkan untuk adanya zat pengotor sehingga lebih murni.

Penanda *Hedgehog (Hh)* telah ditemukan dari peneliti sebelumnya pada ekstrak metanol *Excoecaria agallocha* Linn. yang mengidentifikasi enam glukosida flavanoid (6), dan dari tanaman *Vallaris glabra* Linn. yaitu Acochimperoside P, 2'-acetate yang mengidentifikasi terpenoid, flavanoid, glykosida pada *Acacia pennata* Mil. (7,8).

Berdasarkan uraian diatas, maka telah dilakukan penelitian profil kromatogram dari senyawa cabe jawa yang aktif pada protein *GLI* dengan menggunakan alat Sepacore, sehingga diharapkan dapat menambah informasi untuk obat anti kanker yang bekerja pada protein target *GLI*. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui profil kromatogram dari senyawa tanaman cabe jawa yang aktif pada protein *GLI* dengan menggunakan alat

Sepacore dengan waktu retensi dari senyawa-senyawa hasil isolasi tanaman cabe jawa.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Uraian Tanaman

II.1.1 Klasifikasi Tanaman (9)

Dunia : Plantae
Anak dunia : Tracheobionta
Divisi : Spermatophyta
Anak divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledoneae
Bangsa : Piperales
Suku : Piperaceae
Marga : Piper
Jenis : *Piper retrofractum Vahl.*

II.1.2 Nama Daerah (9)

Sumatera : Cabai panjang
Jakarta : Cabe alas
Sunda : Cabe jawa
Jawa : Cabean, cabe jawa
Madura : Cabe jhamo
Makasar : Cabia

II.1.3 Morfologi Tanaman (9)

Habitus : Semak, menjalar, panjang 12 m. Batang bulat, berkayu, membelit, beratur, beruas, hijau. Daun tunggal, lonjong, pangkal tumpul, ujung runcing, tepi rata, pertulangan menyirip, permukaan atas licin, permukaan bawah berbintik-bintik, panjang 8,5-20 cm, lebar 3-7 cm, hijau. Bunga majemuk, bentuk bulir, tangkai panjang 0,5-2 cm, benang sari dua kadang tiga, pendek, kuning, putih 2-3 buah, hijau kekuningan. Buah lonjong, masih muda hijau setelah tua merah. Biji bulat pipih, cokelat keputih-putihan. Akar tunggang, putih pucat.

II.1.5 Kandungan Kimia (9)

Buah mengandung zat pedas piperin, kavicin, asam palmitik, asam tetrahidropiperik, 1-undesilenil-3,4-metilenedioksi benzen, piperidin, minyak atsiri, isobutildeka-trans-2-trans-4-dienamida, dan sesamin. Akar mengandung piperin, piplartin, dan piperlonguninin. Senyawa lain protein, karbohidrat, gliserida, tanin, dan minyak atsiri, damar. Buah, daun dan batang : alkaloida, saponin dan polifenol, buahnya juga mengandung minyak atsiri.

II.1.6 Kegunaan Tanaman (9)

Buah cabe jawa berkhasiat sebagai obat diare, beri-beri, reumatik, hipotensi, kolera, influenza, sakit kepala, lemah syahwat, bronchitis dan

asma. Karena itu, cabe jawa banyak dibutuhkan sebagai bahan pembuatan jamu tradisional dan obat pil/kapsul modern serta bahan campuran minuman. Pada pemakaian luar digunakan untuk obat kumur (10).

II.2 Metode Ekstraksi Bahan Alam

II.2.1 Definisi Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok, diluar pengaruh cahaya matahari langsung (11). Kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian sehingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (12).

II.2.2 Definisi Ekstraksi

Ekstraksi adalah penyarian komponen kimia atau zat-zat aktif dari bagian tanaman obat, hewan dan beberapa jenis hewan termasuk biota laut. Pada tanaman dan hewan terdapat komponen kimia yang pada umumnya mengandung senyawa-senyawa yang mudah larut dalam pelarut organik.

Proses ekstraksi komponen kimia dalam sel tanaman terjadi dimana pelarut organik akan menembus dinding sel dan masuk kedalam rongga sel yang mengandung zat aktif yang kemudian zat aktif ini akan larut disebabkan adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif didalam dan diluar sel, sehingga larutan yang pekat atau berkonsentrasi tinggi didesak keluar.

Peristiwa tersebut akan terus berulang hingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan diluar sel dan didalam sel (13).

II.2.3 Tujuan Ekstraksi

Tujuan ekstraksi adalah menarik komponen kimia yang terdapat dalam bahan alam baik dari tumbuhan, hewan dan biota laut menggunakan pelarut organik tertentu (13).

II.2.4 Jenis-jenis Ekstraksi

Jenis-jenis ekstraksi yang sering digunakan adalah :

- a. Ekstraksi secara dingin, yaitu ekstraksi yang digunakan untuk sampel yang lunak, tidak tahan panas, tidak mudah mengembang dalam cairan penyari. Yang termasuk dalam ekstraksi dingin yaitu maserasi, perkolasi dan soxhletasi.
- b. Ekstraksi secara panas, yaitu ekstraksi yang digunakan untuk sampel yang mempunyai dinding sel yang tebal. Yang termasuk dalam ekstraksi secara panas yaitu refluks, infuse, dekokta dan destilasi uap air (13)

II.2.5 Metode Ekstraksi Secara Maserasi

Maserasi merupakan salah satu jenis penyarian yang sangat sederhana yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk kedalam rongga sel yang mengandung zat aktif yang kemudian zat aktif ini akan larut disebabkan adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif didalam

dan diluar sel, sehingga larutan yang pekat atau berkonsentrasi tinggi didesak keluar. Peristiwa tersebut akan terus berulang hingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan diluar sel dan didalam sel (13).

Pada penyarian dengan cara maserasi perlu dilakukan pengadukan. Pengadukan diperlukan untuk meratakan konsentrasi larutan diluar butir serbuk simplisia, sehingga dengan pengadukan tersebut tetap terjaga adanya perbedaan konsentrasi yang sekecil-kecilnya antara larutan didalam dan diluar sel. Metode maserasi hanya digunakan untuk penyarian simplisia yang mengandung zat aktif yang mudah larut dalam cairan penyari dan tidak mengandung zat yang mudah mengembang dalam cairan penyari. (13).

II.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

II.3.1 Pengertian KCKT

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) disebut juga dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) merupakan jenis kromatografi yang khusus dari kromatografi kolom, bersifat tidak destruktif dan dapat digunakan baik untuk analisis kualitatif dan kuantitatif (14, 15).

KCKT berkembang dari dasar proses pemisahan adsorpsi dan partisi ke arah yang lebih luas, yaitu proses yang berdasarkan afinitas, filtrasi gel, dan ion yang berpasangan, akan tetapi proses pemisahannya tetap dilaksanakan di dalam kolom disertai pemakaian pelarut pengembang dengan tekanan tinggi. Kolom KCKT dapat ditinjau seperti butiran-butiran

adsorben pada kromatografi gas yang dikenal sebagai KGP (Kromatografi Gas Padat) dengan proses adsorpsi dan KGC (Kromatografi Gas Cair) dengan proses partisi (16).

KCKT paling sering digunakan untuk menetapkan kadar senyawa-senyawa tertentu seperti asam-asam amino, asam-asam nukleat, dan protein-protein dalam cairan fisiologis, menentukan kadar senyawa-senyawa aktif obat, produk hasil samping proses sintesis, atau produk-produk degradasi dalam sediaan farmasi (14).

II.3.2 Prinsip Kerja KCKT

Prinsip kerja KCKT sebenarnya tidak berbeda dengan prinsip-prinsip kromatografi yang lain, yaitu pemisahan komponen-komponen sampel dengan cara melewatkan sampel pada suatu kolom, yang selanjutnya dilakukan pengukuran kadar masing-masing komponen-komponen tersebut dengan suatu detektor. Kerja detektor bermacam-macam, tetapi pada dasarnya membandingkan respon dari komponen sampel dengan respon dari larutan standar (17).

Prinsip pemisahan KCKT yaitu perbedaan distribusi komponen di antara fase gerak dan fase diam yang menyebabkan migrasi diferensial komponen-komponen analit dalam kolom kromatografi (18).

Dengan kata lain, penentuan kadar pada dasarnya adalah membandingkan respon sampel dengan respon standar. Untuk analisis dengan KCKT diperlukan standar yang betul-betul murni, biasanya disebut

KCKT grade. Untuk mendapatkan hasil analisis yang tepat, juga diperlukan fase gerak dengan kemurnian tinggi (24). Salah satu yang termasuk dalam kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) adalah Sepacore[®].

II.3.3 Penggunaan Metode KCKT

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan suatu metode pemisahan canggih dalam analisis farmasi yang dapat digunakan sebagai uji identitas, uji kemurnian dan penetapan kadar. Banyak senyawa yang dapat dianalisis dengan KCKT, mulai dari senyawa ion anorganik sampai senyawa organik makromolekul. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dapat digunakan untuk analisis sebagian besar senyawa yang bersifat tidak atsiri dan senyawa berbobot molekul tinggi, juga untuk senyawa anorganik, yang sebagian besar tidak atsiri (tidak mudah menguap) (14).

Beberapa keunggulan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) seperti:

1. KCKT dapat menangani senyawa-senyawa yang stabilitasnya terhadap suhu terbatas, begitu juga volatilitasnya bila tanpa menggunakan derivatisasi. Sebagai contoh misalnya analisis beberapa jenis gula dapat dikerjakan dengan KCKT tanpa proses derivatisasi dulu.
2. KCKT mampu memisahkan senyawa yang sangat serupa dengan resolusi yang baik.

3. Waktu pemisahan dengan KCKT biasanya singkat, sering hanya dalam waktu 5-10 menit, bahkan kadang-kadang kurang dari 5 menit untuk senyawa yang sederhana.
4. KCKT dapat digunakan untuk analisis kuantitatif dengan presisi yang tinggi dengan koefisien variasi dapat kurang dari 1%.
5. KCKT juga merupakan teknik analisis yang peka.
6. Kolom dapat dipakai kembali. Berbeda dengan kromatografi cair klasik, kolom KCKT dapat dipakai kembali. Banyak analisis dapat dilakukan pada kolom yang sama sebelum kolom itu harus diganti.
7. Ideal untuk molekul besar dan ion. Secara khusus senyawa jenis ini tidak dapat dipisahkan dengan kromatografi gas, karena keatsiriannya rendah.
8. Mudah memperoleh cuplikan kembali. Sebagian besar detektor yang dipakai pada KCKT tidak merusak, sehingga komponen cuplikan dapat dikumpulkan dengan mudah ketika melewati detektor (17, 19).

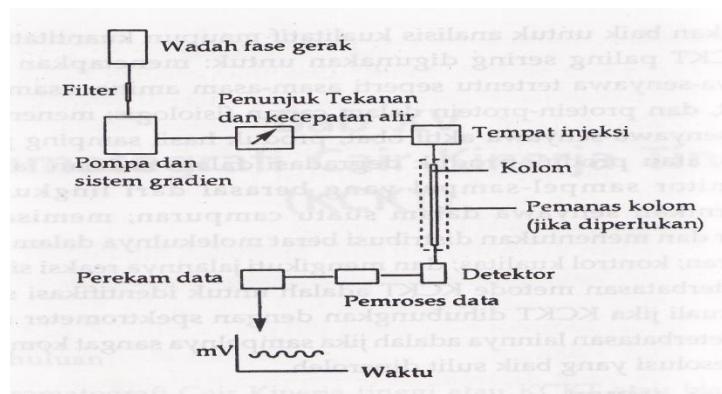
Kelebihan KCKT dibandingkan kromatografi gas cair adalah keleluasaan pemilihan pelarut pengembang atau pelarut pengembang campuran. Namun demikian, pelaksanaan pemakaian pelarut pengembang atau pelarut campur harus memperhatikan beberapa kendala yang meliputi :

- Tetapan fisika dan kimia
- Pernyataan serta peringatan badan-badan resmi (19).

Keterbatasan metode KCKT adalah tidak dapat mengidentifikasi senyawa, kecuali jika KCKT dihubungkan dengan spektrometer massa (MS). Keterbatasan lainnya adalah jika sampelnya sangat kompleks, maka resolusi yang baik sulit diperoleh

II.3.4 Instrumentasi KCKT

Diagram blok untuk sistem KCKT ditunjukkan oleh gambar berikut (20) :



Gambar 1. Diagram blok sistem KCKT secara umum (Sumber : Settle F. Handbook of instrumental Techniques for Analytical Chemistry. Prentice Hall PTR. New Jersey. 1997)

1. Tandon (reservoir)

Reservoir terbuat dari gelas atau *stainless steel*. Jumlahnya bisa satu, dua atau lebih. Reservoir yang baik disertai *degassing system* yang berfungsi untuk mengusir gas-gas terlarut dalam *solvent* (pelarut). Gas terlarut tersebut antara lain oksigen. *Degassing* dilakukan dengan mengalirkan gas inert dengan kelarutan yang sangat kecil, misalnya Helium. Sistem yang lebih lengkap disertai penyaring debu (17).

Wadah fase gerak harus bersih dan lembam (*inert*). Wadah ini biasanya dapat menampung fase gerak antara 1 sampai 2 liter pelarut. Fase gerak sebelum digunakan harus dilakukan *degassing* (penghilangan gas) yang ada pada fase gerak, sebab adanya gas akan berkumpul dengan komponen lain terutama di pompa dan detektor, sehingga akan mengacaukan analisis. Pada saat membuat pelarut untuk fase gerak, maka sangat dianjurkan untuk menggunakan pelarut, bufer, dan reagen dengan kemurnian yang tinggi, dan lebih terpilih lagi jika pelarut-pelarut yang akan digunakan untuk KCKT berderajat KCKT (*HPLC grade*). Adanya pengotor dalam reagen dapat menyebabkan gangguan pada sistem kromatografi. Karenanya, fase gerak sebelum digunakan harus disaring terlebih dahulu untuk menghindari partikel-partikel kecil ini (17).

2. Pompa

Pompa diperlukan untuk mengalirkan pelarut sebagai fase gerak dengan kecepatan dan tekanan yang tetap. Fungsi pompa adalah untuk memompa fase gerak (*solvent*) ke dalam kolom dengan aliran yang konstan dan reproduksibel. Pompa harus memenuhi persyaratan (17) :

- a. Dapat memberikan tekanan sampai 6000 psi (360 atm)
- b. Tekanan yang dihasilkan bebas pulsa
- c. Dapat mengalirkan fase gerak dengan kecepatan 0,1 sampai 10 ml/menit
- d. Dapat mengalirkan fase gerak dengan reproduksibilitas yang tinggi

- e. Tahan terhadap korosi (biasanya terbuat dari baja atau teflon).

Ada beberapa jenis pompa, antara lain (17) :

a. *Reciprocating Pump*

Terdiri atas ruang kecil, dimana solvent dipompa dengan piston yang bergerak maju mundur. Tekanan yang dihasilkan dapat mencapai 10.000 psi.

b. *Displacement Pump*

Terdiri semacam alat suntik (*syringe*) yang besar dengan kapasitas biasanya 250 ml. Solvent dialirkan dengan menggerakkan piston.

c. *Pneumatic Pump*

Terdiri atas kontainer yang berisi solvent yang dapat ditekan dengan suatu gas. Tekanan yang dihasilkan kurang dari 2.000 psi.

Pompa yang cocok digunakan untuk KCKT adalah pompa yang mempunyai syarat sebagaimana syarat wadah pelarut yakni pompa harus inert terhadap fase gerak. Bahan yang umum dipakai untuk pompa adalah gelas, baja tahan karat, teflon, dan batu nilam. Pompa yang digunakan sebaiknya mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan alir 3 mL/menit. Untuk tujuan preparatif, pompa yang digunakan harus mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan 20 mL/menit (17).

3. Katup injektor

Bagian ini merupakan tempat dimana sampel diinjeksikan untuk selanjutnya dibawa oleh fase gerak ke dalam kolom. Ada tiga jenis dasar

injektor, yaitu :

- a) Aliran-henti : aliran dihentikan, penyuntikan dilakukan pada tekanan atmosfer, sistem ditutup dan aliran dilanjutkan lagi. Cara ini dapat dipakai karena difusi di dalam zat cair kecil.
- b) Septum : ini adalah injektor langsung pada aliran, yang sama dengan injector yang lazim dipakai pada kromatografi gas. Injektor tersebut dapat dipakai pada tekanan sampai 60-70 atmosfer.
- c) Katup jalan-kitar : jenis injektor ini biasanya dipakai untuk menyuntikkan volume yang lebih besar dari 10 μl dan sekarang dipakai dalam system yang diotomatiskan (19).

4. Kolom

Kolom merupakan jantung KCKT. Keberhasilan atau kegagalan analisis bergantung pada pilihan kolom dan kondisi kerja yang tepat (17). Kolom dapat dibagi menjadi dua kelompok :

- a. Kolom analitik : garis tengah dalam 2-6 mm. Panjang bergantung pada jenis kemasan, untuk kemasan felikel biasanya panjang kolom 50-100 cm, sedangkan untuk kemasan mikropartikel berpori biasanya 10-30 cm.
- b. Kolom preparatif : umumnya bergaris tengah 6 mm atau lebih besar dan panjang 25 - 100 cm.

Kolom pada Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dibuat lurus (tidak melingkar sebagaimana kolom pada kromatografi, gas ataupun bentuk U). Hal ini dimaksudkan untuk efisiensi kolom (21).

Ditinjau dari ukurannya (panjang dan diameternya), kolom kromatografi cair kinerja tinggi terbagi atas:

Tabel 1. Jenis kolom Kromatografi Cair Kinerja Tinggi berdasarkan ukurannya.

Jenis Kolom	Panjang (cm)	Diameter (mm)	dp (μm)
Konvensional	10-20	4,5	10
Microbone	10	2,4	5
High Speed	6	4,6	3

Keterangan : dp = diameter rata-rata partikel fase diam

Diameter dibuat sangat kecil (kolom mikro) dengan tujuan agar:

- Kepekaan menjadi lebih teliti
- Menghemat larutan pengembang
- Memperluas kemampuan detektor
- Sampel yang dianalisis sedikit

Kolom dibuat pendek agar :

- Menghasilkan resolusi yang baik
- Memperkecil harga diameter rata-rata partikel fase diam

- Waktu retensi (t_R) singkat (mengurangi pengaruh bagian instrumentasi kromatografi cair kinerja tinggi terhadap hasil pemisahan)

Dilihat dari jenis fase diam dan fase gerak, maka kromatografi cair kinerja tinggi (kolomnya) dibedakan atas (21) :

a. Kolom fase normal

Kromatografi dengan kolom konvensional, dimana fase diamnya normal, bersifat polar, misalnya silica gel, sedangkan fase geraknya bersifat non polar.

b. Kolom fase terbalik

Kromatografi dengan kolom yang fase diamnya bersifat non polar, sedangkan fase geraknya bersifat polar, kebalikan fase normal.

5. Detektor

Detektor diperlukan untuk mengindera adanya komponen cuplikan di dalam eluen kolom dan mengukur jumlahnya. Detektor yang baik sangat peka, tidak banyak berderau, rentang tanggapan linearnya lebar, dan menanggapi semua jenis senyawa. Detektor yang merupakan tulang punggung kromatografi cair kecepatan tinggi modern (KCKT) ialah detektor UV 254 nm. Detektor UV-VIS dengan panjang gelombang yang berubah-ubah sekarang mejadi populer karena dapat dipakai untuk mendeteksi senyawa dalam lingkup lebih luas (18). Dua jenis detektor yang dikenal didalam HPLC adalah (18) :

a. Detektor universal

Yaitu detektor yang bisa langsung digabungkan ke dalam instrument HPLC tanpa memerlukan tambahan sistem khusus. Contoh : detektor UV-Vis, detektor indeks refraksi, detektor fluorescence dan detektor hantaran.

b. Detektor khusus

Yaitu detektor yang memerlukan sistem khusus agar bisa digunakan sebagai detektor dalam HPLC, contoh : FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), MS (*Mass Spectrometer*), dan sebagainya.

II.3.5 Waktu Retensi (t_R)

Waktu retensi (t_R) adalah selang waktu yang diperlukan oleh larutan (solut) mulai saat injeksi sampai keluar dari kolom dan sinyalnya ditangkap oleh detektor (21).

Disamping waktuambat untuk larutan, dikenal pula waktuambat untuk pelarut pengembang atau pengembang campuran yang dinyatakan sebagai t_M . Harga t_M akan lebih kecil dari harga t_R karena yang akan lebih dahulu mencapai ujung kolom adalah pelarut pengembang atau pelarut pengembang campur (21).

Waktuambat larutan dikurangi waktuambat pelarut pengembang atau pelarut pengembang campur disebut waktuambat yang terkoreksi yang dinyatakan sebagai t_R .

II.4 Bioassay

Bioassay merupakan metode pengujian aktivitas suatu senyawa dari bahan alam maupun sintetik menggunakan makhluk hidup. Bioassay terdiri dari banyak metode diantaranya yaitu uji toksisitas, uji antimitotik, uji daya hambat dll. Berdasarkan hasil bioassai tersebut dapat dilakukan isolasi senyawa dari bahan alam atau disebut *Bioassay guided isolation* (22).

Namun, ada salah satu metode penemuan obat yang baru yang diperkirakan dapat menggantikan metode *bioassai* ini, yaitu *target-oriented-approach*. *Target-oriented-approach* adalah metode pemisahan senyawa berdasarkan target (protein) yang diinginkan.

Keuntungan dari metode *target-oriented-approach* adalah pengaplikasian yang lebih mudah, menghasilkan senyawa-senyawa yang spesifik, lebih murni dan bebas dari pengotor, tidak banyak menghabiskan pelarut dan menghasilkan rendamen yang lebih banyak, yaitu > 2 mg. Namun, metode ini belum terlalu dipakai secara umum karena masih dalam tahap penelitian secara *in-vivo* dan *in-vitro*.

II.5 Kanker

Kanker atau neoplasma ganas adalah penyakit yang ditandai dengan kelainan siklus sel khas yang menimbulkan kemampuan sel untuk tumbuh tidak terkendali (pembelahan sel melebihi batas normal),

menyerang jaringan biologis di dekatnya, bermigrasi ke jaringan tubuh yang lain melalui sirkulasi darah atau sistem limfatik, disebut metastasis.

Sel normal tumbuh dengan suatu tujuan yang jelas yaitu membentuk jaringan tubuh dan mengganti jaringan yang rusak. Sedangkan pertumbuhan sel-sel kanker akan menyebabkan jaringan menjadi besar yang disebut tumor. Jika tidak diobati sel-sel kanker yang tumbuh dengan cepat ini akan menyusup dan menyebar ke jaringan sekitarnya melalui pembuluh darah dan pembuluh getah bening (2).

Semua jaringan dalam tubuh berasal dari sel punca (*stem cell*) yang akan membentuk organ spesifik. Sel punca memiliki kemampuan beregenerasi, poliferasi, dan deferensiasi yang tinggi. Karakteristik yang unik dari sel punca ternyata dapat bersifat merugikan. Masa hidup sel punca yang panjang menyebabkan sel punca dapat mengalami transformasi menjadi sel punca kanker (*cancer stem cell*). Beberapa penelitian mengungkapkan keberadaan sel punca kanker sebagai penyebab sulitnya mengobati kanker sampai tuntas. Identifikasi sel punca kanker dapat diharapkan dapat membantu dalam hal deteksi dini, pencegahan dan terapi kanker (23).

Sel punca adalah populasi sel yang memiliki kemampuan untuk memperbaharui diri (*self renewal*), berpoliferasi secara ekstensif dan berdiferensiasi (23), sedangkan sel punca kanker adalah sekelompok kecil sel dari sel tumor yang memiliki karakteristik seperti sel punca normal, mampu menginisiasi dan mempertahankan pertumbuhan sel kanker. Sel

punca kanker memiliki karakteristik yang sama dengan sel punca normal yaitu menggunakan jalur sinyal yang sama, aktivitas telomerase yang tinggi, aktivasi anti apoptosis dan ekspresi transporter membran dan motilitas yang tinggi (2).

Ada 3 jalur sinyal yang berperan dalam regenerasi yaitu Hedgehog (Hh), Wnt, dan Notch (23).

II.6 Hedgehog

Signal dalam poliferasi kanker *hedgehog (Hh)* mengatur berbagai kejadian dalam perkembangan embrio dan pemeliharaan jaringan otot dewasa, Jika Hh rusak maka akan terjadi cacat lahir bawaan. Dan jika terjadi penyimpangan Hh mengakibatkan penyakit kanker (4).

Signal mula-mula mengikat ligan protein Hh pada membran reseptor *PTCH*. Ikatan ini akan menekan aktivitas *Proto-oncogen-Smoothened (SMO)* dan memicu pelepasan Gen GLI. Kelebihan GLI akan menyebabkan karsinoma, medula blasoma, kanker pankreas, kanker prostat. Sehingga GLI target protein digunakan sebagai obat penemuan anti kanker.(7,8)

Trend pengembangan inhibitor signal Hh sebagai anti kanker sejak ditemukan Hh antagonis dari bahan alam yakni *Cyclopamin*, pada beberapa jenis seperti karsinoma, medula blasoma. Signal Hh disebabkan oleh mutasi *PTCH* atau *SMO*, mutasi akan mengaktifkan GLI lalu GLI berpartisipasi pada

langkah terakhir aktivasi kanker yang berkaitan dengan penyimpangan signal Hh.(7,8)

GLI yang merupakan faktor transkripsi menyerupai zink, berperan mengatur beberapa gelombang termasuk sel pembeda yang berhubungan dengan signal Hh. Ada tiga gen homolog GLI dalam vertebrata GL1, GL2, dan GL3. Aktivator gelombang GL1, target utama Hh menyebabkan hubungan langsung dengan pembentukan tumor pada wilayah promotor (5'-GACCACCCA-3') target gen. Sementara GL2 dan GL3 bertindak sebagai repressor (7, 8).

II.7 Dynabeads

Magnetic beads (Dynabeads[®] M-270 Carboxylic Acid) ini bersifat sebagai magnet yang dapat menjerap senyawa-senyawa yang terimmobilisasi pada target protein GLI (6).

Buffer-buffer yang digunakan untuk pencucian dan pengaktifan dynabeads[®] M-270 Carboxylic Acid adalah MES (2- (N-morpholino) ethanesulfonic asam), GLI GST (Gluthatione Sepharose) (14), PBS (Phosphate Buffer Saline) dan Buffer Net N (Nonidet-P-40).

Dynabeads[®] M-270 Carboxylic Acid mengandung polistrene yang bersifat supermagnet, pada setiap pori-porinya terdapat partikel dengan kekuatan magnet yang sangat besar. Partikel-partikel tersebut disalut oleh lapisan hidrofilik glisidil eter.

Pengaktifan GLI-dynabeads harus dilakukan terlebih dahulu karena asam karboksilat yang dikandung oleh dynabeads bersifat labil dan sangat mudah terhidrolisis. Fungsi dari buffer dalam pengaktifan GLI-dynabeads antara lain :

- Buffer MES : melekatkan dan memudahkan pelekatan dynabeads dan rekombinan protein GLI
- Buffer PBS : untuk mencuci GLI-dynabeads dari zat-zat pengotor dan logam-logam yang bersifat spesifik.
- Buffer HCL : untuk mencegah aktivasi non reaktif dari asam karboksilat dynabeads.
- Buffer Net N : sebagai buffer penstabil, dapat digantikan dengan tween 20 atau triton X-100. Buffer ini juga menyebabkan GLI-dynabeads dapat disimpan beberapa bulan jika suhu penyimpanan berkisar pada 2-8°C

II.8 GLI-GST (Gluthatione Sepharose)

GST dikulturkan oleh H.Sasaki (Riken, Jepang) (14) dari bakteri *E.colli*, menggunakan kecepatan garis vektor pGEX. pGEX-KG (Guan dan Dixon, 1991) digunakan untuk sintesis GST. Plasmid pGEXHNF-3 β (dari Richard O'Brien, Universitas Vanderbilt, USA) yang menghasilkan sebuah protein fusi dari GST sepanjang protein HNF-3 β , digunakan untuk GST-HNF-3 β . Plasmid pGEX-GLI yang dihasilkan dengan mengkloning HincII-XbaI pecahan dari

GLI cDNA manusia (pGLI•K12) (Kinzler et al,1988) kedalam SmaI dan XbaI bagian dari pGEX-KG, digunakan untuk GLI-GST. Untuk produksi protein, kultur bakteri diinduksi dengan IPTG 0.1 mM. Setelah 3 jam diinduksi, bakteri dipanen dengan sentrifugasi dan sonikasi, dengan alat sonikasi Branson. Sonikasi dibersihkan dengan sentrifugasi PBS yang mengandung 1% Tween-20 sebanyak 12 gram selama 10 menit dan membersihkan juga lysate yang digunakan sebagai protein fusi GST (24).