

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan suatu studi eksperimental laboratorik dengan desain *post test* yang bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak perikarp manggis dalam menghambat sekresi protein CFP-10 pada *M. tuberculosis* H37Rv dengan medium pertumbuhan BD BACTEC MGIT 960 SIRE. Potensi penghambatan dapat diketahui dari ketebalan pita protein CFP-10 pada gel elektroforesis hasil SDS PAGE dan ketebalan dot hasil uji spesifisitas dengan dot blot. Penelitian Pratomo dan Setyanto (2013) dan Champion *etal* (2009) menyatakan bahwa protein CFP-10 disekresikan oleh *M. tuberculosis*. Protein ini ketika berada dalam sitoplasma masih berbentuk kompleks CFP-10/ESAT-6/EspF/EspC. Namun ketika telah disekresikan tidak lagi dalam bentuk kompleks. Oleh karena itu filtrat hasil kultur *M. tuberculosis* yang telah diberikan perlakuan dapat langsung digunakan untuk identifikasi protein CFP-10 dimana telah difilter terlebih dahulu dengan filter bermembran 0,2 μm .

Pemilihan pelarut dan metode ekstraksi akan mempengaruhi hasil kandungan senyawa metabolit sekunder yang dapat terekstraksi. Pemilihan pelarut ekstraksi umumnya menggunakan prinsip *like dissolves like*, dimana senyawa yang nonpolar akan larut dalam pelarut nonpolar sedangkan senyawa yang polar akan larut pada pelarut polar (Sieder, 2008 dalam Dewi *et al* 2013). Menurut Dewi *et al* (2013) ekstrak perikarp manggis didapatkan dari maserasi perikarp manggis dengan etanol 95%. Pada penelitian ini dilakukan maserasi 100

gram serbuk perikarp manggis dan didapatkan ekstrak kental sebanyak 14,7174 gram. Setelah proses maserasi selesai dilakukan skrining kandungan fitokimia dengan metode yang dilakukan pada penelitian Dewi *et al* (2013). Pemilihan maserasi sebagai metode ekstraksi karena metode ini sederhana dan mudah dilakukan. Pemilihan etanol 95% sebagai pelarut didasarkan atas α -mangostin yang merupakan senyawa xanton tidak dapat larut dalam air, tapi dapat larut pada beberapa pelarut yang lain yang jarak kepolarannya dari metanol sampai heksana (Obolskiy *et al*, 2009).

Dari hasil skrining fitokimia didapatkan hasil bahwa ekstrak perikarp manggis memiliki kandungan triterpenoid, tannin dan polifenol, saponin, alkaloid, dan flavonoid. Kandungan α -mangostin dapat diperkirakan terdapat dalam ekstrak perikarp manggis hasil maserasi karena merupakan salah satu komponen dari polifenol. Heyne (1987) dalam Miryanti (2011) menyatakan bahwa secara umum kandungan kimia yang terdapat dalam perikarp manggis adalah xanthone, mangostin, garsinon, flavonoid, dan tannin. Selanjutnya dilakukan identifikasi kandungan α -mangostin pada ekstrak yang diperoleh menggunakan HPLC MS/MS. Metode HPLC MS/MS dipilih karena kemampuannya dalam identifikasi senyawa yang didasarkan atas kepolaran dan massa senyawa tersebut. Dari hasil identifikasi dan kuantifikasi dengan HPLC MS/MS didapatkan kadar α -mangostin sebesar 5984,55 $\mu\text{g}/\text{gram}$.

Kultur *M. tuberculosis* dilakukan dengan medium pertumbuhan BD BACTEC MGIT 960 SIRE. Senyawa fluorescent yang terdapat dalam medium sensitif terhadap adanya oksigen yang terlarut dalam *broth* sehingga ketika terjadi pertumbuhan bakteri maka fluoresensi akan terdeteksi (BACTEC, 2010). Waktu yang diperlukan untuk perlakuan ekstrak perikarp manggis dengan

konsentrasi 522,25 $\mu\text{g/ml}$ (mengandung α -mangostin 3,125); 1044,5 $\mu\text{g/ml}$ (mengandung α -mangostin 6,25; dan 2089 $\mu\text{g/ml}$ (mengandung α -mangostin 12,5 $\mu\text{g/ml}$), ekstrak perikarp manggis pembanding dengan dosis 1044,5 $\mu\text{g/ml}$, dan tanpa perlakuan terhadap bakteri dalam medium adalah 7 hari. Untuk perlakuan rifampicin dengan dosis 1 $\mu\text{g/ml}$ terhadap bakteri dalam medium dibutuhkan waktu lebih lama yakni 48 hari. Sentrifugasi dan filtrasi pada kultur dengan filter 0,2 μm dilakukan sehingga diperoleh filtrat hasil kultur yang telah diberikan perlakuan tanpa adanya bakteri *M. tuberculosis*. Dari hasil tersebut diperoleh kadar protein dari masing-masing perlakuan.

Kuantifikasi kadar total protein pada sampel dilakukan menggunakan Nanodrop Spechtrophotometer ND-1000 setelah pertumbuhan bakteri *M. tuberculosis* terdeteksi pada kultur. Dari hasil tersebut diperoleh bahwa perlakuan D memiliki kadar protein yang paling tinggi. Hal ini karena perlakuan D merupakan kontrol negatif yang tidak diberikan paparan ekstrak sehingga bakteri *M. tuberculosis* dibiarkan tumbuh dalam media tanpa adanya intervensi.

Identifikasi awal potensi penghambatan ekstrak dapat diketahui dari ketebalan pita protein pada gel elektroforesis hasil SDS PAGE. Presentase gel akrilamid untuk *separating gel* yang digunakan adalah 15%. *Separating gel* 15% digunakan untuk protein target dengan ukuran 3-100 kDa dimana CFP-10 memiliki berat molekul 10 kDa. *Stacking gel* yang digunakan adalah *stacking gel* dengan presentase 4%. Pada penelitian dilakukan ini SDS PAGE dengan dua jenis pewarnaan yang berbeda yakni Coomassie blue dan Silver stain. Hasil pengamatan pita protein CFP-10 pada gel elektroforesis hasil pewarnaan Coomassie blue sangat tipis. Menurut Coligan *et al* (2002) intensitas pewarnaan dan ketebalan pita protein merupakan indikasi dari jumlah protein yang relatif

banyak. Pada penelitian ini pita protein yang terbentuk sangat tipis yang dapat dikarenakan oleh jumlah protein CFP-10 yang sangat sedikit sehingga tidak sensitif dengan pewarnaan Coomassie yang mampu mendeteksi protein dengan berat 40-50 ng. Namun masih dapat dilakukan kuantifikasi dengan Adobe Photoshop Cs 6 untuk selanjutnya di analisa statistik menggunakan metode *One Way Anova* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan dari masing-masing perlakuan terhadap sekresi protein CFP-10 dan uji korelasi untuk mengetahui linieritas hubungan antar perlakuan terhadap sekresi protein CFP-10. Sebelum dilakukan analisa statistik dengan *One Way Anova* terlebih dahulu dilakukan uji asumsi homogenitas dan normalitas. Hasil uji asumsi menyatakan bahwa terdapat kehomogonan ragam antar kelompok dan normalitas distribusi data sehingga analisa statistik dengan *One Way Anova* dapat dilakukan.

Analisis statistik *One Way Anova* telah dilakukan dan diperoleh hasil *p-value* (Sig.)= 0.000 dimana < 0.05 yang artinya terdapat perbedaan yang signifikan dari semua perlakuan terhadap sekresi protein CFP-10. Kemudian dilakukan uji korelasi untuk mengetahui linieritas hubungan masing-masing perlakuan terhadap sekresi protein CFP-10. Dari uji tersebut diperoleh hasil *p-value* (Sig.) $>0,05$ yang berarti tidak terdapat linieritas hubungan antar perlakuan terhadap sekresi protein CFP-10. Perlakuan A dengan dosis yang paling rendah yakni 522,25 $\mu\text{g/ml}$ (mengandung α -mangostin 6,25 $\mu\text{g/ml}$) memiliki efek penghambatan yang lebih baik dibandingkan perlakuan lainnya. Perlakuan C dengan dosis 2089 $\mu\text{g/ml}$ (mengandung 12,5 $\mu\text{g/ml}$) memiliki efek penghambatan yang lebih baik dibandingkan perlakuan B dengan dosis 1044,5 $\mu\text{g/ml}$ (mengandung 6,25 $\mu\text{g/ml}$). Perlakuan D yang merupakan kontrol negatif memiliki pita protein yang lebih tipis dibandingkan perlakuan B. Hal ini menyatakan bahwa

tidak ada linieritas hubungan antara masing-masing perlakuan terhadap sekresi protein CFP-10 karena dengan meningkatnya dosis tidak terjadi peningkatan efek penghambatan sekresi protein CFP-10 dan begitu pula sebaliknya. Dengan penurunan dosis ekstrak perikarp manggis tidak terjadi penurunan efek penghambatan sekresi protein CFP-10. Hal ini dapat terjadi karena penggunaan *crude extract* yang mengandung banyak komponen. Pada perlakuan F yang merupakan ekstrak perikarp manggis pembanding dengan konsentrasi 1044,4 µg/ml potensi penghambatan sekresinya tidak lebih baik dari ekstrak perikarp manggis hasil maserasi pada dosis yang sama.

Analisa profil protein dengan metode pewarnaan Silver stain juga dilakukan mengingat pita protein hasil pewarnaan dengan Coomassie blue sangat tipis. Teknik pewarnaan dengan silver stain merupakan teknik yang sangat sensitif untuk visualisasi protein dengan level deteksi 0,3-10 ng. Mekanisme dasar deteksi protein berdasarkan ikatan ion silver pada rantai asam amino dalam kondisi pH netral, terutama pada kelompok sulfhidril dan karboksil, diikuti dengan reduksi silver metalik bebas. Pita protein terlihat sebagai noda tempat terjadinya reduksi (Celis *et al*, 2006).

Hasil pengamatan pita protein CFP-10 pada gel elektroforesis hasil pewarnaan silver stain tampak tebal sehingga dapat dibandingkan antar perlakuan. Hasil ini muncul setelah waktu *developing* pada proses silver stain diperlama menjadi 6 menit karena pada menit ke-4, pita protein tidak muncul. Pita protein sama sekali tidak terbentuk pada lajur yang berisi sampel medium pertumbuhan pada gel elektroforesis. Pengamatan secara visual pita protein CFP-10 pada perlakuan A yakni ekstrak perikarp manggis dengan konsentrasi 522,25 µg/ml (mengandung α-mangostin 3,125 µg/ml) merupakan pita yang

paling tipis dilanjutkan dengan perlakuan F yakni pembanding ekstrak perikarp manggis dengan konsentrasi 1044,5 μ g/ml dengan pita yang lebih tebal. Ketebalan pita protein CFP-10 semakin meningkat pada perlakuan D yang merupakan kontrol negatif, perlakuan C yakni ekstrak perikarp manggis dengan konsentrasi 2089 μ g/ml (mengandung α -mangostin 12,5 μ g/ml) dan perlakuan B yakni ekstrak perikarp manggis dengan konsentrasi 2089 μ g/ml (mengandung α -mangostin 6,25 μ g/ml). Selain dilakukan pengamatan secara visual, dilakukan pula kuantifikasi pita protein dengan Adobe Photoshop Cs 6 dan diperoleh hasil yang sama. Analisis statistik *One Way Anova* digunakan untuk mengetahui apakah setiap perlakuan memiliki pengaruh yang signifikan terhadap penghambatan sekresi protein CFP-10. Uji asumsi homogenitas dan normalitas perlu dilakukan untuk bisa menggunakan analisis statistik *One Way Anova*. Kehomogenan ragam antar kelompok dan normalitas sebaran data terpenuhi sehingga dapat dilanjutkan analisis statistik dengan *One Way Anova*.

Analisis statistik *One Way Anova* telah dilakukan dan diperoleh hasil *p-value* (Sig.)= 0.000 dimana < 0.05 yang artinya terdapat perbedaan yang signifikan dari semua perlakuan terhadap sekresi protein CFP-10. Kemudian dilakukan uji korelasi untuk mengetahui linieritas hubungan masing-masing perlakuan terhadap sekresi protein CFP-10. Dari uji tersebut diperoleh hasil *p-value* (Sig.) $> 0,05$ yang berarti tidak terdapat linieritas hubungan antar perlakuan terhadap sekresi protein CFP-10. Perlakuan A dengan dosis yang paling rendah yakni 522,25 μ g/ml (mengandung α -mangostin 6,25 μ g/ml) memiliki efek penghambatan yang lebih baik secara signifikan dibandingkan perlakuan lainnya. Perlakuan C dengan dosis 2089 μ g/ml (mengandung 12,5 μ g/ml) memiliki efek penghambatan yang lebih baik dibandingkan perlakuan B dengan dosis 1044,5

$\mu\text{g/ml}$ (mengandung $6,25 \mu\text{g/ml}$). Sedangkan perlakuan D yang merupakan kontrol negatif memiliki pita protein yang lebih tipis dibandingkan perlakuan C dan B. Hal ini menyatakan bahwa tidak ada linieritas hubungan antara masing-masing perlakuan terhadap sekresi protein CFP-10 karena dengan meningkatnya dosis tidak terjadi peningkatan efek penghambatan sekresi protein CFP-10 dan begitu pula sebaliknya. Dengan penurunan dosis ekstrak perikarp manggis tidak terjadi penurunan efek penghambatan sekresi protein CFP-10. Hal ini dapat terjadi karena penggunaan *crude extract* yang mengandung banyak komponen.

Penelitian Suksamrarn *et al* (2003) dalam Ragasa *et al* (2010) menyatakan bahwa aktivitas penghambatan α - dan β -mangostin dan garcinone B terhadap *M. tuberculosis* sangat kuat dengan $\text{MIC}=6,25 \mu\text{g/ml}$. Namun hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan A dengan konsentrasi $522,25 \mu\text{g/ml}$ (mengandung α -mangostin $3,125 \mu\text{g/ml}$) memiliki potensi yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan yang lain karena tipisnya pita protein menunjukkan bahwa jumlah protein CFP-10 pada lajur perlakuan A sedikit. Hasil analisa profil protein dengan SDS PAGE menggunakan teknik pewarnaan Coomassie blue dan Silver stain menunjukkan hasil bahwa perlakuan A dengan dosis ekstrak perikarp manggis $522,25 \mu\text{g/ml}$ lebih baik dibandingkan perlakuan C dengan dosis ekstrak perikarp manggis $2089 \mu\text{g/ml}$ dan perlakuan C lebih baik dibandingkan perlakuan B dengan dosis ekstrak perikarp manggis $1044,5 \mu\text{g/ml}$. Penelitian Yulinah (2001) menyatakan bahwa dalam penggunaan ekstrak bahan alam yang merupakan campuran multikomponen sering dijumpai tidak adanya hubungan yang linier antara dosis dengan efek yang ditimbulkan. Efek dari komponen-komponen tersebut dapat saling sinergis, aditif, maupun antagonis. Kemungkinan pada dosis yang lebih tinggi ekstrak perikarp manggis menurunkan

potensi penghambatan sekresi CFP-10. Untuk itu diperlukan penelitian lebih lanjut terkait efek toksik ekstrak perikarp manggis dalam kaitannya sebagai anti TB.

Perlakuan F yang merupakan ekstrak perikarp manggis pembanding dengan konsentrasi 1044,5 µg/ml memiliki efek yang berbeda dibandingkan ekstrak perikarp manggis hasil maserasi pada dosis yang sama. Hal ini dapat dikarenakan proses preparasi serbuk perikarp manggis yang berbeda. Perbedaan lingkungan penanaman, teknik penanaman, teknik pemanenan, teknik penyimpanan, persiapan ekstraksi serta jenis ekstraksi akan mempengaruhi tingkat zat aktif yang dikandung serta efektivitas farmakologinya (Eshtiaghi dan Yoswathana, 2015).

Prosedur selanjutnya adalah uji spesifisitas protein CFP-10 dengan metode dot blot dan visualisasi membran *nitrocellulose* dengan ImageQuant LAS 500. Uji spesifisitas dengan metode dot blot bertujuan untuk membuktikan apakah protein yang di *profiling* adalah benar protein yang diduga yakni protein CFP-10 yang diketahui dari adanya reaksi spesifik antigen antibodi. Pada proses dot blot ini antibodi sekunder yang digunakan berlabel biotin sedangkan ImageQuant LAS 500 hanya dapat mendeteksi konjugat SA-HRP sehingga antibodi sekunder label biotin dikonjugasikan terlebih dahulu dengan SA-HRP. Setelah proses dot blot selesai selanjutnya dilakukan visualisasi dot dengan ImageQuant LAS 500. Membran *nitrocellulose* direaksikan dengan substrat peroksidase-luminal 1:1 kemudian diletakkan di atas *tray* untuk selanjutnya dipapar dengan sinar. Hasil visualisasi diperoleh dari sinyal yang merupakan hasil reaksi antibodi sekunder label SA-HRP dengan substrat peroksida-luminal (1:1). Terdapat 2 metode pembacaan sinyal hasil reaksi yakni dengan metode

colorimetric yang dibaca dengan cahaya tampak dan metode *chemiluminescence* yang dibaca dengan cahaya ultraviolet. Sinyal hasil pembacaan dengan metode *chemiluminescence* selanjutnya dikuantifikasi dengan *software* ImageQuant TL.

Dari hasil kuantifikasi yang diperoleh dilakukan analisa dengan membandingkan tiap perlakuan. Semakin rendah nilai hasil kuantifikasi menunjukkan semakin sedikit sinyal yang diterima oleh alat sehingga dapat dinyatakan semakin rendah nilai kuantifikasi semakin kecil jumlah protein yang dikandung. Pengamatan pada hasil kuantifikasi menunjukkan bahwa perlakuan A dengan konsentrasi ekstrak perikarp manggis 522,25 $\mu\text{g/ml}$ (mengandung α -mangostin 3,125 $\mu\text{g/ml}$) dan perlakuan B dengan konsentrasi ekstrak perikarp manggis 1044,5 $\mu\text{g/ml}$ (mengandung α -mangostin 6,25 $\mu\text{g/ml}$) memiliki sinyal pembacaan yang paling rendah. Sedangkan perlakuan C dengan konsentrasi ekstrak perikarp manggis 2089 $\mu\text{g/ml}$ (mengandung α -mangostin 12,5 $\mu\text{g/ml}$) memiliki sinyal pembacaan yang paling tinggi dibandingkan perlakuan A dan B yang artinya jumlah protein CFP-10 yang terdeteksi berdasarkan reaksi antigen antibodi spesifik lebih tinggi dibandingkan perlakuan A dan B.

Perlakuan E yang merupakan rifampicin 1 $\mu\text{g/ml}$ memiliki sinyal pembacaan yang tinggi sehingga dapat diketahui bahwa jumlah protein CFP-10 masih tinggi. Hal ini dapat dikarenakan oleh perbedaan mekanisme kerja dari kedua zat aktif yakni Rifampicin dan α -mangostin sebagai antibakteri pada *M. tuberculosis*. Pemilihan penggunaan rifampin didasarkan bahwa rifampin merupakan *gold standart* pengobatan TB (Depkes RI, 2005). Rifampicin bekerja dengan menghambat sintesis asam nukelat dimana target utamanya adalah pada RNA polymerase sehingga menghambat proses transkripsi yang berakibat pada matinya sel bakteri (Tatro, 2003). Sedangkan α -mangostin bekerja dengan

menargetkan *inner* membran sel bakteri. Gugus isoprenyl dari α -mangostin meningkatkan sifat hidrofobisitas α -mangostin sehingga terjadi peningkatan permeabilitas membran bakteri dan terjadilah kebocoran komponen intraseluler sehingga berakibat pada matinya sel (Koh *et al.*, 2013). Oleh karena itu Rifampicin tidak memiliki efek penghambatan yang baik terhadap sekresi protein CFP-10.

Perbedaan hasil antara analisa profil protein dengan dua macam teknik pewarnaan yakni Coomassie blue dan Silver stain dengan visualisasi membran hasil dot blot dengan ImageQuant LAS 500 serta bentuk dot yang tidak sempurna dapat dikarenakan waktu *washing* yang kurang lama setelah pemaparan membran dengan antibodi sekunder *anti rabbit* label biotin sehingga kelebihan antibodi sekunder *anti rabbit* label biotin belum tercuci secara sempurna sehingga dapat menyebabkan terjadinya kelebihan reaksi. Hal ini berpengaruh terhadap penempelan atau konjugasi SA-HRP dengan antibodi sekunder *anti rabbit* label biotin dan dilakukan pembacaan dengan ImageQuant LAS 500 yang sensitif. Menurut protokol Bio Rad Laboratories (2011) *nonfat milk* atau *skim milk* yang digunakan untuk tahap *blocking* pada uji spesifisitas dengan dot blot mengandung *endogenous* biotin. Skim milk tidak direkomendasikan penggunaannya untuk sistem deteksi dengan avidin/biotin karena dapat menyebabkan *cross reaction* dengan bahan lain yang mengandung komponen avidin. Pada penelitian ini kemungkinan terjadi reaksi berlebihan antara biotin dari *skim milk* dengan antibodi sekunder yang berlabel biotin dengan antigen pada sampel yang telah berikatan dengan antibodi primer sehingga mempengaruhi hasil dot blot yakni pembentukan *dot* yang tidak sempurna. Proses pengonjugasian dengan SA-HRP memberikan kemungkinan

adanya *cross reaction* dengan *skim milk* sehingga mempengaruhi hasil dot blot.

Penggunaan *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebagai larutan *blocking* lebih disarankan untuk penggunaan deteksi pada protein dengan pelabelan biotin dan alkalin phosphatase serta antibodi antiphosphoprotein. BSA tidak mengandung *endogenous* biotin karena hanya mengandung protein tunggal yang telah dipurifikasi.

