

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
DAFTAR SINGKATAN KATA.....	xviii
INTISARI.....	xx
<i>ABSTRACT</i>	xxi
BAB I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
1. Perumusan masalah	6
2. Keaslian penelitian	6
3. Urgensi penelitian.....	8
B. Tujuan Penelitian	8
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Tanaman Brotowali	10
1. Morfologi.....	11
2. Kandungan kimia	11

3. Penelitian yang sudah dilakukan terhadap Brotowali	14
B. Tuberkulosis	15
1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
2. <i>Mycobacterium marinum</i>	18
3. Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	20
4. Patogenesis Tuberkulosis	25
5. Autofagi	29
C. Obat-obat Anti TB (OAT)	30
D. Penemuan dan Pengembangan OAT	33
E. Pengujian Aktivitas Anti <i>Mycobacterium</i> Secara <i>in vitro</i>	40
F. Landasan Teori	45
G. Keterangan Empiris	46
BAB III. METODE PENELITIAN	
A. Bahan	47
B. Bakteri dan Hewan Uji yang Digunakan	49
C. Alat	49
D. Tempat penelitian	50
E. Jalannya Penelitian	
1. Tahap I Isolasi senyawa	51
2. Tahap II Penentuan struktur senyawa	56
3. Tahap III Uji aktivitas Anti <i>Mycobacterium</i> secara <i>in vitro</i>	57
4. Tahap IV Uji aktivitas penghambatan <i>M. marinum</i> dalam Zebrafish	66

F. Variabel Penelitian	70
G. Definisi Operasional Variabel	70
H. Analisis Data	71
BAB IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
A. Pengumpulan Bahan dan Pengolahan Simplisia	73
B. Ekstraksi	74
C. Fraksinasi.....	75
D. Isolasi senyawa dari Fraksi tidak larut n-heksana.....	76
1. Isolat A1.....	78
2. Isolat B1	96
E. Uji Aktivitas Penghambatan terhadap <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv dengan metode MABA.....	111
F. Uji Aktivitas Penghambatan terhadap <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv dengan metode MGIT	118
G. Uji Aktivitas Penghambatan terhadap <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv dengan metode Dilusi Agar dengan Media LJ	120
H. Uji Aktivitas Penghambatan terhadap <i>Mycobacterium marinum</i>	122
I. Uji Aktivitas Penghambatan terhadap <i>Mycobacterium marinum</i> dalam Zebrafish	127
BAB V. PEMBAHASAN UMUM.....	141
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	
A. Kesimpulan	160
B. Saran	161

DAFTAR PUSTAKA	162
LAMPIRAN	173
RINGKASAN	177
<i>SUMMARY</i>	178
NASKAH PUBLIKASI	179

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1	Bobot bahan batang Brotowali segar hingga ekstrak 74
Tabel 2	Isolat hasil pemisahan dengan KLTP terhadap FTH 78
Tabel 3	Tabel data ¹ H-NMR isolat A1 88
Tabel 4	Tabel data ¹³ C-NMR isolat A1 92
Tabel 5	Data korelasi H dengan C pada spektrum HSQC isolat A1 96
Tabel 6	Tabel data ¹³ C-NMR dan ¹ H-NMR isolat B1 109
Tabel 7	Konsentrasi Hambat Minimum ekstrak, fraksi dan isolat terhadap <i>M. tuberculosis</i> H37Rv dengan metode MABA 116
Tabel 8	Hasil Uji penghambatan ekstrak, fraksi, dan isolat terhadap <i>M. tuberculosis</i> H37Rv dengan metode MGIT 119
Tabel 9	Nilai KHM ekstrak, fraksi, dan isolat terhadap <i>M. marinum</i> ... 124
Tabel 10	KHM ekstrak, fraksi, dan isolat terhadap <i>M. marinum</i> dan <i>M. tuberculosis</i> H37Rv yang diperoleh dengan berbagai metode 148
Tabel 11	Analisis <i>Lipinski's rule</i> terhadap isolat A1 dan isolat B1 157

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1	Tanaman Brotowali 11
Gambar 2	Struktur kimia beberapa senyawa dari Brotowali 13
Gambar 3	Susunan komponen dinding sel <i>Mycobacteria</i> 18
Gambar 4	Daur hidup zebrafish 22
Gambar 5	Pembentukan granuloma pada infeksi <i>M. tuberculosis</i> dan infeksi <i>M. marinum</i> 26
Gambar 6	Struktur isoniazid 31
Gambar 7	Struktur rifampisin 32
Gambar 8	Struktur etambutol 32
Gambar 9	Struktur pirazinamid 33
Gambar 10	Struktur streptomisin 33
Gambar 11	Skema penelitian 72
Gambar 12	Hasil KLT ekstrak etanol batang Brotowali dan Fraksinya dengan fase diam silika gel 60 F ₂₅₄ dan fase gerak kloroform-metanol (9:1) v/v 75
Gambar 13	Kromatogram hasil KLTP fraksi tidak larut n-heksana (FTH) dengan fase diam silika gel 60 PF ₂₅₄ , fase gerak kloroform-metanol (9:1). 77
Gambar 14	Kromatogram hasil pemisahan ekstrak etanol batang Brotowali dengan <i>flash chromatography</i> , fase diam : silika gel 4 g, fase gerak : kloroform-20% metanol dalam kloroform-metanol, elusi secara gradien, detektor : sinar uv 254 nm, 280 nm, 366 nm, dan ELSD 80
Gambar 15	Kromatogram fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etanol batang Brotowali dengan <i>flash chromatography</i> , fase diam : silika gel 60 F ₂₅₄ 81

Gambar 16	Uji kemurnian isolat A1 dengan metode KLT menggunakan 3 eluen berbeda. Fase diam silika gel F ₂₅₄ . Deteksi dengan lampu UV 254 nm	82
Gambar 17	Uji kemurnian isolat A1 dengan metode KLT menggunakan 3 eluen berbeda. Fase diam silika gel F ₂₅₄ . Deteksi dengan pereaksi serium sulfat	83
Gambar 18	Kromatogram isolat A1 dari pemisahan isolat A1 menggunakan <i>Liquid Chromatography</i> dengan fase diam oktadesilsilan (C18), fase gerak metanol, detektor <i>Photo Diode Array</i> (PDA), λ 221 nm	84
Gambar 19	Spektrum ultraviolet isolat A1 dalam pelarut metanol	85
Gambar 20	Spektrum infra merah isolat A1 dalam pelet KBr.....	86
Gambar 21	Spektrum massa puncak 2 (waktu retensi 6,243 menit).....	87
Gambar 22	Struktur senyawa tinotuberide	88
Gambar 23	Spektrum ¹ H-NMR isolat A1.....	89
Gambar 24	Spektrum ¹ H-NMR isolat A1, perbesaran daerah 3,6-4 ppm ...	90
Gambar 25	Spektrum ¹³ C-NMR isolat A1.....	91
Gambar 26	Spektrum DEPT isolat A1	93
Gambar 27	Spektrum HSQC Isolat A1, perbesaran 3,1-3,6 ppm (¹ H-NMR); 45-80 ppm (¹³ C-NMR).....	94
Gambar 28	Spektrum HSQC Isolat A1, perbesaran 3,1-3,6 ppm (¹ H-NMR); 45-80 ppm (¹³ C-NMR).....	95
Gambar 29	Uji kemurnian isolat B1 dengan metode KLT menggunakan 3 eluen berbeda. Fase diam silika gel F ₂₅₄ , deteksi dengan pereaksi serium sulfat	97
Gambar 30	Spektrum infra merah isolat B1 dalam pelet KBr.....	98
Gambar 31	Struktur senyawa borapetosida C.....	99
Gambar 32	Spektrum ¹ H-NMR isolat B1	100
Gambar 33	Spektrum ¹ H-NMR Isolat B1, perbesaran daerah 1,0-2,9 ppm	101

Gambar 34	Spektrum ¹ H-NMR Isolat B1, perbesaran daerah 1,6-1,9 ppm	102
Gambar 35	Spektrum ¹³ C-NMR isolat B1	104
Gambar 36	Spektrum DEPT isolat B1	106
Gambar 37	Spektrum HSQC Isolat B1 (¹ H-NMR daerah geseran kimia 1-4 ppm; ¹³ C-NMR daerah geseran kimia 0-80 ppm).....	107
Gambar 38	Spektrum HSQC Isolat B1 (¹ H-NMR daerah geseran kimia 4-8 ppm; ¹³ C-NMR daerah geseran kimia 0-160 ppm).....	108
Gambar 39	Reaksi reduksi resazurin menjadi resorufin	112
Gambar 40	Hasil Uji penghambatan rifampisin dan isoniazid terhadap <i>M. tuberculosis</i> H37Rv dengan metode MABA	115
Gambar 41	Hasil Uji penghambatan ekstrak terhadap <i>M. tuberculosis</i> H37Rv dengan metode dilusi agar menggunakan media LJ	121
Gambar 42	Telur dan embrio zebrafish dengan beberapa bagian yang dapat menjadi rute infeksi bakteri <i>M. marinum</i>	127
Gambar 43	Perbandingan zebrafish yang tidak terinfeksi oleh <i>M. marinum</i> dengan zebrafish yang terinfeksi oleh <i>M. marinum</i>	129
Gambar 44	Rata-rata fluoresensi bakteri <i>M. marinum</i> mcherry dalam zebrafish tipe ABTL yang tidak terinfeksi dengan zebrafish yang terinfeksi	131
Gambar 45	Hasil analisis COPAS XL daya bunuh ekstrak etanol Brotowali (EEB, 500 µg/mL), FTH (500 µg/mL), Isolat A1 (100 µg/mL), Isolat B1 (100 µg/mL), dan rifampisin (206,57 µM) terhadap <i>M. marinum</i> dalam larva zebrafish tipe ABTL.....	132
Gambar 46	Hasil analisis COPAS XL pengaruh penambahan Isolat A1 (100 µg/mL), Isolat B1 (100 µg/mL), dan Rifampisin (206,57 µM) terhadap jumlah makrofag dalam larva zebrafish tipe Mpeg yang terinfeksi <i>M. marinum</i>	137
Gambar 47	Hasil analisis COPAS XL Pengaruh Isolat A1 (100 µg/mL) dan Isolat B1 (100 µg/mL) terhadap fluoresensi	

	GFP-LC3 dalam larva zebrafish tipe GFP-LC3 yang terinfeksi <i>M. marinum</i>	139
Gambar 48	Dugaan mekanisme aktivitas penghambatan isolat A1 dan isolat B1 terhadap <i>Mycobacterium</i>	150

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Surat Keterangan Determinasi Tanaman.....	173
Lampiran 2 Hasil Uji statistik uji daya bunuh ekstrak, fraksi dan isolat terhadap bakteri <i>M. marinum</i> dalam zebrafish tipe ABTL	174
Lampiran 3 Hasil Uji statistik uji pengaruh penambahan isolat A1 dan isolat B1 terhadap jumlah makrofag pada zebrafish tipe Mpeg yang terinfeksi oleh <i>M. marinum</i>	175
Lampiran 4 Hasil Uji statistik uji pengaruh penambahan isolat A1 dan isolat B1 terhadap proses autofagi pada zebrafish tipe GFP-LC3 yang terinfeksi oleh <i>M. marinum</i>	176

DAFTAR SINGKATAN KATA

ADC	: <i>Albumin Dextrose Catalase</i>
BTA	: Basil Tahan Asam
BSL	: <i>Biosafety Level Laboratory</i>
CFU	: <i>Colony Forming Unit</i>
DEPT	: <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMSO	: Dimetil Sulfoksida
dpf	: <i>day post fertilization</i>
ELSD	: <i>Evaporative Light Scattering Detector</i>
FTIR	: <i>Fourier Transform Infra Red</i>
GC-MS	: <i>Gas Chromatography-Mass Spectroscopy</i>
GFP	: <i>Green Fluorescent Protein</i>
HIV	: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HSQC	: <i>Heteronuclear Single Quantum Coherent</i>
hpf	: <i>hour post fertilization</i>
IR	: <i>Infra Red</i>
KBM	: Konsentrasi Bunuh Minimum
KHM	: Konsentrasi Hambat Minimum
KLT	: Kromatografi lapis tipis
KLTP	: Kromatografi Lapis Tipis Preparatif
LAF	: <i>Laminair Air Flow</i>
MABA	: <i>Microplate Alamar Blue Assay</i>

MGIT	: <i>Mycobacteria Growth Indicator Tube</i>
MDR-TB	: <i>Multidrug Resistant Tuberculosis</i>
MIC	: <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
OADC	: <i>Oleic acid Albumin Dextrose Catalase</i>
OAT	: Obat Anti Tuberkulosis
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
<i>R_f</i>	: <i>Retardation factor</i>
TB	: Tuberkulosis
XDR-TB	: <i>Extensively Drug Resistant Tuberculosis</i>