

AKTIVITAS PENGHAMBATAN FRAKSI DAUN DELIMA (*Punica granatum L.*) TERHADAP BAKTERI *Mycobacterium tuberculosis*

1| Afrisusnawati Rauf, 2| Nurshalati Tahar, 3| Resnia

Email Korespondensi : afrisusnawati.rauf@uin-alauddin.ac.id

Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Alauddin Makassar

Abstract : *Punica granatum L.*, commonly known as pomegranate, has emerged as a medicinal plant with potential antimicrobial activity. This study aims to identify this activity against the bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Pomegranate leaf extract is made using solvents (ethanol 96%), then partitioned using *n*-butanol solvents and fractionated using vacuum liquid chromatography method. After obtaining the fractional results, the inhibitory activity effect of the fraction was studied using the *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇RV strain and compared to commercial antibiotic Isoniazid using the MODS method. Pomegranate leaf fraction shows antibacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* at a concentration of 1000 ppm, as seen from the absence of cord at such concentrations. Therefore this plant can be an important source of new antimicrobial compounds to treat the bacteria *Mycobacterium tuberculosis*.

Keywords : *Mycobacterium tuberculosis*; Fraction of Pomegranate Leaf

Abstrak : *Punica granatum L.*, umumnya dikenal sebagai delima, telah muncul sebagai tanaman obat dengan potensi aktivitas antimikroba. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi aktivitas ini terhadap bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Ekstrak daun delima dibuat menggunakan pelarut (etanol 96%), kemudian dipartisi menggunakan pelarut *n*-butanol dan difraksinasi menggunakan metode kromatografi cair vakum. Setelah mendapatkan hasil fraksi, efek aktivitas penghambatan fraksi dipelajari menggunakan *Mycobacterium tuberculosis* strain H₃₇RV dan dibandingkan dengan antibiotik komersial Isoniazid menggunakan metode MODS. Fraksi daun delima menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Mycobacterium tuberculosis* pada konsentrasi 1000 ppm, terlihat dari tidak adanya *cord* pada konsentrasi tersebut. Oleh karena itu tanaman ini dapat menjadi sumber penting senyawa antimikroba baru untuk mengobati bakteri *Mycobacterium tuberculosis*.

Kata Kunci : *Mycobacterium tuberculosis*; Fraksi Daun Delima

PENDAHULUAN

Punica granatum L. (Punicaceae), umumnya dikenal sebagai delima, buahnya dibudidayakan secara komersial untuk dimakan di daerah kering di Asia Tenggara, wilayah Mediterania, dan Amerika Serikat (Yuan T 2012). Delima telah dikenal selama ratusan tahun karena berbagai manfaat kesehatannya, termasuk aktivitas antimikroba (A. Howell 2013). Minat yang cukup besar telah meningkat terhadap penggunaan sumber tanaman yang menghambat bakteri patogen yang resistan terhadap beberapa obat sebagai pengobatan alternatif (AlMatar 2019). Berbagai ekstrak / konstituen dari berbagai bagian tanaman ini memiliki sejumlah aktivitas biologis seperti antitumor, antibakteri, antijamur, dan antiulcer (Celik I 2009). *Punica granatum* menunjukkan aktivitas antibakteri melalui efek bakteriostatik dan bakteriosidal (Braga LC 2005). Penelitian lain juga telah membuktikan bahwa kehadiran ellagitannins dan punicalagin bertanggung jawab atas efek antibakteri dan kulitnya sering dilaporkan lebih efektif daripada ekstrak biji (Miguel MG 2010). Aktivitas antimikroba delima telah dilaporkan dengan berbagai ekstrak pada manusia dan murine model (Al-Zoreky 2009). Melendez dan Capriles juga melaporkan bahwa ekstrak dari buah *Punica granatum* memiliki aktivitas antibakteri *in vitro* yang kuat terhadap banyak strain bakteri yang diuji (Melendez and Capriles 2006). Daun delima sejauh ini belum banyak dieksplorasi untuk aktivitas antimikroba.

Mycobacterium tuberculosis (MTB) menyebabkan spektrum penyakit yang luas pada kelompok pasien yang berbeda (Rockwood 2016). Tuberkulosis (TB) adalah prioritas



kesehatan masyarakat global, menjadi penyebab utama kematian oleh infeksi bakteri dan penyebab kematian kedua oleh penyakit menular (Russel 2013). Pada 2012, diperkirakan ada 8,6 juta kasus baru TB (kisaran 8,3-9 juta) secara global, setara dengan kejadian 122 kasus per 100.000 penduduk. TB adalah penyebab 1,3 juta kematian di seluruh dunia setiap tahun (WHO 2013). Pengobatan tuberkulosis (TB) adalah disiplin yang matang, dengan lebih dari 60 tahun pengalaman klinis yang bertambah di seluruh dunia. Namun, pengobatan multidrug yang diperlukan untuk TB yang rentan terhadap obat, bertahan enam bulan dan tidak pernah dioptimalkan sesuai dengan standar saat ini (Mitnick 2009).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas penghambatan fraksi daun delima terhadap bakteri *Mycobacterium tuberculosis*.

METODE

Penyiapan sampel

Daun segar delima (500 g) dibersihkan dengan cara sortasi basah untuk menghilangkan kotoran atau partikel kotor yang ada di permukaan. Daun dibersihkan dengan air dan dikeringkan dengan udara kering. Bahan tanaman yang telah kering kemudian dihancurkan menggunakan blender listrik untuk mendapatkan bubuk halus dan selanjutnya disaring untuk mendapatkan partikel yang lebih halus. Sampel bubuk disimpan dalam wadah plastik bersih sampai diperlukan untuk analisis. (Segun, 2013).

Prosedur

Metode Maserasi

500 g bubuk tanaman ditimbang dengan timbangan dan direndam dalam 1500 ml etanol pada suhu kamar selama 48 jam dengan pengocokan kuat pada interval reguler. Residu diekstraksi ulang sebanyak tiga kali untuk memastikan proses ekstraksi telah lengkap. Ekstrak disaring dan diuapkan sampai kering menggunakan rotary evaporator dan konsentrasinya digunakan untuk partisi cair-padat.

Partisi Cair-Padat

Ekstrak Delima ditimbang sebanyak 100 gram, dimasukkan ke dalam lumping dan ditambahkan N-butanol lalu digerus, kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi. Disentrifugasi dengan kecepatan 300 rpm kemudian dipisahkan antara bagian yang larut n-butanol dengan yang tidak larut n-butanol.

Penentuan Eluen

Eluen ditentukan berdasarkan profil KLT yang diperoleh dari metode kromatografi lapis tipis. Kemudian dievaluasi dengan menggunakan perbandingan eluen tertentu dari tingkat kepolaran terendah hingga tertinggi. Penampakan noda eluen diamati dibawah lampu UV 254 dan 366 nm serta penyemprotan dengan H₂SO₄ pada lempeng. Lempeng kemudian dipanaskan dalam oven hingga noda tampak. Pemilihan eluen didasarkan pada kepolaran dengan prinsip Like Dissolves Like

Fraksinasi

Fraksinasi menggunakan kromatografi cair vakum kemudian dilanjutkan dengan penggabungan fraksi-fraksi. Digabungkan fraksi yang memiliki noda yang sama atau hampir sama.

Skrining Fitokimia

Identifikasi Alkaloid (Uji Wagner)

Ekstrak ditetesi dengan 3-5 tetes reagen Wagner (1,27 g yodium dan 2 g kalium yodium dalam 100 ml air) dan diamati untuk pembentukan endapan coklat kemerahan.

Identifikasi Steroid (Uji Liebermann- burchard)

1 ml ekstrak ditetesi dengan kloroform, anhidrida asetat dan conc. H₂SO₄ dan diamati pembentukan warna merah muda gelap atau merah.

Identifikasi Fenol (Uji besi klorida)

1 ml ekstrak ditotolkan pada lempeng kemudian ditetesi dengan FeCl₃ 5% dan diamati pembentukan warna biru atau hitam.

Identifikasi Flavonoid (Uji pereaksi basa)

2 ml ekstrak ditetesi dengan beberapa tetes larutan natrium hidroksida 20%. Pembentukan warna kuning yang intens, yang menjadi tidak berwarna pada penambahan asam klorida encer menunjukkan adanya flavonoid.

Identifikasi Tannin (Uji Braymer)

2 ml ekstrak ditetesi dengan larutan besi klorida alkohol 10% dan diamati untuk pembentukan larutan warna biru atau kehijauan.

Uji Aktivitas Antituberculosis

Pembuatan Media Cair Middlebrook 7H9

Ditimbang 0,327 middleBrook 7H9 dan casitone 0,069 g kemudian dimasukkan ke dalam wadah, ditambahkan 0,172 ml gliserol ke dalam wadah dan dicukupkan dengan aquadest hingga 50 ml. Dikocok sampai homogen, disterilisasi menggunakan autoklaf ± 20 menit pada suhu 121 °C.

Pembuatan Larutan Stok Fraksi

Dibuat larutan stok fraksi 1000 ppm, kemudian diencerkan dengan konsentrasi 250 ppm, 500 ppm dan 750 ppm, kemudian dihomogenkan dengan magnetic stirrer. Sampel disimpan sebagai larutan stok fraksi.

Pembuatan Suspensi Bakteri Mycobacterium Tuberculosis

Diambil larutan media cair MiddleBrook 7H9 sebanyak 25 ml, ditambahkan OADC 0,5 ml dan dihomogenkan. Kemudian ditambahkan bakteri Mycobacterium tuberculosis H₃₇RV sebanyak 1 ml, disuspensikan ke dalam tabung steril yang berisi 25 ml media MiddleBrook 7H9 dan dihomogenkan.

Pengujian Aktivitas dengan Metode MODS (Microscopically Observed Drug Susceptibility)

Disiapkan plat 24 well untuk strain H₃₇RV. Dipipet 50 µl fraksi pada masing-masing konsentrasi (triplo), kemudian ditambahkan 950 µl media cair H₃₇RV dan bakteri Mycobacterium tuberculosis. Dipipet 50 µl DMSO, ditambahkan 950 µl media cair H₃₇RV dan bakteri Mycobacterium tuberculosis sebagai kontrol negatif. Dipipet 50 µl obat isoniazid 0,4 ppm, ditambahkan 950 µl media cair H₃₇RV dan bakteri Mycobacterium tuberculosis sebagai

kontrol positif. Kemudian diinkubasi selama 7 hari dengan suhu 30°C dan diamati dibawah mikroskop.

HASIL

Hasil identifikasi golongan senyawa

Pada pengujian/ identifikasi golongan, hasil fraksi daun delima menunjukkan adanya kandungan senyawa flavonoid, tannin, dan alkaloid.

Hasil uji kativitas penghambatan fraksi daun delima

Aktivitas penghambatan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dapat diketahui dengan mengamati ada atau tidak adanya cord yang terlihat dengan menggunakan mikroskop.

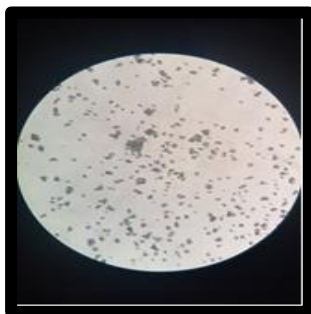
Tabel 1. Hasil pengujian aktivitas penghambatan fraksi Daun Delima (*Punica granatum L*) terhadap Bakteri *Mycobacterium tuberculosis*

Perlakuan	Fraksi larut n-butanol Daun Delima (<i>Punica granatum L</i>)		
	1	2	3
Kontrol negatif	++	++	++
Kontrol positif (Isoniazid)	-	-	-
Konsentrasi 1000 ppm	-	-	-
Konsentrasi 750 ppm	+	+	+
Konsentrasi 500 ppm	++	++	++
Konsentrasi 250 ppm	+++	+++	+++

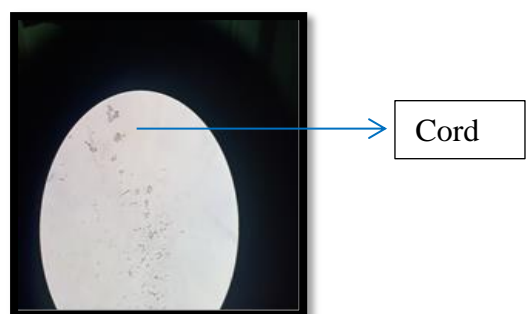
Keterangan:

- : Tidak ada pertumbuhan
- + : Ada pertumbuhan (sedikit) < 10 cord
- ++ : Ada pertumbuhan (banyak) >10 cord
- +++ : Ada pertumbuhan (sangat banyak)

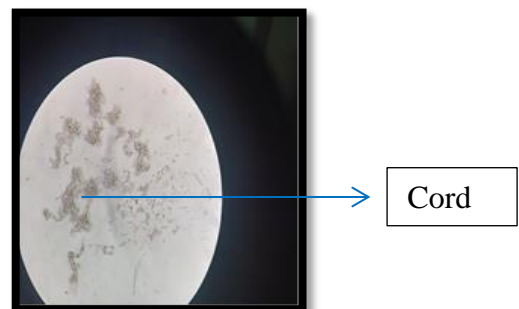
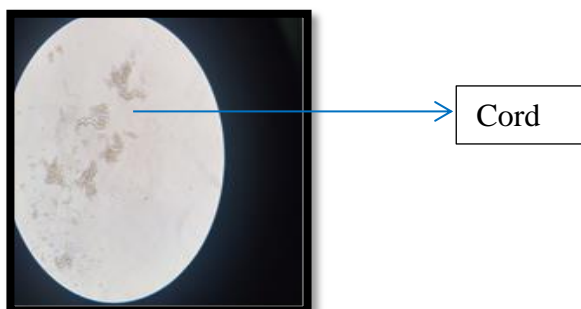
Hasil pengamatan menggunakan mikroskop

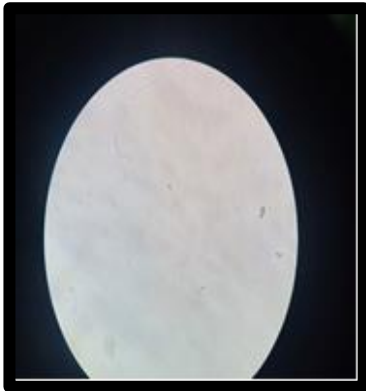


Gambar 1. Konsentrasi 1000 ppm



Gambar 2. Konsentrasi 750 ppm



Gambar 3. Konsentrasi 500 ppm**Gambar 5. Kontrol Positif****Gambar 4. Konsentrasi 250 ppm****Gambar 5. Kontrol Negatif****PEMBAHASAN**

Tuberkulosis masih menjadi salah satu penyakit menular yang paling mematikan bagi manusia. Sekitar 9,2 juta orang tercatat sebagai penderita aktif setiap tahun, sementara 1,7 juta kasus mengakibatkan kematian pada periode yang sama. Tanaman obat menawarkan harapan untuk mengembangkan obat-obatan alternatif untuk pengobatan TBC (Rajandeep Kaur 2015).

Penggunaan bahan alam sebagai substitusi agen terapi kimia untuk mendapatkan aktivitas penghambatan terhadap beberapa bakteri patogen dengan mekanisme spesifik merupakan tujuan utama dari banyak penelitian saat ini. (Hemani 2018). Selama bertahun-tahun telah ada banyak penelitian kecil yang dilakukan di berbagai daerah di dunia tentang efek bakterisida dari buah delima pada sejumlah jenis bakteri patogen dan bakteri yang resistan terhadap obat (A. B. Howell 2013).

Pada identifikasi golongan yang telah dilakukan, hasil fraksi menunjukkan adanya kandungan flavonoid, tannin, dan alkaloid. Telah diketahui bahwa tanaman delima mengandung beberapa zat aktif yang dapat berfungsi sebagai antibakteri, diantaranya flavonoid, fenol, dan tannin. Flavonoid merupakan suatu bahan yang mempunyai struktur fenol dengan satu carbonil group. Senyawa ini telah diketahui disintesis oleh tanaman dalam responnya terhadap infeksi mikroba. Aktivitas flavonoid kemungkinan disebabkan oleh kemampuannya untuk membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler maupun yang terlarut, serta dapat membentuk kompleks dengan dinding sel. Semakin lipofilik suatu flavonoid, kemampuannya dalam merusak dinding sel dari bakteri akan semakin kuat. Senyawa kedua yang teridentifikasi pada fraksi adalah senyawa golongan tannin, Senyawa ini mampu menghambat enzim DNA-topoisomerase, dengan dihambatnya aktifitas enzim ini, akan mengakibatkan terhambatnya proses replikasi bakteri tersebut (Prihantoro 2006). Alkaloid bekerja sebagai antibakteri dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan terjadinya kematian sel (Amalia 2017).

Metode Microscopic Observation Drug Susceptibility (MODS) merupakan metode pengujian dengan alat berbiaya rendah dan berteknologi sederhana untuk deteksi TB dan MDRTB berkinerja tinggi. Uji MODS didasarkan pada tiga prinsip: 1) Mycobacterium tuberculosis tumbuh lebih cepat dalam media cair daripada pada media padat 2) pertumbuhan Mycobacterium tuberculosis mikroskopis dapat dideteksi lebih awal dalam media cair

dibanding pertumbuhan makroskopis koloni pada media padat, dan karena pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* yang spesifik memungkinkannya untuk dibedakan dari mikobakteri atipikal atau kontaminasi jamur atau bakteri 3) obat isoniazid dan rifampisin dapat dimasukkan ke dalam uji MODS untuk memungkinkan deteksi langsung simultan MDRTB, menghindarkan perlunya subkultur untuk dilakukan tes kerentanan obat tidak langsung (Brady 2008).

Fraksi larut n-butanol yang telah diperoleh diujikan pada bakteri *Mycobacterium tuberculosis* strain H₃₇RV. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui apakah hasil fraksi dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara mengamati pertumbuhan bakteri (cord) pada well plate dengan konsentrasi yang berbeda-beda yaitu konsentrasi 1000 ppm, 750 ppm, 500 ppm, dan 250 ppm. Perbedaan konsentrasi dibuat untuk mengetahui tingkat aktifitas fraksi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada konsentrasi 1000 ppm memperlihatkan aktivitas yang paling baik dengan tidak adanya pertumbuhan cord. Aktivitas penghambatan senyawa dari fraksi dapat dilihat dari ada atau tidaknya cord yang terbentuk yang dapat diamati dengan menggunakan mikroskop. Cord (Trehalosa dimikolat) adalah salah satu penyusun dinding sel *Mycobacterium tuberculosis*. Cord terlibat pada mekanisme imunomodulator utama yang bertanggung jawab untuk virulensi *Mycobacterium tuberculosis*, sehingga pada saat pengamatan mikroskop cord inilah yang akan terlihat. Cord berbentuk ekor dengan warna terang mengkilap.

DAFTAR PUSTAKA

- AlMatar, Manaf. "Evaluation of Polyphenolic Profile and Antibacterial Activity of Pomegranate Juice in Combination with Rifampin (R) against MDR-TB Clinical Isolates." *Current Pharmaceutical Biotechnology* 20, no. 0 (2019).
- Al-Zoreky, N. "Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels." *International journal of food microbiology* 134 (2009): 244-248.
- Amalia, Alfi. "Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Sembung (*Blumea balsamifera* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Meticillin Resistant *Staphylococcus Aureus*." *Prosiding Seminar Nasional Biotik 2017*. 2017.
- Brady. "The MODS method for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistant tuberculosis." *J Vis Expo* 11, no. 17 (2008).
- Braga LC, Leite AAM, Xavier KGS, Takahashi JA, Bemquerer MP, Chartone- Souza E, et al. "Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*." *Can J Microbiol* 51, no. 7 (2005): 541.
- Celik I, Temur A, ISIK I. "Hepatoprotective role and antioxidant capacity of pomegranate (*Punica granatum*) flowers infusion against trichloro- acetic acid-exposed in rats." *Food Chem Toxicol.* 47 (2009): 145-149.
- Hemani. "EVALUATION OF ANTIMICROBIAL PROPERTY OF EXTRACT OF *PUNICA GRANATUM* (L.) ON ORAL PATHOGENS." *Int. J. Life Sci. Pharma Res* 8, no. 3 (2018): 35-40.

- Howell, Ami. "The Pomegranate: Effects on Bacteria and Viruses That Influence Human Health." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* (Hindawi Publishing Corporation), 2013: 1-11.
- Howell, Amy B. "The Pomegranate: Effects on Bacteria and Viruses That Influence Human Health." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* (Hindawi Publishing Corporation), 2013.
- Melendez, P.A., and V.A Capriles. "Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico." *Phytomedicine* 2006, 13 (2006): 272-276.
- Miguel MG, Neves MA, Antunes MD. "Pomegranate (*Punica granatum* L.): A medicinal plant with myriad biological properties-A short review." *J Medicinal Plants Res* 4, no. 25 (December 2010): 2836.
- Mitnick, Carole D. "Tuberculosis pharmacotherapy: strategies to optimize patient care." *Expert Opin Pharmacother* 10, no. 3 (2009): 381-401.
- Prihantoro, Teguh. "Antibacterial Effect of Pomegranate's (*Punica granatum*) Rind Extract Againsts *Shigella* *disentriae* in Vitro." *Jurnal Kedokteran Brawijaya* 22, no. 3 (2006).
- Rajandeep Kaur, Harpreet Kaur. "Antitubercular Activity and Phytochemical Screening of Selected Medicinal Plant." *Oriental Journal of Chemistry* 31, no. 1 (2015): 597-600.
- Rockwood, Neesha. "Assessment of treatment response in tuberculosis." *Expert Rev Respir Med* 10, no. 6 (2016): 643-654.
- Russel, DG. "Graduation time." *Nature*, 2013: 502.
- Segun. "Comparison of Efficiency of Different Solvents used for the Extraction of Phytochemicals from the." *International Journal of Science and Research (IJSR)* 4, no. 7 (2013): 835-838.
- WHO. *Global Tuberculosis Report 2013*. 2013.
- Yuan T, Ding YQ, Wan CP, Li LY, Xu JL, Liu K, Slitt A, Ferreira D, Khan IA, Seeram NP. "Antidiabetic ellagitannins from pomegranate flowers: inhibition of alpha-glucosidase and lipogenic gene expression." *Org Lett* 14 (2012): 5358-5361.