

Efek Ekstrak Air Kulit Buah Delima (*Punica granatum L*) terhadap *Salmonella typhimurium* secara *In Vivo*

(*The Effect of Pomegranate (Punica granatum L) Peel Aqueous Extract on Salmonella typhimurium In Vivo*)

Anastasia Citra Purwani, Dini Agustina, Yuli Hermansyah
Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
e-mail: anastasia.citra.purwani@gmail.com

Abstract

Salmonella typhi infection is commonly treated by an antimicrobial agent such as levofloxacin. At the moment, herbal usage has risen as an alternative therapy. Pomegranate (*Punica granatum L*) is a commonly used herb which contains flavonoid as its major active compound. Aqueous extract of pomegranate peel had been known for its antimicrobial effect to *S. typhi* on *in vitro* study. The aim of this research was to investigate the activity of aqueous extract of pomegranate peel to *S. typhimurium* *in vivo* and find the antimicrobial effect of different concentrations. The study was conducted by using typhoid fever model in mice infected by *S. typhimurium*. Each mice was treated with aqueous pomegranate peel extract in three concentrations: 0,65 mg/ml, 1,3 mg/ml and 2,6 mg/ml for treatment groups and levofloxacin 1,3 mg/ml for positive control group. Ileum of each mice was isolated and cultured. The result of post hoc LSD test showed that negative control group significantly different with treatment group and the result of Pearson test showed $p=0,000$ and $r = -0,865$. In conclusion, aqueous extract of pomegranate peel had an antimicrobial activity on *S. typhimurium* *in vivo* where the higher extract concentration the lesser number of *S. typhimurium* colony.

Keywords: Antimicrobial, Pomegranate, *Salmonella typhimurium*

Abstrak

Infeksi *Salmonella typhi* umumnya diterapi dengan antibiotik seperti levofloxacin. Di sisi lain, penggunaan obat herbal telah meningkat salah satunya sebagai terapi alternatif. Delima (*Punica granatum L*) adalah tanaman herbal yang sering digunakan dan terdiri dari flavonoid yang merupakan senyawa aktif utama. Ekstrak air kulit buah delima telah teruji aktivitas antibakterinya terhadap *S. typhi* secara *in vitro*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak air kulit buah delima secara *in vivo* dan mengetahui hubungan antara pemberian konsentrasi ekstrak yang berbeda dengan jumlah koloni bakteri *S. typhimurium*. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan hewan model demam tifoid berupa mencit yang diinfeksi *S. typhimurium*. Setiap mencit diterapi dengan ekstrak air kulit buah delima yang terdiri dari 3 konsentrasi yaitu 0,65 mg/ml, 1,3 mg/ml dan 2,6 mg/ml untuk kelompok perlakuan dan levofloxacin 1,3 mg/ml untuk kelompok kontrol positif. Ileum setiap mencit dikumpulkan dan dikultur. Didapatkan hasil *post hoc* LSD kontrol negatif berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan dan hasil uji *Pearson* $p=0,000$ serta $r = -0,865$. Kesimpulan penelitian ini adalah ekstrak air kulit buah delima memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. typhimurium* secara *in vivo* dan semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin rendah jumlah koloni bakteri *S. typhimurium*.

Kata Kunci: Antibakteri, Delima, *Salmonella typhimurium*

Pendahuluan

Demam tifoid merupakan infeksi sistemik yang diakibatkan oleh *Salmonella enteric* serovar *typhi* (*S.typhi*). Insiden penyakit ini tergolong tinggi sehingga demam tifoid masih menjadi topik yang sering diperbincangkan [1]. Menurut WHO, terdapat 21 juta kasus dengan 216.000-600.000 kematian yang didominasi oleh anak-anak usia sekolah dan dewasa muda per tahunnya. Sedangkan di Indonesia terdapat 800 kasus dari 100.000 penduduk, dengan angka kematian 2% pertahun [2].

Demam tifoid menjadi penyakit yang harus mendapat perhatian serius karena permasalahannya yang semakin kompleks seperti gejala-gejala klinik yang bervariasi dari ringan sampai berat dengan komplikasi yang berbahaya [3]. Selain itu terdapat permasalahan lain yaitu *S.typhi* sebagai agen infeksi demam tifoid resistensinya meningkat terhadap obat-obatan yang lazim dipakai [4]. Oleh karena itu diperlukan alternatif pengobatan, salah satunya adalah dengan menggunakan kulit buah delima.

Telah dilakukan penelitian fitokimia terhadap kulit buah delima dan didapatkan hasil bahwa kulit buah delima mengandung flavonoid dan tannin yang memiliki aktivitas antibakteri. Pada penelitian terdahulu, telah dibuktikan bahwa ekstrak air kulit buah delima memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. typhi* secara *in vitro* dengan angka hambatan (KHM) 9 mm yang menunjukkan *S.typhi* sensitif terhadap ekstrak air kulit buah delima [5]. Namun belum ada pembuktian mengenai aktivitas antibakteri ekstrak air kulit buah delima terhadap hewan model demam tifoid yang diinfeksi *S. typhimurium*.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak air kulit buah delima terhadap *Salmonella typhimurium* secara *in vivo* dan mengetahui hubungan antara pemberian ekstrak pada konsentrasi yang berbeda dengan jumlah koloni *Salmonella typhimurium*.

Metode Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental murni (*True Experimental Design*) dengan rancangan penelitian eksperimental sederhana (*Post test only Control Group Design*) [6]. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Jember, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak air kulit buah delima (0,65 mg/ml, 1,3 mg/ml dan 2,6 mg/ml). Variabel terikat adalah jumlah koloni *S. typhimurium* paska terapi. Variabel terkontrol adalah pemeliharaan mencit, berat badan mencit, jenis kelamin dan lama waktu pemeliharaan mencit. Sampel yang digunakan adalah 24 ekor mencit jantan galur *Balb/C* dengan berat antara 20-25 gram yang dalam pengelompokannya dipilih melalui teknik *Simple random sampling*.

Mencit dibagi menjadi 5 kelompok yang kemudian diadaptasikan selama 7 hari. Setelah masa adaptasi selesai, mencit diinfeksi 1ml suspensi *S. typhimurium* 0,5 Mc. Farland secara peroral. Mencit mendapat terapi sesuai kelompok pada hari ke 8 paska penginfeksian. Kelompok kontrol negatif (tidak mendapat terapi), kelompok kontrol positif (levofloxacin 1,3 mg/ml), kelompok perlakuan 1 (ekstrak air kulit buah delima 0,65 mg/ml), kelompok perlakuan 2 (ekstrak air kulit buah delima 1,3 mg/ml) dan kelompok perlakuan 3 (ekstrak air kulit buah delima 2,6 mg/ml). Terapi diberikan selama 7 hari. Paska pemberian terapi, mencit diterminasi untuk pengambilan ileum. Ileum ditimbang kemudian dimortir dengan menambahkan 1 ml NaCl. Bilasan organ tersebut kemudian dikultur pada media agar SS. Inkubasi dilakukan selama 24 jam dalam suhu 37⁰ C lalu koloni bakteri *S. typhimurium* dihitung menggunakan metode *Total Plate Count* [7]. Setelah data koloni terkumpul kemudian diaplikasikan pada rumus berikut,

$$\frac{\text{Koloni terhitung} \times \text{pengenceran} \times \text{pengenceran pertama}}{\text{berat spesimen}} \quad [8]$$

Data hasil perhitungan rumus kemudian dianalisis secara statistik. Analisis statistik menggunakan uji normalitas *Shapiro Wilk* untuk mengetahui distribusi data, selanjutnya diuji dengan uji *Levene's* untuk mengetahui homogenitas varian. Jika sebaran data normal dan varian data homogen, analisis dapat dilanjutkan dengan uji parametrik yaitu *One Way*

ANOVA dan jika tidak maka data dianalisis menggunakan uji non parametrik yaitu *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan rata-rata secara signifikan pada dua sampel atau lebih. Jika dari uji tersebut didapatkan hasil perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji *Post hoc* untuk mengetahui kelompok manakah yang memiliki perbedaan rata-rata secara signifikan.

Analisis selanjutnya dilakukan dengan uji korelasi sederhana bivariat untuk mengetahui hubungan antara variabel bebas terhadap variabel terikat. Selanjutnya dilakukan uji regresi logaritmik untuk mendapatkan besar angka pengaruh variabel bebas (ekstrak air kulit buah delima) terhadap variabel terikat (jumlah koloni *S. Typhimurium*). Analisis statistik dilakukan dengan program SPSS versi 21.

Hasil penelitian

Koloni *S. typhimurium* paska terapi dihitung melalui 3 kali pengulangan dan didapatkan hasil perhitungan koloni *S. typhimurium* (CFU/gram) yang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil perhitungan koloni *S. typhimurium* (CFU/gram) pada pengenceran 10^{-1}

Mencit	Jumlah Koloni CFU/gram				
	K-	K+	P1	P2	P3
I	4000	150	500	500	350
II	1500	200	1000	450	450
III	2200	250	675	550	150
IV	2100	350	650	600	500
Mean	2450	237,5	706,2 5	525	362,5
Std	1078,58	85,39	210,5 3	64,5 5	154,78

- K- : Kontrol negatif
- K+ : Kontrol positif (levofloxacin)
- P1 : Perlakuan ekstrak konsentrasi 0,65mg/ml
- P2 : Perlakuan ekstrak konsentrasi 1,3mg/ml
- P3 : Perlakuan ekstrak konsentrasi 2,6mg/ml

Berdasarkan Tabel 1, kontrol negatif memiliki rata-rata jumlah koloni 2450 yang menunjukkan jumlah koloni bakteri paling tinggi dan kontrol positif memiliki rata-rata jumlah koloni 237,5 yang menunjukkan jumlah koloni bakteri yang paling rendah. Sedangkan pada kelompok perlakuan diketahui terdapat perbedaan jumlah koloni berdasarkan konsentrasi terapi ekstrak berturut-turut dari jumlah koloni terbesar dimiliki kelompok perlakuan 1 dengan 706,25 koloni, kemudian kelompok perlakuan 2 dengan 525 koloni dan kelompok perlakuan 3 dengan 362,5 koloni.

Data-data yang telah terkumpul dianalisis menggunakan uji *Shapiro-Wilk* didapatkan $p=0,329$ yang menunjukkan sebaran data normal. Selanjutnya data dianalisis dengan uji *Levene's* didapatkan $p=0,395$ yang menunjukkan varian data homogen. Setelah persyaratan untuk uji parametrik terpenuhi yaitu sebaran data normal dan varian data homogen maka dilakukan uji *One Way ANOVA* dan didapatkan $p=0,000$, nilai tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan pada dua kelompok atau lebih. Untuk mengetahui kelompok manakah yang memiliki perbedaan secara signifikan, analisis dilanjutkan dengan uji *Post hoc* dan didapatkan hasil bahwa kelompok kontrol negatif berbeda secara signifikan dengan kelompok perlakuan ekstrak konsentrasi 0,65 mg/ml, konsentrasi 1,3 mg/ml dan 2,6 mg/ml.

Selanjutnya data dianalisis dengan uji korelasi *Pearson* untuk mengetahui hubungan antara variabel bebas dengan variabel terikat. Dari uji korelasi *Pearson* didapatkan $p=0,000$, $r=-0,865$. Nilai p menunjukkan adanya hubungan yang signifikan antara dua variabel yang diuji sedangkan nilai r menunjukkan korelasi negatif dengan kekuatan korelasi yang sangat kuat. Analisis dilanjutkan dengan uji regresi logaritmik untuk mengetahui besar pengaruh dari hubungan antara variabel bebas terhadap variabel terikat, didapatkan nilai $R^2=0,81$.

Pembahasan

Pada penelitian ini hewan coba yang digunakan adalah mencit yang mula-mula diaklimatisasi selama 7 hari guna menciptakan lingkungan bebas rasa takut dan mencegah terjadinya stress [9]. Setelah masa aklimatisasi, mencit yang telah dikelompokkan diinfeksi suspensi bakteri *S. typhimurium* 10^8 atau senilai dengan standar 0,5 *Mc. Farland*. Berdasarkan temuan gejala klinik berupa peningkatan suhu rektal dan perubahan aktivitas fisik mencit, infeksi sistemik terjadi pada hari ketujuh setelah penginfeksi. Setelah muncul gejala klinik yang menunjukkan infeksi sistemik, mencit diterapi sesuai kelompok selama 7 hari yang kemudian diterminasi dan dibuat kultur dari bilasan ileum.

Berdasarkan analisis data menggunakan *One Way ANOVA* didapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan pada dua kelompok atau lebih. Setelah didapatkan hasil uji *One Way ANOVA* yang signifikan maka analisis dilanjutkan menggunakan uji *Post hoc LSD* yang menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan ekstrak 0,65 mg/ml, 1,3 mg/ml dan 2,6 mg/ml. Hal tersebut memiliki interpretasi bahwa ekstrak air kulit buah delima memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. typhimurium*. Aktivitas antibakteri pada ekstrak dikarenakan adanya kandungan flavonoid dan tannin yang masing-masing memiliki mekanisme yang berbeda. Flavonoid memiliki aktivitas mengganggu DNA gyrase sehingga mengakibatkan kerusakan rantai DNA. Rusaknya rantai DNA menyebabkan gagalnya transkripsi, replikasi dan metabolisme bakteri [10]. Sedangkan tannin memiliki target berbeda yaitu enzim DD-transpeptidase yang merupakan penghubung antar peptidoglikan dinding bakteri. Ikatan antara tannin dan enzim DD-transpeptidase dapat mengakibatkan lemahnya dinding sel yang menyebabkan ia tidak mampu menahan kekuatan tekanan osmotik internal bakteri. Hal tersebut menyebabkan kematian bakteri karena lisis [11].

Berdasarkan hasil uji korelasi *Pearson* didapatkan hasil $p=0,000$ maka dapat diinterpretasikan bahwa terdapat korelasi yang bermakna antara dua variabel yang diuji. Selain didapatkan nilai p , uji *Pearson* menunjukkan nilai korelasi (r) sebesar $-0,865$ yang memiliki menunjukkan korelasi negatif dengan kekuatan korelasi sangat kuat. Nilai korelasi negatif menandakan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin rendah jumlah koloni *S. typhimurium*. Hal tersebut dikarenakan jumlah kandungan flavonoid dan tannin pada konsentrasi 2,6 mg/ml lebih besar daripada konsentrasi 1,3 mg/ml dan 0,65 mg/ml. Flavonoid dan tannin dalam konsentrasi kecil tidak mampu menembus lapisan selubung sel *S. typhimurium* yang tergolong dalam bakteri gram negatif yang memiliki 4 lapis selubung sel yaitu lipopolisakarida, membran luar, peptidoglikan dan membran sitoplasma [12]. Ditinjau dari hasil uji regresi logaritma didapatkan $R^2=0,81$, yang menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak air kulit buah delima berpengaruh sebesar 81% terhadap pertumbuhan bakteri *S. typhimurium* sedangkan 19% lainnya dipengaruhi oleh faktor lain.

Simpulan dan Saran

Ekstrak air kulit buah delima (*Punica granatum L*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Salmonella typhimurium* secara *in vivo* dan semakin tinggi konsentrasi ekstrak air kulit buah delima (*Punica granatum L*) maka semakin rendah jumlah koloni *Salmonella typhimurium*.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui gambaran mikroskopis ileum hewan coba yang diinfeksi *S. Typhimurium*, dosis efektif ekstrak air kulit buah delima untuk terapi hewan model tifoid dan uji toksisitas terhadap ekstrak air kulit buah delima.

Daftar Pustaka

- [1] Pohan HT. Management Of Resistant Salmonella Infection. Paper presented at: 12th Jakarta Antimicrobial Update; Jakarta. Indonesia. 2011.
- [2] Widoyono. Penyakit Tropis: Epidemiologi, Penularan, Pencegahan & Pemberantasannya. Jakarta: Erlangga; 2008.
- [3] Fauci AS. Harrison's Internal Medicine, 18th Edition. USA: McGraw – Hill; 2011.
- [4] Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Pedoman Pengendalian Demam Tifoid. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2006.
- [5] Putta S, Kumar E, Sastry N, Kaladhar DS, Rao G. In-vitro antimicrobial and antioxidant activities of aqueous pericarp extract of *Punica granatum*. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2013 Aug; 3(8): 107-112.
- [6] Sugiyono. Metode Penelitian Kualitatif, Kuantitatif dan R&D. Bandung: Alfabeta; 2009.
- [7] Kaufmann SH, Kabelitz D. Methods in Microbiology Immunology of Infection. Annu. Rev. Immunol. 2010; 1(3): 129.
- [8] Baron S, Peterson S, Finegold. Bailey & Schott's Diagnostic Microbiology, Enterobacteriaceae, Mosby; 2007.
- [9] Ridwan E. Etika Pemanfaatan Hewan Percobaan dalam Penelitian Kesehatan. J Indon Med Assoc. 2013; 63 (3): 115.

- [10] Ngajow M, Abidjulu J, Kammu V. Pengaruh Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Matoa (*Pometia pinnata*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* secara *In vitro*. *Jurnal MIPA Unsrat*. 2013; 2(2): 128-132
- [11] Sari FP. Ekstraksi Zat Aktif Antimikroba dari Tanaman Yodium (*Jatropha multifida* Linn) sebagai Bahan Baku Alternatif Antibiotik Alami. Fakultas Teknik Universitas Diponegoro. Semarang; 2011.
- [12] Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. *Mikrobiologi Kedokteran edisi 23*. Jakarta: EGC; 2008.