

Skrining Antituberkulosis Ekstrak Tanaman Obat Lokal terhadap *Mycobacterium tuberculosis* Galur H37Rv dan HE dengan Metode *Lowenstein-Jensen*

Gaby Maulida Nurdin^{1*}, Irnayanti Bahar²

^{1,2} Program Studi Pendidikan Biologi, STKIP Pembangunan Indonesia, Jln. Inspeksi Kanal Citra Land No. 10 Makassar

Email: gabymaulida@gmail.com

Abstrak

Tuberkulosis (TB) menjadi masalah utama di negara berkembang termasuk Indonesia. Hal ini disebabkan oleh peningkatan kasus *multidrug-resistant* (MDR) dan *extensively drug-resistant* (XDR) pada strain *Mycobacterium tuberculosis*. Pengembangan senyawa aktif dari tanaman obat terus digalakkan. Penelitian ini bertujuan untuk menyeleksi (*skrining*) antituberkulosis tanaman obat lokal terhadap pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) galur H37Rv dan HE dengan metode LJ (*Lowenstein-Jensen*). Sampel penelitian yang digunakan berupa tanaman obat yang diduga berpotensi sebagai antituberkulosis, diantaranya mengkudu (*Morinda citrifolia*), benalu jeruk (*Dendrophthoe pentandra*), dan delima (*Punica granatum*) yang merupakan tanaman lokal Sulawesi Selatan. Ekstrak beberapa tanaman tersebut masing-masing diujikan terhadap isolat klinis *Mtb* yaitu galur sensitif H37Rv dan galur resisten HE (resisten terhadap isoniazid dan etambutol) dengan metode LJ (*Lowenstein-Jensen*) sebagai standar baku pemeriksaan tuberkulosis. Dari ketiga ekstrak yang diuji secara *in vitro*, hanya ekstrak etanol mengkudu (*M. citrifolia*) yang dapat menghambat pertumbuhan *M. tb* galur H37Rv dan HE pada konsentrasi masing-masing 1.5 mg/ml dan 2 mg/ml. Dengan demikian mengkudu (*M. citrifolia*) dapat digunakan sebagai terapi tambahan untuk TB.

Kata Kunci: *Mycobacterium tuberculosis*, antituberkulosis, tanaman obat lokal, metode LJ

Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit infeksi menular yang menjadi masalah kesehatan dunia yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Hampir setengah juta kasus TB termasuk kasus *multidrug-resistant* (MDR) dan *extensively drug-resistant* (XDR). Kasus ini menjadi tantangan besar bagi WHO untuk memberantas kasus TB. Pengobatan TB terbagi menjadi dua tahap yaitu tahap intensif (2-3 bulan) dan tahap lanjutan (4-7 bulan). Obat yang digunakan adalah kombinasi dari beberapa obat antituberkulosis (OAT). Pengobatan dalam jangka waktu lama memungkinkan timbulnya efek samping dan ketidakpatuhan pasien dalam mengkonsumsi obat sehingga dapat menimbulkan resistensi dan kekambuhan (Goodman & Gilman, 2008). Kegagalan pada pengobatan poliresisten TB atau TB-MDR akan menyebabkan lebih banyak OAT yang resisten terhadap kuman *M. tuberculosis*. Kegagalan ini tidak hanya merugikan pasien

tetapi juga meningkatkan penularan pada masyarakat.

Pemeriksaan kultur dan uji sensitifitas/resistensi obat perlu dilaksanakan untuk meminimalkan kemungkinan penularan. Teknik kultur masih dianggap sebagai metode baku emas yang paling sensitif saat ini untuk mendeteksi penyakit TB aktif. Metode kultur dengan menggunakan media basa telur adalah *Lowenstein-Jensen* (LJ). Media ini dapat mendukung pertumbuhan yang lebih baik pada *Mycobacterium tuberculosis complex* (*M.tb*) kecuali *M. bovis* dibanding non tuberkulosis mikobakteri (NTM). Masa hidup bakteri dengan metode ini sekitar 6-12 bulan bila didinginkan (Chihota *et al.*, 2010). Kultur LJ membutuhkan waktu 20 – 56 hari untuk diagnosis dan 4-6 minggu untuk siap digunakan pada DST. Meskipun pertumbuhan dan waktu yang lama, namun pemeriksaan identifikasi dengan menggunakan media *Lowenstein-Jensen* ini memberikan sensitivitas dan spesifitas yang tinggi dan dipakai sebagai alat diagnostik pada program penanggulangan TB (Kurniawan dkk., 2016).

Beberapa tanaman yang sudah diuji aktivitas antituberkulosisnya untuk penanggulangan TB adalah lempuyang wangi (*Zingiber aromaticum*), buah makasar (*Brucea javanica*), tabat barito (*Ficus deltoidea*), srigunggu (*Clerodendrum serratum*), sidaguri (*Sida rhombifolia*), dan cucur atap (*Baekkea frutescens*) (Idola, 2017). Pada penelitian ini perlu dikembangkan penelitian untuk menemukan kandidat baru dalam pengobatan TB yang aman dan efektif terkhusus dengan memanfaatkan tanaman obat lokal di Sulawesi Selatan. Skrining antituberkulosis tanaman obat diantaranya mengkudu (*Morinda citrifolia*), benalu jeruk (*Dendrophthoe pentandra*), dan delima (*Punica granatum*). Daun mengkudu memiliki kandungan bahan aktif *skopoletin* yang berfungsi melancarkan pembuluh darah dan terbukti sebagai antibakteri (Fatmawati, 2013). Sedangkan benalu yang dianggap sebagai gulma terkenal sebagai antikanker dan obat batuk (Fajriah, dkk., 2007).

Aktivitas antimikroba dari beberapa tanaman obat tersebut telah banyak diteliti oleh ilmuwan dari berbagai Negara (Sivakumar & Jayaraman, 2011). Namun, aktivitas penghambatan terhadap bakteri patogen *Mycobacterium tuberculosis* khususnya pada galur sensitif (H37Rv) dan resisten (HE) belum banyak dikaji dengan metode LJ. Dengan adanya senyawa aktif yang terkandung pada beberapa tanaman obat diharapkan dapat berfungsi sebagai antituberkulosis. Harapan inilah tentunya yang melatarbelakangi perlunya dilakukan penelitian ini untuk menskrining antituberkulosis dari beberapa tanaman obat terhadap pertumbuhan *M. tb* galur H37Rv dan HE.

Metode Penelitian

Ekstraksi

Daun dari beberapa tanaman obat yang telah dipreparasi selanjutnya diekstraksi dengan etanol secara maserasi yaitu dengan merendam sampel dengan pelarut ke dalam toples kaca sebanyak 300 ml selama tiga kali

pergantian larutan. Toples ditutup dan ditempatkan pada ruangan yang terlindung dari cahaya secara langsung sambil sesekali diaduk-aduk, kemudian disaring dan diuapkan dengan rotavapor hingga diperoleh ekstrak etanol kental.

Pembuatan stok larutan ekstrak

Konsentrasi final ekstrak di dalam media dibuatkan menjadi beberapa konsentrasi, diantaranya 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 1.5 mg/ml, dan 2 mg/ml. Masing-masing konsentrasi dibuatkan terlebih dahulu stok larutan ekstrak dengan menimbang ekstrak dengan konsentrasi tertinggi kemudian dilarutkan dengan ddH₂O. Selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat untuk memperoleh stok larutan.

Suspensi bakteri *M.tb* galur H37Rv dan HE dengan metode LJ

Media yang digunakan untuk melakukan uji resistensi ini adalah Lowenstein-Jensen (LJ) yang telah ditambah dengan OADC enrichment dengan perbandingan 9:1. Tabung yang diperlukan sebanyak 10 tabung terdiri dari 2 tabung LJ sebagai kontrol dan 8 tabung LJ dengan ekstrak berbagai konsentrasi untuk masing-masing galur. Konsentrasi ekstrak tanaman dalam media adalah 0,5 mg/ml; 1 mg/ml; 1,5 mg/ml; dan 2 mg/ml.

Pembacaan dan Interpretasi Hasil Uji

Pembacaan hasil uji dilakukan dengan cara mengamati pertumbuhan koloni tiap minggu pada masing-masing tabung. Pengamatan dilakukan sampai 8 minggu. Hasil negatif dinyatakan jika tidak ada pertumbuhan koloni setelah 8 minggu. Jumlah koloni bakteri yang tumbuh ditulis jika pertumbuhan < 20 koloni, bila koloni 20-100 maka dilaporkan 1+; jumlah koloni 100-200 dilaporkan 2+; ≥ 200 dicatat 3+

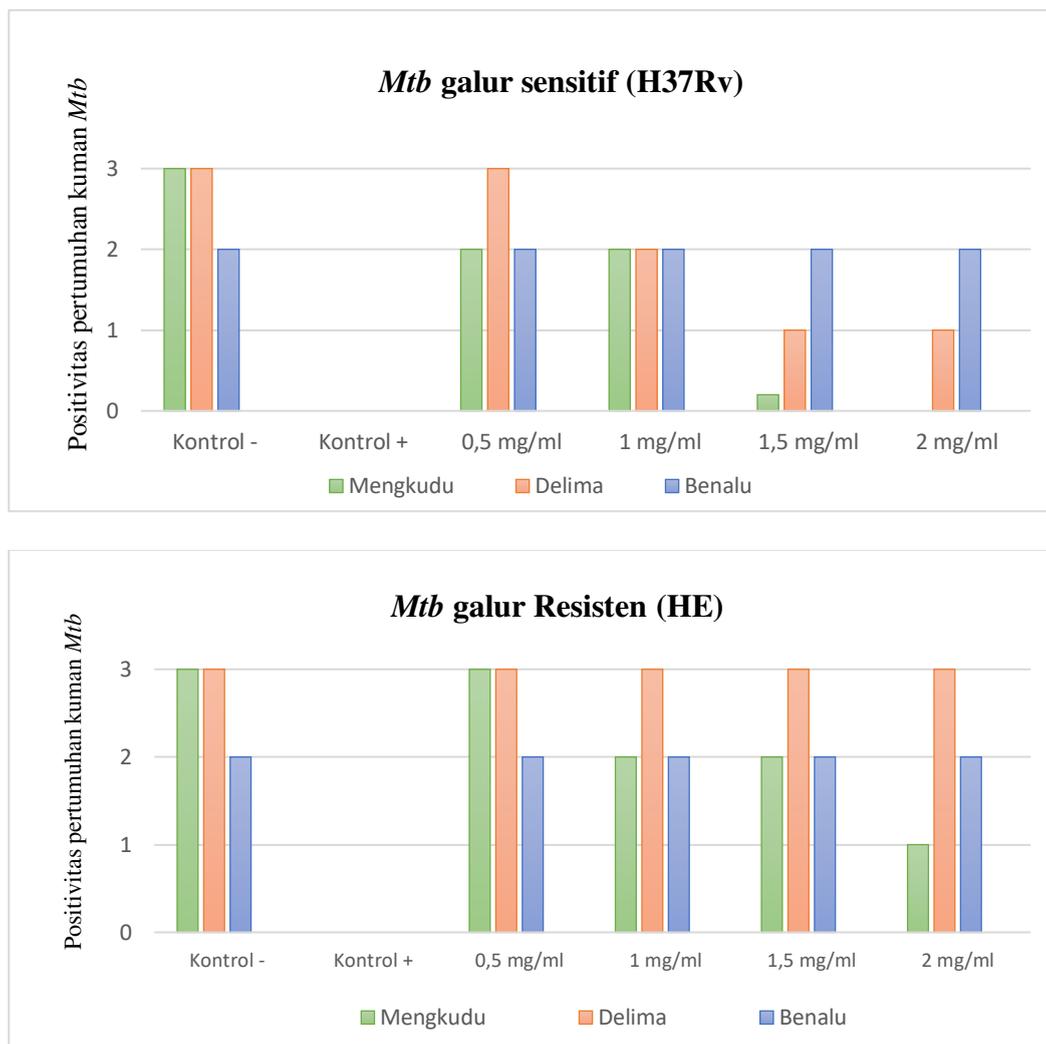
Uji golongan dengan pereaksi semprot

Ekstrak tanaman obat yang berpotensi sebagai antituberkulosis selanjutnya diuji golongan senyawanya menggunakan pereaksi untuk masing-masing senyawa. Diantaranya steroid, flavanoid, tannin, saponin, dan kuinon.

Hasil skrining pada media padat LJ (*Lowenstein-Jensen*) sebagai standar baku biakan *Mtb* yang diamati selama 2 bulan pada galur *Mtb* sensitif (H37Rv) dan galur resisten (HE) dapat dilihat pada grafik 3.3 di bawah ini.

Hasil dan Pembahasan

Gambar 1. Perbandingan skrining aktivitas antituberkulosis tanaman obat terhadap kuman *Mtb* galur sensitif dan resisten pada media LJ



Berdasarkan grafik hasil skrining antituberkulosis menggunakan media LJ bahwa efektifitas penghambatan tertinggi terdapat pada ekstrak metanol daun mengkudu (*M. citrifolia*) dengan konsentrasi 1.5 mg/ml dan 2 mg/ml untuk *Mtb* galur sensitif (H37Rv) dan 2 mg/ml untuk galur resisten (HE) jika dibandingkan dengan kontrol negatif. Sedangkan untuk ekstrak metanol daun benalu jeruk (*D. pentandra*),

dan daun delima (*P. granatum*) tidak menunjukkan aktivitas penghambatan pada media LJ. Ketiga tanaman obat yang telah dievaluasi aktivitas antituberkulosis selanjutnya dipilih 1 (satu) tanaman yaitu ekstrak etanol mengkudu (*M. citrifolia*) untuk diuji golongan senyawa aktifnya.

Uji golongan senyawa aktif merupakan uji kualitatif kandungan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak etanol

mengkudu (*M. citrifolia*), sehingga dapat diketahui senyawa yang terdapat di dalamnya. Uji golongan senyawa aktif berdasarkan tes uji warna dengan beberapa pereaksi untuk golongan senyawa flavonoid, tanin, alkaloid, steroid atau terpenoid, dan saponin yang

menunjukkan hasil positif. Uji fitokimia dilakukan pada simplisia, ekstrak etanol disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji golongan senyawa aktif ekstrak metanol daun mengkudu (*M. citrifolia*)

Sampel daun mengkudu	Hasil Pengamatan				
	Flavanoid HCl + Mg	Tanin FeCl ₃	Saponin H ₂ O panas	Kuinon NaOH 15%	Steroid/terpenoid As. Asetat anhidrat
Simplisia ekstrak etanol	+	+	+	+	+

Pembahasan

Tuberkulosis adalah suatu penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang berbentuk basil dan memerlukan waktu lama untuk mengobatinya (Brooks *et al.*, 2005). Hal ini disebabkan karena pada dinding selnya mengandung komponen asam mikolat dan glikolipid yang berfungsi menghalangi masuknya zat kimia sehingga menyebabkan pertumbuhan yang sangat lambat (Jawelzet *al.*, 2008). Unsur lain yang terdapat pada dinding sel bakteri tersebut adalah polisakarida seperti arabinogalaktan dan arabinomanan. Struktur dinding sel yang kompleks tersebut menyebabkan bakteri *M. tuberculosis* bersifat tahan asam, yaitu apabila sekali diwarnai akan tetap tahan terhadap upaya penghilangan zat warna tersebut dengan larutan asam-alkohol.

Ada beberapa metode pengujian untuk mendapatkan hasil uji kepekaan obat anti tuberculosis (OAT). Metode yang paling sering digunakan saat ini adalah metode proporsi berupa pengujian dengan menggunakan medium Lowenstein Jensen (LJ) yang diberikan OAT ataupun ekstrak tanaman dalam konsentrasi telah terproporsi. Dalam prosesnya, metode ini membutuhkan waktu yang lama yaitu 4 – 8 minggu untuk mendapatkan hasil (Sjahrurachman, 2008). Kultur adalah cara yang paling sensitif dan merupakan baku emas untuk mendiagnosis *Mycobacterium* terutama untuk sputum yang

sedikit kumannya dan sulit ditemukan dengan cara mikroskopis. Medium Lowenstein-Jensen (LJ) merupakan medium yang paling banyak digunakan untuk kultur tuberkulosis. Medium LJ merupakan medium selektif, diferensial dan medium penyubur untuk kuman *Mycobacterium*. Koloni yang tumbuh pada media LJ pada kontrol dan perlakuan menunjukkan adanya pertumbuhan dalam waktu 2-4 minggu. Koloni berwarna putih kekuning-kuningan (*buff coloured*), permukaan kering dan rapuh dengan tepi yang tidak beraturan seperti bunga kol. Konfirmasi dengan membuat sediaan dari koloni dengan pewarnaan Ziehl Neelsen, *M.tb* memberikan gambaran BTA yang bergerombol berbentuk khas seperti cord yang menyerupai ekor kuda.

Skrining antituberkulosis tanaman obat lokal dengan metode LJ menunjukkan ekstrak daun mengkudu (*M. citrifolia*) memiliki aktifitas antituberkulosis terbesar dibandingkan dengan tanaman obat lain pada strain *Mtb* sensitif (H37Rv). Namun, aktifitasnya lebih rendah pada strain resisten (HE). Hal ini disebabkan karena strain HE memiliki gen yang sudah resisten terhadap obat antituberkulosis (OAT) lini pertama seperti isoniazid dan etambutol sehingga senyawa aktif dalam ekstrak mengkudu (*M. citrifolia*) belum mampu menembus gen target *Mtb* secara efektif seperti mekanisme kerja OAT (Lakshmanan, 2011). Daun mengkudu memiliki kandungan senyawa antibakteri seperti flavonoid, kuinon, steroid, tanin, dan saponin. Kandungan kimia yang

memberikan pengaruh penghambatan *Mtb* adalah senyawa flavonoid dan tanin yang merupakan salah satu golongan fenol yang menyebabkan kerusakan struktur protein pada bakteri (Kameswari, 2013; Ningsih dkk., 2016). Uji metabolit sekunder tanin menghasilkan warna hijau kebiruan yang lebih pekat. Hal ini menandakan bahwa ekstrak etanol daun mengkudu mengandung senyawa tanin. Tanin bekerja dengan cara mengendapkan protein dan dapat merusak membran sel sehingga pertumbuhan mikroba terhambat. Sudira, dkk (2011) menambahkan bahwa senyawa tanin merupakan senyawa organik yang aktif menghambat pertumbuhan mikroba dengan mekanisme merusak dinding sel mikroba dan membentuk ikatan dengan protein fungsional sel mikroba. Mekanisme antibakteri yang dimiliki tanin yaitu kemampuannya menghambat sintesis peptidoglikan yang digunakan untuk pembentukan dinding sel pada *Mtb* dan merusak membran sel sehingga pertumbuhan *Mtb* terhambat. Tanin juga merupakan senyawa yang bersifat lipofilik sehingga mudah terikat pada dinding sel dan mengakibatkan kerusakan dinding sel.

Kesimpulan

Mycobacterium tuberculosis galur sensitif (H37Rv) dan galur resisten (HE) hanya dapat dihambat oleh ekstrak etanol daun mengkudu (*M. citrifolia*) pada konsentrasi masing-masing 1.5 mg/ml dan 2 mg/ml. Dengan demikian mengkudu (*M. citrifolia*) dapat digunakan sebagai terapi tambahan untuk TB.

Ucapan Terimakasih

Ucapan terimakasih disampaikan kepada LPPM STKIP Pembangunan Indonesia yang memfasilitasi pendanaan penelitian ini melalui program hibah penelitian dosen pemula (PDP) RistekDikti Tahun 2018.

Daftar Pustaka

Brooks, G.F., Butel, J.S., & Morse, S.A. 2005. *Mikrobiologi kedokteran. Edisi 1.*

- Penerjemah Bagian Mikrobiologi Kedokteran Universitas Airlangga. Penerbit Salemba Medika. Hal 453-356.
- Chihota, V. N., Grant, A. D., Fielding, K., Ndibongo, B., van Zyl, a, Muirhead, D., & Churchyard, G. J. 2010. Liquid vs. solid culture for tuberculosis: performance and cost in a resource-constrained setting. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 14(8), 1024–31.
- Fatmawati, Y. 2013. *Efektifitas ekstrak buah mengkudu (Moringa citrifolia L.) sebagai insektisida nabati terhadap mortalitas hama jagung.* Universitas Muhammadiyah Malang.
- Fajriah, dkk. 2007. *Isolasi senyawa antioksidan dari ekstrak etil asetat daun benalu Dendrophthoe pentandra L. Miq yang tumbuh pada inang Lobi-Lobi.* Pusat Penelitian Kimia. Serpong.
- Goodman & Gilman's. 2008. *The Pharmacological Basis of Therapeutics 12th Edition*, Brunton, L. L., ed. The McGraw-Hill Companies, New York, pp. 171-845.
- Idola, D. 2017. *Antituberculosis potential of medicinal plants from indonesia against Mycobacterium smegmatis JCM6386^T.* Bogor Agricultural University (Thesis). Bogor.
- Jawelz, Melnick & Adeberg. 2008. *Mikrobiologi Kedokteran Edisi 23.* Penerbit Buku Kedokteran: Jakarta. hal 325-336
- Kameswari, M. S., I. N. K. Besung, dan H. Mahatmi. 2013. Perasan daun mengkudu (*Mori ndacitrifolia*) menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* secara in vitro. *Jurnal Indonesia Medicus Veterinus* 2(3): 322-330.
- Kurniawan, E., Raveinal, Fauzar, Arsyad, Z. 2016. Nilai Diagnostik Metode "Real Time" PCR GeneXpert pada TB Paru BTA Negatif. *Jurnal Kesehatan Andalas* 5(3) pp 730-736.
- Lakshmanan, D., Werngren, J., Jose, L., Suja, K.P., Nair, M.S., Varma, R.L., Mundayoor, S., Hoffner,

- S., Kumar, R.A. 2011. Ethyl pMethoxycinnamate isolated from a traditional antituberculosis medicinal herb inhibits drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. *Fitoterapia* 82: 757–761.
- Ningsih, D.R., Zufahair, Kartika. D. 2016. Identifikasi senyawa metabolit sekunder serta uji aktivitas ekstrak daun sirsak sebagai antibakteri. *Molekul* 11 (1) : 101 – 111.
- Sivakumar, A., Jayaraman, G. 2011. Anti-tuberculosis activity of commonly used medicinal plants of south India. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(31), pp. 6881-6884.
- Sudira, I. W., Merdana, I., & Wibawa, I. 2011. Uji daya hambat ekstrak daun kedondong (*Lannea Grandis* Engl) terhadap pertumbuhan bakteri *Erwinia carotovora*. *Buletin Veteriner Udayana* 3(1), 45-50.
- Sjahrurachman, A. 2008. Kultur Dan Uji Kepekaan *Mycobacterium Tuberculosis* Terhadap Obat Anti Tuberculosis lini Pertama. *Modul Depertemen Kesehatan*, hal 6 – 8.