

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI KOMBINASI EKSTRAK
ETANOL KULIT BUAH DELIMA (*Punica granatum L.*) DAN
TETRASIKLIN TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa*
SENSITIF DAN MULTIRESISTEN ANTIBIOTIK**

PUBLIKASI



Oleh :

**DIANA PURBO SIWI
K 100 080 036**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
2012**

PENGESAHAN PUBLIKASI

Berjudul:

AKTIVITAS ANTIBAKTERI KOMBINASI EKSTRAK ETANOL
KULIT BUAH DELIMA (*Punica granatum* L.) DAN TETRASIKLIN
TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* SENSITIF DAN
MULTIRESISTEN ANTIBIOTIK

Oleh:
DIANA PURBO SIWI
K100 080 036

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Muhammadiyah Surakarta
Dekan,

Dr. Muhammad Dwi, M.Si., Apt.

Penguji I

(Dr. Haryoto, M.Sc.)

Penguji II

(Rima Munawaroh, M.Sc., Apt.)

Pembimbing Utama

(Ratna Yuliani, M.Biotech. St.)

Pembimbing Pendamping

(Peni Indrayudha, M.Biotech., Apt.)

Mahasiswa

(Diana Purbo Siwi)

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI KOMBINASI EKSTRAK
ETANOL KULIT BUAH DELIMA (*Punica granatum L.*) DAN
TETRASIKLIN TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa*
SENSITIF DAN MULTIRESISTEN ANTIBIOTIK**

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY COMBINATION ETHANOL
EXTRACT OF POMEGRANATE PEEL (*Punica granatum L.*)
AND TETRACYCLINE AGAINST *Pseudomonas aeruginosa*
SENSITIVE AND MULTIRESISTANT ANTIBIOTIC**

Diana Purbo Siwi, Ratna Yuliani, Peni Indrayudha

*Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta
Jl. A Yani Tromol Pos I, Pabelan Kartasura Surakarta 57102*

ABSTRAK

Kulit buah delima (*Punica granatum L.*) mengandung elagitanin yang merupakan substansi yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antibakteri. Tetrasiklin merupakan antibiotik spektrum luas yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif. Kombinasi keduanya diharapkan dapat mengurangi resistensi bakteri. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antibakteri dan efek kombinasi ekstrak etanol kulit buah delima dan tetrasiklin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dan *Pseudomonas aeruginosa* multiresisten.

Kulit buah delima diekstraksi dengan metode meserasi menggunakan penyari etanol 96%. Uji kombinasi ekstrak konsentrasi 3 mg/disk dan tetrasiklin konsentrasi 30 µg/disk dilakukan dengan metode disk difusi dengan volume total 10 µL. Penelitian ini menggunakan 3 seri perbandingan yaitu 25:75 (2,5 µL ekstrak dan 7,5 µL tetrasiklin), 50:50 (5 µL ekstrak dan 5 µL tetrasiklin), dan 75:25 (7,5 µL ekstrak dan 2,5 µL tetrasiklin). Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 100%. Ekstrak etanol kulit buah delima konsentrasi 30 µg/disk dan tetrasiklin konsentrasi 3 mg/disk digunakan sebagai kontrol positif. Area jernih disekitar disk menunjukkan adanya hambatan bakteri.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit buah delima dan tetrasiklin memiliki aktivitas antibakteri dan kombinasi keduanya memiliki efek sinergis pada perbandingan 50:50 terhadap *Pseudomonas aeruginosa* sensitif dan tidak berefek sinergis terhadap *Pseudomonas aeruginosa* multiresisten pada semua seri perbandingan.

Kata kunci : *Pseudomonas aeruginosa*, *Punica granatum L.*, tetrasiklin

ABSTRACT

*The peel of the fruit pomegranate (*Punica granatum L.*) contains elagitanin a substance that is responsible of antibacterial activity. Meanwhile*

tetracycline is a broad spectrum antibiotic that could inhibit Gram positive and Gram negative bacteria. The combination both of them is expected to decrease bacterial resistance. The aim of this study is to investigate antibacterial activity and effect of combination pomegranate peel's ethanolic extract and tetracycline against sensitive and multiresistant Pseudomonas aeruginosa.

Pomegranate peel was extracted by maceration method using 96% ethanol. The antibacterial test of combination of 3 mg/disc pomegranate peel's extract and 30 µg/disc tetracycline was done by disc diffusion method with total volume of 10 µL. This study used three ratio series that are 25:75 (2,5 µL extract dan 7,5 µL tetracycline), 50:50 (5 µL extract dan 5 µL tetracycline), and 75:25 (7,5 µL extract dan 2,5 µL tetracycline). The negative control that was being used is 100% DMSO. Meanwhile 3 mg/disc pomegranate peel's ethanolic extract and 30 µg/disc tetracycline were used as positive control. Clear area around disc showed bacterial growth inhibition.

The result of this study show that pomegranate peel's ethanolic extract and tetracycline have antibacterial activity and the combination of both of them have synergistic effect at ratio of 50:50 against sensitive Pseudomonas aeruginosa but has not synergistic effect against multiresistant Pseudomonas aeruginosa at all ratio.

Keywords : Pseudomonas aeruginosa, Punica granatum L., tetracycline

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi merupakan penyebab utama kematian di seluruh dunia (Robin & Cobran, 2005). Salah satu agen penyebab infeksi adalah *Pseudomonas aeruginosa* (Jawetz *et al.*, 2005). *Pseudomonas aeruginosa* hanya bersifat patogen bila masuk ke daerah yang fungsi pertahanannya abnormal (Jawetz *et al.*, 2005). *Pseudomonas aeruginosa* dapat menyebabkan infeksi saluran kemih (ISK) dan pneumonia (Nasronudin, 2007).

Pengobatan infeksi yang paling umum dilakukan adalah dengan terapi antibiotik. Penggunaan antibiotik memiliki konsekuensi yaitu timbulnya patogen yang resisten antibiotik (Goodman & Gilman, 2003). Disamping itu, antibiotik generasi baru juga banyak menimbulkan masalah ketoksikan, sehingga perlu dikembangkan penggunaan bahan-bahan alam sebagai alternatif dalam mengobati penyakit infeksi (Sarala *et al.*, 2010).

Beberapa studi telah mengusulkan strategi baru, yaitu kombinasi produk-produk tanaman alam dengan antibiotik untuk terapi infeksi yang disebabkan oleh bakteri sehingga dapat meningkatkan aktivitas antibiotik (Jayaraman *et al.*, 2010). Penelitian Stefanović & Comic (2012) menunjukkan hasil sinergis kombinasi ekstrak etanol *Melissa officinalis* dan tetrasiklin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* multiresisten antibiotik. Selain *Melissa officinalis*, salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah tanaman delima (*Punica granatum* L.). Kulit delima mengandung elagitanin (punicalagin) yang merupakan substansi yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antimikroba (Machado *et al.*, 2002). Penelitian Sharma *et al.* (2009) menunjukkan bahwa ekstrak etanol delima dengan konsentrasi 5 mg/disk mampu menghambat bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

METODE PENELITIAN

Alat : evaporator, penangas air, bejana maserasi, blender, corong *Buchner*, ose, gelas obyektif, mikroskop, lampu spiritus, tabung reaksi, cawan petri steril, mikropipet, *spreader glass*, autoklaf, inkubator, *Laminar Air Flow*, oven, rak tabung, ose steril, pro pipet, alat-alat gelas, *yellow tips*, *blue tips*, *shaker incubator*, neraca analitik dan vortex.

Bahan : kulit buah delima, etanol 96%, bakteri *Pseudomonas aeruginosa* sensitif antibiotik dan multiresisten antibiotik, akuades steril, media BHI (*Brain Heart Infusion*) media MH (Mueller Hinton), media KIA (*Kligler Iron Agar*), media LIA (*Lysine Iron Agar*), dan media MIO (*Motility Indol Ornithine*), DMSO 100 %, spiritus, cat Gram A, cat Gram B, cat Gram C, cat Gram, NaCl 0,9 %, dan antibiotik tetrasiklin.

Cara Penelitian

Determinasi tanaman

Determinasi tanaman delima dilakukan dengan cara mencocokkan ciri-ciri tanaman tersebut dengan yang pustaka. Buku yang digunakan sebagai acuan adalah buku “*Flora of Java*” karangan Backer dan Van de Brink (1965).

Pembuatan ekstrak etanol kulit buah delima

Simplisia kulit buah delima sebanyak 1500 gram direndam dengan 7 liter etanol 96% di dalam bejana maserasi, ditutup rapat dan didiamkan

selama 3 hari dan dilakukan pengadukan beberapa kali sehari. Setelah 3 hari, dilakukan penyaringan dengan corong *Buchner* kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 60°C. Setelah itu, dipekatkan di atas penangas air hingga didapatkan ekstrak kental kulit buah delima. Ekstrak tersebut digunakan untuk uji aktivitas antibakteri.

Uji antibakteri

Persiapan alat

Alat dan bahan yang digunakan disterilkan terlebih dahulu. Untuk alat gelas dicuci bersih, dikeringkan, dibungkus kertas, dan disterilkan dengan pemanasan kering menggunakan oven pada suhu 160–180°C selama 1-2 jam. Alat dan bahan yang tidak tahan pemanasan kering disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 10–20 menit. Sterilisasi pada ose dilakukan dengan cara membakar batang ose dimulai dari pangkal hingga ujung.

Pembuatan media

Media MH 64 gram, media BHI 37 gram. Jumlah media yang ditimbang disesuaikan dengan volume yang dibutuhkan.

Pembuatan persediaan (stok) bakteri

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* diambil dari stok bakteri kemudian digoreskan pada media MH (Mueller Hinton). Bakteri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Bakteri yang tumbuh disimpan pada suhu 4°C sebagai stok bakteri.

Pengecatan Gram

Suspensi bakteri masing-masing diambil 1 ose dan diratakan pada gelas obyek setipis mungkin. Kemudian preparat dipanasi di atas nyala bunsen hingga kering, setelah itu ditetesi formalin 1%, ditunggu 5 menit, dikeringkan lagi, dan preparat siap dicat. Preparat yang telah siap dicat digenangi dengan cat Gram A selama 1-3 menit kemudian cat dibuang tanpa dicuci dengan air. Preparat kemudian digenangi dengan cat Gram B selama 0,5-1 menit, lalu cat dibuang dan dicuci dengan air. Selanjutnya preparat ditetesi cat Gram C sampai warna cat dilunturkan. Preparat selanjutnya digenangi cat Gram D

selama 1-2 menit kemudian dicuci dan dikeringkan dalam udara kamar. Preparat siap diperiksa di bawah mikroskop dengan perbesaran 200 kali.

Identifikasi biokimiawi

Bakteri ditanam pada media KIA (*Kligler Iron Agar*), LIA (*Lysine Iron Agar*), dan MIO (*Motility Indol Ornithine*), selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

Uji sensitivitas bakteri terhadap antibiotik

Suspensi bakteri sebanyak 300 µL dengan konsentrasi 10⁸ CFU/mL diinokulasikan pada cawan petri berisi media MH dan diletakkan beberapa disk antibiotik di atasnya (kloramfenikol, ampicilin, tetrasiklin, siprofloksasin, seftazidim dan eritromisin). Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Kemudian diukur diameter zona hambatan di sekitar disk dan dibandingkan dengan standar resistensi bakteri terhadap masing-masing antibiotik.

Pembuatan suspensi bakteri

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dari stok bakteri diambil sebanyak dua sampai tiga koloni, kemudian ditanam pada media BHI dan diinkubasi menggunakan *shaker incubator* pada suhu 37°C selama 2-5 jam. Suspensi bakteri disamakan konsentrasinya dengan standar Mc Farland 10⁸ CFU/mL dengan penambahan salin steril 0,9 %.

Pembuatan seri konsentrasi ekstrak etanol kulit buah delima

Ekstrak etanol kulit buah delima (*Punica granatum* L.) dibuat seri konsentrasi untuk orientasi sebesar 20 %, 25 %, dan 30 %. Seri konsentrasi dibuat dengan menimbang ekstrak kental delima sebanyak 100 mg, 125 mg, dan 150 mg, kemudian ditambah DMSO 100% sampai 500 µL. Masing-masing seri konsentrasi diambil sebanyak 10 µL/disk, sehingga tiap disk uji mengandung ekstrak sebesar 2 mg/disk, 2,5 mg/disk, dan 3 mg/disk.

Pembuatan seri konsentrasi tetrasiklin

Tetrasiklin dibuat seri konsentrasi sebesar 0,15 %, 0,3 %, 0,45 %, dan 0,6 %. Seri konsentrasi dibuat dengan cara menimbang serbuk antibiotik tetrasiklin sebanyak 0,75 mg, 1,5 mg, 2,25 mg, dan 3 mg, kemudian dilarutkan

dengan akuades steril sampai 500 μL . Masing-masing seri konsentrasi diambil sebanyak 10 $\mu\text{L}/\text{disk}$, sehingga tiap disk uji mengandung tetrasiklin sebesar 15 $\mu\text{g}/\text{disk}$, 30 $\mu\text{g}/\text{disk}$, 45 $\mu\text{g}/\text{disk}$, dan 60 $\mu\text{g}/\text{disk}$.

Penimbangan serbuk tetrasiklin dilakukan dengan timbangan neraca analitik yang memiliki ketelitian 0,1 mg sehingga tetrasiklin yang ditimbang tidak boleh kurang dari 100 mg. Oleh karena itu, seharusnya tetrasiklin ditimbang sebanyak 100 mg kemudian dilarutkan dengan akuades steril sampai 1 mL sehingga diperoleh larutan stok tetrasiklin dengan konsentrasi 10 %

Larutan stok tetrasiklin 10 % kemudian diencerkan dengan mengambil masing-masing 7,5 μL ; 15 μL ; 22,5 μL ; dan 30 μL lalu dilarutkan dalam akuades steril sampai 500 μL .

Uji pendahuluan

Suspensi bakteri sebanyak 300 μL dengan konsentrasi 10^8 CFU/mL dimasukkan ke dalam media MH dalam cawan petri dan diratakan dengan *spreader glass* steril. Masing-masing seri konsentrasi ekstrak etanol kulit delima, dan kontrol (DMSO 100%) diambil 10 μL kemudian diteteskan ke dalam disk kosong dan di preinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit, setelah itu disk diletakkan di atas media. Sepuluh mikroliter larutan dari masing-masing seri konsentrasi tetrasiklin dan kontrol (akuades) diteteskan pada disk lalu dipreinkubasi selama 30 menit. Setelah itu disk diletakkan pada cawan petri yang berbeda. Kedua cawan petri kemudian diinkubasi pada temperatur 37°C selama 18-24 jam, selanjutnya dilakukan pengamatan dengan menentukan diameter zona hambatnya. Disk yang memiliki konsentrasi terkecil dan menghasilkan zona hambat antara 10-20 mm digunakan untuk uji aktivitas antibakteri.

Seri perbandingan kombinasi ekstrak etanol kulit buah delima dan tetrasiklin

Kombinasi ekstrak etanol kulit buah delima dan tetrasiklin dibuat tiga perbandingan, yaitu: 25:75 ; 50:50 ; dan 75:25 sehingga volume total kombinasi ekstrak etanol dan tetrasiklin dalam disk sebesar 10 μL . Pada uji kombinasi 25:75, volume ekstrak etanol kulit buah delima yang dimasukkan ke dalam disk adalah 2,5 μL dan tetrasiklin adalah 7,5 μL . Pada kombinasi 50:50, volume ekstrak etanol kulit buah delima yang dimasukkan ke dalam disk adalah 5 μL dan volume

tetracycline adalah 5 µL. Sementara pada kombinasi 75:25, volume ekstrak etanol kulit buah delima yang dimasukkan ke dalam disk adalah 7,5 µL dan tetracycline adalah 2,5 µL. Pada uji kombinasi, digunakan tiga kontrol. Kontrol pelarut yaitu DMSO 100 %, kontrol tetracycline dan kontrol ekstrak etanol kulit buah delima dengan volume total 10 µL.

Uji aktivitas antibakteri

Suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/mL diambil sebanyak 300 µL diratakan pada media agar menggunakan *spreader glass* steril. Kemudian tiga seri perbandingan konsentrasi ekstrak etanol kulit delima dan tetracycline serta kontrol (kontrol 1 (kontrol pelarut DMSO 100%), kontrol 2 (kontrol tetracycline), dan kontrol 3 (kontrol ekstrak etanol kulit delima) diambil sebanyak 10 µL dan diteteskan pada disk kosong 6 mm yang telah diletakkan di atas media lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Selanjutnya media diinkubasi pada temperatur 37°C selama 18-24 jam, kemudian dilakukan pengamatan untuk menentukan diameter zona hambatnya.

Analisis data

Hasil yang diperoleh dari uji aktivitas antibakteri adalah besarnya diameter zona hambat dari kombinasi ekstrak etanol kulit buah delima dan tetracycline. Hasil akhir dikatakan memiliki efek sinergis apabila besarnya zona hambat kombinasi ekstrak etanol kulit buah delima dan tetracycline lebih besar daripada ekstrak dan tetracycline tunggal.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman bertujuan memastikan bahwa tanaman yang diuji adalah benar *Punica granatum* L. Berdasarkan determinasi didapatkan kunci determinasi yang menunjukkan bahwa tanaman yang akan diteliti adalah spesies *Punica granatum* L. atau tanaman delima

Ekstraksi

Serbuk kering kulit buah delima diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi. Pada penelitian ini, penyari yang digunakan adalah etanol 96%.

Hasil ekstrak kulit buah delima menggunakan etanol 96% diperoleh rendemen sebesar 5,75%, yaitu dari 1500 g serbuk kulit buah delima menjadi 86,27 g ekstrak.

Identifikasi Bakteri

Identifikasi yang dilakukan adalah pengecatan Gram dan uji biokimia dengan menggunakan media KIA (*Kligler Iron Agar*), LIA (*Lysine Iron Agar*), dan MIO (*Motility Indol Ornithine*).

Pewarnaan Gram merupakan pewarnaan kristal violet yang bertujuan untuk mengelompokkan mikroorganisme menjadi mikroorganisme Gram positif dan Gram negatif. Pada mikroorganisme Gram Positif, sel Gram positif akan tetap mengikat kristal violet-iodine jika diberi aseton atau alkohol sehingga akan tetap berwarna ungu. Sedangkan mikroorganisme Gram negatif akan kehilangan warna violetnya jika mikroorganisme tersebut diberi aseton atau alkohol dan akan berwarna merah muda dengan *carbol fuchsin* (Jawetz *et al.*, 2005). Dari pengecatan *Pseudomonas aeruginosa* sensitif dan multiresisten diperoleh hasil berwarna merah, berbentuk basil dan bergerombol sehingga dapat disimpulkan bahwa bakteri yang diuji adalah bakteri Gram negatif

Selanjutnya adalah uji biokimia dengan menggunakan media KIA, LIA, dan MIO. Media KIA digunakan untuk melihat reaksi bakteri terhadap komponen gula penyusun media (glukosa dan laktosa), kemampuan bakteri menghasilkan gas, dan kemampuan bakteri membentuk H₂S. Media LIA digunakan untuk melihat reaksi bakteri terhadap lisin, sedangkan media MIO digunakan untuk melihat sifat pergerakan bakteri, kemampuan bakteri menghasilkan indol, dan kemampuan bakteri mendekarboksilasi ornithin (Elmanama, 2008).

Pada media KIA bakteri *Pseudomonas aeruginosa* mendeaminasi asam amino dan tidak memfermentasi glukosa, laktosa, tidak menghasilkan H₂S dan gas. Pada media LIA terjadi dekarboksilasi lisin. Sedangkan pada media MIO, menunjukkan bahwa bakteri *Pseudomonas aeruginosa* mampu mendekarboksilasi ornithin. Pada media terlihat adanya motilitas.

Hasil Uji Sensitivitas

Uji sensitivitas dilakukan untuk melihat sensitivitas bakteri terhadap

beberapa antibiotik. Antibiotik yang digunakan pada uji sensitivitas *Pseudomonas aeruginosa* sensitif adalah antibiotik kloramfenikol (C), ampisilin (AMP), siprofloksasin (CIP), tetrasiklin (TE), dan eritromisin (E). Sedangkan pada *Pseudomonas aeruginosa* multiresisten, antibiotik yang diuji adalah kloramfenikol, ampisilin, seftazidim (CAZ), tetrasiklin, dan eritromisin. Hasil uji terhadap *Pseudomonas aeruginosa* sensitif antibiotik menunjukkan bahwa bakteri bersifat sensitif terhadap antibiotik tetrasiklin, siprofloksasin, kloramfenikol, dan eritromisin dan sudah resisten terhadap ampisilin. Sedangkan *Pseudomonas aeruginosa* multiresisten telah resisten terhadap antibiotik ampisilin, eritromisin, seftazidim dan sensitif terhadap antibiotik tetrasiklin dan kloramfenikol.

Tabel 1. Hasil uji sensitivitas bakteri terhadap antibiotik (n=2)

Disk Antibiotik	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> sensitif				<i>Pseudomonas aeruginosa</i> multiresisten		
	Standar resistensi (mm)	Diameter zona hambat (mm)	Keterangan	Kesimpulan	Diameter zona hambat (mm)	Keterangan	Kesimpulan
Ampisilin 10 µg (AMP)	≤ 11	8,3	Resisten	Sensitif Antibiotik	8,0	Resisten	Multiresisten Antibiotik
Tetrasiklin 30 µg (TE)	≤ 19	19,3	Sensitif		17,6	Sensitif	
Kloramfenikol 30 µg (C)	≤ 11	18,0	Sensitif		15,4	Sensitif	
Eritromisin 15 µg (E)	≤ 13	15,0	Sensitif		12,8	Resisten	
Siprofloksasin 5 µg (CIP)	≤ 15	21,0	Sensitif		Tidak diujikan	Tidak diujikan	
Seftazidim 30 µg (CAZ)	≤ 14	Tidak diujikan	Tidak diujikan		15,0 (irradikal)	Resisten	

Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan untuk mengetahui konsentrasi ekstrak etanol kulit buah delima dan tetrasiklin yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* sensitif dan *Pseudomonas aeruginosa* multiresisten. Hasil uji pendahuluan, selanjutnya digunakan untuk uji kombinasi. Metode yang digunakan adalah metode disk difusi. Pada uji pendahuluan menggunakan kontrol pelarut DMSO 100% dan akuades steril. Kontrol pelarut digunakan untuk mengetahui apakah pelarut memiliki aktivitas antibakteri atau tidak. Dari hasil uji pendahuluan ekstrak dan tetrasiklin, DMSO 100% dan akuades steril tidak menunjukkan adanya hambatan sehingga dapat disimpulkan bahwa pelarut yang digunakan tidak memiliki aktivitas antibakteri.

Uji pendahuluan ekstrak etanol kulit buah delima menggunakan seri konsentrasi 2 mg/disk, 2,5 mg/disk, dan 3 mg/disk. Pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* sensitif diperoleh diameter zona hambat berturut-turut 9,9 mm, 10,2 mm, dan 10,8 mm (Tabel 1). Sedangkan pada *Pseudomonas aeruginosa* multiresisten diperoleh diameter zona hambat berturut-turut 10,6 mm, 11,1 mm, dan 11,8 mm (Tabel 1). Konsentrasi yang dipilih adalah konsentrasi 3 mg/disk karena pada konsentrasi tersebut diperoleh diameter zona hambat yang paling besar.

Pada uji pendahuluan tetrasiklin, seri konsentrasi yang digunakan adalah 15 µg/disk, 30 µg/disk, 45 µg/disk, dan 60 µg/disk. Pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* sensitif diameter zona hambatnya sebesar 12,8 mm, 13,6 mm, 14,5 mm, dan 14,9 mm (Tabel 2). Sedangkan pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* multiresisten diperoleh diameter zona hambat sebesar 13,0 mm, 14,3 mm, 14,9 mm, dan 15,4 mm (Tabel 2). Konsentrasi yang dipilih adalah konsentrasi 30 µg/disk karena merupakan konsentrasi standar tetrasiklin tiap disk.

Tabel 2. Hasil uji pendahuluan ekstrak etanol kulit buah delima (n= 3)

Bahan uji	Diameter zona hambat ($\bar{x} \pm SD$ mm)	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> sensitif	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> multiresisten
DMSO 100 %	6 (Tidak ada hambatan)	6 (Tidak ada hambatan)
Ekstrak 2 mg/disk	9,9±0,8	10,6±0,1
Ekstrak 2,5 mg/disk	10,2±0,3	11,1±0,4
Ekstrak 3 mg/disk	10,8±0,0	11,8±0,0

Keterangan : Diameter zona hambat termasuk diameter disk 6 mm

Tabel 3. Hasil uji pendahuluan tetrasiklin (n= 3)

Bahan uji	Diameter zona hambat ($\bar{x} \pm SD$ mm)	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> sensitif	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> multiresisten
Akuades	Tidak ada hambatan	6 (Tidak ada hambatan)
Tetrasiklin 15 µg/disk	12,8±0,3	13,0±0,0
Tetrasiklin 30 µg/disk	13,6±0,6	14,3±0,0
Tetrasiklin 45 µg/disk	14,5±0,5	14,9±0,3
Tetrasiklin 60 µg/disk	14,9±0,6	15,4±0,4

Keterangan : Diameter zona hambat termasuk diameter disk 6 mm

Uji Aktivitas Kombinasi Ekstrak Etanol Kulit Buah Delima dan Tetrasiklin

Uji ini dilakukan untuk mengetahui efek kombinasi ekstrak etanol kulit buah delima dan tetrasiklin terhadap pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*. Uji aktivitas kombinasi ekstrak etanol kulit buah delima dan tetrasiklin dilakukan

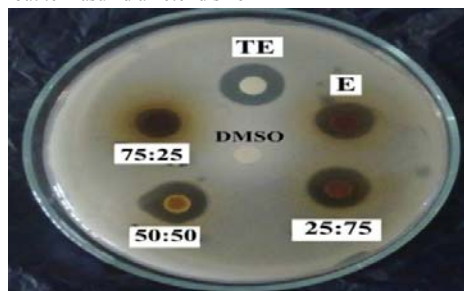
dengan menggunakan 3 seri perbandingan antara ekstrak dan antibiotik yaitu 25:75, 50:50, dan 75:25. Metode yang digunakan adalah metode disk difusi. Konsentrasi yang digunakan didasarkan hasil uji pendahuluan, yaitu konsentrasi ekstrak etanol kulit buah delima 3 mg/disk sedangkan konsentrasi tetrasiklin 30 µg/disk.

Pada *Pseudomonas aeruginosa* sensitif, ekstrak tunggal dan tetrasiklin tunggal memberikan diameter zona hambat masing-masing sebesar 13,2 mm dan 15,6 mm (Tabel 3, Gambar 3). Sedangkan pada kombinasi ekstrak dan tetrasiklin dengan perbandingan (ekstrak:tetrasiklin) 25:75, 50:50, dan 75:25 memberikan diameter zona hambat sebesar 15,0 mm, 15,8 mm, dan 11,4 mm. Dari hasil yang diperoleh, pada kombinasi 50:50 (15,75 mm) menunjukkan diameter zona hambat yang lebih besar daripada ekstrak tunggal (13,2 mm) dan tetrasiklin tunggal (15,6 mm). Sehingga dapat disimpulkan bahwa pada perbandingan 50:50 (ekstrak:tetrasiklin) memberikan efek sinergis terhadap *Pseudomonas aeruginosa* sensitif antibiotik.

Tabel 4. Hasil uji aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak etanol kulit buah delima dan tetrasiklin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* sensitif antibiotik (n=3)

Bahan uji	Diameter zona hambat ($\bar{x} \pm SD$ mm)
Tetrasiklin 30 µg/disk	15,6±0,1
Ekstrak 3 mg/disk	13,2±0,3
25:75	15,0±1,0
50:50	15,8±0,4
75:25	11,4±0,5
DMSO	6 (Tidak ada hambatan)

Keterangan : Diameter zona hambat termasuk diameter disk 6 mm



Gambar 3. Hasil uji aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak etanol kulit buah delima dan tetrasiklin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* sensitif antibiotik dengan perbandingan 25:75, 50:50, dan 75:25 dengan volume total 10 µL. Dengan volume kontrol ekstrak (E), tetrasiklin (TE), dan DMSO 100% sebesar 10 µL

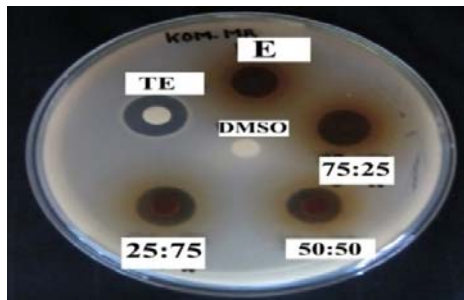
Pada *Pseudomonas aeruginosa* multiresisten antibiotik, ekstrak tunggal dan tetrasiklin tunggal mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan diameter

zona hambat sebesar 12 mm dan 14,33 mm (Tabel 4, Gambar 4). Setelah dilakukan kombinasi dengan perbandingan (ekstrak:tetrasiklin) 25:75, 50:50, dan 75:25 diperoleh diameter zona hambat masing-masing sebesar 13,7 mm, 12,5 mm, dan 12,9 mm (Tabel 4, Gambar 4). Dari hasil yang diperoleh, kombinasi ekstrak dan tetrasiklin pada semua seri perbandingan memiliki diameter zona hambat yang lebih kecil dari diameter zona hambat tetrasiklin tunggal. Sehingga dapat disimpulkan bahwa kombinasi ekstrak dan tetrasiklin tidak memiliki efek sinergis terhadap *Pseudomonas aeruginosa* multiresisten antibiotik.

Tabel 5. Hasil uji aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak etanol kulit buah delima dan tetrasiklin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* multiresisten antibiotik (n= 3)

Bahan uji	Diameter zona hambat ($\bar{x} \pm SD$ mm)
Tetrasiklin 30 μ g/disk	14,3 \pm 0,4
Ekstrak 30 %	12,0 \pm 0,7
25:75	13,7 \pm 0,4
50:50	12,5 \pm 0,0
75:25	12,9 \pm 0,7
DMSO	6 (Tidak ada hambatan)

Keterangan : Diameter zona hambat termasuk diameter disk 6 mm



Gambar 8. Hasil uji aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak etanol kulit buah delima dan tetrasiklin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* multiresisten antibiotik dengan perbandingan 25:75, 50:50, dan 75:25 dengan volume total 10 μ L dengan volume kontrol ekstrak (E), tetrasiklin (TE), dan DMSO 100% sebesar 10 μ L

Resistensi *Pseudomonas aeruginosa* disebabkan oleh mekanisme pertahanan *efflux pump* yang dimiliki bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. *Efflux pump* pada *Pseudomonas aeruginosa* salah satunya adalah *MexAB-OprM pump* (Adwan *et al.*, 2009). *Efflux pump* berfungsi untuk mendorong keluar antibiotik dari dalam sel bakteri (Poole, 2001) sehingga mengurangi jumlah antibiotik di dalam sel bakteri (Li & Nikaido, 2009).

Pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* sensitif, adanya antibiotik akan menginduksi regulator *MexR* untuk menghambat *MexAB-OprM pump* sehingga

antibiotik akan tertahan di dalam sel (Dzidic *et al.*, 2008). Tetapi terjadinya mutasi pada gen pengkode elemen regulator *MexR* yang mengontrol kerja *efflux pump* akan menyebabkan ekspresi berlebih *efflux pump* (Askoura *et al.*, 2011) sehingga dapat menyebabkan bakteri menjadi resisten antibiotik (Dzidic *et al.*, 2008).

Untuk mengatasi kejadian resistensi bakteri terhadap antibiotik karena ekspresi berlebih *efflux pump*, maka diperlukan *efflux pump inhibitor* yang terkandung dalam tanaman yang berfungsi untuk menghambat *efflux pump* (Adwan *et al.*, 2009). Apabila *efflux pump* dihambat, maka antibiotik akan masuk dan tertahan di dalam sel sehingga efektivitas dalam membunuh bakteri meningkat. Penggunaan *efflux pump inhibitor* (EPI) dikombinasikan dengan antibiotik dapat meningkatkan efektivitas antibiotik dalam menghambat pertumbuhan sel bakteri (Askoura *et al.*, 2011). Salah satu tanaman yang mampu menghambat *efflux pump* adalah delima (*Punica granatum* L.) Senyawa aktif dari delima yang bekerja sebagai *efflux pump inhibitor* (EPI) adalah elagitanin (Braga *et al.*, 2005).

Pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* multiresisten, hasil kombinasi ekstrak etanol kulit buah delima dan tetrasiklin adalah tidak sinergis. Hal ini mungkin dikarenakan pada bakteri multiresisten memiliki *efflux pump* yang kuat yang disebabkan mutimutasi pada regulator *efflux pump* sehingga terjadi ekspresi *efflux pump* yang berlebih (Dzidic *et al.*, 2008). Maka elagitanin yang bekerja sebagai *efflux pump inhibitor* (EPI) tidak terlalu efektif dalam menghambat mekanisme *efflux pump* bakteri. Tidak terhambatnya *efflux pump* akan menyebabkan penurunan efektivitas tetrasiklin dalam menghambat pertumbuhan (Li & Nikaido, 2009).

Pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* sensitif antibiotik diperoleh hasil sinergis pada perbandingan 50:50. Hal ini mungkin karena *Pseudomonas aeruginosa* sensitif antibiotik tidak mengalami mutasi pada regulatnya sehingga *efflux pump* bakteri dapat secara alami dihambat oleh regulator *mexR* (Dzidic *et al.*, 2008). Disamping itu, dengan adanya elagitanin yang berfungsi sebagai *efflux pump inhibitor* dalam ekstrak etanol kulit buah delima, akan meningkatkan

efektivitas penghambatan *efflux pump* sehingga tetrasiklin dapat masuk dan tertahan di dalam sel bakteri.

KESIMPULAN

1. Kombinasi ekstrak etanol kulit buah delima 3 mg/disk dan tetrasiklin 30 µg/disk dengan perbandingan 25:75, 50:50, dan 75:25 memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* sensitif dan multiresisten antibiotik.
2. Kombinasi ekstrak etanol kulit buah delima 3 mg/disk dan tetrasiklin 30 µg/disk menunjukkan aktivitas sinergis sebagai antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* sensitif antibiotik pada perbandingan 50:50 dan tidak sinergis pada *Pseudomonas aeruginosa* multiresisten.

SARAN

1. Perlu dilakukan isolasi elagitanin yang terkandung dalam ekstrak etanol kulit buah delima.
2. Perlu dilakukan uji aktivitas antibakteri kombinasi elagitanin dan tetrasiklin terhadap *Pseudomonas aeruginosa* sensitif dan *Pseudomonas aeruginosa* multiresisten.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima terima kasih kepada seluruh pihak di Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta yang telah membantu penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Adwan, G., Abu-Shanab, B., & Adwan, K., 2009, In vitro Interaction of Certain Antimicrobial Agents in Combination with Plant Extracts Against Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains, *Middle-East Journal of Scientific Research*, 4 (3), 158-162.
- Askoura, M., Mottawea, W., Abujamel, T., & Taher, I., 2011, Efflux Pump Inhibitors (EPIs) as New Antimicrobial Agents Against *Pseudomonas aeruginosa*, *Libyan J. Med*, 6, 5870.
- Braga, L. C., Leite, A. A. M., Xavier, K. G. S., Takahashi, J. A., Bemquerer, M. P., & Chartone-souza, E., *et al.*, 2005, Synergic Interaction Between

- Pomegranat extract and Antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol*, 51, 541;547
- Dalimarta, S., 2007, *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*, 8-10, Jakarta, Trubus Agriwidya.
- Dzidic, S., Suskovic, J., & Kos, B., 2008, Antibiotik Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects, *Food Technol. Biotechnol*, 46 (1), 11-21.
- Elmanama, A. A., 2008, *General Microbiology Laboratory*, Medical Technology Department Islamic University, Gaza. Goodman & Gilman, 2003, *Dasar Farmakologi Terapi*, 1117-1118, 1187, Edisi 10, Jakarta, Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Jawetz, E., Melnick, J. L., & Adelberg, E. A., 2005, *Mikrobiologi Kedokteran*, Edisi XXIII, diterjemahkan oleh Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Jakarta, Penerbit Salemba Medika.
- Jayaraman, P., Sakharkar, M. N., Lim, C. S., Tang, T.H., & Sakharkar, K. R., 2010, Activity and Interactions of Antibiotic and Phytochemical Combinations Against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro, *International Journal of Biological Sciences*, 6 (6), 556-568.
- Li, X-Z. & Nikaido, H., 2009, Efflux Mediated Drug Resistance in Bacteria: an Update, *Drugs*, 69 (12), 1555-1623.
- Machado, T. D., Leal, I. C. R., Amaral, A. C. F., dos Santos, K. R. N., da Silva, M. G., & Kuster, R. M., 2002, Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 13, 606–610.
- Nasronudin, 2007, *Penyakit Infeksi di Indonesia Solusi Kini dan Mendatang*, Surabaya, Airlangga University Press.
- Poole, K., 2001, Multidrug Efflux Pumps and Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and Related Organisms, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*, 3(2), 255-264.
- Sarala, G., George, S., & Benny, P., 2010, Antimicrobial Effect of *Punica granatum* on *Pyogenic Bacteria*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, Vol 3 (06).
- Sharma, A., Chandraker, S., Patel, V. K., & Ramteke, P., 2009, Antibacterial Activity of Medicinal Plants Against Pathogens Causing Complicated Urinary Tract Infections, *Indian J Pharm Sci*, 71, 136-9.
- Robin & Cobran, 2005, *Pathologic Basis of Disease*, 7th edition, 344, Philadelphia, Elsevier Sauder's.

