



## $\alpha$ -Mangostin Dari Ekstrak pericarp Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Mampu Menghambat Sekresi Culture Filtrate Protein-10 (CFP-10) pada *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Alify Yanura Putri<sup>1</sup>, Valentina Yurina<sup>1\*</sup>, Dwi Yuni Nur Hidayati<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang

<sup>2</sup>Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang

### INFO ARTIKEL

#### Sejarah artikel:

Penerimaan naskah: 19

Februari 2016

Penerimaan naskah

revisi: 24 Februari 2016

Disetujui untuk

dipublikasikan: 20 Juni

2016

#### Kata kunci :

Culture filtrate protein-10 (CFP-10),

Tuberkulosis, *Garcinia mangostana* L.,  $\alpha$ -mangostin

### ABSTRAK

Tuberkulosis (TB) merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* yang masih menjadi salah satu permasalahan kesehatan utama di dunia. Ekstrak pericarp manggis (*Garcinia mangostana* L.), dengan kandungan aktif  $\alpha$ -mangostin, dapat berfungsi sebagai antituberkulosis. Penelitian ini merupakan suatu studi eksperimental laboratorium dengan desain *post test* yang bertujuan untuk mengetahui potensi  $\alpha$ -mangostin ekstrak pericarp manggis dalam menghambat sekresi *Culture Filtrate Protein-10* (CFP-10), protein yang berperan dalam virulensi dan patogenisitas *M. tuberculosis*. Ekstrak pericarp manggis diperoleh dengan metode maserasi dengan pelarut etanol. Ekstrak pericarp manggis dengan berbagai konsentrasi  $\alpha$ -mangostin 3,125, 6,25, dan 12,5  $\mu$ g/ml dipaparkan pada media yang telah diinokulasikan *M. tuberculosis*. Filtrat kultur dianalisa kandungan CFP-10 nya dengan metode SDS-PAGE dan Dot Blot. Hasil skrining fitokimia menunjukkan ekstrak pericarp manggis yang diperoleh memiliki kandungan triterpenoid, tannin, polifenol, saponin, alkaloid dan flavonoid. Kuantifikasi menggunakan metode HPLC MS/MS menunjukkan konsentrasi  $\alpha$ -mangostin dalam ekstrak sebesar 5984,55  $\mu$ g/ml. Analisis menggunakan SDS PAGE dengan metode pewarnaan *Coomassie blue* dan *Silver stain* menunjukkan bahwa ekstrak pericarp manggis dengan konsentrasi  $\alpha$ -mangostin 3,125,  $\mu$ g/ml memiliki pita protein yang paling tipis. Uji spesifisitas dengan metode Dot Blot dan analisis dengan ImageQuant LAS 500 mengindikasikan bahwa ekstrak pericarp manggis dengan konsentrasi  $\alpha$ -mangostin 3,125  $\mu$ g/ml memiliki sinyal pembacaan yang paling rendah. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak pericarp manggis dengan konsentrasi  $\alpha$ -mangostin 3,125  $\mu$ g/ml memiliki potensi penghambatan sekresi CFP-10 yang paling baik di antara perlakuan lainnya.

## $\alpha$ -Mangostin From Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) Pericarp Extract Inhibit Culture Filtrate Protein (CFP)-10 Secretion in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

### ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a disease which is caused by *Mycobacterium tuberculosis* and still being one of the major health problem in the world. Mangosteen's (*Garcinia mangostana* L.) pericarp extract contains active compounds, one of them is  $\alpha$ -mangostin which can act as an antibacterial agent. This research was a laboratory experimental study with post test design which aim is to study the potency of  $\alpha$ -mangostin from mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) pericarp extract to inhibit secretion of on Culture Filtrate Protein-10 (CFP-10) in *M. tuberculosis* H37Rv. CFP-10 is a protein that has roles in *M. tuberculosis* pathogenicity. Mangosteen pericarp extract was obtained using maseration method with ethanol as solvent. Mangosteen's pericarp extract with various  $\alpha$ -mangostin concentration; i.e 3.125, 6.25, and 12.5  $\mu$ g/mL, were added to media that was inoculated with *Mycobacterium tuberculosis*. Phytochemical screening showed that Mangosteen's pericarp extract had triterpenoids, tannins, polyphenols, saponin, alkaloids, and flavonoids. Quantification using HPLC MS/MS method showed that the concentration of  $\alpha$ -mangostin in the extract was 5984.55  $\mu$ g/ml. SDS PAGE analysis with Coomassie blue and Silver staining showed that pericarp extract with 3.125  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -mangostin had the thinnest protein band. Specificity test using Dot Blot method with ImageQuant LAS 500 analysis indicated that Mangosteen's pericarp extract with 3.125  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -mangostin had the lowest reading signal. To conclude, the Mangosteen's pericarp extract with  $\alpha$ -mangostin concentration 3.125  $\mu$ g/ml has the best CFP-10 inhibition secretion among others.

#### Key words:

Culture filtrate protein-10 (CFP-10),

Tuberculosis, *Garcinia mangostana* L.,  $\alpha$ -mangostin

## 1. Pendahuluan

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* dengan penyebaran melalui droplet infection. Pengobatan TB memerlukan jangka waktu yang relatif lama yaitu hingga 6-8 bulan. *Multidrug-resistant tuberculosis* (MDR-TB) juga menjadi masalah dalam pengobatan TB. MDR-TB muncul karena organisme mengalami resistensi terhadap isoniazid dan rifampisin, dengan atau tanpa resistensi terhadap obat TB lainnya. Resistensi ini dapat meningkatkan kemungkinan terjadinya kegagalan terapi.<sup>1</sup> Oleh karena itu dibutuhkan adanya agen baru dalam terapi TB yang tidak memiliki potensi tinggi menyebabkan resistensi.

Virulensi dan patogenisitas *M. tuberculosis* berhubungan dengan kemampuannya untuk bertahan di dalam makrofag sel inang. Kemampuan tersebut dipengaruhi oleh sekresi *early secretory antigenic 6 kDa* (ESAT-6) dan *Culture Filtrate Protein-10* (CFP-10), dua protein berukuran kecil yang kehilangan *traditional signal sequences* dan dikeluarkan melalui jalur sekresi alternatif yang dikode oleh gen yang terletak di RD1.<sup>2</sup> CFP-10 dapat melindungi *M. tuberculosis* dengan membatasi respon imun sel inang yang secara normal berperan dalam aktivasi makrofag dan antimikroba.<sup>3</sup> *M. tuberculosis* memiliki kandungan lipopolisakarida yang tinggi pada membrane selnya. Lipopolisakarida diketahui mampu menginduksi produksi ROS oleh makrofag. Fungsi CFP-10 pada produksi ROS yakni memodulasi aktivasi subunit p65NF- $\kappa$ B. Hal tersebut dapat menjadi mekanisme dimana protein yang disekresi oleh *M. tuberculosis* dapat memodulasi sistem pensinyalan oleh makrofag.<sup>4</sup>

*Garcinia mangostana* L. yang biasa dikenal dengan manggis, merupakan sumber alami *xanthone* yang dapat berfungsi sebagai antioksidan, antiinflamasi, antifungal, dan juga antikanker, antialergi, antibakteri, dan antiviral.<sup>5</sup>  $\alpha$ -mangostin yang merupakan molekul organik berukuran kecil yang memiliki aktivitas bakterisidal yang potensial dan cepat dengan menjadikan *inner membrane* sel bakteri sebagai target. Hal ini dapat menurunkan kemungkinan mutasi bakteri karena  $\alpha$ -mangostin mampu menginduksi penghilangan potensial *membrane* dengan cepat sehingga dapat menghindari terjadinya resistensi.<sup>6</sup> Tujuan dari penelitian ini adalah membuktikan bahwa  $\alpha$ -mangostin dalam ekstrak perikarp manggis (*Garcinia mangostana* L.) dapat menghambat sekresi CFP-10 *M. tuberculosis* H37Rv.

## 2. Metode

### Desain Penelitian.

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental laboratorik secara *in vitro*. Desain penelitian yang digunakan adalah *post-test*. Pengujian potensi ekstrak

perikarp manggis dilakukan dengan metode SDS PAGE dan Dot Blot.

### Maserasi Perikarp Manggis dengan Etanol 95%.

Seratus gram serbuk kering perikarp manggis dimaserasi dengan 750 ml etanol 95% pada suhu kamar selama 5 hari. Maserat disaring dan dimaserasi dengan 150 ml etanol 95% pada suhu kamar selama 2 hari dan kemudian ekstrak yang didapatkan dievaporasi pada suhu 40°C dengan kecepatan 70 rpm hingga diperoleh ekstrak kental.

### Skrining Kandungan Fitokimia Ekstrak Perikarp Manggis dan Penentuan Kadar $\alpha$ -mangostin dengan HPLC MS/MS.

Pembuatan larutan uji untuk uji fitokimia dilakukan dengan cara melarutkan sebanyak 500 mg ekstrak etanol 95% perikarp manggis dalam 50 ml etanol 95%. Pemeriksaan alkaloid dilakukan dengan menguapkan 2 ml larutan uji di atas cawan porselin hingga didapat residu. Residu kemudian dilarutkan dengan 5 ml HCl 2 N. Larutan yang didapat kemudian dibagi ke dalam tiga tabung reaksi. Pada tabung pertama ditambahkan HCl 2N yang berfungsi sebagai blanko. Pada tabung kedua ditambahkan pereaksi Dragendoff sebanyak 3 tetes dan tabung ketiga ditambahkan pereaksi Mayer sebanyak 3 tetes. Terbentuknya endapan jingga pada tabung kedua dan endapan putih hingga kekuningan pada tabung ketiga menunjukkan adanya alkaloid. Pemeriksaan triterpenoid dilakukan dengan menguapkan 2 ml larutan uji. Residu yang diperoleh dilarutkan dalam 0,5 ml kloroform, lalu ditambah dengan 0,5 ml asam asetat anhidrat. Selanjutnya, campuran ini ditetesi dengan 2 ml asam sulfat pekat melalui dinding tabung tersebut. Terbentuknya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya triterpenoid. Pemeriksaan saponin dilakukan dengan cara ekstrak uji dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 mL air panas, dinginkan dan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Kandungan saponin ditandai dengan terbentuknya buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. pada penambahan HCl 2N, buih tidak hilang. Pemeriksaan flavonoid dilakukan dengan cara mengambil larutan uji sebanyak 1 ml kemudian ditambahkan dengan beberapa tetes HCl pekat dan beberapa butir serbuk Mg. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya warna orange sampai merah. Pemeriksaan tanin dan polifenol dilakukan dengan cara mereaksikan larutan ekstrak uji sebanyak 1 ml dengan larutan besi (III) klorida 10%; jika terbentuk warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan maka menunjukkan adanya senyawa polifenol dan tanin.

### Kultur dan perlakuan *M. tuberculosis* H37Rv.

Kultur *M. tuberculosis* dilakukan dengan medium pertumbuhan BD BACTEC MGIT 960 SIRE selama 7 hari.

Senyawa *fluorescent* yang terdapat dalam medium sensitif terhadap adanya oksigen yang terlarut dalam *broth* sehingga ketika terjadi pertumbuhan bakteri maka fluoresensi akan terdeteksi. Media pertumbuhan disuplementasi dengan ekstrak perikarp manggis dengan dosis yang berbeda. Perlakuan A, B, dan C masing-masing mengandung 522,25 µg/ml ekstrak perikarp manggis (mengandung α-mangostin 3,125 µg/ml); 1044,5 µg/ml ekstrak perikarp manggis (mengandung α-mangostin 6,25 µg/ml); dan 2089 µg/ml ekstrak perikarp manggis (mengandung α-mangostin 12,5 µg/ml). Sebagai kontrol positif, digunakan media dengan penambahan rifampisin 1 µg/mL. Sebagai kontrol digunakan media saja tanpa penambahan apapun. Setelah 7 hari, filtrat kultur diperoleh melalui sentrifugasi. Penentuan kadar protein dalam filtrat dilakukan dengan menggunakan Nanodrop Spectrophotometer ND-100 pada λ 280 nm.

#### Identifikasi CFP-10 Menggunakan SDS PAGE dengan Metode Pewarnaan Coomassie Blue dan Silver Stain.

Sampel filtrat protein dielektroforesis dengan menggunakan *separating gel* 15% dan *stacking gel* 4%. Elektroforesis dilakukan pada kondisi 120 V, 400 mA, selama 90 menit. Setelah elektroforesis dihentikan, dilanjutkan dengan pewarnaan menggunakan *Coomassie blue* dan *silver stain*. Pita hasil pewarnaan dianalisa dengan menggunakan program Adobe Photoshop CS6.

#### Uji Spesifisitas CFP-10 dengan Metode Dot Blot dan Visualisasi Membran Nitrocellulose dengan ImageQuant LAS 500.

Dot blot dilakukan dengan cara mereaksikan filtrat protein dengan antibodi primer anti-CFP-10 (Abcam) dan antibodi sekunder *antirabbit* berlabel biotin. Selanjutnya dilakukan pereaksian dengan SA-HRP pada *membrane nitrocellulose*. Hasil visualisasi diperoleh dari sinyal yang merupakan hasil reaksi antibodi sekunder konjugat SA-HRP dengan substrat peroksida-luminol (1:1) dibaca dengan ImageQuant.

#### Analisa Data.

Data yang diambil berupa kadar protein yang disekresikan. Data tersebut diambil setelah dilakukan metode SDS PAGE dan Dot Blot dengan visualisasi membran *nitrocellulose* dengan ImageQuant LAS 500. Analisis data dilakukan dengan membandingkan ketebalan pita protein yang dianalisis statistik menggunakan SPSS 20. *One Way Anova* digunakan untuk menguji apakah terdapat perbedaan yang signifikan pada sekresi protein dari masing-masing perlakuan dengan tingkat kepercayaan 95%. Kemudian juga dilakukan uji korelasi Pearson untuk mengetahui apakah ada hubungan dari masing-masing perlakuan terhadap sekresi protein yang dihasilkan. Tingkat kepercayaan yang digunakan adalah 95%.

### 3. Hasil

#### Ekstraksi perikarp manggis dan identifikasi kandungan ekstrak.

Dari maserasi serbuk perikarp manggis diperoleh ekstrak cair kental berwarna coklat kehitaman sebanyak 14,72 gram. Hasil uji fitokimia ekstrak perikarp manggis menunjukkan adanya kandungan triterpenoid, tannin dan polifenol, saponin, alkaloid, dan flavonoid dalam ekstrak perikarp manggis. Kadar α-mangostin pada ekstrak perikarp manggis ditentukan dengan HPLC MS/MS dan didapatkan kadar α-mangostin hasil maserasi serbuk perikarp manggis sebesar 5984,55 µg/gram.

#### Kultur dan perlakuan *M. tuberculosis*.

Hasil identifikasi menunjukkan bahwa adanya pertumbuhan bakteri melalui fluoresensi. Kadar protein filtrat yang dideteksi dengan Nanodrop dapat dilihat pada Tabel 1. Semakin tinggi kadar yang terdeteksi, maka semakin tinggi pula jumlah protein yang dikandung.

Tabel 1 Hasil Penentuan Kadar Protein Sampel dengan Metode Nanodrop

Sampel	Kadar (mg/ml)
Perlakuan A (ekstrak perikarp manggis dengan konsentrasi α-mangostin 3,125 µg/ml)	1,62
Perlakuan B (ekstrak perikarp manggis dengan konsentrasi α-mangostin 6,25 µg/ml)	2,64
Perlakuan C (ekstrak perikarp manggis dengan konsentrasi α-mangostin 12,5 µg/ml)	2,64
Perlakuan D (kontrol negatif)	2,66
Perlakuan F (ekstrak perikarp manggis pembanding dengan konsentrasi α-mangostin 6,25 µg/ml)	2,12

#### Identifikasi CFP-10 Menggunakan SDS PAGE Metode Pewarnaan Coomassie Blue dan Silver Stain.

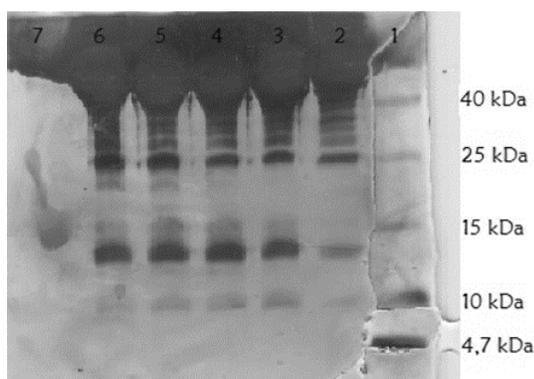
Hasil identifikasi dengan metode pengecatan Coomassie blue disajikan pada Gambar 1. Dari hasil pewarnaan protein *M. tuberculosis* H37Rv dalam filtrat kultur dengan pengecatan *Coomassie blue* didapat beberapa baris pita protein yang terbentuk. Pita CFP-10 teridentifikasi melalui adanya pita berukuran 10 kDa. Pada lajur 2 tidak terbentuk pita protein yang menandakan bahwa media tidak mengandung protein yang dapat mengganggu hasil identifikasi protein CFP-10 pada filtrat kultur. Hasil penghitungan intensitas cahaya pada pita protein dengan menggunakan Adobe Photoshop CS 6 dapat dilihat pada Tabel 2. Semakin tinggi nilai kuantifikasi intensitas cahaya maka semakin tipis pita protein yang terbentuk. Dari data analisa profil protein dengan pewarnaan Coomassie blue diperoleh pita CFP-10 yang sangat tipis (Gambar 1) sehingga diperlukan teknik pengecatan lain yang lebih sensitif yakni metode *silver stain*.

Metode pewarnaan *silver stain* dapat digunakan untuk mendeteksi protein dengan jumlah hingga 1 ng. Hasil identifikasi dengan metode pengecatan *Silver stain* disajikan pada Gambar 2. Pada hasil identifikasi CFP-10 dengan

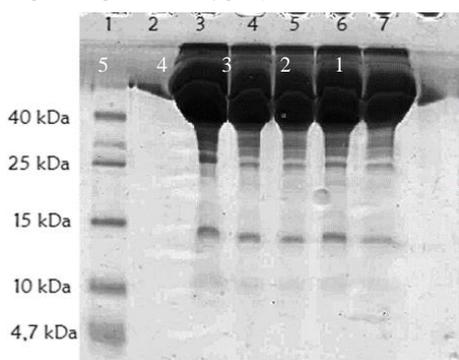
metode pengecatan *Silver stain* diperoleh pita protein yang lebih tebal dibandingkan dengan metode pewarnaan *Coomassie Blue*. CFP-10 teridentifikasi melalui adanya pita protein dengan ukuran 10kDa. Hasil penghitungan intensitas cahaya pada pita protein dengan menggunakan Adobe Photoshop CS 6 dapat dilihat pada Table 3.

**Uji Spesifisitas CFP-10 dengan Metode Dot Blot dan Visualisasi Membran Nitrocellulose dengan ImageQuant LAS 500.**

Uji spesifisitas dengan metode Dot Blot bertujuan untuk membuktikan apakah protein yang di profiling adalah benar protein yang diduga yakni protein CFP-10. Hal ini



**Gambar 1. Hasil Pewarnaan Protein *M. tuberculosis* H37Rv dalam Filtrat Kultur dengan Pewarnaan Coomassie Blue.** Lajur 1: protein marker. Lajur 2: protein medium BD BACTEC MGIT 960 SIRE. Lajur 3: protein *M. tuberculosis* H37Rv perlakuan ekstrak manggis pembeding dengan konsentrasi 1044,5 µg/ml. Lajur 4: protein *M. tuberculosis* H37Rv tanpa perlakuan. Lajur 5: protein *M. tuberculosis* H37Rv perlakuan ekstrak perikarp manggis dengan konsentrasi 2089 µg/ml (mengandung α-mangostin 12,5 µg/ml). Lajur 6: protein *M. tuberculosis* H37Rv perlakuan ekstrak perikarp manggis dengan konsentrasi 1044,5 µg/ml (mengandung α-mangostin 6,25 µg/ml). Lajur 7: protein *M. tuberculosis* H37Rv perlakuan ekstrak perikarp manggis dengan konsentrasi 522,25 µg/ml (mengandung α-mangostin 3,125 µg/ml).



**Gambar 2 Hasil Pewarnaan Protein *M. tuberculosis* H37Rv dalam Filtrat Kultur dengan Pengecatan Silver Stain.** Lajur 1: protein marker. Lajur 2: protein *M. tuberculosis* H37Rv perlakuan ekstrak perikarp manggis

dengan konsentrasi 522,25 µg/ml (mengandung α-mangostin 3,125 µg/ml). Lajur 3: protein *M. tuberculosis* H37Rv perlakuan ekstrak perikarp manggis dengan konsentrasi 1044,5 µg/ml (mengandung α-mangostin 6,25 µg/ml). Lajur 4: protein *M. tuberculosis* H37Rv perlakuan ekstrak perikarp manggis dengan konsentrasi 2089 µg/ml (mengandung α-mangostin 12,5 µg/ml). Lajur 5: protein *M. tuberculosis* H37Rv tanpa perlakuan. Lajur 6: protein *M. tuberculosis* H37Rv perlakuan ekstrak manggis pembeding dengan konsentrasi 1044,5 µg/ml. Lajur 7: protein media BD BACTEC MGIT 960 SIRE.

dapat diketahui dari adanya reaksi antigen antibodi yang spesifik. Setelah proses Dot blot selesai, membran *nitrocellulose* divisualisasi dengan ImageQuant LAS 500 dan hasilnya dapat dilihat pada Tabel 4. Semakin rendah nilai hasil kuantifikasi menunjukkan semakin kecil jumlah protein yang dikandung.

**Tabel 2. Perhitungan Intensitas Cahaya Pita Protein Hasil Pewarnaan Metode Coomassie Blue**

Perlakuan	Intensitas cahaya			Rata-rata
Protein marker	198,60	198,74	198,16	196,50
Kontrol media	227,72	227,41	227,60	227,58
Ekstrak perikarp manggis pembeding 1044,5 µg/ml	219,28	219,32	219,23	219,28
Kontrol negative	222,59	222,20	222,08	222,29
Ekstrak perikarp manggis 2089 µg/ml (mengandung α-mangostin 12,5 µg/ml)	223,59	223,46	223,69	223,58
Ekstrak perikarp manggis 1044,5 µg/ml (mengandung α-mangostin 6,25 µg/ml)	222,83	222,44	222,46	222,58
Ekstrak perikarp manggis 522,25 µg/ml (mengandung α-mangostin 3,125 µg/ml)	224,99	224,88	224,82	224,90

**Tabel 3. Perhitungan Intensitas Cahaya Pita Protein Hasil Pewarnaan Metode Silver Stain**

Perlakuan	Intensitas cahaya			Rata-rata
Protein marker	101,11	103,11	103,46	102,53
Ekstrak perikarp meanggis 522,25 ug/ml mengandung mangostin 3,125 ug/mL	148,32	148,60	148,40	148,44
Ekstrak perikarp manggis 1044,5 µg/ml mengandung α-mangostin 6,25 µg/ml	126,74	126,83	126,51	126,69
Ekstrak perikarp manggis 2089 µg/ml mengandung α-mangostin 12,5 µg/ml	134,20	133,69	134,15	134,01
Kontrol negatif	138,32	138,29	138,72	138,44
Ekstrak perikarp manggis pembeding 1044,5 µg/ml	145,85	145,75	146,03	145,88
Kontrol media	177,62	178,36	178,15	178,04

**Tabel 4. Kuantifikasi Data Kualitatif Hasil Visualisasi Membran Nitrocellulose dengan ImageQuant LAS 500**

Perlakuan	Nilai pembacaan sinyal
Ekstrak perikarp manggis 522,25 µg/ml, mengandung α-mangostin 3,125 µg/ml	0.00
Ekstrak perikarp manggis 1044,5 µg/ml, mengandung α-mangostin 6,25 µg/ml	0.00
Ekstrak perikarp manggis 2089 µg/ml, mengandung α-mangostin 12,5 µg/ml	123737.46
Kontrol negatif	112787.96
Kontrol positif	95281.73
Ekstrak perikarp manggis pembeding dengan konsentrasi 1044,5 µg/ml	102411.27
Kontrol media	6134.66

### Analisis Statistik *One Way Anova* dan Uji Korelasi *Pearson* Profil Protein dengan SDS-PAGE Metode Pewarnaan *Coomassie Blue* dan *Silver Stain*.

Uji homogenitas dan normalitas menunjukkan bahwa data homogen dan normal sehingga dapat dilanjutkan dengan analisis statistik *One Way Anova* yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pengaruh terhadap ketebalan pita CFP-10 secara signifikan. Uji korelasi *Pearson* menunjukkan tidak terdapat korelasi antara perlakuan terhadap ketebalan pita CFP-10.

## 4. Pembahasan

Penelitian ini merupakan suatu studi eksperimental laboratorik dengan desain *post test* yang bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak perikarp manggis dalam menghambat sekresi CFP-10 pada *M. tuberculosis* H37Rv dengan medium pertumbuhan BD BACTEC MGIT 960 SIRE. Potensi penghambatan dapat diketahui dari ketebalan pita CFP-10 pada gel elektroforesis hasil SDS PAGE dan ketebalan dot hasil uji spesifisitas dengan Dot Blot.

Dari hasil skrining fitokimia didapatkan hasil bahwa ekstrak perikarp manggis memiliki kandungan triterpenoid, tannin dan polifenol, saponin, alkaloid, dan flavonoid. Kandungan  $\alpha$ -mangostin terdapat dalam ekstrak perikarp manggis hasil maserasi karena merupakan salah satu komponen dari polifenol. Penelitian menyatakan bahwa secara umum kandungan kimia yang terdapat dalam perikarp manggis adalah *xanthone*, mangostin, garsinon, flavonoid, dan tanin.<sup>7</sup> Selanjutnya dilakukan pengukuran kadar  $\alpha$ -mangostin pada ekstrak yang diperoleh menggunakan HPLC MS/MS.

Intensitas pewarnaan dan ketebalan pita protein merupakan indikasi dari jumlah protein yang relatif banyak.<sup>8</sup> Pada penelitian ini pita protein yang terbentuk sangat tipis karena jumlah CFP-10 yang sangat sedikit sehingga tidak sensitif dengan pewarnaan *Coomassie Blue* yang mampu mendeteksi protein dengan jumlah 40-50 ng. Perlakuan A dengan dosis yang paling rendah yakni 522,25  $\mu\text{g/ml}$  (mengandung  $\alpha$ -mangostin 6,25  $\mu\text{g/ml}$ ) memiliki efek penghambatan yang lebih baik dibandingkan perlakuan lainnya secara signifikan. Perlakuan C dengan dosis 2089  $\mu\text{g/ml}$  (mengandung 12,5  $\mu\text{g/ml}$ ) memiliki efek penghambatan yang lebih baik dibandingkan perlakuan B dengan dosis 1044,5  $\mu\text{g/ml}$  (mengandung 6,25  $\mu\text{g/ml}$ ). Perlakuan D yang merupakan kontrol negatif memiliki pita protein yang lebih tipis dibandingkan perlakuan B. Hal ini menyatakan bahwa tidak ada linieritas hubungan antara masing-masing perlakuan terhadap sekresi protein CFP-10 karena dengan meningkatnya dosis tidak terjadi peningkatan efek penghambatan sekresi protein CFP-10 dan begitu pula sebaliknya. Dengan penurunan dosis ekstrak perikarp manggis tidak terjadi penurunan efek penghambatan sekresi protein CFP-10. Hal ini dapat terjadi karena penggunaan

*crude extract* yang mengandung banyak komponen. Pada perlakuan F yang merupakan ekstrak perikarp manggis pembanding dengan konsentrasi 1044,4  $\mu\text{g/ml}$  potensi penghambatan sekresinya tidak lebih baik dari ekstrak perikarp manggis hasil maserasi pada dosis yang sama.

Analisa profil protein dengan metode pewarnaan *Silver stain* juga dilakukan mengingat pita protein hasil pewarnaan dengan *Coomassie Blue* sangat tipis. Teknik pewarnaan dengan *Silver stain* merupakan teknik yang sangat sensitif untuk visualisasi protein dengan level deteksi 0,3-10 ng.<sup>9</sup> Perlakuan A dengan dosis yang paling rendah yakni 522,25  $\mu\text{g/ml}$  (mengandung  $\alpha$ -mangostin 6,25  $\mu\text{g/ml}$ ) memiliki efek penghambatan yang lebih baik secara signifikan dibandingkan perlakuan lainnya. Perlakuan C dengan dosis 2089  $\mu\text{g/ml}$  (mengandung 12,5  $\mu\text{g/ml}$ ) memiliki efek penghambatan yang lebih baik dibandingkan perlakuan B dengan dosis 1044,5  $\mu\text{g/ml}$  (mengandung 6,25  $\mu\text{g/ml}$ ). Sedangkan perlakuan D yang merupakan kontrol negatif memiliki pita protein yang lebih tipis dibandingkan perlakuan C dan B. Hal ini menyatakan bahwa tidak ada linieritas hubungan antara masing-masing perlakuan terhadap sekresi CFP-10 karena dengan meningkatnya dosis tidak terjadi peningkatan efek penghambatan sekresi protein CFP-10 dan begitu pula sebaliknya. Dengan penurunan dosis ekstrak perikarp manggis tidak terjadi penurunan efek penghambatan sekresi CFP-10. Hal ini dapat terjadi karena penggunaan *crude extract* yang mengandung banyak komponen.

Hasil analisa profil protein dengan SDS PAGE menggunakan teknik pewarnaan *Coomassie Blue* dan *Silver stain* menunjukkan hasil bahwa perlakuan A dengan dosis ekstrak perikarp manggis 522,25  $\mu\text{g/ml}$  lebih baik dibandingkan perlakuan C dengan dosis ekstrak perikarp manggis 2089  $\mu\text{g/ml}$  dan perlakuan C lebih baik dibandingkan perlakuan B dengan dosis ekstrak perikarp manggis 1044,5  $\mu\text{g/ml}$ . Penelitian menyatakan bahwa dalam penggunaan ekstrak bahan alam yang mengandung multikomponen sering menunjukkan tidak adanya hubungan yang linier antara dosis dengan efek yang ditimbulkan.<sup>10</sup> Efek dari komponen-komponen tersebut dapat saling sinergis, aditif, maupun antagonis. Dosis yang lebih tinggi ekstrak perikarp manggis dapat menurunkan potensi penghambatan sekresi CFP-10. Untuk itu diperlukan penelitian lebih lanjut terkait efek toksik ekstrak perikarp manggis dalam kaitannya sebagai anti TB.

Perlakuan F yang merupakan ekstrak perikarp manggis pembanding dengan konsentrasi 1044,5  $\mu\text{g/ml}$  memiliki efek yang berbeda dibandingkan ekstrak perikarp manggis hasil maserasi pada dosis yang sama. Proses preparasi serbuk perikarp manggis yang berbeda dapat menyebabkan efektivitas yang berbeda pula. Perbedaan lingkungan penanaman, teknik penanaman, teknik pemanenan, teknik penyimpanan, persiapan ekstraksi serta

jenis ekstraksi akan mempengaruhi tingkat zat aktif yang dikandung serta efektivitas farmakologinya.<sup>11</sup>

Dari hasil kuantifikasi yang diperoleh dilakukan analisis dengan membandingkan tiap perlakuan. Pengamatan pada hasil kuantifikasi menunjukkan bahwa perlakuan A dengan konsentrasi ekstrak perikarp manggis 522,25 µg/ml (mengandung α-mangostin 3,125 µg/ml) dan perlakuan B dengan konsentrasi ekstrak perikarp manggis 1044,5 µg/ml (mengandung α-mangostin 6,25 µg/ml) memiliki sinyal pembacaan yang paling rendah. Sedangkan perlakuan C dengan konsentrasi ekstrak perikarp manggis 2089 µg/ml (mengandung α-mangostin 12,5 µg/ml) memiliki sinyal pembacaan yang paling tinggi dibandingkan perlakuan A dan B yang artinya jumlah CFP-10 yang terdeteksi berdasarkan reaksi antigen antibodi spesifik lebih tinggi dibandingkan perlakuan A dan B.

Perlakuan E yang merupakan Rifampisin 1 µg/ml memiliki sinyal pembacaan yang tinggi sehingga dapat diketahui bahwa jumlah CFP-10 masih tinggi. Hal ini disebabkan karena perbedaan mekanisme kerja dari kedua zat aktif yakni Rifampisin dan α-mangostin sebagai antibakteri pada *M. tuberculosis*. Pemilihan penggunaan Rifampisin didasarkan bahwa Rifampisin merupakan *gold standart* pengobatan TB.<sup>12</sup> Rifampisin bekerja dengan menghambat sintesis asam nukelat dengan target utama *RNA polymerase* sehingga menghambat proses transkripsi yang berakibat pada kematian sel bakteri.<sup>13</sup> Alpha-mangostin bekerja dengan menargetkan *inner membrane* sel bakteri. Gugus *isoprenyl* dari α-mangostin meningkatkan sifat hidrofobisitas α-mangostin sehingga terjadi peningkatan permeabilitas membran bakteri dan terjadilah kebocoran komponen intraseluler sehingga berakibat pada matinya sel.<sup>6</sup> Oleh karena itu Rifampisin tidak memiliki efek penghambatan yang baik terhadap sekresi CFP-10.

Dari hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa perlakuan ekstrak perikarp manggis dengan konsentrasi α-mangostin 3,125 µg/ml mampu menghambat sekresi protein CFP-10 lebih baik dibandingkan perlakuan lainnya.

## 5. Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini tidak bekerja sama untuk kepentingan perusahaan atau instansi tertentu. Penelitian ini dibiayai oleh dana DIPA Universitas Brawijaya tahun 2014.

## 6. Daftar Pustaka

- Ormerod, L. P. 2005. *Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): Epidemiology, Prevention and Treatment*. British Medical Bulletin 2005; 73 and 74, pp 17–24.
- Tan, T., Lee, W. L., Alexander, D. C., Grinstein, S., Liu, J. 2006. *The ESAT-6/CFP-10 Secretion System of M. marinum Modulates Phagosome Maturation*. Cell Microbiol. 2006. 8 (9), pp 1417–1429.
- Thanassi, D. G., Chapman, M. R., Chakraborty, S. *Bacterial Secreted Protein Secretory Mechanisms and Role in Pathogenesis*, 2009. pp 276-277. Norfolk, United Kingdom: Caister Academic Press.
- Ganguly, N., Sharma, P. *Mycobacterium tuberculosis RD-1 Secreted Antigens as Protective and Risk Factors for Tuberculosis, Understanding Tuberculosis - Deciphering the Secret Life of the Bacilli*, Dr. Pere-Joan Cardona (Ed.), 2012. ISBN: 978-953-307-946-2, pp 98-104.
- Ragasa, C. Y., Crisostomo, C. J., Garcia, K. D. C., Shen, C. *Antimicrobial xanthenes from Garcinia mangostana L. The Philippine Scientist*, 2010. 47, pp 64-75.
- Koh, J. J., Qiu, S., Zou, H., Lakshminarayanan, R., Li, J., Zhou, X., Tang, C., Saraswathi, P., Verma, C., Tan, D. T. H., Tan, A. L., Liu, S., Beurman, R.W. *Rapid Bactericidal Action of Alpha-mangostin Against MRSA as An Outcome of Membrane Targeting*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013. 1828, pp 834–844.
- Miryanti, Y. I. P., Sapei, L., Budiono, K., Indra, S. *Ekstraksi Antioksidan Dari Kulit Buah Manggis (Garcinia mangostana L.)*. Bandung: Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Katolik Parahyangan, 2011. pp 1-52.
- Coligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L. Speicher, D.W., and Wingfield, P.T. *Electrophoresis, In Current Protocols in Protein Science*. John Wiley and Sons, Inc. New York, 2002. pp 10.0.1-10.4.36.
- Celis, J.E., N. Carter, T. Hunter, K. Simons, J.V. Smaa, and D. Shotton. *Protein Detection in Gels by Silver Staining: A Procedure Compatible with Mass-Spectrometry*. Elsevier: Academic Press, 2006. pp 421-429.
- Yulinah, E., Sukrasno, Fitri, M. A. 2001. *Aktivitas Antidiabetika Ekstrak Etanol Herba Sambiloto (Andrographis paniculata Nees (Acanthaceae))*. JMS .2001. 6.(1). pp 13-20.
- Eshtiaghi, M. N., Yoswathana, N. *Optimization of Subcritical Ethanol Extraction for Xanthone from Mangosteen Pericarp*. International Journal of Chemical Engineering and Applications, 2015. 6.(2) pp 115-119.
- Depkes RI. *Pharmaceutical Care Untuk Penyakit Tuberculosis*. Direktorat Bina Farmasi Komunitas Dan Klinik Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian Dan Alat Kesehatan Departemen Kesehatan RI. 2005.
- Tatro, S. D. *A to Z Drug Facts*. Books@Ovid Facts and Comparison. 2003.