

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini adalah suatu studi eksperimental laboratorik untuk mengetahui adanya penghambatan sekresi protein Ag85 *M. tuberculosis* H37Rv oleh ekstrak perikarp manggis. Efek penghambatan sekresi protein Ag85 ini ditentukan oleh hasil pengamatan intensitas pita protein Ag85 (berat molekul 30 kDa) pada gel elektroforesis dan hasil uji spesifisitas protein Ag85 dengan metode Dot Blot dari kelompok perlakuan ekstrak perikarp manggis, pembanding (Garcia®), kontrol negatif, kontrol positif, dan medium BACTEC-MGIT setelah dilakukan pemanenan filtrat kultur *M. tuberculosis* H37Rv.

Pada awal penelitian ini dilakukan ekstraksi serbuk ekstrak perikarp manggis dengan metode maserasi selama 5 hari dan dilanjutkan dengan remaserasi sebanyak 1 kali selama 2 hari sehingga menghasilkan 14,7174 gram ekstrak etanol perikarp manggis. Metode maserasi dipilih karena mudah dan tidak dilakukan dengan pemanasan agar senyawa fitokimia dan *α-mangostin* dapat tersari seefektif mungkin dalam ekstrak perikarp manggis. Kemudian digunakan pelarut etanol 96% karena memiliki kelarutan yang tinggi, bersifat polar, dan titik didihnya rendah.

Ekstrak kental perikarp manggis ini mengandung senyawa bioaktif dari golongan saponin, tanin, polifenol, alkaloid, terpenoid, dan flavonoid (Maliana *et al.*, 2013). Hal ini telah dibuktikan dari hasil skrining fitokimia ekstrak etanol

perikarp manggis yang menunjukkan positif mengandung senyawa bioaktif meliputi saponin, tanin, polifenol, alkaloid, triterpenoid, flavonoid. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antituberkulosis diakibatkan adanya penghambatan enzim *fatty acid synthase* II (FAS II) sehingga pembentukan asam mikolat menjadi terhambat dan tidak terjadi sekresi Ag85 (Brown *et al.*, 2007). Sedangkan, mekanisme kerja golongan senyawa terpenoid sebagai antibakteri disebabkan karena adanya gangguan pada bagian lipid pada membran plasma bakteri sehingga mengakibatkan kebocoran pada bagian intraseluler dan terjadinya perubahan permeabilitas membran (Bueno-Sánchez *et al.*, 2009).

Ekstrak etanol perikarp manggis mengandung salah satu derivat xanthone, yakni *α-mangostin* memiliki aktivitas antibakteri kuat yang dilihat kadar *α-mangostin* dengan menggunakan alat HPLC-MS/MS (Torrungruang *et al.*, 2007). Alat HPLC-MS/MS dipilih karena pemisahan senyawa dilakukan berdasarkan kepolaran antara *α-mangostin* dengan etanol 96% dan diidentifikasi menurut berat molekul *α-mangostin* yang terkandung dalam ekstrak perikarp manggis.

Analisa profil protein sampel filtrat kultur bakteri *M. tuberculosis* H37Rv dengan metode SDS-PAGE pewarnaan *Silver Staining* menggunakan sampel murni (yang belum dipekatkan dengan ammonium sulfat) karena metode ini memiliki tingkat kepekaan yang sangat tinggi (30-100 kali lebih sensitif daripada menggunakan pewarnaan *Coomassie blue*). Metode pewarnaan *Silver Staining* dapat mendeteksi protein dalam jumlah yang sangat kecil (dalam ukuran nanogram) (Chevallet *et al.*, 2007). Berdasarkan hasil analisa profil protein dengan metode SDS-PAGE pewarnaan *Silver Staining* pada gambar 5.4, diketahui bahwa pita protein 29,24 kDa diduga merupakan protein Ag85 yang

memiliki berat molekul 30 kDa. Kemudian bila dilakukan pengukuran intensitas pita protein Ag85 terhadap gel SDS-PAGE pewarnaan *Silver Staining* pada tabel 5.8, maka diperoleh tabung A (104,03) memiliki nilai rata-rata paling besar dibandingkan dengan tabung B (82,06) dan C (90,5).

Kurang jelasnya keberadaan pita protein Ag85 (terutama jika dilihat pada bagian F pada gambar 5.4) ini disebabkan karena pita-pita protein kurang terseparasi secara sempurna sehingga perlu menurunkan prosentase *separating gel*. Agar diperoleh pita protein Ag85 yang lebih jelas intensitasnya, maka sampel filtrat kultur bakteri *M. tuberculosis* H37Rv dipresipitasi dengan ammonium sulfat. Pemekatan protein sampel filtrat kultur bakteri dilakukan dengan menggunakan ammonium sulfat karena protein tidak dapat terdenaturasi dan aktivitasnya dapat diperbaiki selama pelarutan pelet kembali. Selain itu, garam ammonium sulfat juga dapat menstabilkan protein melawan denaturasi, proteolisis ataupun kontaminasi bakteri (Jumiarti, 2012).

Selanjutnya, dilakukan analisa profil protein Ag85 dengan metode SDS-PAGE pewarnaan *Coomassie blue* dan gel *polyacrilamide* yang digunakan adalah 12% supaya pita-pita protein dapat terseparasi secara sempurna. Bila dilihat kembali gambar 5.5 di bab sebelumnya, maka dapat diperoleh pita protein yang terletak diantara 25-35 kDa adalah protein dengan berat molekul 29,58 kDa dimana pita protein ini mendekati angka 30 kDa yang merupakan protein Ag85. Jika dibandingkan antara variabel A, B, dan C (ekstrak perikarp manggis), maka dapat diketahui bahwa ekstrak perikarp manggis dengan dosis *α-mangostin* 12,5 µg/ml bisa menghambat sekresi protein Ag85 *M. tuberculosis* H37Rv lebih banyak dimana ditandai dengan pita protein berukuran 29,58 kDa yang paling tipis dibandingkan ekstrak perikarp manggis dengan dosis *α-mangostin* 3,125

dan 6,25 µg/ml. Hal ini juga terbukti dari hasil pengukuran intensitas pita protein Ag85 terhadap gel SDS-PAGE pewarnaan *Coomassie Blue* pada tabel 5.4 bahwa tabung C memiliki nilai rata-rata paling besar, yakni 145,37 diantara nilai rata-rata tabung A (135,5833) dan B (144,59). Hasil dot blot dengan pengenceran 1x ini memperkuat hasil analisa profil protein dengan metode SDS-PAGE pewarnaan *Coomassie Blue* dimana Garcia® (pembanding) dapat menghambat sekresi protein Ag85 terbanyak dibandingkan dengan variabel lainnya.

Kemudian jika dibandingkan antara ketiga macam dosis ekstrak perikarp manggis, maka dosis *α-mangostin* dalam ekstrak perikarp manggis yang terbukti paling banyak menghambat sekresi Ag85 adalah 12,5 µg/ml. Protein Ag85 berperan dalam perkembangan dinding sel bakteri melalui aktivitas *mycolyl-transferase* yang dapat melakukan sintesis *trehalose dimycolate* (TDM) dimana merupakan pembungkus lipid esensial pada bakteri TB yang virulen sehingga dibutuhkan dosis besar untuk menghambat sekresi protein Ag85 (Huygen, 2014).

Kesalahan yang terjadi pada penelitian saat melakukan uji spesifisitas Ag85 dengan dot blot adalah dalam gambar 5.6 dan lampiran 12, terlihat bahwa dot yang dihasilkan kurang sempurna karena durasi waktu pencucian membran nitroselulosa dengan larutan TBS-Tween 0,05% kurang lama (3 x 3 menit) dan antibodi sekunder yang digunakan berlabel biotin sehingga timbul *overreaksi* antara antibodi primer, antibodi sekunder, dan SA-HRP. Seharusnya, durasi waktu pencucian membran nitroselulosa setelah inkubasi baik itu antibodi primer, antibodi sekunder, maupun SA-HRP dengan larutan TBS-Tween 0,05% lebih lama, yaitu 4-6 x 5 menit. Lalu karena antibodi sekunder yang digunakan berlabel biotin, maka inkubasi membran nitroselulosa dengan SA-HRP diperlama menjadi

1 jam kemudian dicuci dengan larutan TBS-Tween 0,05% selama 4-6 x 5 menit supaya dapat menghasilkan dot secara sempurna (GE Healthcare, 2014).

Selain itu, penggunaan *blocking* buffer, yakni *skim milk (non-fat milk)* yang sebenarnya tidak direkomendasikan untuk direaksikan dengan streptavidin. Hal ini karena *skim milk* mengandung *endogenous* biotin dan glikoprotein sehingga dapat meningkatkan *background* hasil pembacaan dot blot dan terjadi overreaksi antara antibodi primer, antibodi sekunder, dan SA-HRP. Untuk itu, sebaiknya digunakan BSA (*Bovine Serum Albumin*) sebagai *blocking* buffer dengan *streptavidin-biotin* sebab BSA mengandung protein tunggal yang telah dipurifikasi dan tidak mengandung *endogenous* biotin (Li-cor Biosciences, 2011).

Berdasarkan hasil analisa statistika gel SDS-PAGE pewarnaan *Coomassie Blue*, terdapat perbedaan kadar protein Ag85 yang disekresikan antara perlakuan yang satu dengan lainnya secara signifikan setelah dilakukan analisis varian menggunakan metode *One Way ANOVA* karena terdapat 7 (tujuh) variabel yang berbeda antara lain ekstrak perikarp manggis dengan 3 (tiga) macam dosis *α -mangostin* yang berbeda, kontrol positif dan negatif, pembanding, dan medium BACTEC-MGIT (Sudarmanto, 2013). Kemudian dari hasil uji korelasi dengan menggunakan *Korelasi Pearson (Product Moment)* terhadap gel SDS-PAGE pewarnaan *Coomassie Blue* dapat dinyatakan bahwa sebagian besar tidak adanya hubungan antara perlakuan yang satu dengan lainnya secara signifikan karena terdapat tujuh (7) variabel yang berbeda-beda satu sama lain. Sedangkan, terdapat 4 (empat) pasangan perlakuan yang memiliki hubungan secara signifikan, yakni A dengan C, B dengan F, B dengan G, dan F dengan G. (Riwidikdo, 2008).

Berdasarkan hasil analisa statistika gel SDS-PAGE pewarnaan *Silver Staining*, adanya perbedaan kadar protein Ag85 yang disekresikan antara perlakuan yang satu dengan lainnya secara signifikan setelah dilakukan analisis varian menggunakan metode *Kruskal Wallis* karena terdapat 6 (enam) variabel yang berbeda antara lain ekstrak perikarp manggis dengan 3 (tiga) macam dosis *α -mangostin* yang berbeda, kontrol negatif, pembanding, dan medium BACTEC-MGIT (Sudarmanto, 2013). Berikutnya dari hasil uji korelasi dengan menggunakan *Korelasi Pearson (Product Moment)* terhadap gel SDS-PAGE pewarnaan *Silver Staining* dapat dinyatakan bahwa sebagian besar tidak adanya hubungan antara perlakuan yang satu dengan lainnya secara signifikan karena terdapat 6 (enam) variabel yang berbeda-beda satu sama lain. Sedangkan, terdapat 4 (empat) pasangan perlakuan yang memiliki hubungan secara signifikan, yakni B dengan D, B dengan F, C dengan G, dan D dengan F (Riwidikdo, 2008).

