

Evaluasi aktivitas anti mikobakterium tanaman obat Indonesia dengan pengujian reduksi resazurin

Evaluation of Indonesian medicinal plants for their anti-mycobacterial activity by resazurin reduction assay

MARTHA SARI[✉], WIEN KUSHARYOTO

Laboratorium Rekayasa Genetika Terapan dan Desain Protein, Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Jl. Raya Bogor Km 46 Cibinong, Bogor 16911, Jawa Barat. Tel.: +62-21-8754587, Fax.: +62-21-8754588, ✉email: martha.biotek@gmail.com

Manuskrip diterima: 6 September 2016. Revisi disetujui: 6 Desember 2016.

Abstrak. Sari M, Kusharyoto W. 2016. Evaluasi aktivitas anti mikobakterium tanaman obat Indonesia dengan pengujian reduksi resazurin. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 2: 138-142*. Tuberkulosis (TB) merupakan salah satu penyakit paling berbahaya yang menular dan disebabkan oleh bakteri patogen tunggal. Tuberkulosis menginfeksi baik individu sehat maupun individu dengan daya tahan tubuh lemah. Produk alami yang berasal dari mikroba dan tanaman obat merupakan sumber yang sangat penting untuk pengobatan TB. Pengujian reduksi resazurin menggunakan pelat mikro (MRA) umum digunakan dalam mengevaluasi produk alami dan senyawa sintesis sebagai aktivitas anti-mikobakterium. Penelitian ini menggunakan metode MRA dan bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas anti-mikobakterium dari ekstrak kimia tanaman terhadap *Mycobacterium smegmatis* dan *M. bovis* BCG serta membandingkannya dengan obat anti-mikobakterium Rifampisin. MRA dioptimalkan dengan menggunakan 2% pelarut DMSO dan larutan indikator 62,5 µg/ml resazurin dalam 5% larutan tween 80 selama 96 jam inkubasi. Ekstrak metanol tanaman yang didapat dari berbagai tanaman obat Indonesia telah diketahui secara empiris memiliki aktivitas anti-mikobakterium, mencakup *Baeckea frutescens* (Myrtaceae), *Caesalpinia sappan* (Fabaceae), *Centella asiatica* (Apiaceae), *Ficus deltoidea* (Moraceae), *Merremia mammosa* (Convolvulaceae), *Pluchea indica* (Asteraceae), *Sida rhombifolia* (Malvaceae), *Tinospora crispa* (Menispermaceae), *Usnea barbata* (Parmeliaceae), dan *Zingiber aromaticum* (Zingiberaceae). Hasil menunjukkan bahwa ekstrak *S. rhombifolia* dan *L. lavandufolia* memiliki potensi aktivitas menghambat *M. smegmatis*, begitu juga ekstrak *F. deltoidea* dan *B. frustecens* memiliki aktivitas sebagai anti *M. bovis*, dan ekstrak *Z. aromaticum* memiliki aktivitas anti-mikobakterium pada kedua bakteri (*M. smegmatis* - *M. bovis*). Aplikasi MRA menggunakan bakteri uji *M. smegmatis* atau *M. bovis* BCG sebagai target anti-mikobakterium memiliki beberapa kelebihan diantaranya biaya rendah, pengujian cepat, dan pengujian yang aman untuk aktivitas anti-mikobakterium dalam format uji cepat berteknologi tinggi.

Kata kunci: Aktivitas anti-mikobakterium, ekstrak fitokimia, *microplate resazurin assay* (MRA), tanaman obat

Abstrak. Sari M, Kusharyoto W. 2016. Evaluation of Indonesian medicinal plants for their anti-mycobacterial activity by resazurin reduction assay. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 2: 138-142*. Tuberculosis (TB) is one of the most important infectious diseases caused by a single pathogen bacteria. Tuberculosis infects both healthy and immunocompromised individuals. Natural products derived from microbes and medicinal plants were an important source of TB therapeutics. The microplate resazurin assay (MRA) is commonly used to evaluate natural products and synthetic compounds for anti-mycobacterial activity. This research used MRA method and aimed to evaluate the anti-mycobacterial activity of phytochemical extracts to *Mycobacterium smegmatis* and *M. bovis* BCG and compared them to the anti-mycobacterial drug of Rifampicin. MRA was optimized by utilizing 2% DMSO solvent and an indicator solution of 62.5 µg/mL resazurin in 5% tween 80 for 96 hours incubation. The methanolic phytochemical extracts were obtained from various Indonesian medicinal plants that been known empirically to have anti-mycobacterial activity, including *Baeckea frutescens* (Myrtaceae), *Caesalpinia sappan* (Fabaceae), *Centella asiatica* (Apiaceae), *Ficus deltoidea* (Moraceae), *Merremia mammosa* (Convolvulaceae), *Pluchea indica* (Asteraceae), *Sida rhombifolia* (Malvaceae), *Tinospora crispa* (Menispermaceae), *Usnea barbata* (Parmeliaceae) and *Zingiber aromaticum* (Zingiberaceae). The results showed that *S. rhombifolia* and *L. lavandufolia* extracts have a potential as an anti-mycobacterial activity against *M. smegmatis*, also *F. deltoidea* and *B. frustecens* extracts have an activity against *M. bovis*, and *Z. aromaticum* extract has a potency as anti-mycobacterium for both of them (*M. smegmatis* - *M. bovis*). The application of MRA using *M. smegmatis* or *M. bovis* BCG as anti-mycobacterial targets had several advantages such as low-cost, rapid testing and safe screening for anti-mycobacterial activity in a high-throughput format.

Keywords: Anti-mycobacterial activity, medicinal plants, microplate resazurin assay (MRA), phytochemical extracts

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit menular yang signifikan menjadi masalah bagi kesehatan global. Penyakit

ini diperkirakan menjadi penyebab sembilan juta orang di dunia meninggal dan terinfeksi setiap tahunnya (WHO 2012). Untuk beberapa dekade, belum ada pengobatan baru yang dapat diaplikasikan, sedangkan strain bakteri yang

resistan obat terus bertambah. Saat ini, penemuan obat anti-tuberkulosis baru dengan target obat yang unik merupakan kebutuhan yang mendesak (O'Neill et al. 2012).

Pada zaman dahulu, tanaman obat sering digunakan untuk menyembuhkan berbagai penyakit berabad lamanya (Sivakumar dan Jayaraman 2011). Sejarah telah membuktikan bahwa senyawa produk bahan alami dapat menjadi petunjuk bagi penemuan obat baru dan memiliki potensi tinggi untuk menghasilkan beberapa obat baru (Newman dan Cragg 2012). Penggunaan obat yang terbatas dan spesifik terhadap tanaman obat Indonesia mendorong kita untuk terus menyelidiki lebih lanjut aktivitas biologi dan hal-hal yang berkaitan dengan penghambatan pertumbuhan mikobakterium (Carpenter et al. 2012).

Indonesia memiliki 40.000 jenis tanaman endemik dan termasuk diantaranya 6000 tanaman obat (Kitagawa et al. 1995). Produk alami dan turunannya memainkan peranan penting dalam pengobatan kemoterapi modern untuk tuberkulosis (Copp dan Pearce 2006). Telah terjadi peningkatan permintaan untuk senyawa obat asal tumbuhan sebab riset mengenai obat allopathic memiliki efek cukup menjanjikan (Lall dan Meyer 1999). Senyawa yang terkandung dalam tanaman, seperti: alkaloids, flavonoids, tannins, xanthones, triterpenes, quinines dapat berfungsi sebagai anti-mikobakterium.

Terapi obat penyakit TB membutuhkan antibiotik dan berpotensi menimbulkan efek samping, sehingga penderita sering tidak taat dalam pengobatannya (Sivakumar 2011). Oleh karena itu, pencarian senyawa baru sebagai senyawa pemandu bagi pengembangan obat sangatlah penting. Tanaman obat merupakan salah satu sumber potensial dalam pencarian senyawa aktif dan menginspirasi bagi perolehan obat baru dari produk bahan alam (Carpenter 2012).

Dalam penelitian ini, beberapa jenis tanaman yang sering digunakan sebagai obat tradisional Indonesia dipilih untuk pengujian anti-mikobakterium diantaranya *Baeckea frutescens* (Myrtaceae), *Caesalpinia sappan* (Fabaceae), *Centella asiatica* (Apiaceae), *Ficus deltoidea* (Moraceae), *Merremia mammosa* (Convolvulaceae), *Pluchea indica* (Asteraceae), *Sida rhombifolia* (Malvaceae), *Tinospora crispa* (Menispermaceae), *Usnea barbata* (Parmeliaceae), dan *Zingiber aromaticum* (Zingiberaceae). Tanaman tersebut dipilih untuk diuji melawan *Mycobacterium smegmatis* and *M. bovis* BCG menggunakan teknik

microplate resazurin assay (MRA). Metode MRA adalah metode yang digunakan untuk menguji keaktifan senyawa anti-mikobakterium dalam kandungan bahan alami seperti pada tanaman obat dengan menggunakan resazurin sebagai indikator warna. Dengan demikian, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas anti-mikobakterium dari ekstrak kimia tanaman terhadap *Mycobacterium smegmatis* dan *M. bovis* BCG serta membandingkannya dengan obat anti-mikobakterium Rifampisin.

BAHAN DAN METODE

Bahan material ekstrak tanaman

Tanaman obat potensial yang digunakan dalam pengujian ini bersumber dari informasi empirik dan studi pustaka. Daftar simplisia yang digunakan, *Baeckea frutescens* (Myrtaceae), *Caesalpinia sappan* (Fabaceae), *Centella asiatica* (Apiaceae), *Ficus deltoidea* (Moraceae), *Merremia mammosa* (Convolvulaceae), *Pluchea indica* (Asteraceae), *Sida rhombifolia* (Malvaceae), *Tinospora crispa* (Menispermaceae), *Usnea barbata* (Parmeliaceae), dan *Zingiber aromaticum* (Zingiberaceae), diperoleh secara komersial di lokasi sekitar Jawa Tengah. Bagian tanaman yang diekstraksi antara lain pada bagian batang, rizoma, daun, kulit kayu, kulit buah, dan biji kering. Simplisia yang telah kering dicacah secara random sebanyak 30 gram dan di-soxhlet dengan 300 ml pelarut metanol (1:1) bersuhu 40-50°C. Untuk mendapatkan konsentrat ekstrak tanaman dilakukan evaporasi sampai bebas pelarut metanol. Informasi ekstrak tanaman obat yang diperoleh disajikan pada Tabel 1.

Preparasi kultur *Mycobacterium*

Mycobacterium bovis strain BCG (DSM 43756) dan *Mycobacterium smegmatis* (DSM 43990) ditumbuhkan dalam media tumbuh cair Middlebrook 7H9 lalu ditambahkan 0,5 ml *oleic acid/albumin/dextrose/catalase* (OADC) sebagai medium pengayaan. Selanjutnya, kultur bakteri diinkubasi pada suhu ruang 37°C dengan cara dikocok selama 24 jam. Kepadatan sel *M. bovis* dan *M. smegmatis* diobservasi menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 600 nm. Pengukuran kepadatan sel diamati pada interval waktu tertentu untuk mengetahui fase logaritmik hingga fase stasioner.

Tabel 1. Sumber simplisia tanaman obat Indonesia yang digunakan

Famili	Nama tanaman		Asal	Lokasi asal	Jaringan yang diekstraksi
	Spesies	Nama lokal			
Myrtaceae	<i>Baeckea frutescens</i>	Jung rahab	BAM	Jawa Tengah	Seluruh bagian
Fabaceae	<i>Caesalpinia sappan</i>	Secang	BAM	Jawa Tengah	Kulit kayu
Apiaceae	<i>Centella asiatica</i>	Pegagan	BAM	Jawa Tengah	Seluruh bagian
Moraceae	<i>Ficus deltoidea</i>	Tabat barito	HT	Jawa Tengah	Daun
Convolvulaceae	<i>Merremia mammosa</i>	Bidara upas	HT	Jawa Tengah	Umbi
Asteraceae	<i>Pluchea indica</i>	Beluntas	BAM	Jawa Tengah	Daun
Malvaceae	<i>Sida rhombifolia</i>	Sidaguri	BAM	Jawa Tengah	Daun
Lamiaceae	<i>Leucas lavandulifolia</i>	Lengengan	BAM	Jawa Tengah	Seluruh bagian
Parmeliaceae	<i>Usnea barbata</i>	Kayu angin	HT	Jawa Tengah	Seluruh bagian
Zingiberaceae	<i>Zingiber aromaticum</i>	Lempuyang wangi	BAM	Jawa Tengah	Rizoma

Keterangan: BAM = Bina Argo Mandiri; HT = Herba Tama

Microplate resazurin assay (MRA)

Metode MRA dilakukan dalam alat *microtiter 96 well transparan* steril (Webster et al. 2010). Larutan stok Rifampisin sebagai kontrol positif (20µg/L) dan ekstrak tanaman (10 mg/ml) dilarutkan dalam DMSO 2% dan disimpan pada suhu -20°C. Kontrol negatif pada cawan mikro dilakukan tanpa pemberian antibiotik, yaitu larutan 2% DMSO. Larutan indikator warna resazurin (60 µl/ml dalam 5% tween 80) ditambahkan setelah 24 jam inkubasi pada *incubator shaker*. Setiap 100 µl suspensi *Mycobacterium* dalam media tumbuh cair Middlebrook 7H9 pada konsentrasi $2,0 \times 10^6$ sel/ml dimasukkan ke dalam cawan secara aseptik. Suspensi *Mycobacterium* dimasukkan ke dalam sumur *microtiter 96 well plate* yang telah dimasukkan ekstrak tanaman sebelumnya dan kontrol positif 20µg/L Rifampisin, sedangkan kontrol negatif menggunakan DMSO 2% sebagai pengganti ekstrak tanaman (Montoro et al. 2005). Inkubasi sampel dilakukan selama 24 jam pada suhu 37°C. Larutan indikator warna resazurin (60 µl/ml dalam 5% tween 80) ditambahkan setelah 24 jam inkubasi pada *incubator shaker* terbentuk. Selanjutnya, intensitas warna diukur dengan alat Varioscanner Fluorometri dan dihitung tingkat penghambatan ekstrak menggunakan rumus berikut:

$$\text{Tingkat penghambatan (\%)} = 1 - \frac{(\text{Nilai fluoresens kontrol positif})}{(\text{Nilai fluoresens kontrol negatif})} \times 100$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 10 jenis tanaman obat Indonesia telah diekstraksi dan diuji aktivitasnya sebagai antimikobakterium (Tabel 2). Ekstraksi tanaman dengan pelarut organik dimaksudkan untuk mengeluarkan zat-zat kimia tanaman hingga diperoleh rendemen dengan jumlah beragam. Bobot bahan mentah (*simplisia*) yang diekstraksi diketahui tidak berbanding lurus terhadap bobot bersih ekstrak dan jumlah rendemen yang diperoleh. Hasil akhir ekstrak pada seluruh bagian tanaman menunjukkan bobot bersih cukup tinggi yaitu berkisar 16,77-33,11%. Sebaliknya, ekstrak pada bagian daun menghasilkan rendemen paling rendah yaitu sebesar 3,53%. Perbedaan bagian tanaman yang diekstraksi ikut mempengaruhi perolehan jumlah bobot bersih ekstrak. Dari sepuluh ekstrak tanaman obat yang diberi perlakuan diketahui memiliki warna yang cukup beragam.

Sebelum ekstrak tanaman obat diaplikasikan ke dalam pengujian MRRA, tahap awal akan dilakukan observasi pola hidup bakteri uji. Tujuan observasi bakteri ini adalah untuk melihat kondisi optimum bakteri beradaptasi dalam medium nutrisi sebelum mengalami fase kematian. Observasi ini penting dilakukan agar nantinya lamanya proses skrining mengacu pada pola optimum bakteri tersebut. Pada pengamatan fase pertumbuhan sel (logaritmik) bakteri uji *M. smegmatis* terjadi pada jam ke-24, sedangkan pada bakteri *M. bovis* terjadi pembentukan kepadatan sel lebih dari 24 jam waktu inkubasi, yaitu pada jam ke-48 sebelum akhirnya terbentuk fase stasioner (Gambar 1). Pola pertumbuhan bakteri jam ke-24 (*M.*

smegmatis) dan ke-48 (*M. bovis*) sangat mempengaruhi waktu optimal inkubasi sel dalam ekstrak tanaman saat pengujian MRA anti-mikobakterium berlangsung. Penambahan medium pengayaan (OADC) dapat mempercepat pertumbuhan sel *Mycobacterium*. Penurunan kepadatan sel (fase stasioner) terjadi pada jam ke-30 untuk *M. smegmatis* dan ke-54 untuk *M. bovis* sebelum akhirnya memasuki fase kematian. Dengan demikian skrining MRRA dari ekstrak tanaman obat pada bakteri uji *M. bovis* akan dilakukan inkubasi lebih lama dibanding bakteri uji *M. smegmatis*.

Dari hasil pengujian MRRA terhadap 10 jenis tanaman obat diketahui bahwa pembentukan warna terjadi dalam bentuk biru dan merah muda (pink). Perbedaan warna ini merupakan sinyal potensi ekstrak mengandung zat aktif untuk melawan sel bakteri uji diketahui dengan jelas. Dalam pengujian MRRA menggunakan indikator resazurin, munculnya warna merah mengandung arti bahwa telah terjadi proses oksidasi resazurin oleh sel-sel bakteri hidup membentuk resofurin. Warna merah muda menandakan ekstrak tanaman tidak mampu menekan laju pertumbuhan mikobakterium (ekstrak tidak aktif). Sebaliknya, warna biru menandakan pertumbuhan sel mikobakterium terhambat oleh ekstrak tanaman potensial yang diuji. Pada Gambar 2 terlihat proses oksidasi-reduksi sel yang terjadi dalam cawan berisi 96 sumur. Menurut penelitian sebelumnya dinyatakan bahwa warna biru dan pink terbentuk akibat reaksi redoks dari indikator resazurin yang berubah membentuk resofurin akibat pertumbuhan sel bakteri (O'Brien et al. 2000). Pada penelitian Webster et al. (2012) dilaporkan bahwa rendahnya pertumbuhan mikobakterium ditandai dengan suspensi tetap berwarna biru dan nilai fluoresensi yang relatif lebih rendah.

Seluruh jenis tanaman yang digunakan dalam penelitian MRRA ini secara empirik telah terbukti dapat menyembuhkan berbagai penyakit seperti batuk, demam, paru-paru, dan antiradang serta memiliki kemampuan sebagai antibakteri (Dai et al. 2013; Absamah et al. 2012; Razmavar 2014). Konfirmasi positif (Tabel 3) telah ditunjukkan oleh ekstrak *S. rhombifolia* dan *L. lavandufolia*. Kedua ekstrak tersebut pada dosis 10 mg/ml dapat menghambat pertumbuhan sel *M. smegmatis*. Nilai ketajaman warna (fluorosensi) dalam cawan mikro yang berisi ekstrak *S. rhombifolia* lebih besar dibanding ekstrak *L. lavandufolia*. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak *S. rhombifolia* sangat efektif menghambat pertumbuhan sel *M. smegmatis*. Penelitian yang sama telah dilakukan oleh Papitha et al. (2013) bahwa ekstrak *S. rhombifolia* dalam pelarut etil asetat dari organ daun dan akar sangat efektif menekan penghambatan sel *M. tuberculosis*. Dalam penelitian tersebut dinyatakan bahwa ekstrak *S. rhombifolia* memiliki kandungan senyawa aktif seperti steroid, flavonoid, terpenoid, alkaloid, fenol, saponin, glikosida, dan tanin serta diduga mampu menghambat sel-sel mikobakterium. Penelitian lain mengungkapkan bahwa ekstrak *L. lavandufolia* mengandung senyawa antibakteri yang dimanfaatkan sebagai obat ant demam, batuk, dan radang di kawasan India, Asia, dan Afrika (Das et al. 2012).

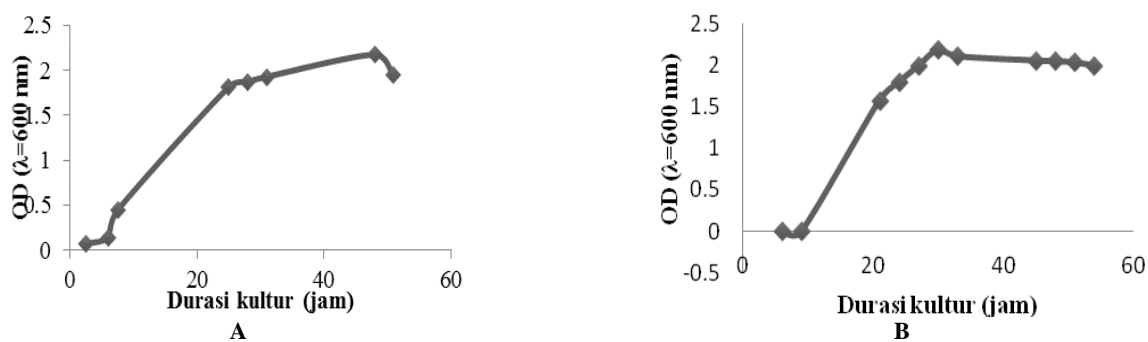
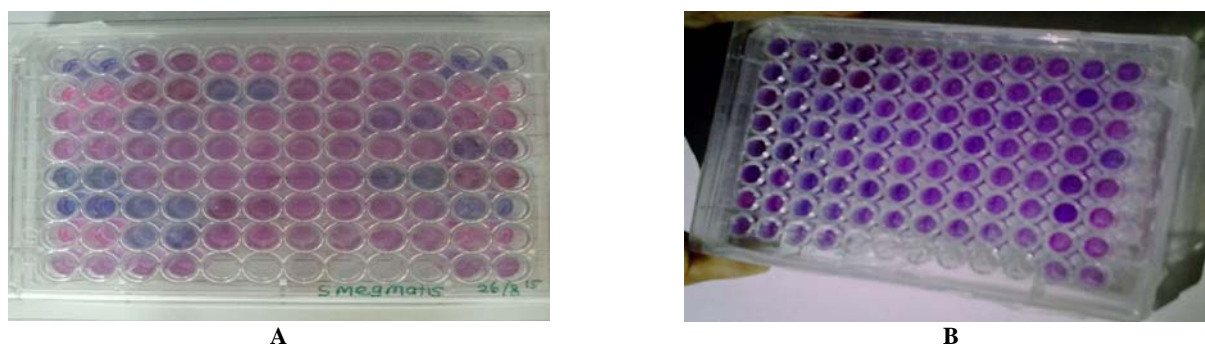
Tabel 2. Sumber tanaman obat Indonesia yang diekstraksi dengan pelarut metanol

Famili	Nama tanaman		Bobot		Bobot bersih (%)	Jaringan yang diekstraksi	Warna ekstrak
	Spesies	Nama lokal	Bahan mentah (g)	Ekstrak (g)			
Myrtaceae	<i>B. frutescens</i>	Jung rahab	50	16,5532	33,11	Seluruh bagian tanaman	Hijau tua
Fabaceae	<i>C. sappan</i>	Secang	25	3,6743	14,69	Kulit kayu	Merah tua
Apiaceae	<i>C. asiatica</i>	Pegagan	28	8,7839	31,37	Seluruh bagian tanaman	Cokelat
Moraceae	<i>F. deltoidea</i>	Tabat barito	33	2,8610	8,67	Daun	Cokelat kehijauan
Convolvulaceae	<i>M. mammosa</i>	Bidara upas	48	7,6239	15,88	Umbi	Cokelat tua
Asteraceae	<i>P. indica</i>	Beluntas	31	2,4997	8,07	Daun	Hijau tua
Malvaceae	<i>S. rhombifolia</i>	Sidaguri	34	1,2000	3,53	Daun	Hijau daun
Lamiaceae	<i>L. lavanduvolia</i>	Lenglangan	30	5,8173	19,39	Seluruh bagian tanaman	Hijau kecokelatan
Parmeliaceae	<i>U. barbata</i>	Kayu angin	50	3,3828	16,77	Seluruh bagian tanaman	Hijau tua
Zingiberaceae	<i>Z. aromaticum</i>	Lempuyang wangi	37	5,2962	14,31	Rizoma	Cokelat

Tabel 3. Aktivitas anti-mikobakterium dari ekstrak berbagai tanaman obat di Indonesia dan manfaatnya

Nama tanaman	Manfaat	Anti <i>M. smegmatis</i>	Anti <i>M. bovis</i>
<i>B. frutescens</i>	Obat demam, anti-inflamasi, rematik	-	++
<i>C. sappan</i>	Obat batuk, anti-koagulasi, obat TBC, antibakteri	-	-
<i>C. asiatica</i>	Memperlancar peredaran darah, antialergi, antibakteri, anti-inflamasi	-	-
<i>F. deltoidea</i>	Mengobati demam, radang, antibakteri	-	++
<i>M. mammosa</i>	Mengobati demam, batuk, serak, radang tenggorokan, radang paru-paru	-	-
<i>P. indica</i>	Obat penurun panas, obat batuk, anti-tuberkulosis	-	-
<i>S. rhombifolia</i>	Mengobati flu, demam, peradangan	+++	-
<i>L. lavandufolia</i>	Mengobati demam dan batuk	+	-
<i>U. barbata</i>	Antibakteri, <i>antifungal</i> , anti-inflamasi	-	-
<i>Z. aromaticum</i>	Antibakteri	+	+

Keterangan: - = Tidak efektif, + = kurang, ++ = baik, +++ = sangat baik

**Gambar 1.** Kurva pertumbuhan bakteri uji: (A) *M. bovis*, (B) *M. smegmatis***Gambar 2.** Hasil pengujian MRA menggunakan indikator warna resazurin dan reaksi perubahan warna. (A) Pada sel uji *M. smegmatis* dan (B) sel uji *M. bovis* selama 24 jam inkubasi.

Aktivitas anti-mikobakterium terhadap *M. bovis* telah diperoleh dari sumber ekstrak *F. deltoidea* dan *B. frustecens*. Nilai penghambatan sel-sel *Mycobacterium* uji dari berbagai ekstrak tanaman tersebut menunjukkan moderat positif. Pada penelitian sebelumnya telah dijelaskan bahwa ekstrak tanaman *F. deltoidea* dan *B. frustecens* berpotensi sebagai sumber pengobatan baru dengan aktivitas sebagai antibakteri.

Respons yang berbeda ditunjukkan oleh ekstrak *Z. aromaticum* yaitu memiliki daya hambat dengan spektrum lebih luas terhadap pertumbuhan keduanya yaitu *M. bovis* dan *M. smegmatis*. Namun demikian, tingkat intensitas warna yang muncul relatif kecil. Penelitian sebelumnya mengungkapkan bahwa optimasi dosis ekstrak dan pemurnian senyawa aktif dari pengotor dapat meningkatkan kemampuan aktivitas ekstrak *Z. aromaticum* sebagai anti-mikobakterium (Kiat et al. 2006).

Ekstrak tanaman obat yang memiliki aktivitas sebagai anti-mikobakterium yaitu *S. rhombifolia* dan *L. lavandufolia* (anti *M. smegmatis*), sedangkan *F. deltoidea* dan *B. frustecens* (anti *M. bovis*), dan ekstrak aktif dengan spektrum lebih luas sebagai target anti-mikobakterium keduanya (*M. smegmatis* dan *M. bovis*) adalah *Z. aromaticum*. Optimasi kondisi dan pemurnian ekstrak untuk meningkatkan kualitas ekstrak perlu ditingkatkan agar bebas dari pengotor, sehingga sensitivitas ekstrak akan terus stabil dan meningkat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini difasilitasi oleh Proyek Unggulan LIPI 2015, Puslit Bioteknologi - LIPI dan sumber mikroba uji diperoleh dari kultur koleksi lembaga riset DSMZ Jerman. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Risqi Ayuningtyas atas asistensinya selama penelitian berlangsung serta pihak-pihak yang membantu dalam penelitian ini dan sumber-sumber ilmiah dalam penulisan literatur kami.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdsamah O, Zaidi NT, Sule AB. 2012. Antimicrobial activity of *Ficus deltoidea* Jack (Mas Cotek). Pak J Pharm Sci 25 (3): 675-678.
- Carpenter CD, O'Neill T, Picot N et al. 2012. Anti-mycobacterial natural products from the Canadian medicinal plants *Juniperus communis*. J Ethnopharmacol 143 (2): 695-700.
- Copp BR, Pearce AN. 2006. Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. Natutal Product Report 20:535-557.
- Dai DN, Thang TD, Chau TM et al. 2013. Chemical constituents of the root essential oils of *Zingiber rubens* Roxb. and *Zingiber zerumbet* (L.) Smith. Am J Plant Sci 4: 7-10.
- Das NS, Patro VJ, Dinda SC. 2012. A review: Ethnobotanical survey of genus *Leucas*. Pharmacogn Rev 6(12): 100-106.
- Kiat TS, Pippen R, Yusof R et al. 2006. Screening of selected Zingiberaceae extracts for Dengue-2 virus protease inhibitory activities. J Sunway Academic. 3: 1-7.
- Kitagawa I, Shibuya H. 1995. Pharmacochemical investigation of Indonesian medicinal plants. Proceedings of the Phytochemical Society of Europe 37: 335-358.
- Lall N, Meyer JJ. 1999. In vitro inhibition of drugresistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. J Ethnopharmacol 66(3):347-54.
- Montoro E, Lemus D, Echemendia M et al. 2005. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother 55: 500-505.
- Newman DJ, Cragg GM. 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. J Nat Prod 75 (3): 311-335.
- O'brien J, Wilson I, Orton T et al. 2000. Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. Eur J Biochem 267: 5421-5426.
- O'Neill T, Johnson JA, Webster D et al. 2012. The Canadian medicinal plant *Heracleum maximum* contains antimycobacterial diynes and furanocoumarins. J Ethnopharmacol 147: 232-237.
- Papitha N, Jayshree N, Seenivasan PS et al. 2013. Anti-tubercular activity on leaves and roots of *Sida rhombifolia* L. Int J Pharm Sci Rev Res 23: 135-137.
- Razmavar S, Abdulla AM, Ismail SB et al. 2014. Antibacterial activity of leaf extracts of *Baeckea frustecens* against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Biomed Res Int 5: 1-6.
- Sivakumar A, Jayaraman G. 2011. Anti tuberculosis activity of commonly used medicinal plants of south India. J Med Plants Res 5 (31): 6881-6884.
- Taneja NK, Tyagi JS. 2007. Resazurin reduction assays for screening of anti-tubercular compounds against dormant and actively growing *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium bovis* BCG. J Antimicrob Chemother 10: 1-6.
- Webster D, Timothy DGL, Moore J et al. 2010. Antimycobacterial screening of traditional medicinal plants using the microplate resazurin assay. Can J Microbiol 56: 478-494.
- WHO [World Health Organization]. 2012. Global tuberculosis report 2012. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. WHO, Geneva.