

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA ANTIJAMUR (*Candida albicans*) DARI KULIT BUAH DELIMA (*Punica granatum L.*)

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ANTIFUNGAL (*Candida albicans*) COMPOUND FROM THE HULL OF DELIMA FRUITS (*Punica granatum L.*)

Indah Purwantini dan Subagus Wahyuono

Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRAK

Kulit buah delima (*Punica granatum L.*) secara tradisional digunakan untuk mengobati keputihan dan terbukti bahwa ekstrak kulit buah *P. granatum* tersebut mampu menghambat pertumbuhan *Candida albicans* sehingga perlu dilanjutkan dengan mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa aktif yang terdapat dalam kulit buah *P. granatum*. Penelitian diawali dengan ekstraksi kulit buah delima dengan petroleum eter dan dilanjutkan dengan metanol dalam soxhlet. Uji aktivitasnya terhadap *C. albicans* dari kedua ekstrak (100 mg/mL) menunjukkan bahwa ekstrak petroleum eter lebih aktif dibandingkan dengan ekstrak metanol (diameter hambatan: 10,59 vs 6,92 mm). Ekstrak petroleum eter selanjutnya difraksinasi dengan pelarut n-heksana, diperoleh fraksi larut n-heksana (aktif, 9,50 mm) dan fraksi tidak larut n-heksana (tidak aktif, 0,00 mm). Selanjutnya fraksi aktif (larut n-heksana) difraksinasi lanjut dengan kromatografi kolom vakum [VLC, fasa diam SiO₂; fasa gerak petroleum eter dan etilasetat yang konsentrasinya bertambah] diperoleh 7 fraksi (F1-F7). Uji aktivitas antijamur menunjukkan bahwa F2 (diameter, 9,05 mm) dan F3 (11,05 mm) menghambat pertumbuhan *C. albicans*. *Contact bioautography* dari F3 menunjukkan 2 senyawa aktif [*Rf*: 0,50 (major); 0,10 (minor)] yang dapat dipisahkan dengan preparatif KLT [SiO₂ F-254nm; n-heksana:etilasetat (4:1 dikembangkan 2 x)] diperoleh 2 senyawa aktif. Karena jumlah senyawa terbatas, maka hanya senyawa utama (*Rf*: 0,50) yang ditentukan KBM-nya (200 µg/ml). Identifikasi senyawa aktif secara spektroskopi (uv, ir, massa dan nmr) mengarah pada senyawa golongan sterol dengan kerangka stigmastan, dalam bentuk ester dari asam lemak rantai panjang.

Kata kunci : *Punica granatum L.*, *Candida albicans*, senyawa aktif, terpenoid

ABSTRACT

The hull of delima fruits (*Punica granatum L.*) are traditionally used to cure dysmenorrhoe. Preliminary study indicated that extract of the hull was able to inhibit the growth of *Candida albicans*. Therefore this study was aimed to isolate and identify active compounds responsible for the activity from the hull of *P. granatum*. The study was initiated by extracting the powdered material with petroleum ether followed by methanol. Antifungal activity test (100 mg/ml) indicated that the petroleum ether extract was more active than the methanol extract (inhibition zone: 10.59 vs 6.92 mm). The pet. ether extract was triturated by n-hexane to give n-hexane insoluble and n-hexane soluble fractions. The latter that was active (inh. zone: 9.50 vs 0.00 mm) was fractionated by vacuum liquid column chromatography (vlc; SiO₂, n-hexane with increasing amount of ethylacetate) to give 7 fractions (F1-F7). Fraction 2 (inh. zone: 9.05 mm) and 3 (11.05 mm) displayed antifungal activity, then F3 was subjected to contact bioautography to give 2 active compounds [*Rf*: 0.50 (major) and 0.10 (minor)]. Preparative tlc [SiO₂ F-254 nm; n-hexane:ethylacetate 4-1, developed 2x] of F3 was aimed to separate 2 active compounds. Due to limited amount of the minor compound, the MFC was applied only for the major compound (*Rf*: 0.50; 200 µg/ml). The structure identification was done by mean of spectroscopic methods (uv, ir, ms and nmr) to be a setrol type of compound having stigmastane skeleton, esterified by a long-chain fatty acid.

Keywords: *Punica granatum L.*, *Candida albicans*, active compound, terpenoid

PENDAHULUAN

Penelitian awal tentang aktivitas antijamur (*Candida albicans*) dari beberapa tanaman yang secara tradisional digunakan untuk mengobati keputihan. Kulit buah delima (*Punica granatum* L., fam. Punicaceae) mampu menghambat pertumbuhan *C. albicans* (Setyawati dkk., 2000). Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk isolasi dan identifikasi senyawa yang bertanggung jawab atas aktivitas antijamur melalui metoda *bioassay guided solvent extraction and partition*.

Secara umum, *P. granatum* L. mengandung alkaloid, estrone, granatin A dan B, flavonoid, punikalina, punikalagin (Syamsuhidayat dan Hutapea, 1991). Menurut Duke, kulit buah *Punica granatum* mengandung delfinidin-3,5-diglukosida, asam elaidat, flavogallol, granatin A dan B, isoquersetrin, manitol, punikalina, punikalagin, resin dan lilin.

Kegunaan delima ini dalam masyarakat sangat luas, antara lain akar tanaman ini sudah lama digunakan sebagai obat anti cacing dan obat batuk. Bunganya dapat menyembuhkan gusi yang sakit, kulit buahnya merupakan obat disentri, diare dan keputihan (Syamsuhidayat dan Hutapea, 1991). Morton (1987) mengungkapkan bahwa *P. granatum* L. juga digunakan untuk bronkhitis, antiinflamasi, dan antispasmodik.

Menurut Trinpathi dan Singh (2000), batang *P. granatum* L. mempunyai bioaktivitas sebagai anti moluska. Ekstrak etanol batang mampu membunuh siput dengan harga LC_{50} 22,42 mg. Jafri *et al.*, (2000) melaporkan bahwa ekstrak etanol 50% bunga tanaman ini mampu menurunkan kadar gula darah pada tikus. Ekstrak air kulit buah *P. granatum* L. yang diketahui mengandung tanin, mampu mengurangi lesi pada gastrik sebesar 47,7% - 76% dan diketahui bahwa ekstrak ini mampu meningkatkan asam dalam lambung sebesar 368% dan hal ini diduga dapat memperkuat pertahanan mukosa gastrik (Gharzouli, *et al.*, 1999). Tanin dalam kulit buah ini juga diketahui mempunyai efek antiviral, terutama virus herpes genital (HSV-2). Senyawa ini mampu menghambat replikasi maupun membunuh virus HSV-2, serta mampu menghalangi absorpsi virus ke dalam sel. Kulit buah *P. granatum* L. juga diketahui mempunyai aktivitas antibakteri (Perez dan Anesinin, 1994) serta mengandung zat inhibitor karbonik anhidrase (Satomi, *et al.*, 1993). Aviram *et al.* (2000) melaporkan bahwa jus buah delima mampu mengurangi aterosklerosis pada tikus. Penelitian kulit buah *P. granatum* sebagai antioksidan sudah dilakukan (Singh dkk., 2002; Noda dkk., 2002; Chidambara dkk., 2002), demikian juga sifat sebagai *chemopreventive* (Kim dkk., 2002). Penelitian aktivitas antiinfeksi dari *P. granatum* telah dilakukan oleh Holetz dkk., (2002), terhadap *Staphylococcus aureus* resisten terhadap methicillin (Machado dkk., 2003) dan sebagai antimutagenesis (Aleksperov, 2002) telah dilaporkan. Penelitian aktivitas anti *Candida albicans* dari kulit buah *P. granatum* belum pernah dilakukan.

METODOLOGI

Bahan

Kulit buah *Punica granatum* L. dari daerah Bangkalan, Madura; Petroleum eter, metanol, n-heksana, etilasetat, dimetilsulfoksida (DMSO), kloroform, ketokonazol, larutan ferriklorida ($FeCl_3$), serum (IV) sulfat $Ce(SO_4)_2$, media *nutrient broth* dan media *potato dextrosa agar*.

Alat

Alat Soxhlet, rotavapor, vortex, pengaduk magnet, lempeng klt silika gel F_{254} , bejana kromatografi, pipa kapiler, seperangkat alat kromatografi kolom vakum, piring petri dan alat-alat gelas, pipet mikro, *autoclave*, kotak aseptis, inkubator, dan silinder besi.

Cara Kerja

a. Ekstraksi, isolasi dan pemurnian. Kulit buah delima diekstraksi dengan petroleum eter teknik, dilanjutkan dengan metanol. Kedua ekstrak diuji aktivitasnya terhadap *C. albicans*, ekstrak petroleum eter (aktif) ditriturasi dengan n-heksana diperoleh dua fraksi yaitu fraksi senyawa yang larut n-heksana (aktif, fr. A) dan fraksi senyawa yang tidak larut dalam n-heksana (inaktif, fr. B).

b. Uji aktivitas antifungi. Ekstrak (100 mg) dilarutkan dalam DMSO (1 ml). Uji aktivitas anti *C. albicans* dengan metode difusi [*Potato Dextrose Agar* (medium), *C. albicans* ditumbuhkan dalam medium *Sabouroud's Dextrose* cair dan diinkubasi 24 jam. kekeruhan medium yang diperoleh dibandingkan dengan standar McFarland untuk mendapatkan konsentrasi *C. albicans* 10^8 CFU/ml. Ke dalam medium PDA steril (10 ml) yang masih cair dan dalam kondisi hangat dimasukkan 100 μ l inokulum *C. albicans*, kemudian dipindahkan ke cawan petri steril dan dibiarkan membeku. Pada permukaan medium dipasang silinder besi pada dan tiap silinder ditetesi dengan sampel sebanyak 20 μ l. Medium diinkubasi 24 jam dan zone jernih yang timbul di sekitar silinder diukur diameternya.

c. Uji aktivitas antifungi dengan metode bioautografi. Fraksi aktif ditotolkan pada lempeng KLT silika gel F_{254} , dan dieluasi dengan fase gerak n-heksana:etilasetat (4:1). Pada media PDA padat yang telah diinokulasi dengan *C. albicans*, ditempelkan lempeng hasil KLT tersebut, dan dibiarkan selama kurang lebih 20 menit. Setelah 20 menit lempeng diambil dan media diinkubasi selama 24 jam pada suhu $37^\circ C$. Zone jernih yang timbul diamati dan dihitung harga R_f nya.

d. Penentuan harga KBM. Harga KBM ditentukan dengan metode difusi padat. Beberapa konsentrasi senyawa hasil isolasi dimasukkan ke dalam piring petri. Ke dalam petri tersebut dimasukkan media PDA yang masih cair dan hangat, petri digoyang agar senyawa dapat tercampur homogen dengan media dan dibiarkan memadat. Setelah media padat, *C. albicans* ditanam pada permukaan media secara merata kemudian media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kadar terkecil yang mampu membunuh *C. albicans* yang ditandai dengan tidak adanya koloni fungi dianggap sebagai harga KBM senyawa.

e. Identifikasi senyawa aktif. Identifikasi senyawa hasil isolasi yang merupakan senyawa aktif anti *C. albicans* dianalisis menggunakan spektrofotometer sinar ultra violet (uv), sinar infra merah (ir), spektrometer massa (ms) dan resonan magnet inti (nmr). Spektra yang diperoleh dianalisis untuk mendapatkan gambaran struktur senyawa aktif tersebut.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari penyarian 400 gram serbuk kulit buah *Punica granatum* L. diperoleh ekstrak petroleum eter yang berwarna hijau dengan berat 9,55 gram dan ekstrak metanol berwarna coklat tua dengan berat 53,24 gram. Dengan hasil tersebut dapat diduga bahwa senyawa-senyawa non polar yang terdapat dalam kulit buah delima lebih sedikit dibandingkan dengan senyawa-senyawa yang relatif polar. Hasil uji aktivitas ekstrak petroleum eter (non polar) dan ekstrak metanol (polar) terhadap *C. albicans* terlihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji aktivitas terhadap *C. Albicans* ekstrak petroleum eter dan ekstrak metanol kulit buah *P. granatum* L.

Bahan uji	Konsentrasi (mg/ml)	Diameter hambatan (mm)	Keterangan
Ekstrak petroleum eter	100	10,25	Zone radikal
		10,25	Zone radikal
		10,00	Zone radikal
		10,40	Zone radikal
		12,05	Zone radikal
Ekstrak metanol	100	6,45	Zone irradikal
		6,40	Zone irradikal
		7,40	Zone irradikal
		7,15	Zone irradikal
		7,20	Zone irradikal
Kontrol positif (ketokonazol)	100	25,35	Zone radikal
		23,25	Zone radikal
		25,20	Zone radikal
		22,20	Zone radikal
		23,75	Zone radikal

Dengan konsentrasi ekstrak yang sama yaitu 100 mg/ml didapatkan hasil bahwa ekstrak petroleum eter mempunyai aktivitas terhadap *C. albicans* lebih besar dibandingkan dengan ekstrak metanol. Dengan konsentrasi yang sama pula, dapat diketahui bahwa ekstrak petroleum eter mampu membunuh *C. albicans* sedangkan ekstrak metanol hanya mampu menghambat pertumbuhannya. Dari hasil tersebut dapat diduga bahwa untuk dapat membunuh *C. albicans* dibutuhkan konsentrasi ekstrak metanol yang lebih tinggi. Oleh karena itu, isolasi senyawa aktif dilakukan terhadap ekstrak petroleum eter melalui *bioassay guided solvent extraction and fractionation*. Ekstrak petroleum eter difraksinasi dengan n-heksana sehingga akan diperoleh fraksi larut n-heksana (Fr. A) dan fraksi tidak larut n-heksana (Fr. B). Kedua fraksi tersebut diuji aktivitasnya, dan diperoleh hasil bahwa fraksi larut n-heksana mempunyai aktivitas anti *C. albicans* sedangkan fraksi tidak larut n-heksana tidak mempunyai aktivitas. Dan selanjutnya fraksi larut n-heksana yang merupakan fraksi aktif dipisahkan menjadi beberapa fraksi dengan menggunakan metode kromatografi kolom vakum (VLC) dengan sistem gradien fase gerak.

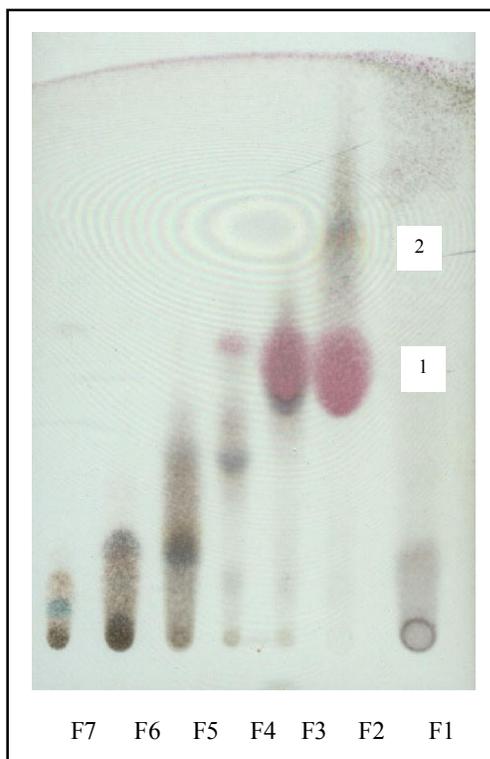
Fr. A difraksinasi lebih lanjut dengan kromatografi kolom vakum (vlc) [SiO₂, (fase diam), fase gerak:Pet. eter dan etilasetat dengan polaritas yang meningkat] memberi 7 fraksi gabungan (F1-F7). Ke-7 fraksi tersebut diuji aktivitasnya, dan hasil lengkap uji tersebut terlihat pada tabel II. F2 dan F3 menghambat pertumbuhan *C. albicans*, *contact bioautobiography* F3 menunjukkan adanya 2 senyawa aktif [Rf. 0,10 (minor) dan 0,50 (major)]. Isolasi 2 senyawa aktif dari F3 dilakukan secara preparatif klt [SiO₂, F-254 nm; n-heksana:etilasetat (4-1) 2 pengembangan], namun KBM hanya dilakukan pada senyawa utama (major). Uji kemurnian senyawa dilakukan dengan klt berbagai fasa gerak [kloroform : aseton (2:1), Rf. 0,83; petroleum eter : eter (1:3), Rf. 0,70; dan kloroform : etilasetat (3:1), Rf. 0,55].

Tabel 2. Hasil uji aktivitas fraksi gabungan (F1 sampai F7) terhadap *C. albicans*

Bahan Uji	Konsentrasi (mg/ml)	Diameter hambatan (mm)
1	1	- - -
F 2	1	9,35 8,60 9,20
F3	1	11,45 11,20 10,50
F 4	1	6,50 6,80 6,10
F 5	1	6,00 6,30 6,35
F 6	1	- - -
F 7	1	- - -
Kontrol pelarut		- - -

Ketujuh fraksi gabungan tersebut dianalisis menggunakan kromatografi lapis tipis dengan fase diam silika gel F₂₅₄ dan fase gerak n-heksana : etilasetat (4:1) serta penampak bercak larutan serum sulfat menghasilkan kromatogram (Gambar 1).

Dengan membandingkan hasil uji aktivitas dengan profil kromatogram pada gambar 1, terlihat bahwa pada F2 dan F3 mengandung senyawa dominan dengan harga *R_f* 0,48 (bercak no 1), dan pada fraksi lainnya bercak dengan harga *R_f* 0,48 tidak ada. F2 dan F3 mempunyai aktivitas antifungi yang paling besar dibandingkan dengan fraksi lainnya, sehingga diduga bahwa senyawa antifungi dalam F2 dan F3 adalah senyawa yang mempunyai harga *R_f* 0,48. Fraksi F2 mempunyai aktivitas antifungi yang lebih kecil dibandingkan fraksi F3. Dari kromatogram tampak bahwa kandungan senyawa F2 dan F3 berbeda, hal ini dapat dilihat dari adanya bercak berwarna hijau dengan *R_f* 0,72 (bercak no 2) pada fraksi F2 sedangkan pada fraksi F3 tidak ada. Pada fraksi F3 tampak adanya bercak yang berwarna hijau yang tumpang tindih dengan bercak dengan *R_f* 0,48, yang pada fraksi F2 tidak ada. Kemungkinan karena adanya perbedaan kandungan senyawa inilah yang menyebabkan aktivitas antifungi antara kedua fraksi tidak sama. Senyawa yang mempunyai *R_f* 0,48 diduga merupakan senyawa golongan terpenoid, karena dengan pereaksi semprot serum sulfat tampak bercak yang berwarna merah keunguan, sedangkan dua bercak lain yang tampak pada fraksi F2 dan F3 bukan termasuk golongan terpenoid. Dengan pereaksi semprot ferri klorida, ketiga bercak tersebut tidak menunjukkan warna violet, sehingga dapat disimpulkan bahwa ketiga senyawa bukan merupakan senyawa fenolik.



Gambar 1. Kromatogram F1-F7

Uji aktivitas dengan metode bioautografi hanya dilakukan terhadap F3 dengan pertimbangan bahwa F3 mempunyai aktivitas antifungi yang paling besar dibandingkan dengan fraksi lainnya. Hasil uji aktivitas dengan metode bioautografi ini menunjukkan bahwa pada F3 terdapat 2 senyawa yang mempunyai aktivitas sebagai anti *C. albicans*. Senyawa pertama yaitu senyawa utama mempunyai harga R_f sebesar 0,50 sedangkan senyawa kedua yang merupakan senyawa minor mempunyai harga R_f sebesar 0,10. Pada kromatogram gambar 1, terlihat bahwa pada fraksi F3 tidak tampak jelas adanya senyawa yang mempunyai R_f 0,10, akan tetapi pada metode bioautografi terlihat adanya senyawa yang mempunyai aktivitas sebagai antifungi dengan harga R_f 0,10. Hal ini disebabkan oleh adanya perbedaan konsentrasi dan volume fraksi yang ditotolkan, yang berakibat tidak tampaknya senyawa dengan R_f 0,10. Kemungkinan lain adalah senyawa dengan harga R_f 0,10 bukan senyawa yang dapat dideteksi dengan peraksi semprot serum sulfat. Dengan melihat hasil tersebut maka ditetapkan untuk mengisolasi senyawa utama yang terdapat pada F3 yang mempunyai aktivitas sebagai anti *C. albicans*.

Untuk mengisolasi senyawa aktif pada F3 digunakan metode kromatografi lapis tipis preparatif. Dari hasil isolasi, diuji kemurniannya menggunakan kromatografi lapis tipis dengan 3 macam fase gerak yang berlainan, yaitu kloroform:aseton (2:1 v/v), petroleum eter:eter (1:3 v/v), dan kloroform:etilasetat (3:1 v/v). Kromatogram hasil uji kemurnian isolat tersebut terlihat pada gambar 2. Pada kromatogram dengan sistim I, II dan III, menggunakan fase gerak kloroform:aseton (2:1), petroleum eter:eter (1:3), dan kloroform:etil asetat (3:1), kepolaran sistem meningkat dibandingkan dengan sistem KLT yang digunakan pada uji kemurnian yaitu n-heksana:etil asetat (4:1). Hasil uji kemurnian tersebut menunjukkan bahwa eluasi menggunakan 3 macam fase gerak di atas menghasilkan satu bercak tunggal, sehingga dapat diambil kesimpulan bahwa senyawa/isolat yang diperoleh relatif murni.

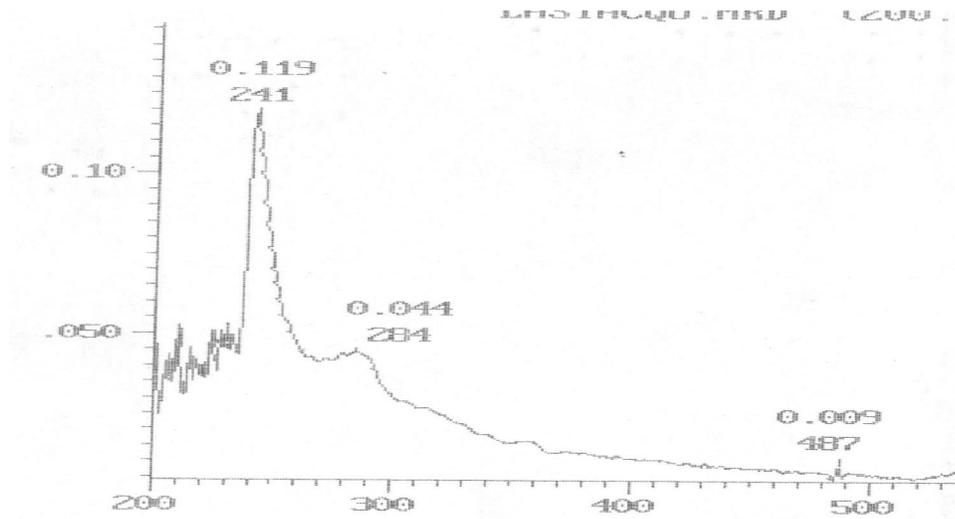
Untuk mengetahui nilai kadar bunuh minimum (KBM) senyawa aktif digunakan metode difusi padat. Uji dilakukan terhadap konsentrasi 100, 200, 400, 800 dan 1000 $\mu\text{g/ml}$. Dari uji tersebut diperoleh hasil bahwa KBM senyawa aktif hasil isolasi adalah 200 $\mu\text{g/ml}$.

Spektra ultra violet senyawa aktif hasil isolasi menunjukkan adanya absorpsi maksimum pada panjang gelombang 241 nm (Gambar 3). Menurut kaidah Woodward hal ini menunjukkan adanya sistem dien pada struktur senyawa yang diuji.



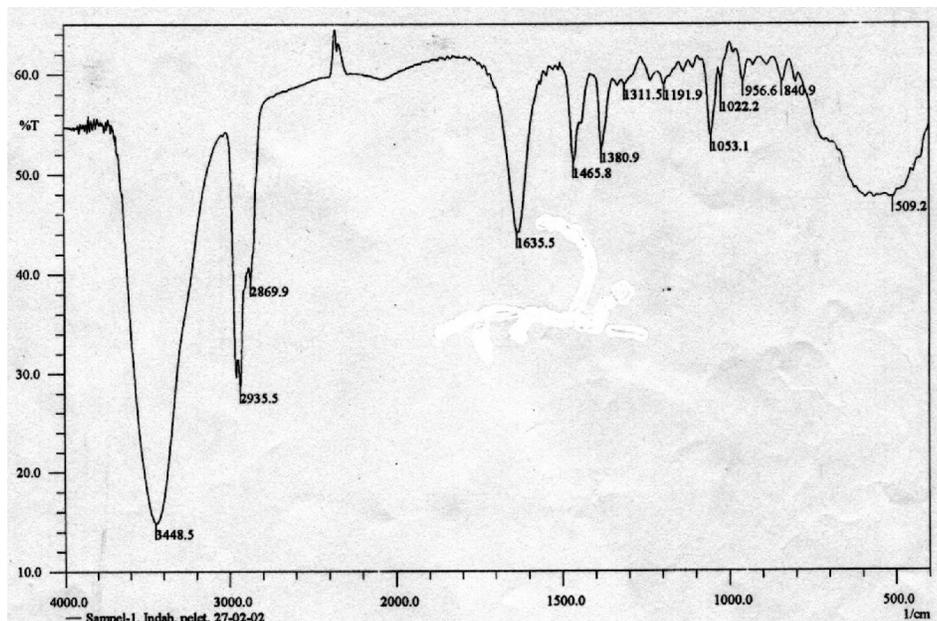
Keterangan
I : kloroform : aseton (2:1)
II : petroleum eter : eter (1:3)
III : kloroform : etilasetat (3:1)
Deteksi dengan serium sulfat

Gambar 2. Kromatogram hasil uji kemurnian isolat



Gambar 3. Spektra ultraviolet senyawa aktif

Dari spektra infra merah dapat dilihat adanya serapan kuat dan lebar pada $3433,1\text{ cm}^{-1}$ yang merupakan pita uluran -OH (Gambar 4). Hal ini menunjukkan adanya gugus hidroksil (-OH) pada senyawa hasil isolasi. Hal ini juga didukung dengan adanya pita lemah pada $1022,2\text{ cm}^{-1}$ yang merupakan serapan uluran -OH . Serapan kuat pada daerah 2960 cm^{-1} yang didukung adanya serapan sedang pada $1465,8\text{ cm}^{-1}$ dan serapan sedang pada 1055 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus sikloheksil. Selain itu serapan pada 2960 cm^{-1} juga dapat menunjukkan adanya gugus metil (-CH_3). Serapan kuat pada $2852,5\text{ cm}^{-1}$ serta serapan sedang pada $1438,8\text{ cm}^{-1}$ juga mendukung adanya gugus metil pada spektra ini. Tidak adanya serapan kuat pada daerah $3100 - 3000\text{ cm}^{-1}$ dan pada $1600 - 1500\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi bukan merupakan senyawa aromatis.

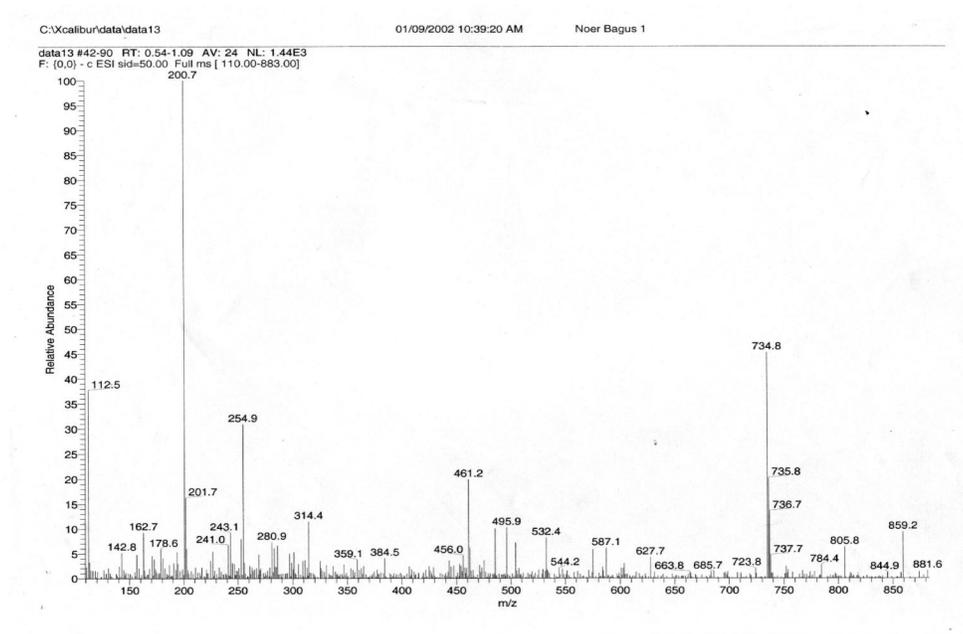


Gambar 4. Spektra infra merah senyawa aktif

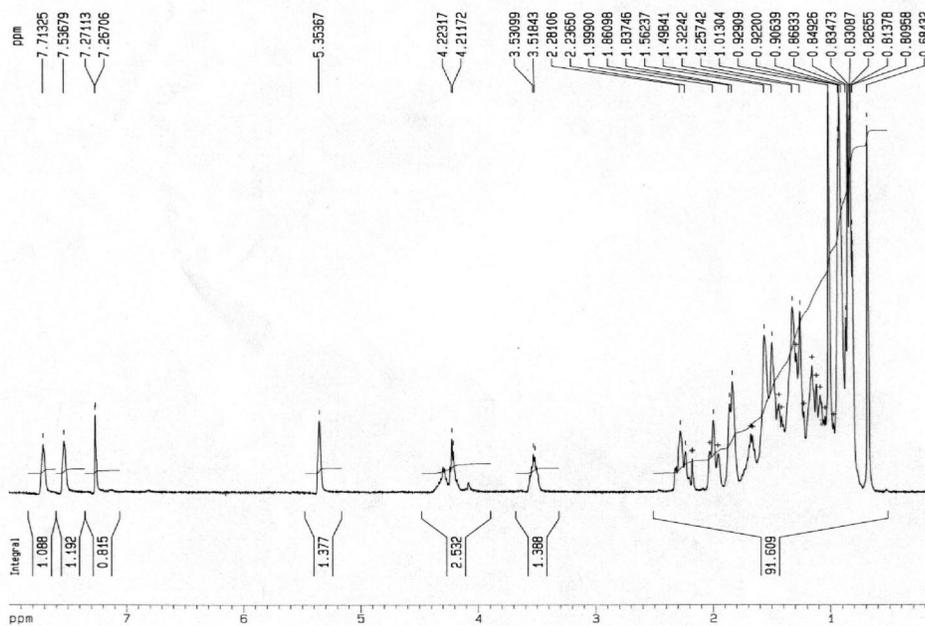
Spektra massa memperlihatkan adanya puncak-puncak pada m/z 881,6; 734,8; 461,2; 254,9; 200,7; dan 112,5; yang menggambarkan fragmen yang bisa terdeteksi dengan spektrometri massa, akan tetapi data-data tersebut kurang bisa memberikan informasi yang cukup untuk menentukan struktur senyawa hasil isolasi. Walaupun demikian pendekatan struktur senyawa dapat dilakukan dengan menganalisis spektra ^1H NMR dan NMR ^{13}C (Gambar 5).

Spektra ^1H NMR (Gambar 6) menunjukkan adanya 16 puncak resonansi, yaitu δ 0,68 ppm (s, 3H), 0,8 ppm (m, 12H), 0,9 ppm (t, 9H), 1,2 ppm (m, 6H), 1,3 ppm (d, 3H), 1,4 ppm (d, 10H), 1,6 ppm (d, 2H), 1,8 ppm (d, 4H), 1,9 ppm (m, 3H), 2,2 ppm (m, 3H), 3,5 ppm (d, 1H), 4,2 ppm (d, 2H), 5,3 ppm (s, 1H), 7,2 ppm (s, 1H), 7,5 ppm (s, 1H), dan 7,7 ppm (d, 1H).

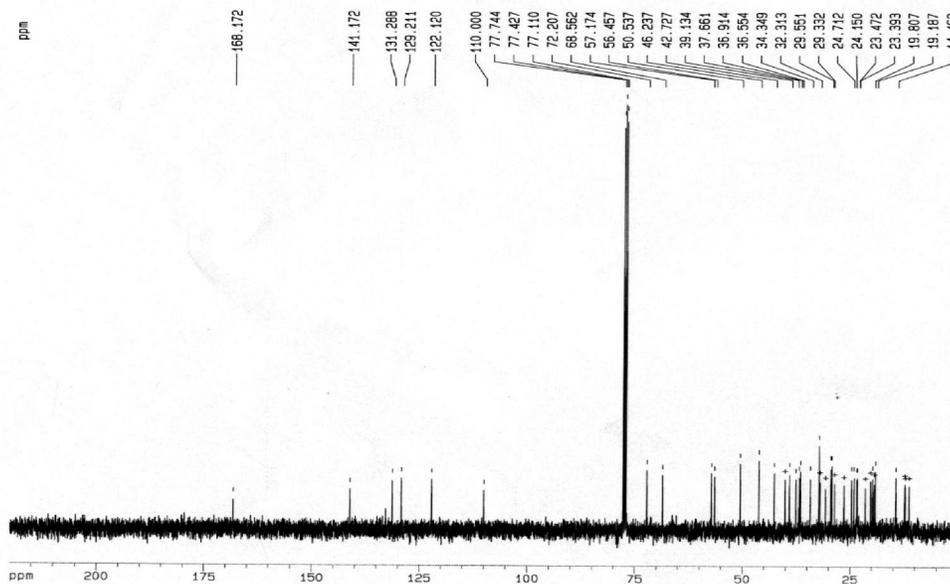
Dengan cara membandingkan integrasi tiap-tiap puncak dapat diperkirakan bahwa senyawa hasil isolasi mengandung atom H sebanyak 62 buah. Puncak-puncak resonansi pada δ 0,8 ppm (m, 12H) menunjukkan puncak resonansi proton gugus metil (-CH_3) yang terikat pada senyawa alifatik jenuh, sedangkan δ 1,6 ppm (d, 2H) menunjukkan puncak resonansi proton metil yang terikat pada ikatan rangkap dua karbon (-CH=CH-). Dari spektra ini juga dapat diketahui adanya gugus metin (-CH-) yang terikat pada gugus hidroksil (-OH), yaitu dengan adanya puncak resonansi pada δ 3,5 ppm (d, 1H). Pada δ 2,2 ppm (m, 3H) menunjukkan puncak resonansi proton metilen ($\text{-CH}_2\text{-}$) yang terikat pada gugus ester ($\text{-CH}_2\text{-COOR}$). Posisi β pada gugus karbonil ester diperkirakan adalah gugus metin (-CH-) dengan terlihat adanya puncak resonansi pada δ 1,9 ppm (m, 3H).



Gambar 5. Spektra massa senyawa aktif

Gambar 6. Spektra ^1H NMR senyawa aktif

Jumlah atom C pada senyawa hasil isolasi dapat diperkirakan dengan melihat spektra NMR ^{13}C (Gambar 7). Dari spektra tersebut diperkirakan senyawa hasil isolasi mengandung atom C sebanyak 39 buah. Puncak serapan yang terlihat pada δ 10 – 60 ppm merupakan puncak serapan atom karbon dari gugus $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}-$, dan $-\text{C}-$. Daerah δ 80-160 ppm merupakan daerah serapan untuk gugus alkena, dan dari spektra tersebut diperkirakan ada 6 atom C yang membentuk gugus alkena tersebut. Puncak serapan pada δ 168 ppm menunjukkan adanya gugus α,β *unsaturated ester*. Hal ini didukung juga oleh adanya puncak serapan pada spektra NMR H^1 dengan adanya puncak serapan pada δ 1,9 ppm.

Gambar 7. Spektra ^{13}C NMR senyawa aktif

Dengan melihat hasil analisis spektra di atas dapat diambil kesimpulan bahwa senyawa hasil isolasi di atas diperkirakan adalah sterol dengan kerangka stigmasteran dengan substitusi gugus hidrokarbon alifatik, hidroksil dan ester. Struktur secara pasti belum dapat diketahui karena masih diperlukan data spektra pendukung yang lebih lengkap lagi.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan bahwa kulit buah delima (*Punica granatum* L.) mengandung senyawa yang mempunyai aktivitas sebagai anti *C. albicans* dengan konsentrasi bunuh minimum 200 $\mu\text{g/ml}$, dan senyawa aktif tersebut diduga mempunyai struktur sterol kerangka stigmasteran dengan substitusi hidrokarbon alifatik, gugus hidroksil dan gugus ester.

DAFTAR PUSTAKA

- Alekperov, U. K., 2002, Plant antimutagens and their mixtures in inhibition of genotoxic effects of xenobiotics and aging processes, *Eur. J. Cancer Prev.*, Aug; 11, suppl. 2:S8-11
- Aliadi, A., Sudibyo, B., Hargono, D., Farouq, Sidik, Sutaryadi, Pramono, S., 1996, *Tanaman Obat Pilihan*, Yayasan Sidewayah, Jakarta
- Chidambara Murthy, K. N., Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P., 2002, Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo model, *J. Agric. Food Chem.* Aug 14;50(17):4791-5
- Duke, Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases, <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/farmacy-scroll13.pl/>, diakses Desember 2001
- Gharzouli K, Khennouf S, Amira S, Gharzouli A, 1999, Effects of aqueous extracts from *Quercus ilex* L. root bark, *P. granatum* L. fruit peel and *Artemisia herba-alba* Asso leaves on ethanol-induced gastric damage in rats. *Phytother Res*, Feb;13(1):42-5
- Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sanches, N. R., Cortez, D. A., Nakamura, C. V., Filho, B. P., 2002, Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, Oct; 97(7): 1027-31
- Jafri MA, Aslam M, Javed K, Singh S, 2000, Effect of *P. granatum* Linn. (flowers) on blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, Jun;70(3):309-14
- Kim, N. D., Mehta, R., Yu, W., Neeman, Livney, T., Amichay, A., Poirier, D., Nicholls, P., Kirby, A., Jiang, W., Mansel, R., Ramachandran, C., Rabi, T., Kaplan, B., Lansky, E., 2002, Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer, *Breast Cancer Res. Treat.*, Feb; 71(3):203-17

- Machado, T. B., Pinto, A. V., Pinto, M. C., Leal, I. C., Silva, M. G., Amaral, A. C., Kuster, R. M., Netto-dosSantos, K. R., 2003, In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Int. J. Antimicrob. Agents*, Mar.; 21(3): 279-84
- Noda, Y., Kaneyuki, T., Mori, A., Packer, L., 2002, Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin, *J. Agric. Food. Chem.*, Jan 2; 50(1):166-71
- Perez C, Anesini C, 1994, In vitro antibacterial activity of Argentine folk medicinal plants against *Salmonella typhi*, *J Ethnopharmacol*, Aug;44(1):41
- Satomi H, Umemura K, Ueno A, Hatano T, Okuda T, Noro T, 1993, Carbonic anhydrase inhibitors from the pericarps of *P. granatum* L., *Biol Pharm Bull*, Aug; 16(8):787-90
- Setyowati, E. P., 1998, Pemeriksaan Potensi Antijamur (*C. albicans*) Pada Beberapa Penyusun Jamu Keputihan yang Beredar di Pasaran, *Laporan Penelitian*, Lembaga Penelitian Universitas Gadjah Mada
- Silverstein, R. M., Bassler, G.C., Morrill, T. C., 1991, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, fifth edition, John Wiley and Sons Inc., New York
- Singh, R. P., Chidambara Murthy, K. N., Jayaprakasha, G. K., 2002, Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models, *J. Agric. Food. Chem.*, Jan. 2; 50(1):81-6
- Syamsuhidayat, S. S., Hutapea, J. R., 1991, Inventaris Tanaman Obat Indonesia, edisi I, Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Trinpathi dan Singh, 2000, Molluscicidal activity of *P. granatum* bark and *Canna indica* root, *Braz J Med Biol Res*, Nov; 33(11):1351-1355