

KERAGAMAN GENETIK BERDASARKAN MARKA RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA DARI *Punica granatum L.* DAN AKTIVITAS ANTIBAKTERINYA TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus* DAN *Pseudomonas aeruginosa*.

Rifdah Anggrini Zabir¹, Herlina Rante², Gemini Alam³, Siti Halimah Larekeng⁴

^{1,2,3} Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar

⁴ Fakultas Kehutanan, Universitas Hasanuddin, Makassar

Kata Kunci :

Daun Delima (*Punica granatum L.*), Antibakteri, RAPD, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRAK

Delima (*Punica granatum L.*) merupakan salah satu tanaman yang digunakan sebagai obat. *P. granatum* mempunyai berbagai khasiat, salah satunya sebagai antibakteri. Adanya efek antibakteri pada *P. granatum* karena mengandung senyawa antibakteri seperti, fenolik, flavonoid, dan tannin. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak daun *P. granatum* var Album, *P. granatum* var Nana dan *P. granatum* var Saveh Black terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 serta mengetahui tingkat kekerabatan dan keragaman genetiknya. Ekstraksi yang digunakan yaitu metode maserasi menggunakan etil asetat, etanol 96, 70, dan 30%. Hasil menunjukkan ekstrak etanol 96% *P. granatum* dan ekstrak etanol 70% *P. granatum* memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri *S. aureus* dan bakteri *P. aeruginosa*, sementara ekstrak etil asetat *P. granatum* memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri *S. aureus* tetapi tidak memiliki memberikan aktivitas penghambatan terhadap bakteri *P. aeruginosa*, sedangkan ekstrak etanol 30% *P. granatum* daerah Gowa dan Kediri tidak memberikan aktivitas penghambatan terhadap *S. aureus* dan *P. aeruginosa*. Analisis RAPD dan dendrogram menunjukkan bahwa hubungan kekerabatan antara dua kelompok *P. granatum* berkisar 0,65-0,72. Hal ini menunjukkan bahwa keragaman genetik antara ketiga varietas *P. granatum* dengan empat daerah yang berbeda cukup rendah meskipun memiliki fenotip yang berbeda.

PENDAHULUAN

Tanaman delima (*Punica granatum L.*) merupakan salah satu tanaman herbal yang telah lama dimanfaatkan sebagai pengobatan dan pencegahan berbagai penyakit, diantaranya untuk terapi pencegahan kanker, penyakit kardiovaskuler, penyakit gigi dan mulut, penyakit infeksi dan proteksi terhadap radiasi ultraviolet (1). Delima adalah tanaman buah-buahan yang dapat tumbuh hingga 5-8 m. Tanaman ini diperkirakan berasal dari Iran, namun telah lama dikembangkan di daerah Mediterania. Tanaman ini juga banyak ditanam di daerah Cina Selatan dan Asia Tenggara (2). *P. granatum* dimanfaatkan buahnya untuk dikonsumsi dan beberapa bagian dari tanaman delima dimanfaatkan sebagai obat berbagai penyakit salah satunya sebagai antibakteri (3).

Penelitian tentang efektifitas *P. granatum* sebagai antibakteri telah banyak dilakukan. Penelitian yang dilakukan oleh Yazer et al (2018) menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah dan biji *P. granatum* mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif *S. aureus* dan bakteri Gram negative *P. aeruginosa* (4). Ekstrak metanol kulit *P. granatum* juga terbukti efektifitasnya dalam membunuh dan mengeliminasi pertumbuhan bakteri *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Escherichia coli* dan *Yersinia enterocolitica* (5). Efek antibakteri *P. granatum* disebabkan karena terdapatnya komponen bioaktif dalam ekstrak delima (6). *P. granatum* mengandung zat-zat aktif seperti asam fenolik, flavonoid, dan tannin yang berpotensi sebagai antibakteri (7). Menurut penelitian Amine dan Mohamed (2020)

menyatakan bahwa rutin, luteolin, asam galat, asam ellagic pada ekstrak daun *P. granatum* dapat menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* (8).

P. granatum yang tersebar di Indonesia terdiri dari 3 varietas, yakni *P. granatum* var Album, *P. granatum* var Nana dan *P. granatum* var Saveh Black. Ketiga *P. granatum* var Album, *P. granatum* var Nana dan *P. granatum* var Saveh Black. Ketiga *P. granatum* ini memiliki variasi genetik yang berbeda, dan dilihat dari morfologi buahnya yang beda. Penurunan produksi dan mutu *P. granatum* salah satunya bisa disebabkan karena sedikitnya ketersediaan bibit delima unggul. Bibit delima unggul didapatkan melalui pemuliaan tanaman yang ditentukan oleh tersedianya keragaman genetik yang luas. Keragaman genetik dari delima ini dilihat dengan penanda molekuler. Menurut Setiyo (2001) dan Ribaut (2002) menjelaskan bahwa penanda molekuler merupakan teknik yang efektif dalam analisis genetik dan telah diaplikasikan secara luas dalam program pemuliaan tanaman (9).

Ada beberapa metode untuk mengetahui keragaman genetik dengan penanda molekuler. Penanda molekuler ini salah satunya adalah RAPD. Penggunaan marka RAPD mudah dilakukan, cepat, hanya memerlukan sedikit DNA sebagai cetakan dan tanpa memerlukan informasi awal genom target (10). Marka RAPD merupakan metode yang tepat untuk mengidentifikasi sejumlah besar polimorfisme DNA pada genom dengan cepat dan efisien. Tipe polimorfisme ini membuat RAPD tepat untuk studi keanekaragaman genetik,

Masuk 17-01-2022

Revisi 06-06-2022

Diterima 03-07-2022

DOI: 10.20956/mff.v26i2.19678

Korespondensi

Herlina Rante

herlinarante@unhas.ac.id

Copyright

© 2022 Majalah Farmasi

Farmakologi Fakultas Farmasi -
Makassar

Diterbitkan tanggal

30 Agustus 2022

Dapat Diakses Daring Pada:

<http://journal.unhas.ac.id/index.php/mff>



hubungan kekerabatan, peta genetic, dan sidik jari DNA. Metode RAPD menggunakan oligonukleotida pendek (10 bp) sebagai primer yang akan berikatan dengan bagian (sites) komplemennya. Kelemahan RAPD dalam konsistensi produk dapat diatasi dengan mengoptimalkan ekstraksi, dan kondisi PCR serta pemilihan primer yang tepat. (11).

Berdasarkan latarbelakang diatas maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak *P. granatum* var Album, *P. granatum* var Nana dan *P. granatum* var Saveh Black terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 serta mengetahui tingkat kekerabatan dan keragaman genetiknya.

METODE PENELITIAN

Sampel yang digunakan adalah daun *P. granatum* dari tiga varietas dengan empat daerah yang berbeda yaitu *P. granatum* var Album dari Kabupaten Soppeng (Sulawesi Selatan), *P. granatum* var Nana dari Kabupaten Polewali (Sulawesi Barat), *P. granatum* var Album dan *P. granatum* var Nana dari Kabupaten Gowa (Sulawesi Selatan) serta *P. granatum* var Album, *P. granatum* var Nana dan *P. granatum* var Saveh Black dari Kabupaten Kediri (Jawa Timur).

1. Ekstraksi Sampel

Daun delima 10 gr diekstraksi dalam pelarut nonpolar dan polar (etil asetat, etanol 96%, etanol 70%, etanol 30%). Ekstraksi dilakukan selama 3 x 24 jam. Filtrat yang diperoleh dari proses maserasi disaring dan dipekatkan dengan Rotary evaporator pada suhu 60oC. Ekstrak yang diperoleh digunakan untuk proses selanjutnya.

2. Uji Aktivitas Antibakteri

Aktivitas antibakteri ekstrak *P. granatum* ditentukan terhadap bakteri Gram positif (*S. aureus*) dan bakteri Gram negative (*P. aeruginosa*). Ekstrak diuji terhadap bakteri strain yang diperoleh dari American Type Culture Collection (*S. aureus* ATCC 25923 dan *P. aeruginosa* ATCC 9027). Metode yang digunakan adalah metode Disk difusi. Metode Disc Diffusion Kirby-Bauer dilakukan sesuai dengan metode yang telah dilaporkan oleh National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Disk steril dengan diameter 5 mm ditetesi masing-masing ekstrak *P. granatum* kemudian dikeringkan. Setiap disk berisi 20 µg ekstrak pada konsentrasi 1% (10 mg/disc). Disk kosong yang telah ditetesi DMSO 10% digunakan sebagai control negative dan disk yang mengandung kloramfenikol 30 µg digunakan sebagai control positif. Disk ditempatkan pada MHA yang diinokulasikan dengan bakteri uji (108 CFU/mL). Setelah diinkubasi selama 24 jam, diameter zona hambat diukur dalam skala millimeter.

3. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

3.1 Ekstraksi dan Isolasi DNA *P. granatum*

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan Genomic DNA Mini Kit (Geneaid) yang telah dimodifikasi dari Vogelstein and Gillespie (1979).

3.2 Optimasi kondisi PCR dan Amplifikasi DNA

Optimasi kondisi PCR dilakukan untuk mendapatkan kondisi PCR yang optimal. Beberapa variabel seperti konsentrasi primer (5, 10, 25 fTmol), konsentrasi DNA template, dan suhu annealing yang digunakan untuk PCR dipelajari dan dicoba untuk mendapatkan produk PCR yang optimal. Amplifikasi program RAPD menggunakan 15 primer yang diseleksi dari secara acak dipilih yang sering digunakan menghasilkan pita-pita, yaitu OPG-06, OPAD-11, OPA-05, OPG-19, OPAE-11, OPK-20, OPA-02, OPAA-20, OPAC-12, OPD-20. Primer yang terpilih

dan menghasilkan pita dengan intensitas tegas dan banyak yaitu OPD-20, OPAC-12 dan OPA-02. Reaksi PCR dilakukan pada volume total 15 ml yang berisi 0.2 nM dNTPs; IX bufer reaksi; 2mM MgCl₂; 25 ng DNA sample; 1 pmole primer tunggal; dan 1 Unit Taq DNA polymerase (Promega) dengan menggunakan Thermocycler (Takara) selama 45 siklus. Pemanasan pertama pada suhu 94°C selama 5 menit, kemudian diikuti oleh 45 siklus yang terdiri atas denaturasi 1 menit pada suhu 94°C, annealing 1 menit pada suhu 36°C, dan 2 menit ekstensi pada suhu 72°C. Setelah 45 siklus selesai, kemudian diikuti 4 menit proses ekstensi fragmen DNA pada suhu 72°C. Hasil amplifikasi PCR divisualisasi pada gel Agarose 3,6 g dalam buffer TAE secara elektroforesis selama 60 menit pada tegangan 120 volt. Kemudian direndam dalam larutan ethidium bromida dengan konsentrasi akhir 1ml/100 ml selama 10 menit. Hasil pemisahan fragmen DNA dideteksi dengan menggunakan UV transiluminator Geldoc untuk didokumentasikan. Sebagai standar ukuran DNA digunakan 100 bp DNA ladder (Promega) untuk menetapkan ukuran pita hasil amplifikasi DNA.

3.3 Analisis RAPD

Karena RAPD merupakan marka yang dominan, maka setiap pita RAPD dianggap sebagai satu lokus putatif bialel (single biallelic locus). Hanya lokus yang menunjukkan pita yang jelas yang digunakan untuk skoring, (1) dan kosong (0) (12). Matriks binari fenotipe RAPD ini kemudian disusun untuk digunakan pada analisis kluster dengan menggunakan UPGMA program NTSYS-pc versi 1.80. Nilai kesamaan genetika diambil dari Simple Matching Coefficient, sedangkan nilai ketidaksamaan genetic merupakan pengurangan nilai dalam matrik kemiripan oleh nilai 1, Matrik jarak genetic antar populasi dihitung berdasarkan Saito and Nei (1987) menggunakan perangkat lunak Darwin 6.5.

$$Q(i,j) = d(i,j) - \left(\sum_k [d(i,k) + d(j,k)] \right) / (n - 2)$$

i, j : element

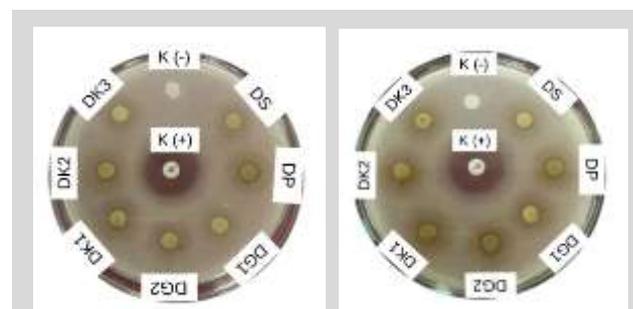
d (i,j) : dissimilarity dari i dan j

n-2 element lain dari k

HASIL DAN PEMBAHASAN

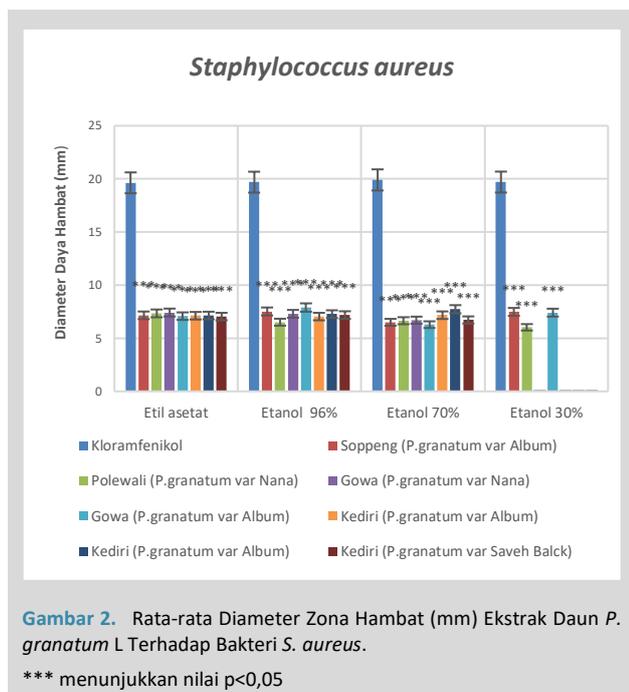
1. Uji Aktivitas Antibakteri

Perkembangan resistensi obat pada manusia terhadap antibiotik yang umum digunakan memerlukan pencarian antibakteri baru yang sebagian besar berasal dari tumbuhan. Hasil pengukuran zona hambat ekstrak daun *P. granatum* terhadap bakteri *S. aureus* dan bakteri *P. aeruginosa* dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2.



Gambar 1. Uji Daya Hambat Ekstrak Daun *P. granatum* L Terhadap Bakteri (A) *Staphylococcus aureus* (B) *Staphylococcus aeruginosa*

Keterangan : DS = *P. granatum* var Album (Soppeng)
DP = *P. granatum* var Nana (Polewali)
DG1 = *P. granatum* var Nana (Gowa)
DG2 = *P. granatum* var Album (Gowa)
DK1 = *P. granatum* var Album (Kediri)
DK2 = *P. granatum* var Nana (Kediri)
DK3 = *P. granatum* var Saveh Black (Kediri)



Ekstrak etanol 96% dan ekstrak etanol 70% daun *P. granatum* var Album yang berasal dari daerah Soppeng, *P. granatum* var Nana yang berasal dari daerah Polewali, *P. granatum* var Album dan *P. granatum* var Nana yang berasal dari daerah Gowa serta *P. granatum* var Album, *P. granatum* var Nana dan *P. granatum* var Saveh Black yang berasal dari daerah Kediri memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri *S. aureus* dan *P. aeruginosa*. Hal ini sejalan dengan studi yang dilakukan oleh Amine et al (2020) yang mengatakan bahwa ekstrak etanol daun *P. granatum* memberikan aktivitas penghambatan terhadap *S. aureus* (Gram positif) yang resisten terhadap penicillin dan *E. coli* (Gram negative) yang resisten terhadap amoksisilin (8). Menurut Jahir dan Sonali (2011) Ekstrak etanol dan methanol kulit buah delima memiliki aktivitas antibakteri terhadap strain bakteri *E. coli*, *P. aeruginosa*, dan *S. aureus* (13). Braga et al menunjukkan bahwa ekstrak buah delima menghambat atau menunda pertumbuhan *S. aureus* pada konsentrasi 0,01 hingga 1% v/v (14).

Pada ekstrak etanol 30% daun *P. granatum* hanya tiga dari tujuh ekstrak yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* yaitu ekstrak etanol 30% daun *P. granatum* var Album dari daerah Soppeng, *P. granatum* var Nana dari daerah Polewali dan *P. granatum* var Album dari daerah Gowa. Sementara itu hanya dua dari tujuh ekstrak etanol 30% daun *P. granatum* yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *P. aeruginosa* yaitu ekstrak etanol 30% daun *P. granatum* var Album dari daerah Soppeng, *P. granatum* var Nana dari daerah Polewali.

Jika dibandingkan dengan ekstrak etanol 96% daun *P. granatum* dan ekstrak etanol 70% daun *P. granatum* kemampuan ekstrak etanol 30% daun *P. granatum* lebih kecil, hal tersebut dapat disebabkan karena tingkat kepolaran dari ekstrak etanol 30% yang lebih tinggi dibandingkan dengan yang lainnya, sebagaimana penelitian yang dilakukan oleh Falah (2015) bahwa golongan senyawa dari ekstrak yang dimediasi dengan ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% lebih besar dibandingkan dengan ekstrak etanol 30% (15), karena sedikitnya jumlah senyawa yang kemungkinan dapat ditarik dari ekstrak etanol 30% sehingga kemampuannya

sebagai antibakteri juga lebih sedikit dibandingkan dengan ekstrak etanol 96% dan ekstrak etanol 70%.

Berdasarkan Anova menunjukkan bahwa daya hambat pada masing-masing sampel terdapat perbedaan signifikan 0,0001 ($P < 0,05$). Uji post hoc menggunakan metode tukey's test diantara tigapuluh lima sampel. Hasil terlihat bahwa perbedaan larutan penyari mempengaruhi penghambatan bakteri semakin rendah tingkat kepolaran semakin besar daya hambat suatu sampel.

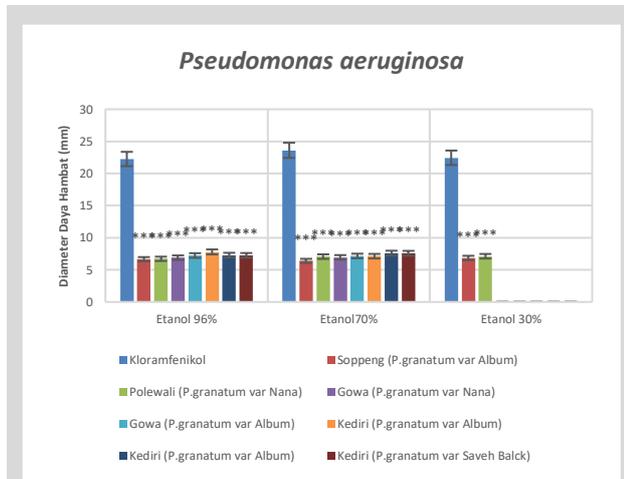
Adanya perbedaan aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat daun *P. granatum* terhadap kedua bakteri *S. aureus* dan bakteri *P. aeruginosa* disebabkan oleh perbedaan kepekaan dari masing-masing bakteri terhadap zat antimikroba karena mempunyai struktur dan komposisi sel yang berbeda (16). Struktur dinding sel bakteri Gram positif *S. aureus* relatif lebih sederhana sehingga memudahkan senyawa anti- bakteri masuk ke dalam sel dan menemukan sasaran untuk bekerja, sedangkan sel bakteri Gram negatif *P. aeruginosa* mempunyai struktur yang berlapis-lapis serta kandungan lemak yang relatif lebih tinggi (11-12%), sehingga lebih tahan terhadap perubahan lingkungan yang disebabkan oleh bahan kimia (17). Hal ini yang diduga mengakibatkan dinding sel bakteri Gram positif mudah rusak oleh senyawa antibakteri dari ekstrak daun delima daripada bakteri Gram negatif. *S. aureus* sebagai bakteri gram positif memiliki 3 lapisan yaitu selaput sitoplasma, lapisan peptidoglikan yang tebal (18) Sementara struktur dinding sel bakteri gram negatif lebih kompleks, berlapis tiga, yaitu lapisan luar lipoprotein, lapisan tengah liposakarida yang berperan sebagai penghalang masuknya bahan bioaktif antibakteri, dan lapisan dalam berupa petidoglikan dengan kandungan lipid tinggi (19).

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan bahwa ekstrak daun *P. granatum* memiliki kemampuan sebagai antibakteri terhadap *S. aureus* dan *P. aeruginosa*. Hal ini disebabkan adanya metabolit sekunder dalam daun *P. granatum* yang memiliki aktivitas antibakteri yang bekerja secara sinergis seperti asam fenolik, flavonoid, flavonoid estrogenik, flavon, tannin (20), (21), ellagitannins, asam punctic, anthocyanins (22). Beberapa senyawa ini telah ditemukan memiliki aktivitas antibakteri. Ellagitannin yang kaya akan tannin dan asam fenolik pada delima mungkin memiliki aktivitas antibakteri (23), (24), (25). Diperkirakan senyawa fenolik, terutama asam galat merupakan senyawa yang paling aktif terhadap bakteri (26). Masing-masing zat aktif tersebut memiliki mekanisme berbeda sebagai antibakteri. Mekanisme kerja flavonoid sebagai senyawa antibakteri dibagi menjadi tiga, yaitu menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel, serta menghambat metabolisme energi (8). Tannin memiliki aktifitas antibakteri dengan mengikat makromolekul sehingga tidak tersedia sumber energi bagi bakteri (27). Tannin juga menghambat enzim reverse transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri akan mati (28). Golongan fenol mampu merusak membrane sel, menginaktifkan enzim dan mendenaturasi protein sehingga dinding sel mengalami kerusakan karena penurunan permeabilitas. Perubahan permeabilitas membran sitoplasma memungkinkan terganggunya transportasi ion-ion organik yang penting ke dalam sel sehingga berakibat terhambatnya pertumbuhan bahkan hingga kematian sel (29). Dalam konsentrasi tinggi, kandungan fenol menembus dan mengganggu dinding sel bakteri dan mempresipitasi protein dalam sel bakteri. Dalam konsentrasi yang lebih rendah, fenol menginaktifkan sistem enzim penting dalam sel bakteri (30).

2. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

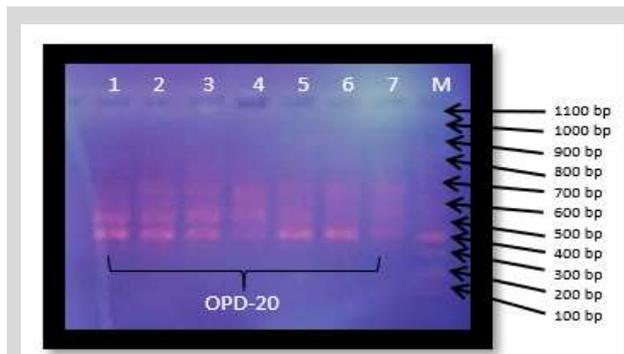
2.2 Seleksi Primer dan Suhu Annealing

Skrining primer RAPD dari 15 primer RAPD dipilih tiga primer yang mampu menghasilkan pita polymorphic yaitu OPD-20, OPAC-12, dan OPA-02. Primer yang dipilih dapat dilihat pada Gambar 3, 4, dan 5.

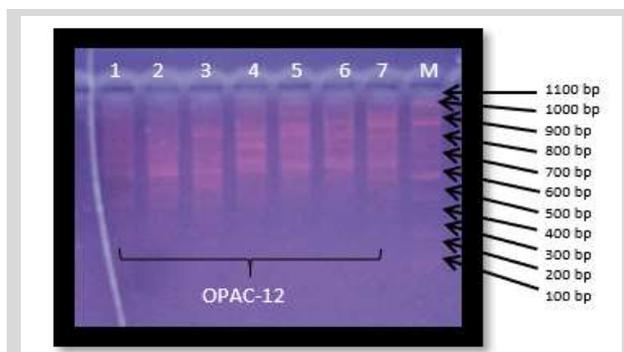


Gambar 3. Rata-rata Diameter Zona Hambat (mm) Ekstrak Daun *P. granatum L.* Terhadap Bakteri *P. aeruginosa*.

*** menunjukkan nilai $p < 0,05$.



Gambar 4. Elektroforegram hasil amplifikasi DNA dengan primer OPD-20. Baris 1 (Soppeng, *P. granatum* var Album), 2 (Polewali, *P. granatum* var Nana), 3 (Gowa, *P. granatum* var Nana), 4 (Gowa, *P. granatum* var Album), 5 (Kediri, *P. granatum* var Album), 6 (Kediri, *P. granatum* var Nana), 7 (Kediri, *P. granatum* var Saveh Black).



Gambar 5. Elektroforegram hasil amplifikasi DNA dengan primer OPD-20. Baris 1 (Soppeng, *P. granatum* var Album), 2 (Polewali, *P. granatum* var Nana), 3 (Gowa, *P. granatum* var Nana), 4 (Gowa, *P. granatum* var Album), 5 (Kediri, *P. granatum* var Album), 6 (Kediri, *P. granatum* var Nana), 7 (Kediri, *P. granatum* var Saveh Black).

Tiga suhu annealing yang digunakan untuk DNA sampel *P. granatum* adalah OPD-20, OPAC-12, dan OPA-02. OPA-02 memiliki suhu tertinggi, sedangkan OPAC-12 memiliki suhu

terendah. Secara keseluruhan, suhu annealing OPD-20, OPAC-12, dan OPA-02 secara berturut-turut adalah 43,60C, 43,10C, dan 44,40C. Dapat dilihat bahwa suhu rata-rata primer polymorphic telah mencapai 40,00C atau lebih (Tabel 1).

Tabel 1. Polymorphic primer dan suhu annealing

Primer	Suhu Annealing (oC)
OPD-20	43,6
OPAC-12	43,1
OPA-02	44,4

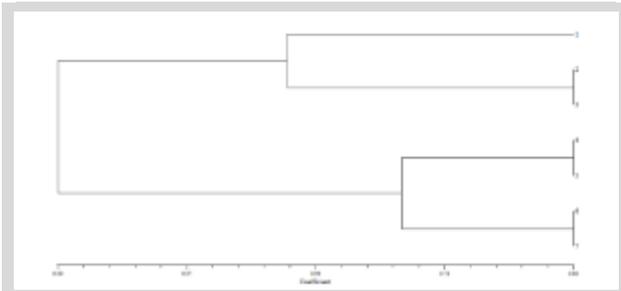
Skrining primer dilakukan untuk menentukan suhu annealing yang tepat dan memilih primer polymorphic. Hal ini dilakukan dengan membuat beberapa reaksi amplifikasi PCR menggunakan primer berbeda dan DNA sampel yang berbeda dibawah kondisi yang sama (31). Dengan demikian setiap primer menghasilkan kondisi optimum dan tingkat variasi yang berbeda dari pita yang diperoleh (32). Keberhasilan amplifikasi DNA genom menggunakan Teknik RAPD ditentukan oleh urutan primer, kuantitas primer yang terkandung dalam PCR, kesesuaian kondisi PCR, termasuk annealing suhu primer dan pemanjangan DNA (33). Jumlah primer yang dihasilkan polymorphic, jelas, dan pita terang adalah tiga dari 15 primer RAPD terdiri dari OPD-20, OPAC-12, dan OPA-02.

Keanekaragaman genetic adalah hubungan yang identic dari suatu populasi tanaman. Populasi yang memiliki keragaman genetic yang tinggi akan meningkatkan jumlah adaptasi populasi. Jumlah total pita yang dihasilkan oleh ketiga primer RAPD adalah 50 pita polymorphic. OPD-20 menghasilkan pita amplifikasi tertinggi (20 pita polymorphic), OPAC-12 menghasilkan 17 pita polymorphic, sedangkan pita yang paling sedikit yaitu primer OPA-02 (13 pita).



Gambar 6. Elektroforegram hasil amplifikasi DNA dengan primer OPA-02. Baris 1 (Soppeng, *P. granatum* var Album), 2 (Polewali, *P. granatum* var Nana), 3 (Gowa, *P. granatum* var Nana), 4 (Gowa, *P. granatum* var Album), 5 (Kediri, *P. granatum* var Album), 6 (Kediri, *P. granatum* var Nana), 7 (Kediri, *P. granatum* var Saveh Black).

Hasil analisis sebagaimana yang ditampilkan dalam bentuk dendogram pada Gambar 6. Berdasarkan dendogram dapat dilihat bahwa terdapat 2 kelompok utama *P. granatum* sejalan dengan jenis varietas yang sama, pada koefisien lebih dari 0,50. Kelompok pertama yaitu sampel 1 (*P. granatum* var Album dari daerah Soppeng), sampel 2 (*P. granatum* var Nana daerah Polewali) dan sampel 3 (*P. granatum* var Nana daerah Gowa), dengan tingkat kemiripan 0,65, sedangkan Kelompok kedua yaitu sampel 4 (*P. granatum* var Album dari daerah Gowa), sampel 5 (*P. granatum* var Album dari daerah Kediri), sampel 6 *P. granatum* var Nana daerah Kediri), dan sampel 7 (*P. granatum* var Saveh Black daerah Kediri) dengan tingkat kemiripan 0,72. Hal ini menunjukkan bahwa keragaman genetic antara tiga varietas *P. granatum* dengan empat daerah berbeda cukup rendah. Menurut Olivier et al (1995) nilai hubungan kekerabatan berkisar antara 0-1,0 dan hubungan kekerabatan dekat apabila nilai kekerabatan mendekati 1 (34).



Gambar 7. Dendrogram kekerabatan genetik *P. granatum* pada empat daerah berbeda dengan tiga varietas yang berbeda, 1 (Soppeng, *P. granatum* var Album), 2 (Polewali, *P. granatum* var Nana), 3 (Gowa, *P. granatum* var Nana), 4 (Gowa, *P. granatum* var Album), 5 (Kediri, *P. granatum* var Album), 6 (Kediri, *P. granatum* var Nana), 7 (Kediri, *P. granatum* var Saveh Black).

Hal ini menunjukkan bahwa individu *P. granatum* di tiga varietas dengan empat daerah yang berbeda sebagian besar mengelompok berdasarkan varietasnya, dengan demikian hubungan kekerabatan tergolong cukup tinggi. Semakin tinggi tingkat kemiripan maka semakin rendah keragaman genetik dalam suatu populasi. Dengan demikian *P. granatum* yang ada di Indonesia juga mempunyai keragaman genetik yang cukup kecil.

Tabel 2. Hasil perhitungan jarak genetik delima (*Punica granatum* L.).

Units	1	2	3	4	5	6	7
1	0.00						
2	0.20						
3	0.33	0.13					
4	0.26	0.33	0.27				
5	0.33	0.40	0.33	0.16			
6	0.47	0.53	0.44	0.25	0.33		
7	0.56	0.50	0.33	0.26	0.22	0.20	0.00

Ket: Individu 1 (Soppeng, *P. granatum* var Album), 2 (Polewali, *P. granatum* var Nana), 3 (Gowa, *P. granatum* var Nana), 4 (Gowa, *P. granatum* var Album), 5 (Kediri, *P. granatum* var Album), 6 (Kediri, *P. granatum* var Nana), 7 (Kediri, *P. granatum* var Saveh Black).

Nilai jarak genetik (Tabel 2) berkisar dari 0,13 hingga 0,56 dengan jarak tertinggi terdapat antara sampel 1 (Soppeng, *P. granatum* var Album), dan 7 (Kediri, *P. granatum* var Saveh Black) sehingga hubungan kekerabatan yang dekat antar sampel *P. granatum* berdasarkan varietas yang sama meskipun berasal dari daerah berbeda, sementara itu, jarak genetik terendah antara sampel 2 (Polewali, *P. granatum* var Nana) dan 3 (Gowa, *P. granatum* var Nana) yang menunjukkan baw hubungan kekerabatan genetik yang jauh disebabkan varietas yang berbeda dan berasal dari daerah yang berbeda. Menurut Nei dan Li (1979), jarak genetik yang besar menandakan bahwa hubungan kekerabatan genetik antar individu cukup jauh. Sebaliknya, jarak genetik yang kecil menandakan hubungan kekerabatan genetik yang dekat (35). Berdasarkan jarak genetik menunjukkan adanya variasi antar individu dalam populasi yang dapat disebabkan karena adanya percampuran genetik dari satu pohon induk dengan pohon induk di sekitarnya sebagai akibat dari perkawinan silang. Semakin rendah jarak genetik, semakin rendah keragaman genetik antara individu atau semakin dekat hubungan kekerabatan antara individu. Kedekatan hubungan kekerabatan antarpopulasi dapat disebabkan oleh adanya asal-usul leluhur yang sama (36)

DAFTAR PUSTAKA

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan ekstrak etanol 96% *P. granatum* dan ekstrak etanol 70% *P. granatum* memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri *S. aureus* dan bakteri *P. aeruginosa*, sementara ekstrak etil asetat *P. granatum* memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri *S. aureus* tetapi tidak memiliki memberikan aktivitas penghambatan terhadap bakteri *P. aeruginosa*, sedangkan ekstrak etanol 30% *P. granatum* daerah Gowa dan Kediri tidak memberikan aktivitas penghambatan terhadap *S. aureus* dan *P. aeruginosa*. Analisis RAPD dan dendrogram menunjukkan bahwa hubungan kekerabatan antara dua kelompok *P. granatum* berkisar 0,65-0,72. Hal ini menunjukkan bahwa keragaman genetik antara ketiga varietas *P. granatum* dengan empat daerah yang berbeda cukup rendah meskipun memiliki fenotip yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Jurenka, Julie. 2008. Therapeutic Application of Pomegranate (*Punica granatum* L.): A Review. *Alternative Medicine Review*, Vol. 13 (2), pp. 128-144.
- Hardana H. Efrida W. 2015. Ekstrak Buah Delima Sebagai Antibiotik Pengobatan Infeksi MRSA. *Majority*. Vol 4 (9), pp. 83-87.
- Ravinder K., Sonia K., Poonam S. 2018. Antimicrobial and antioxidant potential of pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel. *International Journal of Chemical Studies*. Vol 6 (5), pp. 3441-3449.
- Yaser N., Reza G., Reza M., Majid F. 2018. Antibacterial Activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed and Peel Alcoholic Extracts on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Health Centers. *J Appl Biotechnol Rep*. Vol 5 (1), pp. 32-36.
- Al-Zoreky NS. 2009. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *Int J Food Microbiol*. Vol 134 (3), pp. 244-248.
- Dahham SS, Ali MN, Tabassum H, Khan M. 2010. Studies on antibacterial and antifungal activity of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Am Eurasian J Agric Environ Sci*. Vol. 9 (3), pp. 273-281.
- Dahanukar S A., Kulkarni R A., Rege N N. 2000. Pharmacology of medicinal plants and natural products. *Indian journal of pharmacology*. 32(4), pp. 81-118.
- Amine A., Mohamed A., Aimen A. 2020. Phytochemical Study and Antibacterial and Antibiotic Modulation Activity of *Punica granatum* (Pomegranate) Leaves. *Scientifica*. DOI: 10.1155/2020/8271203.
- Ercisli S, Gadze J, Agar G, Yildirim N, Hizarci Y. 2011. Genetic relationships among wild pomegranate (*Punica granatum*) genotypes from Coruh Valley in Turkey. *Genet Mol Res*. Vol 10 (1), pp. 459-464.
- Weising K., Nybom H., K Wolff, and W Meyer. 1995. DNA Fingerprinting in Plants and Fungi. Boca Rato: CRC Press.
- Anggereini E, 2008. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Suatu Metode Analisis DNA dalam Menjelaskan Berbagai Fenomena Biologi. *Biospecies*. Vol. 1 (2), pp. 73-76.
- Widyatmoko, A.Y.P.B.C., Lejo, E.S., Prasetyaningih, A & Rimbawanto, A. 2010. Keragaman Genetik Populasi *Araucaria cunninghamii* Menggunakan Penanda RAPD (Random Ampified Polymorphic DNA). *Jurnal Pemuliaan Tanaman*. Vol 4 (2), pp. 63-77.
- Jahir A and Sonali H. 2011. Antibacterial Properties of *Punica granatum* Peels. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. Vol. 2 (3), pp. 23-27.
- Braga LC, Shupp JW, Cummings C. 2005. Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *J Ethnopharmacol*. Vol. 96 (1-2), pp. 335-339.
- Falah S., Hasim., Ayunda R. D., Faridah D. N. 2015. Potential of Lemongrass extract (*Cymbopogon citratus*) as prevention for oil oxidation. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. Vol. 7 (10), pp. 55-60.
- Priya V, Mallika J, Surapaneni KM, Saraswathi P, Chandra SG. 2010. Antimicrobial activity of pericarp extract of *Garcinia mangostana* Linn. *International Journal of Pharma Sciences and Research*. Vol. 1 (8), pp. 278-281.
- Pelczar, Michael J., dan Chan, E. C. S., 1986, *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, Universitas Indonesia, UI-Press, Jakarta. 190-191.
- Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A., 2001, *Mikrobiologi Kedokteran*, Edisi XXII, diterjemahkan oleh Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, 205-209, Penerbit Salemba Medika, Jakarta.

19. Salni. Hanifa., We d y a , R., 2011, Isolasi Senyawa Antibakteri Dari Daun Jengkol (*Pithecolobium lobatum Benth*) dan Penentuan Nilai KHM-nya. *Jurnal Penelitian Sains*. Vol. 14 (1), pp. 14109.
20. Fateh MV, Ahmed S, Ali M, Bandyopadhyay S. 2013. A review on the medicinal importance of pomegranate. *J Pharm sci*. Vol. 3 (4), pp. 23-25.
21. Heber D, Schulman RN, Seeram NP. Pomegranates: ancient roots to modern medicine. CRC Press; 2006.
22. Satomi H., umemura K., Ueno A. 1993. Carbonic Anhydrase Inhibitors from The Pericarps of *Punica granatum L.* *Biol Pharm Bull*. Vol 16, pp. 787-790.
23. Reddy MK, Gupta SK, Jacob MR, Khan SI, Ferreira D. 2007. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum L.* *Planta Med*. Vol. 73 (5), pp. 461-467. doi:10.1055/s-2007-967167.
24. Voravuthikunchai SP, Sririrak T, Limsuwan S, Supawita T, Iida T, Honda T. 2005. Inhibitory effects of active compounds from *Punica granatum* pericarp on verocytotoxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *J Health Sci*. Vol. 51 (5), pp. 590-596. doi:10.1248/jhs.51.590
25. Prashanth D, Asha MK, Amit A. 2001. Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia*. Vol. 72 (2), pp. 171-173. doi:10.1016/S0367326X(00)00270-7.
26. Rachida B., Imene Y., sarah B. 2020. Phytochemical Analysis, Antibacterial and Antioxidant Activities of Pomegranate (*Punica granatum L.*) Peel extracts. *Int J Biosci*. Vol 16 (6), pp. 35-44.
27. Hossain T., Furhatun N., Assadujaman. 2021. A Review Study on The Pharmacological Effect And Mechanism O Action Of Tannins. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Reseach*. Vol 8 (8), pp. 5-10.
28. Noventi, W and N. Carolia. 2016. Potensi Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle L.*) sebagai alternatif *Acne vulgaris*. *Majority*. Vol 5 (1), pp. 140-145.
29. Volk WA. 1992. *Basic Microbiology* (7 ed). New York: Harper Collins Publisher.
30. Jawetz E, JJ Melnick & EA Adelberg. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran* Buku 1. Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga (Penterjemah). 2005. Jakarta: Salemba Medika.
31. Larekeng S. Selection of Dominant and Co-dominant Markers for Red Wood (*Pterocarpus indicus Willd*) Polymorphism from Five Provenances in East Nusa Tenggara. In: 1st International Conference on Science and Technology, ICOST. 2019.
32. Larekeng SH, Dermawan R, Iswoyo H, Mustari K. 2019. RAPD primer screening for amplification on Katokkon pepper from Toraja, South Sulawesi, Indonesia. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* ;270. 012-023.
33. Gunawan. Red Wood DNA Amplification (*Pterocarpus indicus Willd*) on some Provenances in East Nusa Tenggara. Hasanuddin University; 2019.
34. Olivier M., Meehl MA, Lust G. 1999. Random Amplified Polymorphic DNA Sequences as Markers for Canine Genetic Studies. *The journal of heredity*. Vol 90 (1).
35. Nei M, Li WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76:5269-5273. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>
36. Campbell, Reece & Mitchell L. 2008. *Biologi*. Edisi Kedelapan Jilid 1. Jakarta : Erlangga.

Sitasi artikel ini: Rahmawaty A, Cahyani FR, Safitri N, Sitepu AANC, Hapitria EN, Sandra. Keragaman Genetik berdasarkan Marka Random Amplified Polymorphic DNA dari *Punica granatum L.* dan Aktivitas Antibakterinya terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. *MFF 2022;26(2):63-68*