



ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER DARI EKSTRAK METANOL DAUN MARPUYAN (*Rhodamnia cinerea* Jack.)

Submitted : 11 Maret 2023

Edited : 23 Desember 2023

Accepted : 30 Desember 2023

Musyirna Rahmah Nst, Dwi Andreyas, Rahma Dona, Emrizal, Emma Susanti,
Ihsan Ikhtiarudin, Rahayu Utami

Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau
Email: musyirnarahmah@stifar-riau.ac.id

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang isolasi dan uji aktivitas antibakteri senyawa metabolit sekunder dari ekstrak metanol daun Marpuyan (*Rhodamnia cinerea* Jack.) terhadap *Escherichia coli*. Isolasi dilakukan dengan metode kromatografi kolom. Sedangkan uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar. Hasil isolasi menghasilkan senyawa murni dengan berat 17,9 mg, berbentuk kristal berwarna kuning muda, dengan titik leleh 170-172°C dan larut dalam metanol yang dikode senyawa RC-F13. Hasil identifikasi RC-F13 melalui pengujian dengan pereaksi $AlCl_3$, positif termasuk golongan flavonoid, diperkuat dengan hasil dari spektrum UV dan spektrum FT-IR. Berdasarkan hasil spektrum UV, terlihat bahwa senyawa isolat RC-F13 menunjukkan λ maks 353.60, 257.00 dan 209.20 nm. Spektrum FT-IR menunjukkan adanya beberapa gugus fungsi seperti OH, C-H alifatik, C=O karbonil, C=C aromatik dan C-O. Ekstrak fraksi metanol (20%; 10%; 1%; 0,1% dan 0,01%), fraksi 13 (1%; 0,1% dan 0,01%) dan senyawa isolat RC-F13 (0,1%), tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* yang ditandai dengan tidak adanya daerah bening di sekeliling cakram.

Kata kunci : *Rhodamnia cinerea* Jack, Isolasi dan Antibakteri

ABSTRACT

A study on isolation and antibacterial activity of secondary metabolites from the methanol extract of Marpuyan (Rhodamnia cinerea Jack.) Leaves on Escherichia coli has been carried out. Isolation was carried out by column chromatography methods. Whereas the antibacterial activity test was carried out using agar diffusion method. The results of the isolation produced 17.9 mg of RC-F13 isolate compound in the form of light yellow crystals, with a melting point of 170-172°C and soluble in methanol. The results of identification of RC- F13 isolate compounds through testing with $AlCl_3$ reagents, positive including the flavonoid group, were strengthened by the results of the UV spectrum and FT-IR spectrum. Based on the results of the UV spectrum, it was seen that the RC- F13 isolate compound showed λ max 353.60, 257.00 and 209.20 nm. The FT-IR spectrum shows the presence of several functional groups such as OH, C aliphatic C-H, C = O carbonyl, C = C aromatic and C-O. testing the antibacterial activity of methanol extract with a concentration of 20%; 10%; 1%; 0.1% and 0.01%, fraction 13 at 1% concentration; 0.1% and 0.01% and RC- F13 isolate compound concentration of 0.1%, against Escherichia coli bacteria did not show any antibacterial activity which was marked by the absence of clear areas around the disc.

Keywords: *Rhodamnia cinerea* Jack, Isolation and Antibacterial



PENDAHULUAN

Indonesia memiliki jumlah tanaman obat yang melimpah. Bagian daun, akar, buah, kayu dan umbi-umbian telah digunakan oleh masyarakat Indonesia dalam berbagai ramuan obat tradisional dan diyakini memberikan efek terhadap kesehatan.. Ramuan tradisional tersebut sering dikenal sebagai pengobatan herbal⁽¹⁾. Salah satu tumbuhan obat tradisional adalah Marpuyan.

Di Bangka Belitung, marpuyan (*Rhodamnia cinerea* Jack.) dikenal dengan nama daerah merepuyon. Tumbuhan ini digunakan sebagai obat batuk, diare, sariawan, serta mengobati luka⁽²⁾. Bagian daun dan kulit batang sering digunakan untuk pengobatan pasca melahirkan oleh orang-orang etnis Melayu tradisional di daerah perbatasan Riau-Jambi⁽³⁾. Secara empirik, air rebusan akar marpuyan digunakan untuk mengobati diare⁽⁴⁾.

Kandungan senyawa metabolit sekunder ekstrak metanol daun dan kulit batang marpuyan (*Rhodamnia cinerea* Jack.) adalah tanin, flavonoid dan glikosida⁽⁵⁾. Pada penelitian lain dilaporkan bahwa ekstrak aseton daun marpuyan diketahui memiliki aktivitas antibakteri. Ekstrak kasar aseton daun marpuyan terhadap empat bakteri yaitu (*Staphylococcus aureus*, *Enteropatogenik Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sp.*) menunjukkan zona bening pada tiap konsentrasi ekstraknya (70 mg/mL, 80 mg/mL dan 90 mg/mL). Aktivitas paling tinggi yaitu terhadap bakteri Gram positif *S. aureus* pada konsentrasi 80 mg/ml sebesar 21,957 mm. Ekstrak kasar daun marpuyan juga juga mampu menghambat bakteri Gram negatif *Shigella sp*, *Enteropatogenik Escherichia coli*, *P. aeruginosa* dengan diameter daerah hambat 5,520 mm, 7,210 mm dan 5,457 mm, namun ketiganya dikategorikan sedang⁽⁶⁾. Ekstrak baik *n*-heksana, etil asetat dan etanol memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dengan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) untuk ekstrak *n*-heksana (1%), etil asetat (0,1%) dan etanol (1%)⁽⁷⁾.

Tumbuhan marpuyan diketahui berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut pada pengobatan infeksi. Namun sejauh ini evaluasi sifat antibakteri tumbuhan marpuyan telah dilaporkan

masih tingkatan skrining, belum ada laporan yang melengkapi senyawa kimianya dan mengevaluasi sifat-sifat antimikrobanya. Oleh karena itu dalam penelitian ini akan dilakukan isolasi dan uji antibakteri senyawa metabolit sekunder daun marpuyan terhadap *Escherichia coli*. Diharapkan hasil yang didapatkan dari penelitian mengenai daun dapat memberikan informasi baru mengenai potensi bioaktivitas daun marpuyan sehingga dapat dikembangkan menjadi bahan obat baru.

METODE PENELITIAN

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah satu unit *rotary evaporator* (Buchi®), satu unit alat destilasi (Gopal®), alat-alat gelas laboratorium (seperti gelas beker, Erlenmeyer, gelas ukur, *chamber*, tabung reaksi dan corong), pipet tetes, vial, lumpang, plat KLT GF₂₅₄, kolom kromatografi (Pyrex®), aluminium foil, *plastic wrapping*, lampu spiritus, autoklaf (Gea®), botol gelap, desikator, cawan Petri, *hot plate*, incubator (*Binder*®), blender, jangka sorong, gunting, jarum Ose, kain kasa, kapas, kertas cakram, kertas perkamen, kertas saring, alat penentu titik leleh *Stuart Melting Point Apparatus* (SMP-11), *Laminar Air Flow* (JSCB-900SL®), oven (Memert®), vorteks (Ason®), pinset, pipet mikro (Nesco®), plat tetes, spatel, lampu UV 254 nm dan 366 nm (Camag®), timbangan analitik (Shimadzu® AUW-320), Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu® UV-1800), FT-IR (Shimadzu® IR Prestige-21), HPLC (Shimadzu® Lc Solution).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun marpuyan (*Rhodamnia cinerea* Jack.). Bahan yang digunakan adalah pelarut organik kualitas teknis dan telah didestilasi (*n*-heksana, etil asetat, metanol), silika gel 60, asam asetat anhidrat, Butanol, Aquadest, kloroform, kloroform amoniak 0,05N, logam magnesium, FeCl₃ 1%, AlCl₃, asam klorida pekat, asam sulfat 2N, NaCl fisiologis, *ciprofloxacin* 5 µL, norit, pereaksi Mayer, pereaksi *Lieberman-Burchard*, pereaksi *Dragendorff*, media *Nutrient Agar* (NA) dan bakteri *Escherichia coli*.

Uji Skrining Fitokimia Sampel Segar

5 g daun marpuyan (*Rhodamnia cinerea* Jack) dipotong sampai halus, lalu sampel ditambahkan 10 mL etanol ke dalam tabung reaksi dengan cara memanaskan di atas nyala api bunsen dengan pemanasan di atas nyala Bunsen. Untuk mendapatkan hasil yang lebih baik, ekstrak selanjutnya disaring dan ditambahkan 5 ml akuades dan kloroform (1:1), diaduk kuat dan dibiarkan beberapa saat sampai terpisah menjadi 2 lapisan, Bagian lapisan air digunakan untuk uji senyawa flavonoid, fenolik dan saponin. Sedangkan bagian lapisan kloroform digunakan untuk uji terpenoid dan steroid⁽⁸⁾. Untuk uji alkaloid memiliki prosedur tersendiri.

Ekstraksi Sampel dengan Metanol

Daun marpuyan yang sudah kering sebanyak 600 g dihaluskan dan ditimbang. Kemudian, daun tersebut direndam dalam pelarut *n*-heksana, etil asetat dan metanol selama 5 hari dengan tiga kali pengulangan di dalam botol gelap. Setelah itu, cairan tersebut disaring dan didapatkan ekstrak cair, kemudian, cairan ekstrak disaring menggunakan alat bernama rotary evaporator sampai menjadi ekstrak kental dan hasilnya adalah ekstrak kental metanol sebanyak 26, 62 g.

Pengujian Ekstrak Metanol dengan KLT

Kandungan senyawa metabolit sekunder dari ekstrak Metanol diidentifikasi dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Plat KLT diberikan batas atas dan bawah, masing-masing 0,5 cm dari atas dan bawah plat. Sampel ditotolkan pada plat KLT. Plat dimasukan kedalam bejana yang telah dijenuhkan dengan eluen *n*-heksana : etil asetat (5:5). Tunggu eluen sampai ke garis atas plat agar terjadi noda terpisah. Keluarkan plat dari bejana dan dibiarkan mengering. Hasil elusi diamati di bawah lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm.

Pemisahan dengan Kromatografi Kolom

Kolom diisi dengan silika gel 60 (70-230 mesh) sebanyak 100 gram. Pengisian kolom dilakukan dengan membuat bubur silika terlebih dahulu dengan pelarut *n*-heksan, lalu dimasukkan ke dalam kolom

dengan menggunakan corong, kemudian dielusi sampai kerapatan silika di dalam kolom maksimum. Ekstrak kental metanol sebanyak 10 gram dilakukan preadsorpsi dengan silika gel dan dimasukkan ke dalam kolom, jadi posisi serbuk ekstrak metanol daun marpuyan berada di atas bubur silika. Kemudian dielusi secara bergradien menggunakan kombinasi campuran pelarut *n*-heksana 100%, perbandingan *n*-heksana: etil asetat (90:10). Pemisahan dilakukan dengan bantuan gaya gravitasi. Hasil pemisahan ditampung dalam wadah vial dan diberi nomor. Hasil kolom diperoleh sebanyak 651 vial.

Pengujian Fraksi Hasil Kromatografi Kolom dengan KLT

Untuk memonitor fraksi hasil pemisahan dengan kromatografi kolom maka dilakukan uji KLT. Fraksi uji diambil dengan jarak 5 vial dari banyak nya vial 651. Fraksi diberi label, kemudian ditotolkan pada plat KLT sesuai dengan nomor fraksi masing-masing. Selanjutnya dielusi dengan eluen yang sesuai. Noda yang dihasilkan dilihat di bawah alat penampak noda lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm dan didapatkan sebanyak 13 fraksi gabungan dari vial 1- vial 651. Hasil pengujian pola KLT dari 13 fraksi tersebut, pada fraksi nomor 13 memperlihatkan satu pola noda yang bagus dan juga memperlihatkan pembentukan kristal di dasar vial. fraksi tersebut selanjutnya dilakukan pemurnian untuk memisahkan senyawa dari pengotor dengan teknik pencucian dan rekristalisasi.

Pemurnian dan Rekristalisasi Senyawa Isolat

Fraksi 13 kemudian dimurnikan dengan teknik pencucian dan rekristalisasi. Pertama, bagian tersebut dicuci dengan menambahkan pelarut yang dapat melarutkan pengotor tetapi tidak dapat melarutkan kristal, dalam hal ini digunakan pelarut *n*- heksana. Proses pencucian ini dapat diulang beberapa kali hingga diperoleh senyawa terisolasi yang dapat dipantau pada pelat KLT dibawah lampu UV λ 254 dan 366 nm. Untuk memperoleh kembali kristal setelah dicuci, langkah selanjutnya terdiri dari rekristalisasi bagain fraksi 13 yaitu dengan melarutkan kristal di dasar botol dengan pelarut yang

melarutkan sesedikit mungkin (metanol). Kemudian secara bertahap menambahkan pelarut yang sulit dilarutkan (etil asetat) lalu disaring dan dibiarkan menguap sehingga diperoleh senyawa hasil isolasi. Isolat murni yang dihasilkan diberi label RC-F13 (*Rhodamnia cinerea*-F13) dan diuji ulang dengan KLT dibawah lampu UV pada panjang gelombang λ 254 dan 366 nm.

Analisis Kemurnian dengan HPLC Identifikasi Senyawa Isolat

Sistem HPLC yang digunakan adalah fase terbalik (Reverse Phase), menggunakan sistem Shim-Pack VP-ODS (150x4,6 mm) dan metode yang digunakan adalah elusi gradien. Senyawa RC- F13 hasil isolasi selanjutnya dikarakterisasi meliputi pengujian sensorik, sifat fisik, sifat kimia dan analisis dengan Spektrofotometri Ultraviolet dan Visible (UV Vis) dan Spektrofotometri *Fourier Transform-Infra Red* (FT-IR)

Pengujian Aktivitas Antibakteri Seterilisasi alat dan bahan serta Persiapan Mikroba Uji

Tahapan awal sebelum dilakukan uji aktivitas antibakteri adalah melakukan sterilisasi alat (oven) dan media (autoklaf). Kemudian dilakukan peremajaan mikroba bakteri. Lalu pembuatan suspensi bakteri dengan cara sebanyak 3-4 goresan, kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi NaCl fisiologis, dilanjutkan dengan proses homogenisasi menggunakan vorteks. Kekasaran suspensi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis hingga diperoleh suspensi dengan transmittan \pm 25% pada panjang gelombang 580 nm untuk bakteri⁽⁸⁾

Penyiapan Konsentrasi Larutan Uji

Ekstrak metanol Daun Marpuyan (*Rhodamnia cinerea* Jack.) dibuat dalam konsentrasi 20% b/v dalam pelarut DMSO. Selanjutnya, didesain konsentrasi pengenceran sebanyak 10%, 1%, 0,1%, 0,01%. Disk ciprofloxacin 5 μ g digunakan sebagai kontrol positif. Untuk fraksi 13 didesain pada konsentrasi asal 1%, 0,1% serta 0,01%. Sedangkan RC- F13 dirancang di konsentrasi 0,1%.

Pengujian Aktivitas Antimikroba dengan Metode Difusi Cakram

300 μ L suspensi bakteri uji dimasukkan ke dalam cawan Petri lalu dimasukkan 15-20 mL medium *Nutrient Agar*, dan dihomogenkan. Kertas cakram steril ditetesi sebanyak 10 μ L larutan uji pada masing-masing konsentrasi yang telah diencerkan, kemudian dimasukkan ke dalam cawan Petri. Sebagai kontrol negatif digunakan DMSO sedangkan kontrol positif yang digunakan *paper disc* antibiotik *ciprofloxacin* 5 μ g/disk yang langsung dapat digunakan. Inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Kemudian amati adanya daerah bening dan diukur diameter daerah hambat pada tiap-tiap cawan Petri menggunakan jangka sorong. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali pada masing-masing konsentrasi.



Analisis Data

Teknik pengolahan data yang digunakan untuk isolasi senyawa yaitu analisis kemurnian dengan menampilkan hasil chromatogram HPLC dan menampilkan hasil spektrum dari UV-Vis, FT-IR. Uji aktivitas antibakteri yaitu dengan cara mengukur diameter daerah bening sekitar kertas cakram yang didapat dari variasi konsentrasi ekstrak metanol, fraksi 13 dan senyawa murni isolat RC-F13 menggunakan jangka sorong. Dihitung rata-rata zona hambat, \pm standar deviasi dan data disajikan dalam bentuk gambar dan tabel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan isolasi dan uji aktivitas antibakteri senyawa metabolit sekunder dari ekstrak metanol daun marpuyan (*Rhodamnia cinerea* Jack.) terhadap *Escherichia coli*. Penelitian ini menggunakan sampel daun marpuyan (*Rhodamnia cinerea* Jack.) yang diambil di Desa Kuapan, Kecamatan Tambang, Kabupaten Kampar, Provinsi Riau. Kemudian, sampel diidentifikasi di Laboratorium Botani Jurusan Biologi FMIPA Universitas Riau untuk menghindari kesalahan dalam pengambilan sampel. Hasil identifikasi sampel dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil identifikasi sampel

Klasifikasi Sampel	Sampel	Tumbuhan Marpuyan	Daun Marpuyan
Kingdom	Plantae		
Divisi	Magnoliophyta		
Kelas	Magnoliosida		
Bangsa	Myrtales		
Suku	Myrtaceae		
Marga	Rhodamnia		
Spesies	<i>Rhodamnia cinerea</i> Jack		
Nama Daerah	Marpuyan		

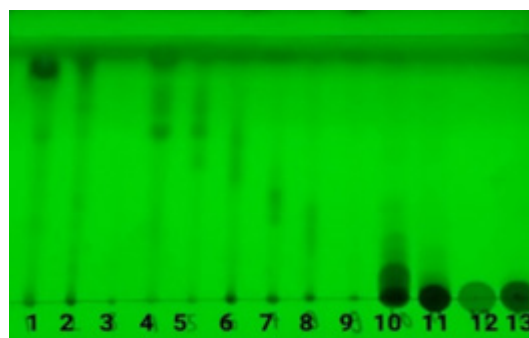
Hasil ekstraksi 600 gram simplisia kering menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol diperoleh ekstrak fraksi kental metanol sebanyak 26,62 gram dengan rendemen 4,436 %. Hasil skrining fitokimia terhadap sampel segar daun marpuyan, mengandung senyawa metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, fenolik dan steroid. Sedangkan pada ekstrak metanol daun marpuyan mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu flavonoid, fenolik dan saponin.

Hasil pengujian pola KLT ekstrak fraksi metanol dari daun marpuyan (*Rhodamnia cinerea* Jack.), menggunakan beberapa eluen dengan kepolaran berbeda. Pemisahan terbaik menggunakan eluen *n*-heksana : etil asetat (5:5). Pengamatan hasil KLT dilakukan di bawah lampu UV λ 254 nm dan λ 366 nm (Gandjar dan Rohman, 2007). Hasil pengamatan, terlihat 5 pola noda yang menandakan bahwa pada ekstrak metanol daun marpuyan terdeteksi 5 senyawa (Gambar 1). Namun, tidak menutup kemungkinan senyawa yang didapat lebih dari yang terlihat, karena kemungkinan pada plat KLT noda yang terlihat saling berhimpitan.

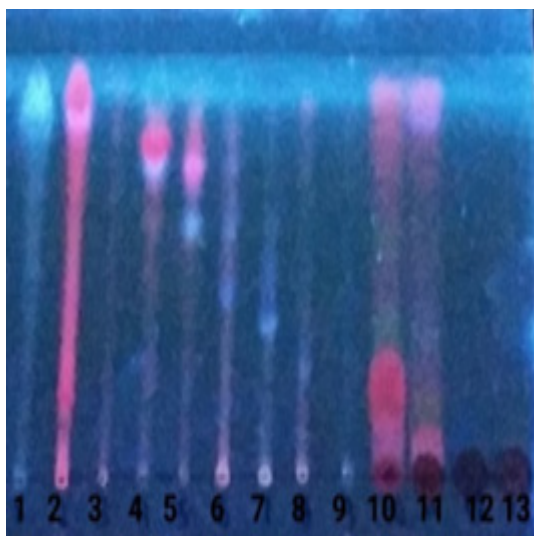


Gambar 1. Profil Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Metanol Daun Marpuyan

Hasil fraksinasi dari ekstrak metanol daun marpuyan setelah kolom didapatkan 651 vial dan setelah uji KLT jarak 5 didapatkan 13 fraksi gabungan. Pengelusan dilakukan dengan eluen secara SGP (*Step Gradient Polarity*) yaitu metoda elusi dengan cara meningkatkan kepolaran pelarut secara bergradien. Hal ini dimaksudkan agar semua senyawa non-polar maupun polar dapat terfraksinasi⁽⁹⁾. Berbagai perbandingan eluen yang dimulai dari pelarut *n*-heksana 100% kemudian ditingkatkan kepolarannya secara bertahap dengan menambahkan pelarut yang lebih polar, *n*-heksana : etil asetat. Hasil yang diperoleh dari isolasi ekstrak fraksi metanol didapatkan sebanyak 13 fraksi, Vial yang mempunyai harga *R_f* yang sama setelah di uji dengan KLT dan dilihat di lampu UV dengan jarak 5 vial, dapat menjadi satu fraksi, sehingga didapatkan 13 fraksi yaitu F1: vial (41-66), F2: vial (76-81), F3: vial (96-106), F4: vial (126-176), F5: vial (186-196), F6: vial (206-211), F7: vial (236-241), F8: vial (251-256), F9: vial (281-286), F1: vial (306-316), F11: vial (326-331), F12: vial (356-391), F13: vial (401-406) (Gambar 2).



λ = 254 nm, Eluen = *n*-Heksana : Etil Asetat = 5:5



(b) $\lambda = 366$ nm, Eluen = *n*-Heksana : Etil Asetat = 5:5

Gambar 2. Profil Kromatografi Lapis Tipis dari Ekstrak Fraksi Metanol Daun Marpuyan (*Rhodamnia cinerea* Jack.) pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm

Hasil isolasi ekstrak fraksi metanol menunjukkan adanya kristal pada vial 401-406 (di Fraksi 13). Kristal yang diperoleh dimurnikan dengan cara pencucian dan rekristalisasi. Pemurnian ini dilakukan berulang hingga didapat senyawa berbentuk kristal (RC-F13). Selanjutnya kristal yang didapat dimonitor kembali pada plat KLT di bawah lampu UV 254 nm dan 366 nm untuk melihat kemurnian dari senyawa tersebut, yang akan menunjukkan satu noda tanpa adanya noda lain yang mengganggu.

Hasil KLT senyawa isolat RC- F13 didapatkan satu noda menggunakan eluen BAA (4:1:1) (Butanol, Asam asetat anhidrat dan Air) diperoleh nilai R_f 0,75 (Gambar 3). Alasan menggunakan eluen BAA adalah karena ketika menggunakan eluen *n*-heksana, etil asetat dan metanol pola tolotan noda yang terdapat pada plat KLT tidak naik karena menggunakan eluen yang kurang tepat. Tetapi ketika menggunakan eluen BAA pola noda yang tampak pada RC-F13 tampak jelas dan berada pada range R_f . Adanya noda tunggal pada beberapa uji KLT tersebut menunjukkan bahwa sudah diperoleh senyawa dengan tingkat kemurnian tinggi⁽¹⁰⁾



Keterangan :

- (a) $\lambda = 254$ nm, Butanol : Asam asetat anhidrat : Air (B : A : A = 4 : 1 : 1)
- (b) $\lambda = 366$ nm, Butanol : Asam asetat anhidrat : Air (B : A : A = 4 : 1 : 1)

Gambar 3. Profil Kromatografi Lapis Tipis Senyawa Isolasi RC- F13.

Senyawa isolat yang didapat sebanyak 17,9 mg dan diberi label RC- F13 (*Rhodamnia cinerea* Jack-Andre). Identifikasi senyawa selanjutnya dilakukan secara organoleptis, pemeriksaan fisika, pemeriksaan kimia, analisis kemurnian dengan HPLC, analisis spektrofotometri dengan UV-Vis, FT-IR dan uji aktivitas antibakteri.

Pemeriksaan organoleptis diketahui bahwa senyawa isolat RC-13 yang didapat berbentuk kristal, berwarna kuning muda, tidak larut dalam *n*-heksana, sukar larut dalam etil asetat dan larut dalam metanol. Pengukuran titik leleh senyawa isolat RC- F13 menggunakan *Stuart Melting Point Apparatus* (SMP-11) diperoleh titik leleh 170-172°C. Suatu senyawa murni memiliki trayek titik leleh tajam yakni awal dari melelehnya hingga meleleh secara keseluruhan berada dalam trayek titik leleh tidak lebih dari 2°C (Amaliah, 2020). Selanjutnya Senyawa isolat RC- F13 dilakukan pengujian penampak noda dengan menggunakan pereaksi $AlCl_3$ terbentuk warna kuning yang mengindikasikan senyawa golongan flavonoid. Identifikasi senyawa isolat RC- F13 selanjutnya dilakukan dengan analisis pemurnian HPLC, spektrofotometer UV dan spektrofotometer FT-IR.


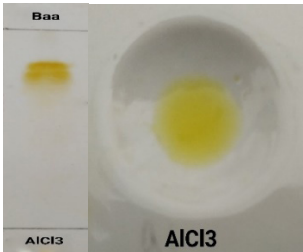

Berdasarkan hasil identifikasi dengan menggunakan HPLC untuk menguji kemurnian dari senyawa isolat RC- F13. HPLC yang

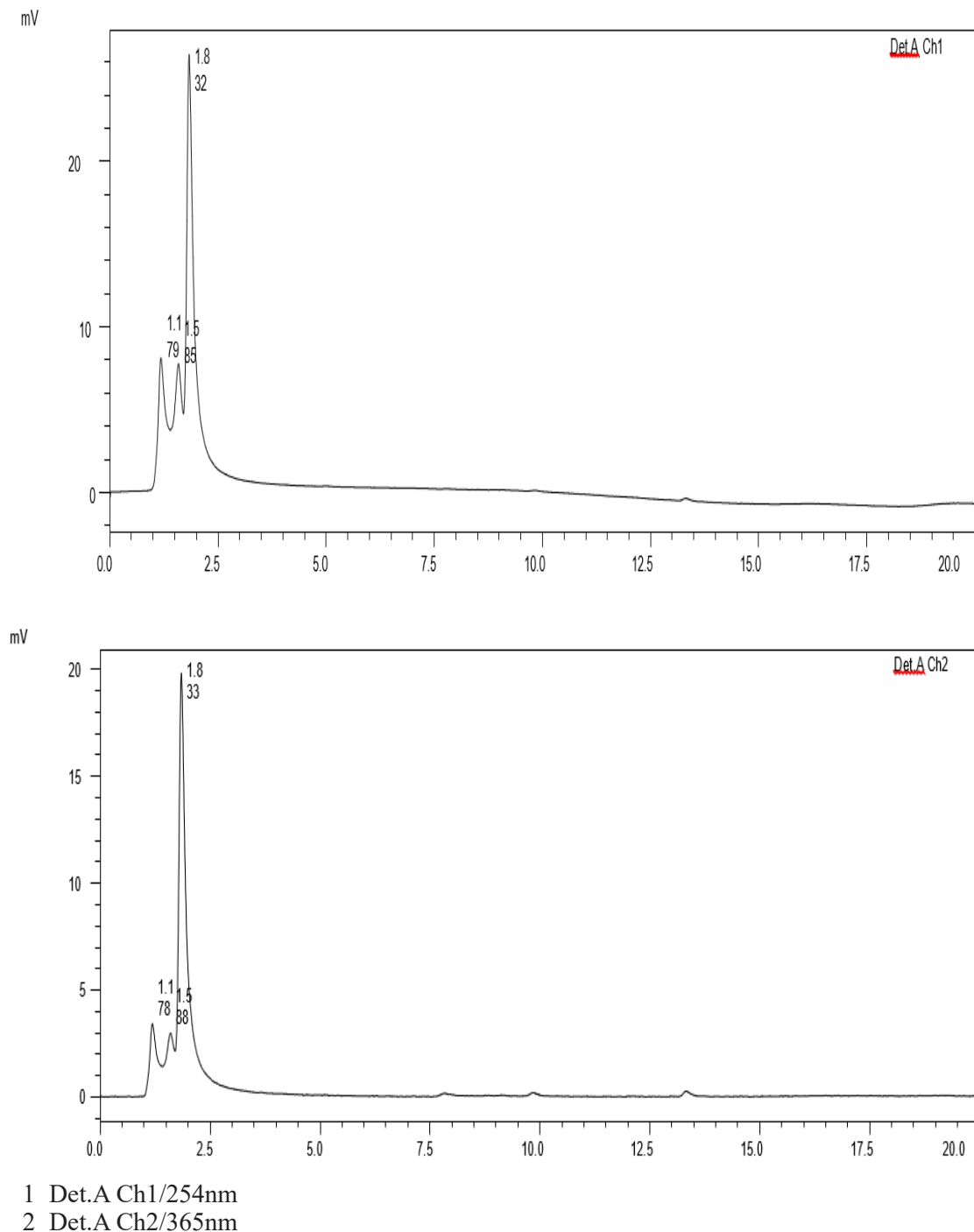
digunakan adalah jenis fase terbalik (Reverse Phase), ukuran kolom yang digunakan Shim-Pack VP-ODS (150x4,6 mm) dan metode yang digunakan adalah gradien elusi, Gradien elusi didefinisikan sebagai penambahan kekuatan fasa gerak selama analisis kromatografi berlangsung. Efek dari elusi gradien adalah mempersingkat waktu retensi dari senyawa-senyawa yang tertahan kuat pada kolom(11). Pada senyawa isolat RC- F13 ini waktu retensi yang dibutuhkan ketika sampel diinjeksikan sampaimemperlihatkan hasil kromatogram adalah : 1 – 4 menit Asetonitril : Air (70:30) , menit 12-15 Asetonitril : Air (90:10) ,menit 19 Asetonitril : Air (70:30) dan pada menit 20 sudah

berhenti, yang menandakan bahwa senyawa isolat RC- F13 tidak terdeteksi lagi senyawanya oleh detektor uv pada HPLC.

Volume injeksi 20 µl, laju alir 1,0 mL/ menit, detektor UV pada panjang gelombang 254 nm dan 365 nm. Hasil HPLC menunjukkan ada tiga puncak, tetapi diantara tiga puncak tersebut terdapat satu puncak yang dominan, dan waktu retensi senyawa tersebut 1,832 menit pada detektor 254 nm dan 1,833 menit pada detektor 365 nm, maka dapat disimpulkan senyawa isolat RC- F13 tersebut belum murni karena memiliki tiga puncak yang artinya setiap satu puncak menandakan satu senyawa yang terkandung di dalam sampel.

Tabel 2. Hasil Identifikasi Senyawa Isolat RC- F13

NO.	Hasil Identifikasi Senyawa Isolat RC- F13
1.	 <p>Warna dan Bentuk : Kuning muda dan berbentuk kristal</p>
2.	 <p>Pemeriksaan dengan pereaksi AlCl_3 : Kuning (Positif Flavonoid)</p>
3.	 <p>Hasil Pemeriksaan Mikroskopis pada perbesaran 40x40 Senyawa Isolat RC- F13</p>



Gambar 4. Kromatogram HPLC Senyawa Isolat RC- F13

Uji Spektrofotometer UV dilakukan pada panjang gelombang 200 – 400 nm yang bertujuan untuk mengidentifikasi ikatan rangkap terkonjugasi pada senyawa isolat RC- F13 (Gambar 5). Hasil analisis spektroskopi UV menunjukkan terdapat tiga puncak pada panjang gelombang 353,60; 257,00; dan 209,20 nm dengan absorbansi masing-masing 0,736; 0,816; dan 1,862. Serapan pada panjang gelombang 353,60 nm

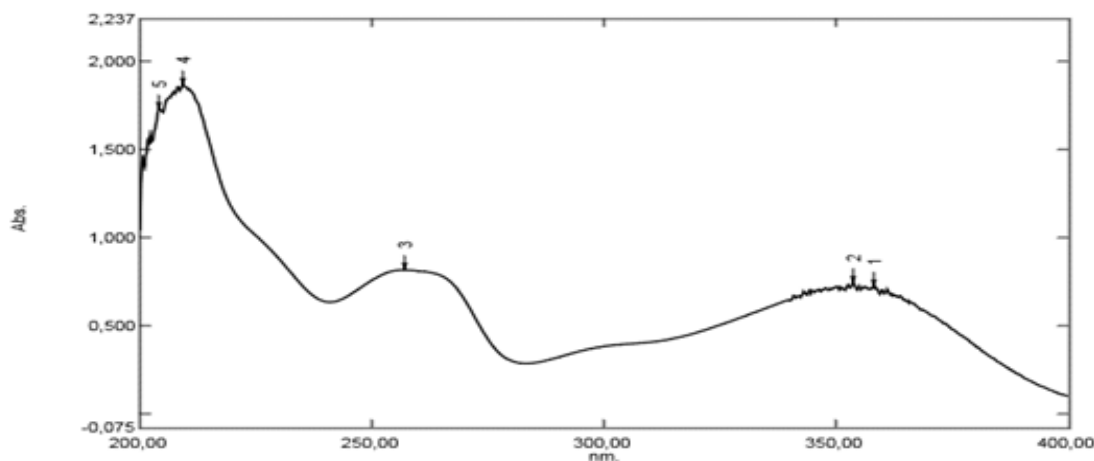
merupakan pita I yang menunjukkan adanya sistem konjugasi sinamoiil. Kemudian, serapan pada panjang gelombang 257,00 nm merupakan pita II yang menunjukkan adanya sistem konjugasi benzoil yang merupakan ciri khas dari serapan senyawa flavonoid golongan flavonol dan rentang serapan spektrum flavonol mempunyai panjang gelombang 250-280 nm dan 350-385 nm.⁽¹²⁾

Uji spektrofotometer FT-IR dilakukan

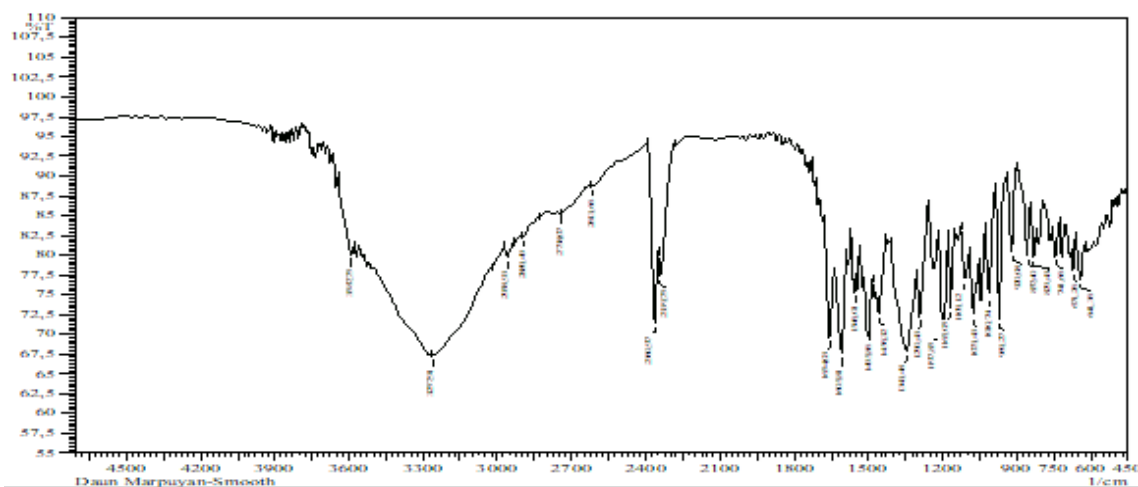
bertujuan untuk mengetahui jenis gugus fungsi yang terdapat pada senyawa isolat RC- F13 (Gambar 6). Hasil analisis spektroskopi menunjukkan bahwa terdapat gugus fungsi O-H pada daerah bilangan gelombang 3257 cm^{-1} yang merupakan ciri khas dari sifat senyawa flavonoid. Adanya bilangan gelombang pada daerah 2958 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus fungsi C-H Alifatik. Adanya bilangan gelombang pada daerah 1654 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus fungsi C=O Karbonil dan Adanya bilangan gelombang pada daerah 1605 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus fungsi C=C Aromatik yang merupakan ciri khas dari sifat flavonoid. Adanya bilangan gelombang pada daerah 1073 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus fungsi C-O^(13,14)

Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun marpuyan (*Rhodamnia cinerea* Jack.) pada konsentrasi 20%, 10%, 1%, 0,1% dan 0,01%, tidak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli*

(Tabel 4). Hasil pengujian aktivitas antibakteri fraksi 13 pada konsentrasi 1%, 0,1% dan 0,01%, pada bakteri *Escherichia coli* tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri yang ditandai dengan tidak adanya daerah bening di sekeliling cakram. Sedangkan sebagai kontrol positif, *Ciprofloxacin* menunjukkan nilai rata rata daya hambat 20,4; 25,1 dan 25,8 mm yang mana menurut Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) diameter daya hambat bakteri yang berada pada rentang ≥ 20 dikategorikan kuat. Penggunaan kontrol positif bertujuan sebagai pembandingan diameter hambat sampel uji terhadap bakteri karena antibiotik merupakan senyawa antibakteri yang telah dibuat secara terstandar. Pelarut DMSO digunakan sebagai kontrol negatif. Tujuan digunakannya kontrol negatif untuk memastikan bahwa zona hambat yang dihasilkan bukan berasal dari pelarut yang digunakan, tetapi benar-benar berasal dari ekstrak, fraksi 13 dan senyawa isolat RC-F13 yang diujikan.



Gambar 5. Spektrum UV Senyawa Isolat RC-F13



Gambar 6. Spektrum FT-IR Senyawa Isolat RC- F13

Tabel 4. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap Bakteri *Escherichia coli* Ekstrak Metanol, Fraksi 13 dan Senyawa Isolat RC- F13 dari Daun Marpuyan

Sampel Uji	Konsentrasi	Diameter Daerah Hambat (mm)			Rata-rata Diameter Hambat \pm SD (mm)
		I	II	III	
Ekstrak Metanol	K (-)	6	6	6	6
	K (+)	20,4	20,5	20,4	20.4 \pm 0,05
	20%	6	6	6	6
	10%	6	6	6	6
	1%	6	6	6	6
	0,1%	6	6	6	6
	0,01%	6	6	6	6
	K (-)	6	6	6	6
Fraksi 13	K (+)	22,7	26,7	25,9	25.1 \pm 2,11
	1%	6	6	6	6
	0,1%	6	6	6	6
	0,01%	6	6	6	6
Senyawa Isolat RC- F13	K (-)	6	6	6	6
	K (+)	28,1	24,1	25,2	25.8 \pm 2,06
	0,1%	6	6	6	6

Keterangan :

Diameter cakram

: 6 mm

I , II dan III

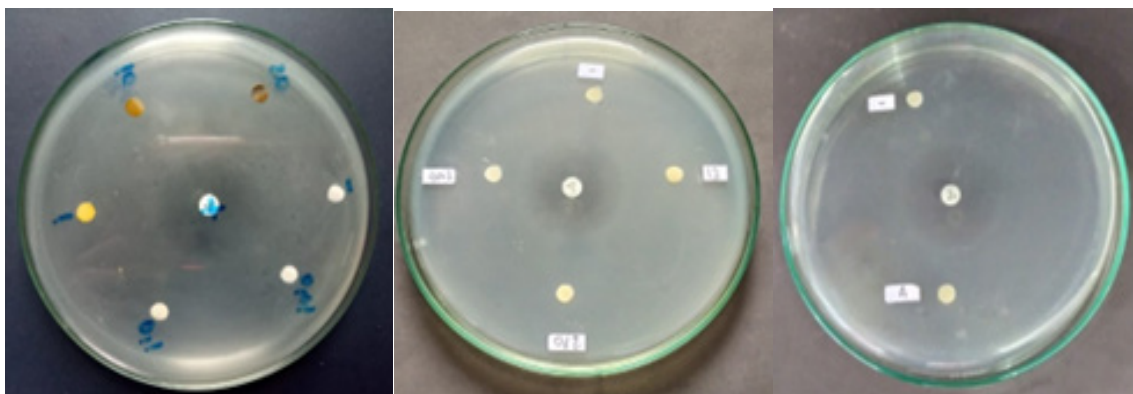
: Pengulangan ke-1, ke-2 dan ke-3

K(-)

: Kontrol negatif (DMSO)

K(+)

: Kontrol positif (*Ciprofloxacin* 5 μ g/Disk)



Gambar 7. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Fraksi Metanol (A) Daun Marpuyan, Fraksi (F13) (B) Isolat RC- F13 (C) Marpuyan Terhadap *Escherichia coli*

Pada pengujian aktivitas antibakteri yang telah dilakukan pada ekstrak fraksi metanol, fraksi 13 dan senyawa isolat RC-F13 dengan beberapa konsentrasi yang berbeda terhadap bakteri *Escherichia coli* tidak memberikan zona bening pada aktivitas

antibakterinya (Gambar 7). Struktur dinding sel *E. coli* (Gram negatif) lebih kompleks dimana terdiri atas tiga lapisan, diantaranya lapisan luar lipoprotein, lapisan tengah lipopolisakarida yang berperan sebagai penghalang masuknya bahan bioaktif, dan

lapisan dalam berupa peptidoglikan dengan kandungan lipid yang tinggi yaitu 11-12%. Oleh sebab itu, sampel sulit menembus dinding sel tersebut.⁽¹⁵⁾ Hasil ini berbeda dengan penelitian yang telah dilakukan oleh peneliti sebelumnya yang menyatakan bahwa ekstrak baik *n*-heksana, etil asetat dan etanol memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dengan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) untuk ekstrak *n*-heksana (1%), etil asetat (0,1%) dan etanol (1%)⁽⁶⁾. Adapun kemungkinan beberapa faktor yang mempengaruhi perbedaan hasil yang di dapat terhadap aktivitas antibakteri pada daun marpuyan (*Rhodamnia cinerea* Jack.) yakni faktor kondisi geografis, tempat tumbuhnya, umur sampel juga dapat mempengaruhi kandungan pada tanaman dan mutu ekstrak yang digunakan untuk uji antibakteri.^(16,17)

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa hasil isolasi senyawa metabolit sekunder dari ekstrak fraksi metanol daun marpuyan (*Rhodamnia cinerea* Jack.) diperoleh suatu senyawa isolat yang diberi label RC- F13 sebanyak 17,9 mg, berbentuk kristal, berwarna kuning muda dengan titik leleh 170-172°C. Hasil identifikasi senyawa isolat (RC- F13) melalui pengujian dengan pereaksi $AlCl_3$, positif termasuk golongan flavonoid, diperkuat dengan hasil dari spektrum UV dan spektrum FT-IR. Selain itu, hasil pengujian aktivitas antibakteri pada ekstrak fraksi metanol, fraksi 13 dan senyawa isolat (RC- F13) terhadap bakteri *Escherichia coli* tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri yang ditandai dengan tidak adanya daerah bening di sekeliling cakram.

DAFTAR PUSAKA

1. Suparni I, dan Wulandari A. *Herbal Nusantara: 1001 Ramuan Asli Indonesia*. Yogyakarta: Andi. 2012.
2. Fakhrurozzii Y. *Landscap Tumbuhan Obat Masyarakat Belitung*. Bogor: IPB. 2009.
3. Abdullah M, Mustikaningtyas D, Widiatningrum T. Inventarisasi Jenis-Jenis Tumbuhan Berkhasiat Obat Di Hutan Hujan Dataran Rendah Desa Nyamplung Pulau Karimunjawa. *Biosaintifika*. 2010. 2(2):.75–81
4. Febriansyah AR. Uji Aktivitas Immunomodulator Ekstrak Metanol Daun Dan Kulit Batang (*Rhodamnia cinerea* Jack). (*Skripsi*). Jakarta: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah. 2009.
5. Aminah S, Helmi H, Susanti I. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Aseton Daun Merapin (*Rhodamniacinerea* Jack) Terhadap Bakteri Enteropatogen., *Ekotonia*, 2013.1(1): 46–55.
6. Fitra S. Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum Ekstrak Daun Marpuyan Sebagai Antibakteri dan Antijamur. (*Skripsi*). Pekanbaru : Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau. 2013.
7. Hanani E. *Analisis Fitokimia*. Jakarta: EGC. 2015.
8. Lay BW. *Analisa Mikroba di Laboratorium*. Jakarta : PT.Grafindo Persada. 1994.
9. Amaliah A, Salempa P, Muharram. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Fraksi Metanol Batang Belajang Susu (*Scindapsus pictus* Hassk.), *Jurnal Chemica*. 2020. Vol. 21 Nomor 1., 78 – 85
10. Atun S. Metode Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam. *Jurnal Konservasi Cagar Budaya Borobudur*. 2014. Vol. 8. No. 2.
11. Shrivastava A and Gupta VB. HPLC: Isocratic or Gradient Elution and Assessment of Linearity In Analytical Methods. *Journal of Advanced Scientific Research*, 2012. 2(1): 21-25.
12. Koirewoa YA, Fatimawali, Wiyono WI. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dalam Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.). *E-Journal Unsrat*. 2012. 1, 47-52.

13. Dachriyanus. *Analisis Struktur Senyawa Organik Secara Spektroskopi*, Padang: Universitas Andalas. Davis, W and Stout, TR. 1971. Disc Plate Methods of Microbiological Antibiotic Assay. *Microbiology*. 2004. 22: 659-665.
14. Sastrohamidjojo H. *Dasar-Dasar Spektroskopi*. Yogyakarta: UGM Press. 2013.
15. Winarno S, Ma'ruf WF, & Dewi EN. Uji Bioaktivitas Ekstrak Gelidium sp. terhadap Bakteri *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus*., *Jurnal Perikanan*, 2012. Vol. 1, No. 2.
16. Anonim. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat Cetakan 1*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. 2000.
17. Dwiyantri W, Ibrahim M, dan Trimulyono G. Pengaruh Ekstrak Daun Kenikir (*Cosmoscaudatus*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* Secara In Vitro, *Lentera Bio*, 2014, 3(1): 1-5.