

Isolasi, Identifikasi dan Uji Pendahuluan Aktivitas Antibakteri Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Metanol Kulit Batang Bakau Merah (*Rhizophora stylosa*)(*Rhizophoraceae*)

Isolation, Identification, and Test of Antibacterial Activity Secondary Metabolites from Methanol Extract of Red Mangrove's Stem Bark (*Rhizophora stylosa*)(*Rhizophoraceae*)

Fitri Puspitasari* dan Tukiran

Jurusan Kimia FMIPA, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Negeri Surabaya, Jl. Ketintang, Surabaya, 60231

email: fitri_puspita@ymail.com

Abstrak Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui struktur molekul senyawa metabolit sekunder hasil isolasi dari ekstrak metanol kulit batang tumbuhan bakau merah (*Rhizophora stylosa*)(*Rhizophoraceae*) dan untuk melakukan uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Salmonella typhi* dan *Streptococcus pyogenes*. Isolasi dimulai dengan ekstraksi serbuk kering kulit batang tumbuhan bakau merah (*Rhizophora stylosa*)(*Rhizophoraceae*) dengan *n*-heksan kemudian dilanjutkan dengan metanol. Isolasi dilakukan dengan metode kromatografi (KCV dan KLTP) yang selalu dimonitor melalui KLT. Identifikasi isolat ditentukan dengan spektroskopi UV-Vis, IR, dan GC-MS. Berdasarkan data spektroskopi, isolat ini diduga mengandung senyawa piperin. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode muller hinton dengan konsentrasi larutan uji 1000 ppm. Hasil dari uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak metanol pekat memiliki daerah hambatan 13 mm (kuat) untuk *Streptococcus pyogenes* dan 0 mm (negatif) untuk *Salmonella typhi*. Sedangkan isolat 1 dan isolat 2 tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri untuk kedua bakteri *Salmonella typhi* dan *Streptococcus pyogenes*.

Kata kunci: aktivitas antibakteri, ekstrak methanol, *Rhizophora stylosa*, *Rhizophoraceae*,

Abstract The aims of this research are to know the molecular structure of the dominant compounds of secondary metabolite isolated methanol extract of the stem bark of (*Rhizophora stylosa*)(*Rhizophoraceae*) and to do the antibacterial activity test of *Salmonella typhi* dan *Streptococcus pyogenes*. Isolation was started by extraction of dry powder from the stem bark of red mangrove using *n*-heksan then continued by methanol. The isolation was done by chromatographic methods (VLC and PTLC) that always be monitored by TLC. The identification of isolate was determined by UV-Vis, IR, and GC-MS. Based on spectroscopic data, both isolates was guessed containing piperin. Antibacterial activity test was done by muller hinton method with 1000 ppm concentration. The result of the test showed that methanol extract had 13 mm (strong) zone of inhibition, but for isolate 1 and isolate 2 didn't show the antibacterial activity.

Keywords: antibacterial activity, methanol extract, *Rhizophora stylosa*, *Rhizophoraceae*

PENDAHULUAN

Beberapa spesies dari genus tanaman mangrove *Rhizophora* digunakan oleh orang lokal sebagai obat. Misalnya, kulit *R. mucronata* digunakan untuk pengobatan diabetes. Ketika direbus dalam air dapat digunakan sebagai obat untuk mengatasi diare, mual, dan muntah-muntah dan sebagai antiseptik di Thailand. Ekstrak dari beberapa spesies dari genus ini telah dilaporkan memiliki aktivitas antijamur, aktivitas antibakteri, anti-inflamasi, dan penyembuhan luka [1].

Telah ditemukan dua antioksidan flavon-3-ol glikosida, glabraosida A, dan glabraosida B, bersama-sama dengan tujuh turunan flavanol, (+)-catechin, (-)-epicatechin, cinchonain Ia, cinchonain Ib, (+)-catechin 3-O - L-rhamnoside, cinchonain IA, dan cinchonain IB yang terdapat pada batang tumbuhan *Rhizophora stylosa* yang tumbuh di wilayah Jepang [1].

Senyawa lainnya yang telah berhasil diisolasi dari batang bakau merah (*Rhizophora stylosa*, Griff) yang tumbuh di wilayah Jepang ialah senyawa baru flavanol terasetilasi yaitu, 3,7-O-diasetil (-)-epicatechin dan tujuh turunan flavanol yang telah diketahui seperti, (-)-epicatechin, 3-O-asetil(-)-epicatechin, 3,3',4',5,7-O-pentaasetil (-)-epicatechin, (+)-afzelechin, (+)-catechin, cinchonain Ib, dan proanthocyanidin B2 [2].

METODE PENELITIAN

Alat

Peralatan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah alat ekstraksi maserasi, *rotary vacuum evaporator*, seperangkat alat kromatografi vakum cair, seperangkat alat kromatografi lapis tipis dan plat KLT. Peralatan yang digunakan untuk identifikasi meliputi *Melting point apparatus electrothermal*, spektroskopi UV-Vis, IR dan GC-MS.

Bahan

Pelarut yang digunakan untuk keperluan ekstraksi yaitu pelarut *n*-heksan dan metanol. Isolasi menggunakan cara KCV dan KLTP menggunakan pelarut *n*-

heksan, etil asetat, dan metanol. Fasa diam untuk KCV menggunakan silika gel Merck 60 G F₂₅₄ dan analisa KLT menggunakan plat aluminium berlapis silika gel Merck Keisegel 60 F₂₅₄ 0,25 mm, 20 x 20 cm, pereaksi Liebermann-Burchard, serbuk kulit batang tumbuhan bakau merah (*Rhizophora stylosa*), bakteri *Salmonella typhi*, dan bakteri *Streptococcus pyogenes*, media Muller Hinton agar.

PROSEDUR PENELITIAN

Ekstraksi dan Isolasi

Bahan berupa serbuk kulit batang tumbuhan *Rhizophora stylosa* sebanyak 10 kg diperoleh dari daerah tambak di Wilangan, Surabaya. Selanjutnya dimaserasi dengan menggunakan pelarut *n*-heksan kemudian metanol, dan filtrat hasil maserasi diuapkan melalui *rotary vacuum evaporator* dan diperoleh ekstrak kental berwarna coklat pekat sebanyak 30 gram. Lalu 5 gram ekstrak kloroform ini difraksinasi melalui KCV₁, dan KCV₂, eluen yang digunakan sama yaitu (H=100% diulang 2x, H:E=9:1, H:E=8:2, H:E=7:3, H:E=6:4, H:E=5:5, H:E=3:7, E=100%, dan M=100%), dan dihasilkan masing-masing 10 fraksi. Dengan eluen sama dari kesepuluh fraksi tersebut menghasilkan fraksi utama fraksi 3-8 (1). Memfraksinasi 5 gram ekstrak metanol melalui KCV₃ dengan eluen yang masih sama, menghasilkan dua fraksi utama 3-6 (2) dan 7-9 (3). Dari ketiga fraksi (1), (2), dan (3) tersebut masing-masing dipisahkan menggunakan KLTP dengan eluen H:E (7:3). Dilakukan pengulangan proses KLTP (elusidasi) untuk menyempurnakan pemisahan. Dari hasil KLTP tersebut kemudian diperoleh noda atas sebagai isolat 1 dan noda bawah sebagai isolat 2. Hasil dari isolat diuji dengan pereaksi dragendorf dan hasil kedua isolat terbentuk warna jingga menunjukkan isolat mengandung senyawa golongan alkaloid. Uji karakteristik berikutnya dilakukan terhadap isolat 1 dan isolat 2 yaitu uji spektroskopi UV-Vis, IR, dan GC-MS.

Pembuatan Media Muller Hinton Agar

Muller Hinton agar sebanyak 38 gram dilarutkan dalam 1 liter air suling kemudian dipanaskan di atas penangas air hingga jernih. Selanjutnya media tersebut disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C.

Pembuatan Inokulum Bakteri

Biakan bakteri *Salmonella typhi* dan *Streptococcus pyogenes* masing-masing ditanam di permukaan Muller Hinton agar miring secara merata, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Satu ose koloni bakteri dari biakan padat disuspensikan ke dalam 5 ml larutan NaCl isotonis dan dikocok.

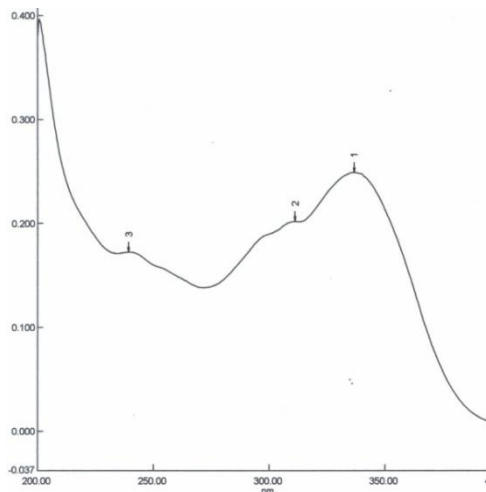
Penentuan Zona Hambatan

Sebanyak 1 ml inokulum bakteri dimasukkan ke dalam cawan petri berdiameter 9 cm. Kemudian ke dalam cawan petri tersebut dimasukkan 15 ml larutan agar Muller Hinton steril suhu 45-50 °C. Campuran dibuat homogen dengan cara menggoyang-goyang cawan petri secara teratur dan selanjutnya dibiarkan menjadi padat. Kertas cakram (*paper disk*) berdiameter 6 mm yang telah dicelupkan ke dalam larutan isolat 1000 ppm diletakkan pada permukaan media agar dalam cawan petri. Posisi kertas cakram diatur agar tidak terlalu dekat dengan tepi posisi cawan petri. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Zona hambatan dari isolat ditentukan dengan mengukur diameter zona bening di sekeliling kertas cakram menggunakan jangka sorong. Dengan cara yang sama, juga dilakukan penentuan zona hambatan untuk antibiotik sintetik, yakni ampisillin sebagai kontrol positif, serta aquades sebagai kontrol negatif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Senyawa

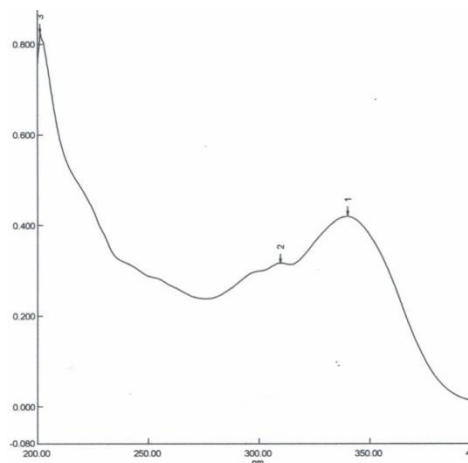
Data spektroskopi (UV-Vis, IR dan GC-MS) untuk isolate 1 dan 2 dijelaskan sebagai berikut. Hasil pengukuran spektrum UV-Vis dari isolat 1 dalam pelarut metanol dapat dilihat pada Gambar 1, menunjukkan adanya serapan



Gambar 1. Spektrum UV-Vis isolat 1

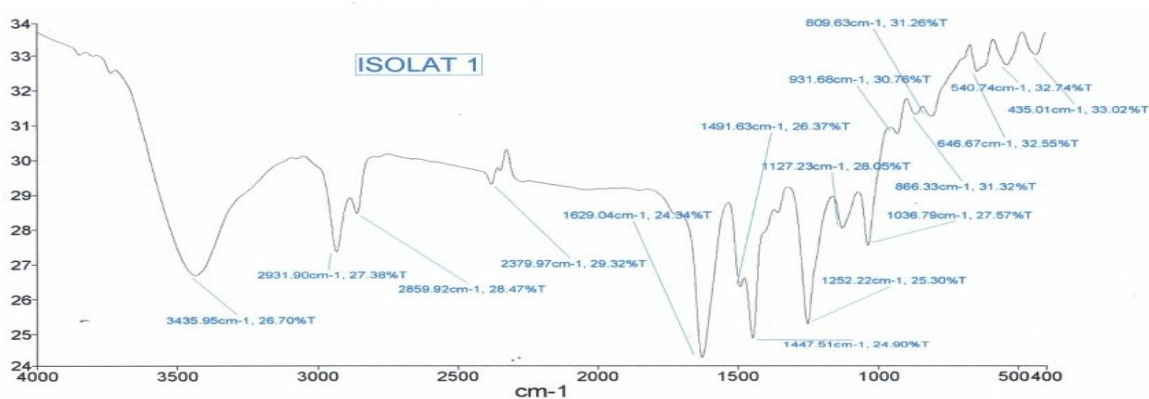
pada daerah panjang gelombang 239 nm dan 337 nm.

Sementara itu, berdasarkan gambar 2 senyawa isolat 2 menunjukkan puncak serapan maksimum pada panjang gelombang 201 nm dan 340 nm.

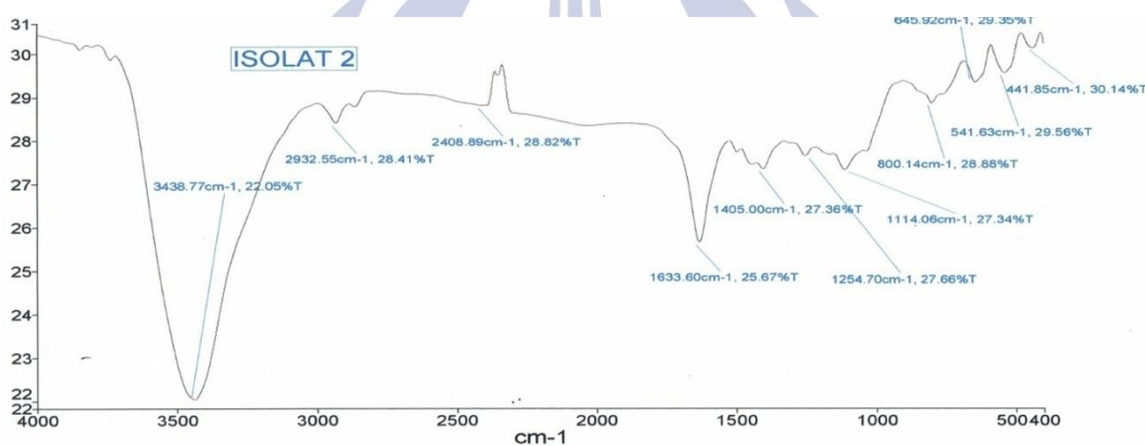


Gambar 2. Spektrum UV-Vis isolat 2

Spektrum infra merah (IR) senyawa hasil isolat 1 memperlihatkan serapan melebar pada bilangan gelombang, $\lambda_{maks} = 3435,95 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus N-H amida; pita serapan pada bilangan gelombang $\lambda_{maks} = 2931,9 \text{ cm}^{-1}$, mengindikasikan adanya gugus C-H alkana, didukung dengan adanya pita serapan pada bilangan gelombang



Gambar 3. Spektrum IR Isolat 1



Gambar 4. Spektrum IR Isolat 2

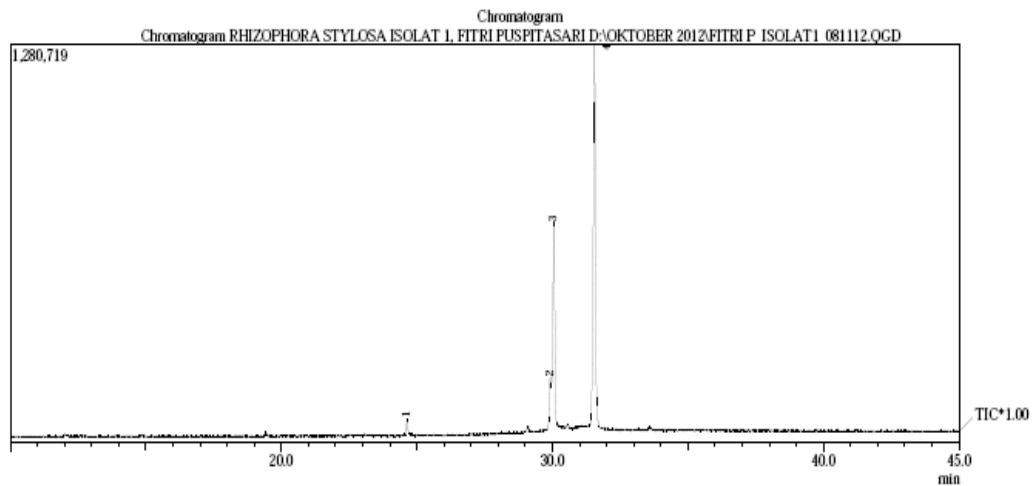
2859,92cm⁻¹ dan 1447,51 cm⁻¹; pita serapan pada bilangan gelombang $\lambda_{maks} = 1629,04$ cm⁻¹, mengindikasikan adanya gugus N-H amina; pita serapan pada bilangan gelombang $\lambda_{maks} = 1127,23$ cm⁻¹, 1036,79 cm⁻¹ mengindikasikan adanya gugus C-H amina; pita serapan pada bilangan gelombang $\lambda_{maks} = 931,68$ cm⁻¹, 866,33 cm⁻¹, dan 809,63 cm⁻¹ mengindikasikan adanya gugus (C-H) alkena. Spektrum IR dapat ditunjukkan pada gambar 3.

Sedangkan spektrum IR hasil isolat 2 menunjukkan pita serapan bilangan gelombang $\lambda_{maks} = 3438,77$ cm⁻¹ menunjukkan adanya gugus N-H amida; pita serapan pada bilangan gelombang $\lambda_{maks} = 2932,55$ cm⁻¹, mengindikasikan adanya gugus C-H alkana; pita serapan pada bilangan gelombang $\lambda_{maks} = 1633,6$ cm⁻¹, mengindikasikan adanya gugus

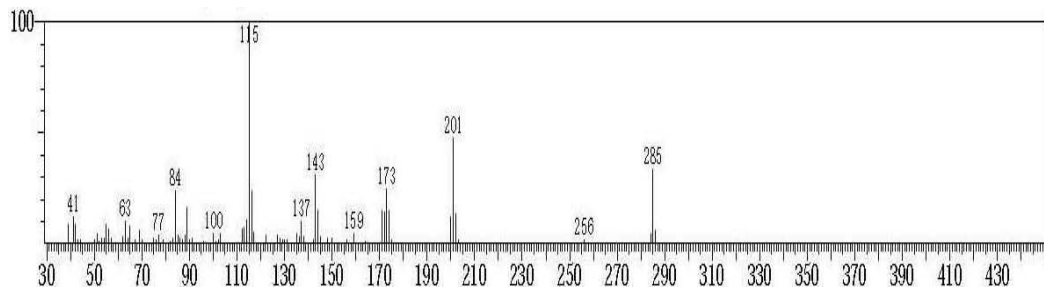
N-H amina; pita serapan pada bilangan gelombang $\lambda_{maks} = 1254,7$ cm⁻¹, 1114,06 cm⁻¹ mengindikasikan adanya gugus C-H amina; dan pita serapan pada bilangan gelombang $\lambda_{maks} = 800,14$ cm⁻¹, mengindikasikan adanya gugus C-H (alkena) [3].

Berdasarkan pengukuran spektrum massa (GC-MS) senyawa isolat 1 menunjukkan 4 puncak dengan kadar 1=1,70%; 2=2,87%; 3=26,40%; 4=69,03.

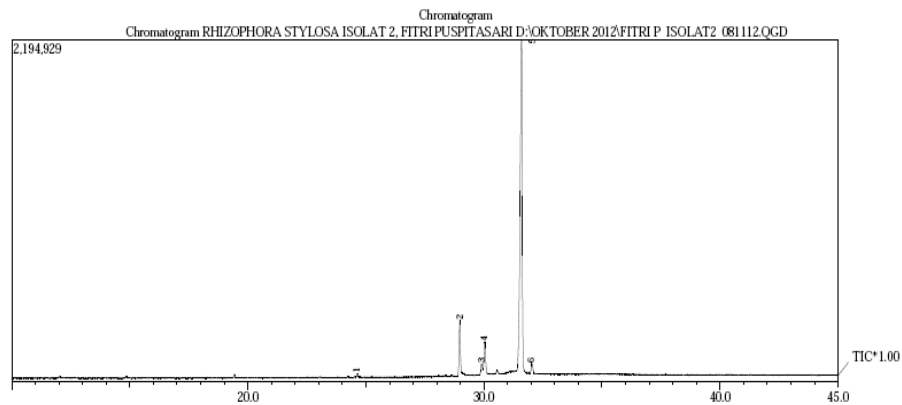
Puncak nomor 4 adalah puncak yang paling dominan dengan kadar 69,03%. Spektrum massa puncak nomor 4 adalah 41; 63; 77; 84; 100; 115; 137; 143; 159; 173; 201; 256; dan 285.



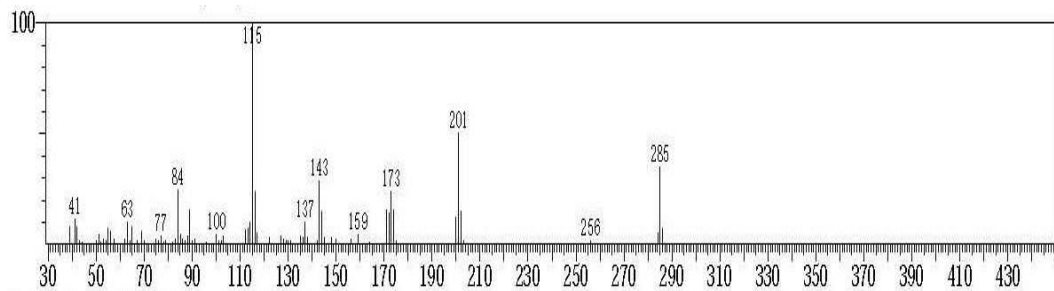
Gambar 5. Kromatogram GC senyawa isolat 1



Gambar 6. Spektrum MS senyawa isolat 1



Gambar 7. Kromatogram GC senyawa isolat 2



Gambar 8. Spektrum MS senyawa isolat 2

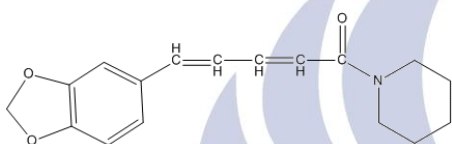
Sementara itu spektrum massa dari isolat 2 menunjukkan 6 puncak dengan kadar 1=0,30%; 2=8,27%; 3=1,18%;

4=5,10%; 5=83,35%; 6=1,80%. Puncak nomor 5 adalah

puncak yang paling dominan dengan kadar 83,35%. Spektrum massa puncak nomor 5 adalah 41; 63; 77; 84; 100; 115; 137; 143; 159; 173; 201; 256; dan 285.

Kedua isolat yang telah diuji, dilihat dari hasil spektrum UV-Vis, IR, dan GC-MS, keduanya diduga menunjukkan hasil yang sama dengan kemurnian yang berbeda. yaitu senyawa piperin dengan rumus molekul $C_{17}H_{19}NO_3$ [4].

Pendugaan ini didukung dengan adanya persamaan puncak fragmentasi dari kedua isolat tersebut, yaitu m/z 41, 77, 84, 100, 115, 137, 201, 256, dan 285 dianalisis dengan bantuan Library: NIST62.LIB



Gambar 9. Senyawa piperin

Uji Aktivitas Antibakteri

Dalam uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram ini, 2 isolat dan ekstrak metanol pekat dilarutkan dalam pelarut metanol untuk membuat konsentrasi larutan sebesar 1000 ppm kemudian cakram (*paper disk*) berdiameter 6 mm dicelupkan ke dalam larutan tersebut selama 5 menit.

Cakram yang telah dicelupkan dalam masing-masing larutan isolat dan larutan ekstrak diletakkan pada bakteri uji (*Salmonella typhi* dan *Streptococcus pyogenes*) yang telah dibiakkan dalam media Muller Hinton Agar. Selanjutnya dilakukan proses inkubasi selama 24 jam dengan suhu $37^{\circ}C$. Senyawa yang aktif sebagai antibakteri akan menimbulkan zona bening (hambatan) sekitar cakram.

Dengan cara yang sama, juga dilakukan penentuan diameter daerah hambatan untuk antibakteri ampisilin sebagai kontrol positif dan aquades sebagai kontrol negatif.

Tabel 1. Zona Hambatan Sampel Pada Bakteri

Sampel	Zona Hambatan (mm)	Zona Hambatan (mm)	
		<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Salmonella typhi</i>
1. Sampel I (isolat 1)	0	0	0
2. Sampel II (isolat 2)	0	0	0
3. Sampel III (ekstrak metanol)	13	0	0
4. Kontrol (+) Positif	38	26	26
5. Kontrol (-) negatif	0	0	0

Berdasarkan tabel 1, menunjukkan bahwa senyawa sampel III (ekstrak metanol pekat) memiliki daerah hambatan 13 mm (kuat) [5] untuk *Streptococcus pyogenes* dan 0 mm (negatif) untuk *Salmonella typhi*. Sedangkan isolat 1 dan isolat 2 tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri untuk kedua bakteri *Salmonella typhi* dan *Streptococcus pyogenes*.

SIMPULAN

Senyawa alkaloid yang berhasil diisolasi dari ekstrak metanol kulit batang tumbuhan bakau merah (*Rhizophora stylosa*)(*Rhizophoraceae*) adalah senyawa piperin.

Uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol kulit batang tumbuhan bakau merah (*Rhizophora stylosa*)(*Rhizophoraceae*) terhadap bakteri *Salmonella typhi* dan *Streptococcus pyogenes* menunjukkan bahwa pada konsentrasi 1000 ppm, yang aktif sebagai antibakteri adalah ekstrak metanol pekat pada bakteri *Streptococcus pyogenes* saja. Sedangkan untuk isolat tidak menunjukkan aktivitas antibakteri pada kedua bakteri. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan konsentrasi hambat minimum (HKM) pada senyawa piperin terhadap kedua bakteri uji guna mengetahui kadar minimum isolat dalam menghambat pertumbuhan kedua bakteri uji.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kensaku Takara, Ayako Kuniyoshi, Koji Wada, Kazuhiko Kiniyo, and Hironori Iwasaki. 2008. *Antioxidative Flavan-3-ol Glycosides from Stems of Rhizophora stylosa*. 72 (8), 2191-2194.
2. Dong-Li Li, Xiao-Ming, Ze-Yu Peng, and Bin-Gui Wang. 2007. *Flavanol Derivatives from Rhizophora stylosa and Their DPPH Radical Scavenging Activity*. 12, 1163-1169
3. Sudjadi, 1986. *Metode Pemisahan Cetakan 1*. Yogyakarta. Kanisius
4. G.C.L. Ee, S. K. Lim, C.M. Lim, and K. Dzulkefly. 2008. *Alkaloids and Carboxylic Acids from Piper Nigrum*. Vol. 20, No. 8 (2008), 5931-5940.
5. Pasaribu, S.P., Eva, M., dan Boby, S.N. 2008. *Uji Fitokimia, Toksisitas dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Batang Jarak Cina (Jatropha multifida L.)*. *Jurnal Kimia Mulawarman*. 5 (2). ISSN 1693-5616.