

**PENELUSURAN SENYAWA KIMIA FRAKSI KLOROFORM DARI
KULIT BATANG *Cryptocarya acuminata* DAN UJI BIOAKTIVITAS
TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli***

IRWANTO

H 311 03 025



23 - 2 - 09
KLPN
Iris
Hafid
36
SKR - MPOG
IRW
P.

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2009**

SKIPSI

**PENELUSURAN SENYAWA KIMIA FRAKSI KLOROFORM DARI
KULIT BATANG *Cryptocarya acuminata* DAN UJI BIOAKTIVITAS
TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli***

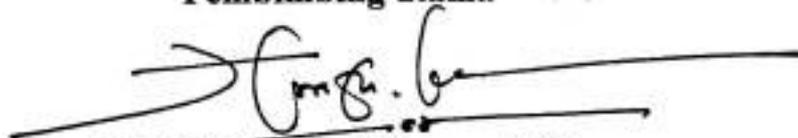
Disusun dan diajukan oleh

IRWANTO

H 311 03 025

Skripsi ini telah diperiksa dan disetujui oleh :

Pembimbing utama



Prof. Dr. Hanapi Usman, MS.

NIP : 131 690 166

Pembimbing Pertama



Dr. M. Natsir Djide, MS. Apt.

NIP : 130 785 083

Pembimbing Kedua



Drs. Federyk W. Mandey, M.Sc.

NIP : 131 876 906

**PENELUSURAN SENYAWA KIMIA FRAKSI KLOROFORM DARI
KULIT BATANG *Cryptocarya acuminata* DAN UJI BIOAKTIVITAS
TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli***

Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat

Untuk memperoleh gelar sarjana sains

Oleh

IRWANTO

H 311 03 025



**MAKASSAR
2009**

*Janganlah takut, sebab Aku menyertai engkau,
Janganlah bimbang, sebab Aku ini Allahmu;
Aku akan meneguhkan, bahkan akan menolong engkau;
Aku akan memegang engkau dengan tangan kanan-Ku yang membawa
kemenangan.*

(Yesaya 40 : 10)

*Kupersembahkan karya ini untuk orang-orang yang aku cintai: kedua orang tua,
kakak-kakak dan sahabat-sahabatku.*

KATA PENGANTAR

Puji syukur yang terhingga kepada Tuhan Yang Maha Kuasa atas kasih setia dan penyertaan-Nya yang begitu besar sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini. Terima kasih yang sebesar-besarnya penulis persembahkan untuk kedua orang tua, Simson Kabassi dan Bulawan atas segala doa, bimbingan dan kasih sayang yang tiada henti untuk penulis, semoga damai Yesus Kristus tetap bersinar di dalam hatimu. Penulis juga berterima kasih untuk kakak-kakak tercinta, M. Hery, M. Eryl, P. Ardi, M. Arruan, Gerson, Asmadi dan Hendra Yosi atas segala doa dan dorongan semangat buat penulis, semoga Tuhan akan senantiasa memelihara hati dan pikiran kita.

Terima kasih kepada Bapak Prof. Dr. Hanapi Usman, MS., Bapak Dr. M. Natsir Djide, MS. Apt., dan Bapak Drs. Federyk W. Mandey, M.Sc., selaku pembimbing yang telah meluangkan waktu dan pikiran serta tenaga untuk membimbing penulis mulai dari awal penelitian hingga penyelesaian skripsi ini. Penulis juga berterima kasih kepada Ibu Dra. Hj. Adiba Arief, MP. yang telah menjadi pembimbing akademik sejak semester pertama, terima kasih atas bimbingan dan perhatiannya.

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada pihak yang telah membantu selama proses penyusunan skripsi ini, yaitu:

1. Ibu Dr. Hj. Nursia La Nafie, M.Sc. dan Ibu Prof. Dr. Nunuk Hariani Soekamto, MS. sebagai ketua dan sekretaris Jurusan Kimia serta Bapak/Ibu dosen dan pegawai Jurusan Kimia FMIPA UNHAS.

2. Prof. Dr. M. Syahrul, M.Agr., Dra. Hj. Hasnah Natsir, M.Si., Prof. Dr. Hanapi Usman, MS., Dr. M. Natsir Djide, MS. Apt., Drs. Federyk W. Mandey, M.Sc., Drs. H. L. Musa Ramang, M.Si. dan Dr. Muhammad Zakir, M.Si. sebagai tim penguji. Terima kasih atas segala masukannya.
3. Teman-teman penelitian di Laboratorium Kimia Organik: Noraini Bt. Cabuslay, Esran Rande Salu, Seriwanta Agustinus, Rimayanti, Makmun, Musdalifah dan Rahma, terima kasih atas segala bantuannya selama dalam penelitian.
4. Teman-teman terbaik di kelompok PA "EREZ": Elson Impa, Yohanes Tikuali, Jean Loto P., Yulius B., dan Crisandi. Terima kasih atas setiap kebenaran Firman Tuhan, doa dan motivasi buat penulis. Kehadiran kalian menjadikan hidup ini lebih berarti.
5. Teman-teman sepelayanan di GMKI Komisariat FMIPA UNHAS dan PMKO Filadelfia FMIPA_FARMASI UNHAS, yang tetap setia dalam pelayanan dan setiap doa buat penulis, semoga pelayanan yang kita lakukan dapat berkenan dihadapan Tuhan.
6. Teman-teman Kimia '03: Satriadi, M. Sahib, M. Sul kifli, Amalia Patabang, Sriyati Pala'langan, Arjuna, A. Saidah P. I. L., Lisy a Pebrianti Syam, Asrianti, Fitriana, Wa Ode Auliah, Dahlia, Echa, Patimah, Wa Ode Nurmila, Noor Asdiana Asri, Astina T., Astri, Yulianti P., Anna, Umi kalsum, Dian S., Selpa, dan Rina. Terima kasih untuk setiap kebersamaannya selama ini, walaupun kita berbeda tetapi tetap satu.
7. Buat saudara dan teman yang selalu memberi bantuan: Nona, Ratna, Megawati, Desy Ratna S., Dian Sari, Surianti, Astrit, Intan, Lia dan

Septrianingsih. Anugerah terindah dari kalian adalah hidup ini lebih berwarna karena kehadiran kalian.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih sangat jauh dari kesempurnaan, oleh sebab itu penulis mengharapkan kritik dan saran dari Bapak/Ibu, saudara(i) yang meluangkan waktu untuk membaca karya ini. Akhir kata semoga apa yang telah penulis kerjakan dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan dan setiap orang yang membutuhkan karya ini.

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian identifikasi senyawa metabolit sekunder dalam fraksi kloroform pada kulit batang *Cryptocarya acuminata* yang berasal dari Malili, Kabupaten Luwu Timur, Sulawesi Selatan. Sampel dimaserasi dengan kloroform, disaring kemudian dievaporasi. Pemisahan dan pemurnian dilakukan dengan kromatografi kolom dan rekristalisasi. Kemudian diidentifikasi berdasarkan uji warna Liebermann-Burchard. Pengujian daya hambat terhadap bakteri *Escherichia coli* dilakukan dengan metode difusi agar pada medium MHA (Muller Hilton Agar). Dari data menunjukkan bahwa metabolit sekunder yang terdapat pada fraksi kloroform dalam *Cryptocarya acuminata* merupakan golongan senyawa terpenoida yaitu fraksi D₇, D₈, D₉, yang diduga dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

Kata kunci : *Cryptocarya acuminata*, Terpenoida, Kromatografi, *Escherichia coli*.

ABSTRACT

The investigation on group of secondary metabolite compound in chloroform fraction at steam bark of *Cryptocarya acuminata* from Malili, East Luwu regency of South Sulawesi was carried out. Sample was macerated by chloroform, refined and then evaporated. Separation and purification were done by column chromatography and recrystallization. The result further were identified by Liebermann-Buchard. The inhibition test was conducted by a layered gel diffusion method in a medium of MHA (Muller Hilton Agar). The result showed that secondary metabolite in chloroform fraction of *Cryptocarya acuminata* were terpenoids compound is fraction of D₇, D₈, d₉, that have a potency to be inhibited the growth of *Escherichia coli*.

Key words: *Cryptocarya acuminata*, Terpenoid, Chromatography, *Escherichia coli*.

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN.....	xvii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1 Maksud Penelitian.....	3
1.3.2 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Tinjauan Umum Famili Lauraceae.....	5
2.2 Tinjauan Umum Genus <i>Cryptocarya</i>	6
2.3 Tinjauan Umum Tumbuhan <i>Cryptocarya acuminata</i>	8
2.4 Tinjauan Umum Tentang Antimikroba.....	9
2.5 Tinjauan Umum Bakteri <i>Escherichia coli</i>	11
2.6 Metode Isolasi Bahan Alam.....	13

2.6.1 Perlakuan Tumbuhan.....	13
2.6.2 Metode Ekstraksi Bahan Alam.....	13
2.6.3 Isolasi.....	14
2.6.4 Uji Kemurnian.....	15
2.6.5 Pengujian Secara Mikrobiologi.....	15
BAB III METODE PENELITIAN.....	17
3.1 Bahan Penelitian.....	17
3.2 Alat Penelitian.....	17
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian.....	17
3.4 Perlakuan dan Rancangan Penelitian.....	18
3.4.1 Pengumpulan Bahan Tumbuhan.....	18
3.4.2 Ekstraksi.....	18
3.4.3 Isolasi.....	18
3.4.4 Uji Golongan Senyawa.....	18
3.5 Pengujian Aktivitas Mikroba.....	19
3.5.1 Pembuatan Medium.....	19
3.5.2 Pembuatan Larutan Kontrol.....	20
3.5.3 Penyiapan Bakteri Uji.....	20
3.5.4 Uji Antibakteri.....	21
3.6 Pengamatan.....	21
3.6.1 Fraksinasi.....	21
3.6.2 Analisis KLT.....	22
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	23
4.1 Ekstraksi.....	23

4.2 Proses Isolasi.....	23
4.3 Uji Golongan Senyawa.....	27
4.4 Uji Bioaktivitas.....	28
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	32
5.1 Kesimpulan.....	32
5.2 Saran.....	32
DAFTAR PUSTAKA.....	33
LAMPIRAN.....	36

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Berat fraksi-fraksi kloroform.....	24
2. Berat fraksi-fraksi D.....	26
3. Hasil uji golongan senyawa fraksi D ₄ – D ₉ dan senyawa fraksi C	27
4. Hasil pengukuran bioaktivitas fraksi D ₄ – D ₉ dan senyawa fraksi C dengan konsentrasi 5% terhadap bakteri <i>E. coli</i>	29
5. Hasil pengukuran bioaktivitas fraksi D ₉ dengan konsentrasi 15% terhadap bakteri <i>E. coli</i>	31

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Morfologi tumbuhan <i>Cryptocarya acuminata</i>	9
2. Morfologi bakteri <i>Escherichia coli</i>	12
3. Kromatogram senyawa fraksi C.....	25
4. Kromatogram hasil rekristalisasi fraksi utama D.....	25
5. Diameter hambatan fraksi D ₄ – D ₉ dan senyawa fraksi C terhadap bakteri <i>E. coli</i> dengan konsentrasi 5% pada masa inkubasi 24 jam dan 48 jam.....	30
6. Diameter hambatan fraksi D ₉ terhadap bakteri <i>E. coli</i> dengan konsentrasi 15% pada masa inkubasi 48 jam.....	31

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Bagan isolasi senyawa metabolit sekunder fraksi kloroform.....	36
2. Bagan kerja fraksi D.....	37
3a. Kromatogram hasil maserasi metanol.....	38
3b. Kromatogram hasil partisi kloroform.....	38
4a. Kromatogram eluen yang sesuai untuk ekstrak kloroform.....	39
4b. Kromatogram hasil fraksinasi ekstrak kloroform.....	39
5a. Kromatogram eluen yang sesuai untuk fraksi D.....	40
5b. Kromatogram hasil fraksinasi fraksi D.....	40
6. Bagan kerja uji antibakteri.....	41
7. Bagan kerja uji senyawa alkaloid.....	42
8. Bagan kerja uji senyawa terpenoid, steroid, fenolik dan flavonoid...	43
9a. Foto hasil uji daya hambat fraksi D ₄ – D ₉ dan senyawa fraksi C dengan konsentrasi 5% pada masa inkubasi 24 jam.....	44
9b. Foto hasil uji daya hambat fraksi D ₄ – D ₉ dan senyawa fraksi C dengan konsentrasi 5% pada masa inkubasi 48 jam.....	45
10a. Foto hasil uji daya hambat fraksi D ₉ dengan konsentrasi 5% pada masa inkubasi 24 jam.....	46
10b. Foto hasil uji daya hambat fraksi D ₉ dengan konsentrasi 5% pada masa inkubasi 48 jam.....	47
11a. Hasil pengukuran diameter hambatan fraksi D ₄ – D ₉ dan senyawa fraksi C dengan konsentrasi 5% pada masa inkubasi 24 jam.....	48

11b. Hasil pengukuran diameter hambatan fraksi D ₄ – D ₉ dan senyawa fraksi C dengan konsentrasi 5% pada masa inkubasi 48 jam.....	49
12a. Hasil pengukuran diameter hambatan fraksi D ₉ dengan konsentrasi 5% pada masa inkubasi 24 jam.....	50
12b. Hasil pengukuran diameter hambatan fraksi D ₉ dengan konsentrasi 5% pada masa inkubasi 48 jam.....	50



DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

μm	=	Mikrometer
nm	=	Nanometer
mm	=	Milimeter
cm	=	Sentimeter
mg	=	Miligram
g	=	Gram
kg	=	Kilogram
ppm	=	Part Per Million
mL	=	Mililiter
atm	=	Atmosfer
R _f	=	Ratio Force
°C	=	Derajat Celcius
%	=	Persen

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Berbagai senyawa kimia yang dihasilkan oleh organisme bukan secara kebetulan dan tidak tanpa tujuan, melainkan diciptakan secara teratur dan bermakna bagi kelangsungan hidup organisme di muka bumi ini. Keanekaragaman molekul organik bahan alam sesungguhnya menyimpan sejuta misteri yang harus dapat diungkap melalui penelitian dan kajian mendalam. Meskipun upaya untuk mencari, mengembangkan dan memanfaatkan senyawa kimia organik bahan alam telah menjadi tradisi ilmiah yang cukup panjang, dan telah dirintis sejak abad ke 17, namun hingga saat ini hasil penelitian di bidang kimia organik bahan alam masih minim jika dibandingkan dengan melimpahnya keanekaragaman hayati.

Dunia mengakui bahwa Indonesia memiliki tingkat keragaman hayati (biodiversity) yang sukar ditandingi. Kekayaan alam yang sangat melimpah sehingga dari dulu Indonesia dikenal sebagai *spice island* (negeri rempah-rempah, yang terdiri dari cengkeh, lada, pala, jahe, kayu manis, kunyit, dan sebagainya). Hutan tropis Indonesia yang sangat luas (hampir 45% wilayah Indonesia terdiri dari hutan) membuat Multatuli (penulis buku Max Havelaer) menjulukinya sebagai zamrud khatulistiwa (*gordel van smaragand*" dalam bahasa Belanda). Bahkan para astronot yang terbang melintasi orbit ekuator mengakui keindahan warna hijau hutan-hutan Indonesia (Kiansantang, 2006).

Tumbuh-tumbuhan tropika mampu hidup pada lingkungan yang keras, baik faktor lingkungan yang keras, faktor iklim maupun gangguan dari herbivora, serangga, dan hama penyakit. Oleh karena itu, tumbuhan tropika mampu merekayasa beranekaragam senyawa kimia dengan bioaktivitas yang menarik untuk mempertahankan diri dari ancaman lingkungan. Banyak diantara senyawa-senyawa kimia tersebut sangat potensial sebagai rujukan (leads compounds) untuk mengembangkan bahan-bahan kimia yang berguna dalam berbagai bidang, antara lain dapat digunakan sebagai bahan obat atau perangkat biokimia, farmakologi, dan fisiologi dalam penelitian biomedis (Achmad, 2004).

Salah satu tumbuhan yang cukup besar adalah familia Lauraceae. Tumbuh-tumbuhan yang termasuk familia Lauraceae banyak digunakan dalam bidang pengobatan seperti anti inflamasi, anti hipertensi, antimikrobal dan anti viral (Collins dkk dalam Achmad, 2004). Selain itu, Lauraceae juga digunakan sebagai bahan rempah-rempah, dan bahan bangunan. Spesies yang paling banyak dikenal dari familia Lauraceae antara lain pohon salam atau *Laurus*, kayu manis atau *Cinnamomum*, alpokat atau *Persea*, dan *Sassafras* (Chanderbali dkk, 2001).

Cryptocarya adalah salah satu genus dari familia Lauraceae yang tumbuh di daerah tropika dengan topologi berupa pohon tinggi. Oleh karena itu, sejak dahulu kelompok tumbuhan ini banyak digunakan sebagai bahan bangunan dan bahan baku mebel (Konstermans dalam Usman, 2006). Beberapa penelitian yang dilakukan telah mengungkapkan bahwa *Cryptocarya* mengandung senyawa kimia yang dapat berguna dalam bidang pengobatan, antara lain sebagai obat diare dan obat untuk iritasi kulit (Mbambezeli, 2005).

Cryptocarya acuminata adalah jenis *Cryptocarya* yang ditemukan di kawasan hutan Sulawesi, wilayah Wallaceae. Dari pendekatan etnobotani didapatkan bahwa *Cryptocarya acuminata* banyak digunakan sebagai obat tradisional seperti pengobatan penyakit diare (Mbambezi, 2005). Berdasarkan literatur spesies ini ini belum ditemukan di kawasan lain, kandungan kimianya pun belum pernah dilaporkan. Oleh karena itu peluang untuk melakukan penelitian mengenai tumbuhan *Cryptocarya acuminata* terbuka luas.

1.2 Rumusan Masalah

Cryptocarya acuminata merupakan tumbuhan primitif yang hanya tumbuh di kawasan Timur Indonesia, terutama di Sulawesi Selatan dan belum pernah diteliti kandungan kimianya, diduga tumbuhan ini mengandung molekul-molekul kimia yang berguna. Bagaimana senyawa kimia pada kulit batang *Cryptocarya acuminata* tersebut?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder yang ada pada kulit batang tumbuhan *Cryptocarya acuminata* dari wilayah Sulawesi Selatan.

1.3.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan menguji bioktivitas golongan senyawa metabolit sekunder yang ada pada kulit batang tumbuhan *Cryptocarya acuminata* dari wilayah Sulawesi Selatan dengan pelarut klorofom.

1.4 Manfaat Penelitian

Diharapkan penelitian ini dapat memberikan gambaran mengenai kandungan senyawa kimia dari kulit batang tumbuhan *Cryptocarya acuminata* dari Sulawesi Selatan dan memberikan kontribusi terhadap pengembangan ilmu kimia khususnya kimia organik bahan alam.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum Familia Lauraceae

Lauraceae adalah salah satu familia tumbuhan yang paling primitif dari kelompok tumbuhan Angiospermeae (Achmad, 2004). Tumbuhan ini termasuk kelompok tumbuhan berbunga yang memiliki sekitar 55 genus dan lebih dari 2000 spesies. Lauraceae lebih banyak tumbuh di daerah panas atau tropis pada belahan bumi bagian utara dan selatan, termasuk kepulauan Makronesia, Madagaskar, Cili bagian tengah, dan Brasil (Anonim, 2005).

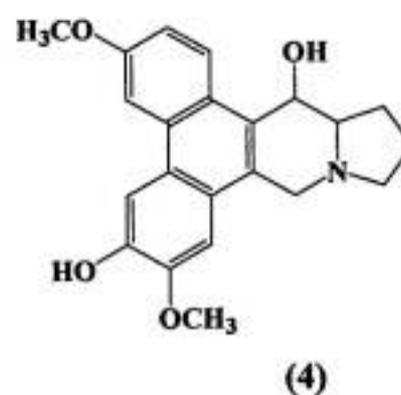
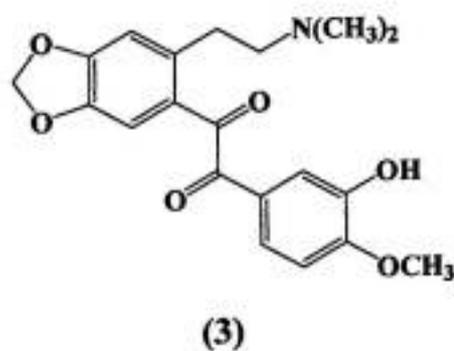
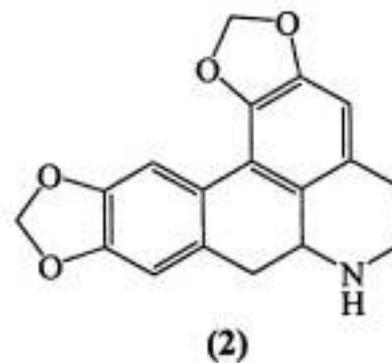
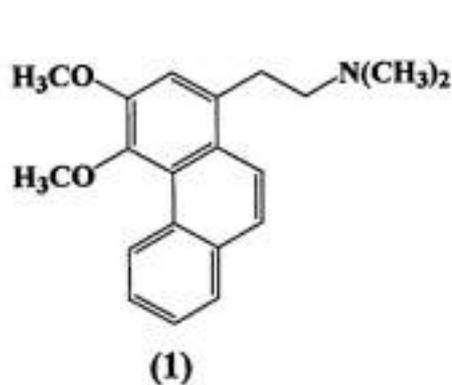
Menurut Lin dkk (2007), beberapa spesies Lauraceae memperlihatkan berbagai aktivitas farmakologi, seperti ekstrak *Litsea akoensis* dan ekstrak *Cryptocarya concina* menunjukkan aktivitas anti inflamasi. Berdasarkan uji sitotoksisitas, ekstrak *Lindera aggregate* dan *Cryptocarya concina* menunjukkan sifat sitotoksik *in vitro* terhadap Human Umbilical Vein Endothelial Cell Line (HUVEC) dan ekstrak *Phoebe formosanae* menunjukkan sifat sitotoksik terhadap Human Leukemia Cell Line (HL-60). Selain itu, beberapa spesies lain juga menunjukkan aktivitas farmakologi antara lain anti hipertensi, anti mikrobial, dan anti viral (Collins dkk dalam Achmad, 2004).

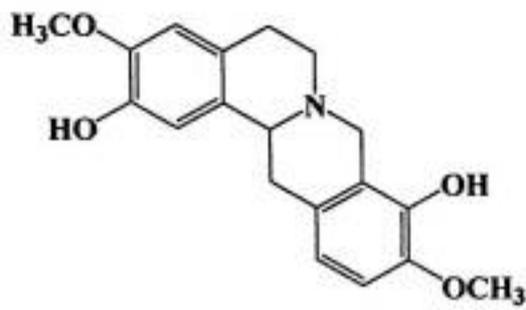
Lauraceae juga merupakan tumbuhan yang kaya akan kandungan metabolit sekunder. Senyawa alkaloid yang ditemukan pada familia Lauraceae antara lain kriptoleurospermin, proaporfin, protoberberin, dan fenantrokuinolidin, sedangkan senyawa non alkaloid yang telah diisolasi antara

lain flavan 3,4-diol, 5,7-dihidroksi-flavanon, δ -dihidrokadinen, dan Bis-(2-etilheksil)-ftalat (Gozler dalam Usman, 2006).

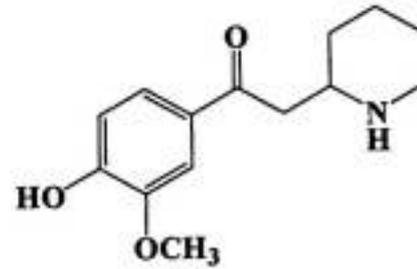
2.2 Tinjauan Umum Genus *Cryptocarya*

Cryptocarya merupakan genus dari familia Lauraceae. *Cryptocarya* memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder yang bervariasi jika dibandingkan dengan tumbuhan familia Lauraceae lainnya. Beberapa senyawa alkaloida yang telah disolasi dari spesies *Cryptocarya* seperti ateromidin (1) dan kriptodorin (2) ditemukan pada *Cryptocarya odorta*. Sedangkan kriptopleurospermin (3), tiloporin (4), skolaratin (5), dan pleurospermin (6) ditemukan pada *Cryptocarya pleurosperma* (Gellert dalam Usman, 2006). Pada tumbuhan yang sama, Collins dkk (1990) menemukan kriptopleuridin (7).

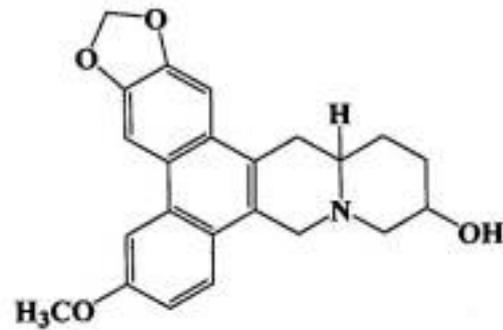




(5)

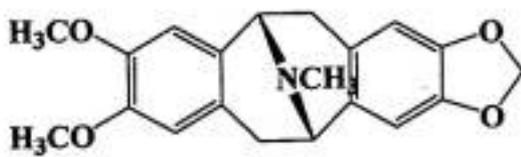


(6)



(7)

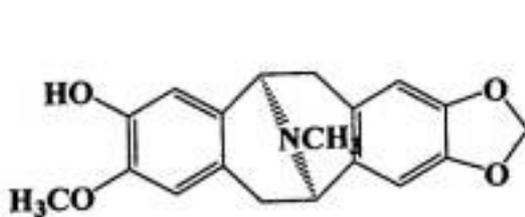
Pavin adalah jenis alkaloida yang banyak ditemukan dalam *Cryptocarya* (Lin dkk, 2001) diantaranya (-)-eskolsidin (8), (-)-krisin (9), (+)-kariasin (10), dan (-)-neokariasin (11) yang ditemukan pada *Cryptocarya chinensis*



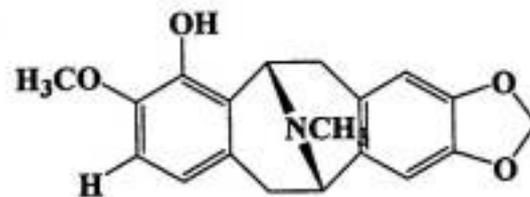
(8)



(9)

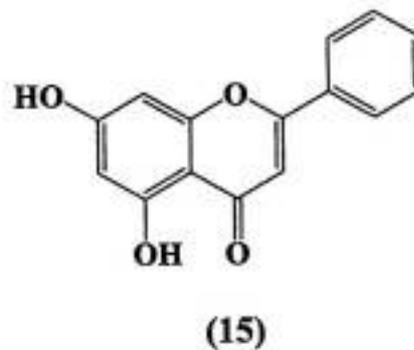
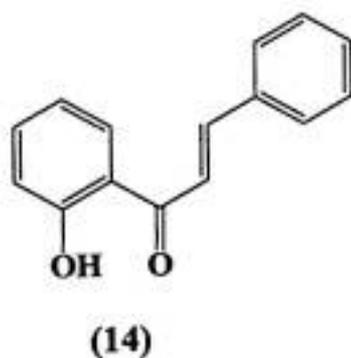
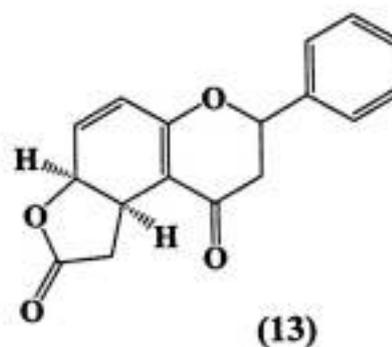
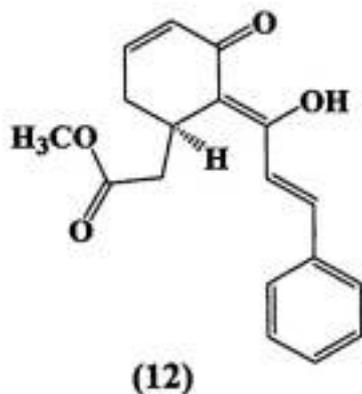


(10)



(11)

Selain senyawa-senyawa alkaloida yang telah ditemukan dari genus *Cryptocarya*, juga telah diisolasi beberapa senyawa flavonoida, antara lain infektokaryon (12) dan kriptocaryon (13) yang diisolasi dari *Cryptocarya infectorya* (Dumontet dkk, 2001). Sementara dari *Cryptocarya ferrea* BI (Achmad dkk, 1994) telah ditemukan senyawa 2'-dihidrosicalkon (14) dan 5,7-dihidroflavanon (15).



2.3 Tinjauan Umum Tumbuhan *Cryptocarya acuminata*

Menurut Juliawaty dalam Usman dkk (2006) bahwa *Cryptocarya acuminata* merupakan salah satu tumbuhan primitif dan langka yang terdapat di kawasan hutan Sulawesi. *Cryptocarya acuminata* dalam bahasa Bugis disebut Tarusu dan dalam bahasa Makassar disebut Garate Borong. Berdasarkan penelusuran literatur diketahui bahwa *Cryptocarya acuminata* belum banyak dieksplorasi kandungan kimianya.



Gambar 1. Morfologi tumbuhan *Cryptocarya acuminata*.

Klasifikasi tumbuhan *Cryptocarya acuminata* yaitu:

Divisi	: Spermatophyta
Sub. Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledon
Ordo	: Rosales
Familia	: Lauraceae
Genus	: <i>Cryptocarya</i>
Spesies	: <i>Cryptocarya acuminata</i>

2.4 Tinjauan Umum Tentang Antimikroba

Antimikroba adalah bahan atau obat yang digunakan untuk memberantas infeksi oleh mikroorganisme pada manusia (Djide dan Sartini, 2008). Antimikroba dapat berupa senyawa kimia sintetik atau produk alami. Antimikroba sintetik dapat dihasilkan dengan membuat suatu senyawa yang sifatnya mirip dengan aslinya yang dibuat secara besar-besaran, sedangkan yang alami

didapatkan langsung dari organisme yang menghasilkan senyawa tersebut dengan melakukan proses isolasi (Setyaningsih, 2004).

Senyawa antibakteri sebagai salah satu bahan antimikroba memiliki tiga macam bentuk kerja (Brock dan Madigan, 1994), yaitu:

1. Bakteriostatik. Senyawa antibakteri yang bersifat bakteriostatik hanya menghambat pertumbuhan bakteri tetapi tidak menyebabkan kematian.
2. Bakterisidal. Mekanisme kerja bakterisidal adalah mencegah pertumbuhan dan menyebabkan kematian, namun tidak menyebabkan sel bakteri menjadi lisis.
3. Bakterilitik. Mekanisme kerja bakterilitik adalah dengan cara membuat lisis sel-sel bakteri. Proses lisisnya sel bakteri terlihat dari penurunan jumlah sel ataupun kekeruhan setelah bahan tersebut ditambahkan.

Kerja senyawa bakteri dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain konsentrasi senyawa antibakteri yang digunakan, jumlah dan spesies bakteri, suhu, keberadaan bahan organik lain, dan pH (Pelczar dan Chan, 1988). Beberapa contoh senyawa yang mempunyai aktivitas antibakteri adalah penisilin, cephalosporin, tertrasiklin, kloramfenikol, aminoglikosida, dan sulfonamida (Greenwood, dkk., 1992).

Keefektifan penghambatan merupakan salah satu kriteria pemilihan suatu senyawa antimikroba untuk diaplikasikan sebagai bahan pengawet bahan pangan. Semakin kuat penghambatannya semakin efektif digunakan. Mekanisme penghambatan mikroorganisme oleh senyawa antimikroba dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain gangguan pada senyawa penyusun dinding sel, peningkatan permeabilitas membran sel yang dapat menyebabkan kehilangan

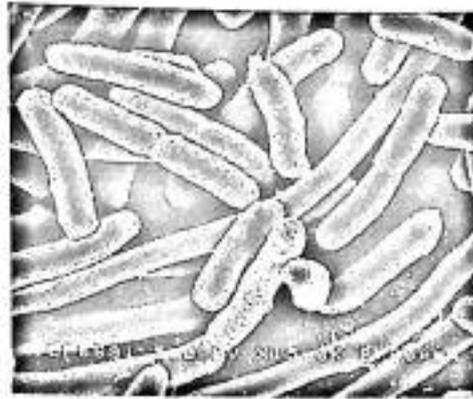
komponen penyusun sel, menginaktivasi enzim, dan destruksi atau kerusakan fungsi material genetik (Ardiansyah, 2007).

Suatu antimikroba yang ideal mempunyai sifat-sifat antara lain (Sulistia, 1995):

1. Mampu menghambat atau membunuh patogen tanpa merusak inangnya.
2. Bersifat bakterisida dan bukan bakteriostatik.
3. Tidak menyebabkan resistensi kuman dan mempunyai daya kerja yang berspektrum luas.
4. Tidak bersifat alergik atau menimbulkan efek samping bila dipergunakan dalam jangka waktu lama.
5. Tetap aktif dalam plasma, cairan badan atau eksudat.
6. Larut dalam air serta stabil.

2.5 Tinjauan Umum Bakteri *Escherichia coli*

Escherichia coli adalah bakteri gram negatif berbentuk batang lurus, dengan ukuran $0,4 - 0,7 \mu\text{m}$ kali $2 - 4 \mu\text{m}$ dan kadang-kadang lebih pendek membentuk rantai. Tumbuh optimal pada suhu 37°C . Bakteri ini merupakan penghuni flora usus manusia dan hewan berdarah panas yang pada kondisi tidak menguntungkan populasinya dapat meningkat sehingga dapat bersifat patogen.



Gambar 2. Morfologi bakteri *Escherichia coli*.

Strain *Escherichia coli* mempunyai mekanisme virulensi dari banyak tipe. Beberapa strain menghasilkan sitotoksin yang menghancurkan sel-sel epitel dan sel-sel darah. Strain-strain tertentu menghasilkan sitotoksin yang mempengaruhi sel-sel vero (diuji di Afrika pada sel-sel ginjal monyet). Sejak tahun 1940-an strain *Escherichia coli* diketahui dapat menyebabkan diare. Infeksi lain yang disebabkan oleh *Escherichia coli* adalah infeksi saluran kencing dan ginjal pada manusia (Mahon dan Manuselis, 1995).

Klasifikasi bakteri *Escherichia coli* (Escherich, 1985):

Kingdom : Procaryotae
Phylum : Proteobacteria
Classis : Gammaproteobacteria
Ordo : Enterobacteriales
Familia : Enterobacteriaceae
Genus : *Escherichia*
Species : *Escherichia coli*

2.6 Metode Isolasi Bahan Alam

2.6.1 Perlakuan Tumbuhan

Langkah-langkah dalam perlakuan tumbuhan adalah pemilihan tumbuhan, pengambilan sampel dan pengeringan sampel. Menurut Harbone (1987) ada tiga cara pemilihan tumbuhan yaitu:

- a. Pendekatan etnobotani yang didasarkan pada pengetahuan dan kebiasaan masyarakat tradisional dalam memanfaatkan tumbuhan untuk mengobati penyakit tertentu.
- b. Pendekatan filogenetik yang didasarkan pada hubungan kekerabatan tumbuhan yang diketahui mempunyai jenis-jenis bahan kimia tertentu.
- c. Pendekatan kemotaksonomi yang didasarkan pada struktur senyawa kimia yang lazim ditemukan pada tumbuhan yang berkerabat dekat dengan tumbuhan akan diteliti.

2.6.2 Metode Ekstraksi Bahan Alam

Ekstraksi merupakan suatu metode pemisahan dimana prinsip kerjanya yaitu perpindahan suatu zat dari lapisan zat satu ke lapisan zat yang kedua, jika lapisan adalah cairan yang tidak saling bercampur, metode ini dikenal dengan ekstraksi cair-cair (Zenta dan Kumanireng, 2003)

Jenis ekstraksi yang umum digunakan dalam isolasi suatu bahan alam adalah ekstraksi panas, antara lain secara sokletasi dan ekstraksi dingin, misalnya yang dilakukan secara maserasi (Hardborne, 1987).

Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruangan. Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperlihatkan

kelarutan senyawa metabolit sekunder dalam pelarut yang digunakan. Secara umum pelarut metanol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam, karena dapat melarutkan seluruh golongan metabolit sekunder (Harborne, 1987).

2.6.3 Isolasi

Isolasi adalah proses pemisahan komponen kimia yang terdapat dalam suatu ekstrak. Pemisahan ini didasarkan atas sifat adsorpsi dan partisi dari setiap senyawa yang dipisahkan terhadap adsorben dengan menggunakan cairan tertentu. Isolasi biasanya dilakukan dengan cara kromatografi. Isolasi dan pemurnian dapat dilakukan dengan kromatografi lapis tipis atau kromatografi kertas preparatif dengan pengembangan yang dapat memisahkan komponen paling baik.

Kromatografi lapis tipis adalah suatu teknik pemisahan komponen campuran senyawa-senyawa yang melibatkan partisi suatu senyawa di antara padatan penjerap (adsorben/fasa diam) yang dilapiskan pada plat kaca atau plastik kaku dengan suatu pelarut (fasa gerak) yang mengalir melewati adsorben (Zenta dan Kumanireng, 2003).

Untuk proses fraksinasi, digunakan cara kromatografi yaitu kromatografi kolom, antara lain :

- a. Kromatografi kolom vakum (KKV)
- b. Kromatografi kolom gravitasi (KKG)
- c. Kromatografi kolom tekan (KKT).

2.6.4 Uji Kemurnian

Uji kemurnian dilakukan dengan mengukur titik leleh suatu kristal. Titik leleh suatu zat murni adalah temperature di mana fase cair dan fase padat senyawa tersebut ada dalam keadaan berkesetimbangan pada tekanan 1 atm. Kristal dapat dikatakan murni bila kristal meleleh dalam range suhu 1-2 °C.

Titik leleh mencerminkan ukuran kekuatan tarik-menarik antara molekul-molekul. Semakin tinggi titik leleh, semakin kuat tarik-menarik antar molekul. Titik leleh suatu senyawa murni ditentukan dengan mengamati temperatur dimana terjadi perubahan padat menjadi cair (Zenta dan Kumanireng, 2003).

2.6.5 Pengujian Secara Mikrobiologis

Pengujian secara mikrobiologis dapat dilakukan dengan dua cara (Depkes RI, 1995) yaitu:

1. Metode difusi agar

Pada metode ini kemampuan antimikroba ditentukan berdasarkan hambatan yang terjadi. Beberapa modifikasi dari metode ini adalah:

a. Cara difusi dengan silinder pipih

Cara ini didasarkan atas perbandingan antara luas daerah hambatan yang dibentuk larutan contoh terhadap pertumbuhan mikroba dengan daerah hambatan yang terjadi pada larutan pembanding.

b. Cara difusi dengan mangkuk pipih

Cara ini sama dengan silinder pipih, namun perbedaannya adalah disini menggunakan alat berupa "Cup Plate" yaitu lubang atau semacam mangkuk yang dibuat langsung pada medium.

c. Cara difusi dengan kertas saring

Cara ini menggunakan kertas saring yang dibuat dengan bentuk dan ukuran tertentu, biasanya berbentuk bulat dengan garis tengah 0,1 – 0,7 cm, yang nantinya akan dicelupkan pada larutan contoh dan larutan pembanding, kemudian kertas saring tersebut dikeringkan dan diletakkan di atas medium agar yang telah ditanami mikroba uji. Pengamatan dilakukan setelah waktu inkubasi dengan melihat daerah hambatannya.

d. Cara difusi Kirby-Bauer

Cara ini menggunakan alat untuk meletakkan kertas saring dan cawan petri yang digunakan berukuran 150 x 15 mm, sehingga langsung dapat diuji dengan berbagai konsentrasi larutan contoh.

e. Cara difusi agar berlapis

Cara ini merupakan modifikasi cara Kirby-Bauer. Perbedaannya pada cara ini menggunakan dua lapis agar. Lapisan pertama “based layer” tidak mengandung mikroba sedangkan lapisan kedua “seed layer” mengandung mikroba.

2. Metode dilusi (pengenceran)

Metode ini menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap, baik dengan media cair atau padat. Potensi antimikroba dapat dapat diketahui dengan melihat kekeruhan yang terjadi akibat pertumbuhan bakteri uji pada konsentrasi tertentu. Kekurangan dari cara ini adalah prosedurnya lebih panjang dan jenis antibiotik yang digunakan terbatas.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain serbuk kulit batang *Cryptocarya acuminata*, larutan metanol teknis, n-heksana teknis, etil asetat teknis, aseton teknis, kloroform p.a., larutan NaCl, silika gel 60 (7733), silika gel 60 (7734), silika gel 60 (7731), plat KLT, dan $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 2 % dalam H_2SO_4 2 N, biakan murni bakteri *Escherichia coli*, medium NA (Nutrient Agar), medium MHA (Muller Hinton Agar), DMSO (Dimetil Sulfoksida), tetrasiklin dan kapas.

3.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain alat gelas yang umum digunakan di dalam laboratorium, rotary evaporator, timbangan digital, perangkat destilasi Vigreux, kromatografi kolom vakum, kromatografi kolom tekan, kromatografi kolom gravitasi, alat KLT (camber, pipa kapiler, pensil, cutter, dan mistar), autoklaf, jangka sorong, ose, spoit, bunsen, paper disc, cawan petri, inkubator, lampu UV Varian Conc 100.

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini mulai dilaksanakan pada bulan Juni – Oktober 2008, di Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam, dan di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin .

3.4 Perlakuan dan Rancangan Penelitian

3.4.1 Pengumpulan Bahan Tumbuhan

Kulit batang *Cryptocarya acuminata* diperoleh dari Desa Puncak Indah, Kecamatan Malili, Kabupaten Luwu Utara. Spesimen tumbuhan diidentifikasi oleh Herbarium Bogoriensis, LIPI Bogor.

3.4.2 Ekstraksi

Pada penelitian ini kulit batang tumbuhan dalam bentuk serbuk diekstrak kering dengan menggunakan cara maserasi yaitu sampel direndam dalam pelarut metanol selama 3x24 jam kemudian dipartisi dengan pelarut n-heksana dan kemudian kloroform. Ekstrak kloroform lalu dikurangi pelarutnya menggunakan rotary evaporator kemudian dilihat komponennya dengan kromatografi lapis tipis.

3.4.3 Isolasi

Pada fraksi-fraksi hasil partisi akan dilakukan proses pemisahan dengan menggunakan alat kromatografi yaitu KKV, dan KKT dengan pelarut yang bervariasi. Setiap hasil dari pemisahan akan dimonitor dengan analisis KLT.

3.4.4 Uji Golongan Senyawa

Metode identifikasi senyawa metabolit sekunder sebagai berikut:

a. Senyawa Alkaloid

Uji senyawa alkaloid menggunakan pereaksi Mayer. Pereaksi Mayer dibuat dengan melarutkan 0,2 gram $HgCl_2$ dengan 6 mL aquades dan KI sebanyak 0,5 gram dilarutkan dalam 1 mL aquades. Kedua larutan tersebut dicampur. Cara kerja uji alkaloid, yaitu: sampel dilarutkan dengan asam klorida

0,1 N kemudian dimaserasi selama 2 jam. Hasil maserasi tersebut ditambahkan 2-3 tetes pereaksi meyer. Adanya warna kuning menandakan positif alkaloid.

b. Senyawa Terpenoid, steroid, fenolik dan flavonoid

Sampel dikocok kuat dengan kloroform lalu ditambahkan aquades, biarkan sampai terbentuk dua lapisan.

1. Lapisan kloroform

Diteteskan pada plat tetes dan biarkan kering, tambahkan beberapa tetes asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat (pereaksi Liebermann Burchard). Terbentuknya warna merah atau pink menandakan positif untuk senyawa terpenoid dan terbentuknya warna biru atau hijau positif untuk steroid.

2. Lapisan air

- a. Sebanyak 5 tetes ditempatkan dalam tabung reaksi ditambahkan besi (III) klorida, jika timbul warna hijau sampai ungu menandakan positif fenolik.
- b. Sebanyak 5 tetes ditempatkan dalam tabung reaksi, ditambahkan asam klorida pekat dan serbuk magnesium, jika timbul warna merah menunjukkan adanya flavonoid.

3.5 Pengujian Aktivitas Mikroba

3.5.1 Pembuatan Medium

A. Pembuatan Medium NA (Nutrien Agar)

Komposisi medium NA (nutrient agar) yaitu ekstrak daging 3 gram, pepton 5 gram, dan agar-agar 15 gram. Cara membuatnya yaitu bahan ditimbang sebanyak yang dibutuhkan kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan

dilarutkan dengan aquades. Setelah larut, medium tersebut diatur pH-nya hingga 7,0 kemudian disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 2 atm.

B. Pembuatan Medium MHA (Muller Hinton Agar)

Komposisi medium MHA (Muller Hinton Agar) yaitu meat infusio 300 gram, casein hidrolisat 17,5 gram, starch 1,5 gram dan agar-agar 17 gram. Cara membuatnya yaitu bahan ditimbang sebanyak yang dibutuhkan, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan aquades. Setelah larut, medium diatur pH-nya hingga 7,0 kemudian disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 2 atm.

3.5.2 Pembuatan Larutan Kontrol

A. Larutan Kontrol Positif

Kontrol positif yang digunakan adalah tetrasiklin dengan konsentrasi 500 ppm.

B. Larutan Kontrol Negatif

Larutan kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO (Dimetil Sulfoksida)

3.5.3 Penyiapan Bakteri Uji

A. Peremajaan Bakteri Uji

Bakteri *Escherichia coli* yang berasal dari biakan murni, diambil sebanyak 1 ose lalu digores pada medium NA (nutrien agar) miring kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 x 24 jam.

B. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Bakteri yang telah diremajakan, diambil 1 ose lalu disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,9% kemudian dihomogenkan dan diukur kekeruhannya.

3.5.4 Uji Antibakteri

Pengujian daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri (*Escherichia coli*) dilakukan dengan metode difusi agar yang menggunakan paper disc. Medium MHA (Muller Hinton Agar) steril yang telah dihomogenkan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL suspensi bakteri uji, dikocok hingga homogen lalu dituang ke dalam cawan petri dan dibiarkan hingga membeku. Sementara itu, sampel uji sebanyak 20 μ L dipipet diatas permukaan paper disc hingga semuanya meresap dan dibiarkan sampai kering. Setelah kering paper disc yang telah berisi sampel uji diletakkan di atas medium MHA yang telah ditanami bakteri uji. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam dan 48 jam. Daya hambat dari tiap fraksi terhadap bakteri uji diamati dan diukur diameter zona hambatannya dalam satuan millimeter.

3.6 Pengamatan

3.6.1 Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan dua macam kromatografi kolom yaitu KKV dan KKT, dengan menggunakan eluen yang bervariasi. Hasil fraksinasi dianalisis dengan KLT menggunakan eluen yang sesuai agar dapat menggabungkan fraksi-fraksi yang sama.

3.6.2 Analisis KLT

Analisis dengan KLT dilakukan menggunakan berbagai variasi pelarut. sampel ditotolkan pada plat KLT yang memiliki silika gel sebagai adsorben lalu dimasukkan ke dalam tabung yang berisi eluen. Noda dari hasil totolan pada *base line* bergerak berdasarkan perbedaan kepolaran dan dihasilkan noda-noda. Sistem ini dilakukan dengan prinsip *trial and error* guna mencari eluen yang sesuai untuk fraksinasi. Eluen yang digunakan dapat berupa campuran dua atau tiga pelarut. Kromatogram yang baik ditandai dengan terpisahnya masing-masing noda. Dari noda tersebut akan dihitung nilai Rf-nya.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekstraksi

Serbuk kulit batang *Cryptocarya acuminata* sebanyak 2,5 kg dimaserasi dengan menggunakan pelarut metanol selama 24 jam sebanyak 3 kali pada suhu kamar. Maserat yang dihasilkan kemudian disaring dan dilakukan analisis KLT untuk mengetahui komponen kimia yang terdapat dalam maserat metanol (lampiran 3a). Hasil yang didapatkan dari maserasi dengan metanol sebanyak 140,7 gram ekstrak kering yang berwarna coklat kehitaman.

Ekstrak metanol kemudian dimaserasi kembali menggunakan pelarut n-heksana kemudian dipartisi dengan pelarut kloroform. Hasil partisi dianalisis dengan KLT (lampiran 3b) kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak kloroform kering sebanyak 80 gram.

4.2 Proses Isolasi

Ekstrak kloroform dengan berat 80 gram dianalisis KLT menggunakan perbandingan eluen EtOAc : n-heksana = 2 : 8 (lampiran 4a). Ekstrak kloroform kemudian difraksinasi dengan kromatografi kolom vakum yang menggunakan eluen dari non polar sampai eluen polar yaitu n-heksana, n-heksana : etilasetat, etilasetat, dan metanol. Pada fraksinasi ini dihasilkan fraksi-fraksi yang selanjutnya dilakukan analisis KLT kemudian fraksi-fraksi dengan nilai Rf yang sama digabungkan sehingga didapatkan 10 fraksi utama yaitu fraksi A, B, C, D, E, F, G, H, I dan J (lampiran 4b).

Kesepuluh fraksi utama tersebut kemudian dikeringkan sehingga didapatkan berat kering masing-masing fraksi seperti yang terlihat pada tabel 1.

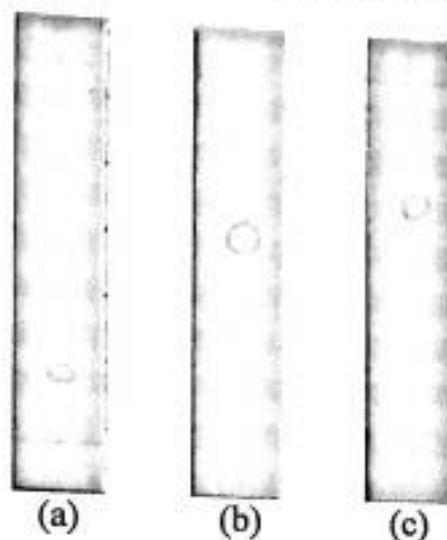
Tabel 1. Berat fraksi-fraksi kloroform (CHCl_3).

Fraksi	Gabungan dari fraksi	Berat (mg)	Warna
A	1 – 2	91,9	Kuning kehijauan
B	3 – 7	27,8	Kuning kehijauan
C	8	40,8	Hijau tua
D	9	219,4	Hijau tua
E	10 – 12	27,1	Hijau tua
F	13 – 18	34,3	Hijau tua
G	19 – 20	25,4	Hijau tua
H	21 – 22	23,6	Hijau tua
I	23 – 30	39,1	Coklat tua
J	31 – 33	28,7	Coklat tua

Dari tabel di atas dapat dilihat bahwa fraksi paling berat adalah fraksi D. Hal ini dapat diketahui bahwa dalam fraksi tersebut terdapat komponen-komponen yang memiliki kepolaran yang hampir sama.

Fraksi utama C (40,8 mg) membentuk kristal berwarna orange kemudian dikristalisasi dan direkristalisasi dengan menggunakan pelarut n-heksana p.a. sebanyak 2 kali hingga diperoleh kristal berwarna putih dengan berat 3,9 mg. Dari hasil analisis KLT yang dilakukan didapatkan bahwa kristal C menunjukkan noda tunggal. Kristal tersebut kemudian diuji kemurnian dengan analisis KLT pada tiga macam sistem eluen (gambar 1). Hasil kromatogram KLT pada tiga macam sistem

eluen menunjukkan bahwa Kristal tersebut tetap memiliki satu noda sehingga dapat dikatakan bahwa Kristal tersebut sudah murni. Senyawa tersebut juga diuji titik lelehnya dan didapatkan bahwa titik lelehnya $118^{\circ}\text{C} - 120^{\circ}\text{C}$.



Gambar 3. Kromatogram senyawa fraksi C dengan perbandingan eluen :
(a) CHCl_3 : n-heksana = 9 : 1 ($R_f = 0,175$)
(b) EtOAc : CHCl_3 = 2 : 8 ($R_f = 0,55$)
(c) EtOAc : n-heksana = 3 : 8 ($R_f = 0,925$)

Fraksi lain yang juga membentuk kristal warna orange adalah fraksi utama D dengan berat 219,4 mg. Fraksi tersebut kemudian dikristalisasi dan rekristalisasi sebanyak 2 kali dengan menggunakan pelarut n-heksana p.a. hingga didapatkan padatan berwarna kuning muda (39,4 mg). Setelah dilakukan analisis KLT (gambar 2), Fraksi tersebut belum menunjukkan noda tunggal hingga dilakukan analisis lanjutan yaitu fraksinasi menggunakan KKT.



Gambar 4. Kromatogram hasil rekristalisasi fraksi utama D (eluen EtOAc : n-heksana = 2 : 8)

Fraksi utama D difraksinasi menggunakan perbandingan eluen EtOAc : n-heksana = 2 : 8 (Lampiran 5a) yang kepolarannya terus meningkat yaitu n-heksana : CHCl₃, etil asetat, dan metanol. Dari hasil fraksinasi didapatkan 23 fraksi. Berdasarkan kromatogram analisis KLT fraksi yang memiliki Rf sama digabung dan didapatkan 9 fraksi utama (fraksi D₁ – D₉). Kromatogram hasil analisis KLT 9 fraksi tersebut dapat dilihat pada Lampiran 5b. Hasil fraksinasi fraksi utama D menunjukkan bahwa berat masing-masing fraksi tidak memungkinkan untuk dilakukan fraksinasi lanjutan. Berat minimum fraksi yang memungkinkan untuk melakukan fraksinasi yaitu 100 mg (Harborne, 1987) sehingga hanya dilakukan uji golongan yang meliputi uji fenolik, uji alkaloid, uji terpenoid, uji steroid dan uji flavonoid.

Table 2. Berat fraksi-fraksi D

Fraksi	Gabungan dari fraksi	Berat (mg)	Warna
D ₁	1 – 3	1,9	Kuning
D ₂	4 – 5	1,3	Kuning
D ₃	6 – 8	1,7	Kuning
D ₄	9 – 12	3,5	Kuning
D ₅	13 – 14	3,2	Kuning
D ₆	15	2,7	Kuning
D ₇	16 – 17	2,7	Kuning
D ₈	18 – 19	2,9	Kuning
D ₉	20 – 23	10,6	Kuning

H₂SO₄ p.a. yang menunjukkan hasil positif terhadap uji golongan steroid (Harborne, 1987).

4.4 Uji Bioaktivitas

Pengujian daya hambat fraksi D₄ – D₉ dan senyawa fraksi C terhadap bakteri *Escherichia coli*, dilakukan dengan metode difusi agar. Pada media MHA (Muller Hilton Agar) sebelum dilakukan uji aktivitas terlebih dahulu bakteri diinokulasi dalam tabung agar pada medium NA (Nutrient Agar) sebagai media. Inokulasi dimaksudkan untuk meremajakan kultur bakteri murni supaya pertumbuhan dalam media uji dapat tumbuh dengan optimal. Kontrol positif yang digunakan yaitu tetrasiklin karena memiliki spektrum daya hambat yang luas untuk bakteri sedangkan kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO (dimetil sulfoksida) karena diketahui DMSO tidak memiliki aktivitas antibakteri sehingga digunakan sebagai acuan untuk melihat respon kematian bakteri benar-benar berasal dari aktivitas sampel dan bukan disebabkan oleh faktor teknis perlakuan.

Sifat suatu antibakteri dapat diketahui melalui pengamatan dengan mengukur diameter zona hambat tiap-tiap fraksi yang dilakukan setelah masa inkubasi 24 jam dan 48 jam, dimana besarnya diameter zona hambat tersebut digunakan sebagai acuan untuk menentukan aktivitas mekanisme kerja sampel sebagai antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli*, dimana senyawa antibakteri memiliki 3 macam mekanisme kerja yaitu bersifat bakteristatik yang menghambat sintesis protein dengan mengikat ribosom namun tidak mematikan sel yang ditandai dengan zona hambat yang menjadi keruh atau ditumbuhi kembali oleh bakteri, bakterisidal bekerja dengan mencegah pertumbuhan dan menyebabkan kematian namun tidak menyebabkan selnya menjadi lisis, sedangkan

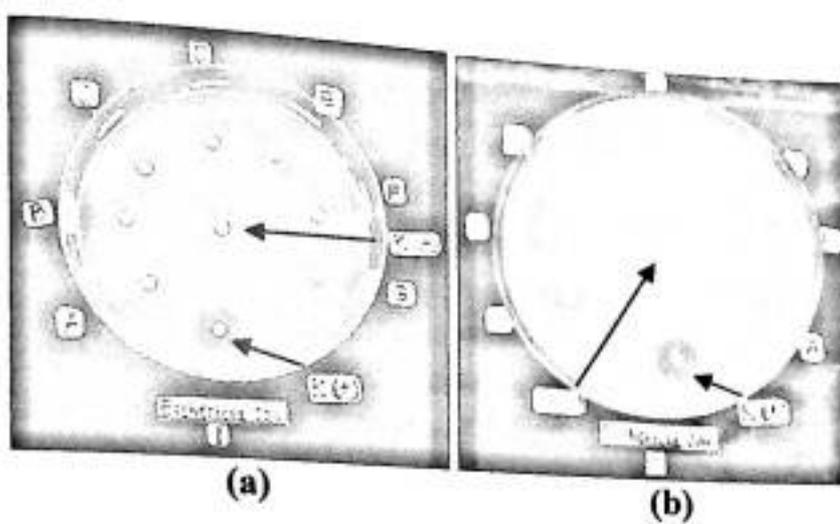
bakterilitik bekerja dengan cara membuat sel-sel bakteri menjadi lisis yang dapat dilihat dari penurunan jumlah sel atau kekeruhan (Brock dan Madigan, 1994).

Tabel 4. Hasil pengukuran bioaktivitas fraksi D₄ – D₉ dan senyawa fraksi C dengan konsentrasi 5 % terhadap bakteri *Escherichia coli*.

No.	Fraksi	Rata-rata diameter hambatan (mm)	
		24 jam	48 jam
1.	Senyawa fraksi C	8,7	8,275
2.	D ₄	8,41	6,915
3.	D ₅	9,46	9,04
4.	D ₆	9,215	9,05
5.	D ₇	8,375	8,87
6.	D ₈	10,62	11,44
7.	D ₉	11,395	12,6
8.	Kontrol +	17,875	18,305
9.	Kontrol -	-	-

Dari tabel di atas dapat dilihat bahwa dengan konsentrasi 5 % daya hambat paling besar pada masa inkubasi 24 jam adalah fraksi D₉ dengan diameter 11,395 mm, akan tetapi daya hambat fraksi D₉ lebih kecil dibandingkan kontrol positif yaitu 17,875 mm. Sedangkan daya hambat terkecil ditunjukkan oleh fraksi D₇ dengan diameter 8,375 mm.

Hasil uji bioaktivitas antibakteri fraksi D₄ – D₉ dan senyawa fraksi C terhadap bakteri *Escherichia coli* dengan konsentrasi 5 % dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 5. Diameter hambatan fraksi D₄ – D₉ dan senyawa fraksi C terhadap bakteri *E. coli* dengan konsentrasi 5 % pada masa inkubasi 24 jam (a) dan 48 jam (b).

- Keterangan :
- A = Senyawa fraksi C
 - B = Fraksi D₄
 - C = Fraksi D₅
 - D = Fraksi D₆
 - E = Fraksi D₇
 - F = Fraksi D₈
 - G = Fraksi D₉
 - K (+) = Kontrol positif (tetrasiklin)
 - K (-) = Kontrol negatif (DMSO)

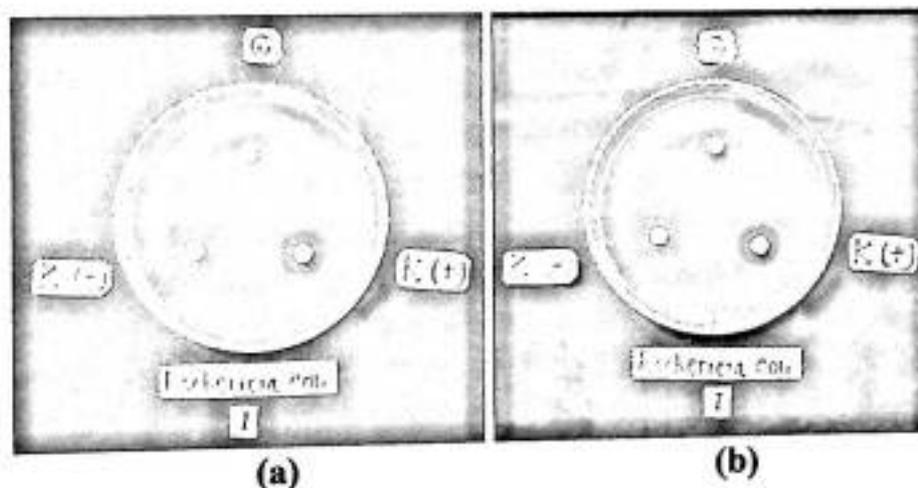
Untuk mengetahui sifat toksisitas fraksi-fraksi terhadap bakteri *Escherichia coli*, maka fraksi yang diuji dinaikkan konsentrasinya menjadi 15 %. Fraksi yang dinaikkan konsentrasinya adalah fraksi D₉. Dari hasil pengukuran diameter hambatan fraksi D₉ dengan konsentrasi 15 % terhadap bakteri *Escherichia coli* pada masa inkubasi 24 – 48 jam dapat dilihat pada table berikut:

Tabel 5. Hasil pengukuran bioaktivitas fraksi D₉ dengan konsentrasi 15 % terhadap bakteri *Escherichia coli*.

No.	Fraksi	Rata-rata diameter hambatan (mm)	
		24 jam	48 jam
1.	D ₉	11,217	12,225
2.	Kontrol +	12,266	14,15
3.	Kontrol -	-	-

Berdasarkan tabel hasil pengamatan di atas, didapatkan bahwa diameter hambatan fraksi D₉ pada masa inkubasi 24 jam yaitu 11,217 mm sedangkan kontrol positif mempunyai daya hambat yang lebih besar yaitu 12,266 mm.

Hasil uji bioaktivitas fraksi G terhadap bakteri *Escherichia coli* dengan konsentrasi 15 % dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar 6. Diameter hambatan fraksi D₉ terhadap bakteri *E. coli* dengan konsentrasi 5 % pada masa inkubasi 24 jam (a) dan 48 jam (b).

Keterangan : G = Fraksi D₉
 K (+) = Kontrol positif (tetrasiklin)
 K (-) = Kontrol negatif (DMSO)

Dari hasil tersebut di atas dapat diketahui bahwa fraksi D₇, D₈ dan D₉ memiliki pertambahan diameter zona hambat setelah masa inkubasi 48 jam.

Sedangkan fraksi D₄, D₅, D₆, dan senyawa fraksi C terjadi penurunan diameter zona hambat setelah masa inkubasi 48 jam. Bertambahnya daya hambat fraksi D₇, D₈ dan D₉ tersebut dapat disebabkan oleh senyawa turunan terpenoid yang memiliki gugus aktif seperti gugus keto. Sedangkan fraksi D₄, D₅, D₆ dan fraksi senyawa C diduga memiliki gugus yang kurang aktif sehingga mempunyai daya hambat kecil. Berdasarkan penelusuran literatur didapatkan bahwa senyawa-senyawa terpenoid yang memiliki gugus keto mempunyai aktivitas positif terhadap bakteri *Escherichia coli*, seperti senyawa phytadiene dan 1,2-seco cladellan (Gunawan, dkk., 2008). Selain itu, besar kecilnya diameter hambatan dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu laju pertumbuhan mikroorganisme, resistensi dari bakteri terhadap substansi bioaktif, jumlah inokulum bakteri/kepadatan bakteri uji, serta konsentrasi antimikroba yang terdapat dalam sampel (Frazier, 1979). Jika ditinjau berdasarkan acuan dari Cappucino (1987) yang menyatakan bahwa suatu antibiotik dapat dinilai tidak efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri apabila diameter hambatan yang ditunjukkan ≤ 9 mm, bersifat kurang efektif apabila diameter hambatannya sebesar 10-11 mm, dan bersifat efektif apabila diameter hambatannya sebesar ≥ 14 mm.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa isolasi terhadap kulit batang *Cryptocarya acuminata* dari ekstrak kloroform diketahui mengandung senyawa yang merupakan golongan senyawa terpenoid dan steroid.

Berdasarkan data uji bioaktivitas dapat disimpulkan pula bahwa dari ekstrak kloroform, fraksi yang diduga dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* yaitu fraksi D₇, D₈ dan D₉ yang merupakan senyawa golongan terpenoid.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada tumbuhan *Cryptocarya acuminata* seperti elusidasi struktur untuk mengetahui kandungan senyawa kimia yang terdapat didalamnya mengingat tumbuhan *Cryptocarya acuminata* belum pernah dieksplorasi kandungan kimianya.

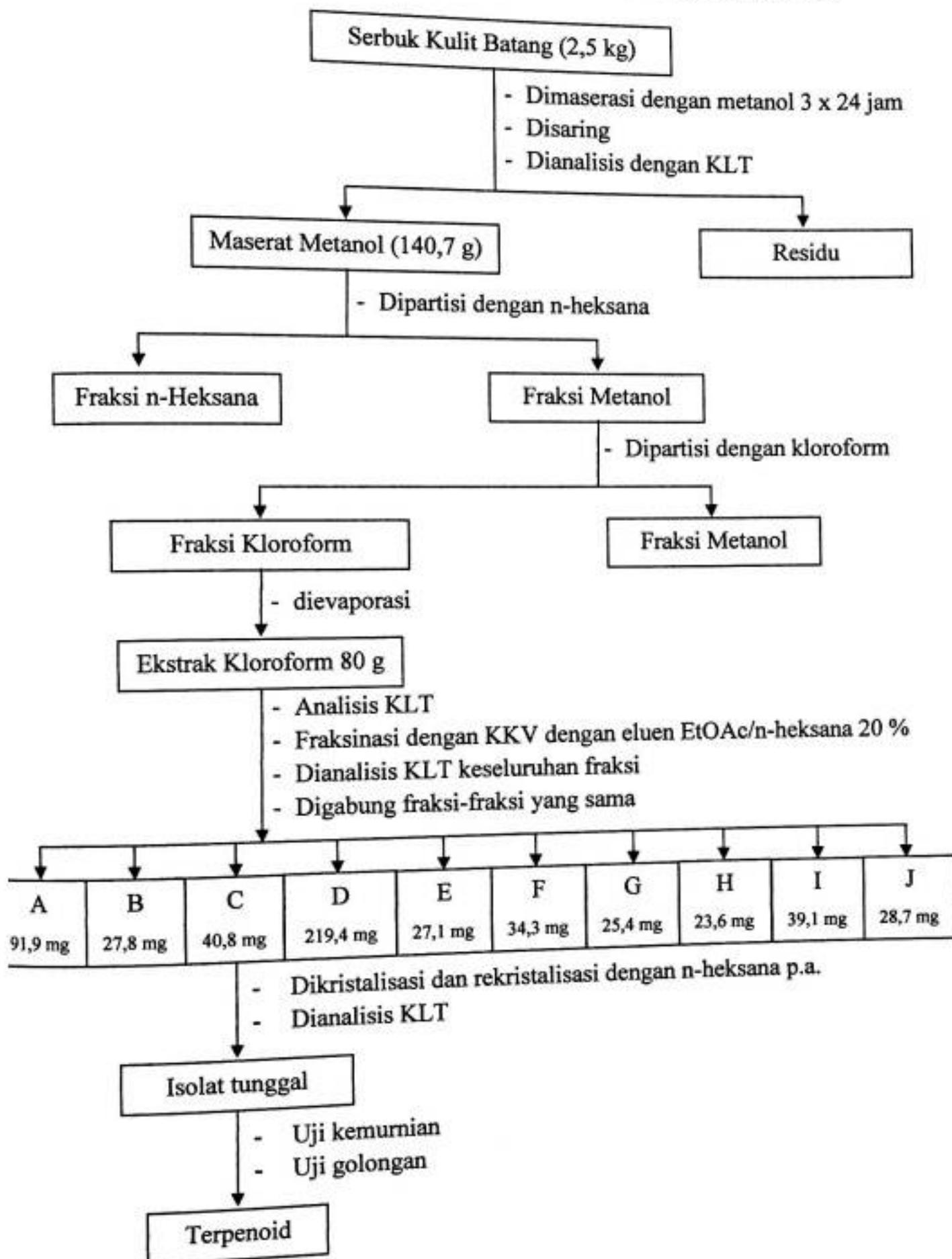
DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S.A., 2004, Empat Puluh Tahun Dalam Kimia Organik Bahan Alam Tumbuh-Tumbuhan Tropika Indonesia: Rekoleksi Dan Prospek, *Bulletin Of The National Society Of Natural Products Chemistry*, 4 (2).
- Achmad, S.A., Hakim, E.H., Juliawaty, L.D., Makmur, L., Syah, Y.M., 1994, Chemical Studies Of Indonesian Reinforest Plant: Triterpenoids From *Cryptocarya crassinervia* And *Litsea ellepatica*, *Rep. Asahi Glass Found*
- Anonim, 2005, *Lauraceae*, (online), <http://en.wikipedia.org/wiki/Lauraceae>, diakses tanggal 31 Maret 2008
- Ardiansyah, 2007, *Antimikroba Dari Tumbuhan*, (online), [http://www.beritaiptek.com/zberita-beritaiptek-2007-06-09-Antimikroba-dari-Tumbuhan-\(Bagian-Kedua\).shtml](http://www.beritaiptek.com/zberita-beritaiptek-2007-06-09-Antimikroba-dari-Tumbuhan-(Bagian-Kedua).shtml), diakses tanggal 5 Desember 2008.
- Brock, T.D., Madigan, M.T., 1994, *Biology of Microorganism, Fifth Edition*, Prentice Hall International, New Jersey.
- Chanderbali, A.S., van der Werff, H., Renner, S.S., 2001, Phylogeny and Historical Biogeography of Laruaceae: Evidence from the Chloroplast and Nuclear Genomes, *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88 (1).
- Collins, D.J., Culvenor, C.C.J., Lamberton, J.A., Loder, J.W., Price, J.R., 1990, *Plants For Medicine*, CSIRO, Melborne.
- Depkes RI, 1995, *Farmakope Indonesia Edisi IV*, Departemen Kesehatan RI Dirjen POM, Jakarta.
- Djide, M. N., Sartini, 2008, *Dasar-Dasar Mikrobiologi Farmasi*, Lembaga Penerbitan UNHAS, Makassar.
- Dumontet, V., Gaspard, C., Van Hung, N., Fahy, J., Tchertanov, L., sevenet, T., Gueritte, F., 2001, New Cytotoxic Flavonoids From *Cryptocarya infectoria*, *Tetrahedron* 57 (29).
- Esccherich, T., 1985, *Escherichia coli*, (online), http://www.wikipedia.com/escherichia_coli.htm, diakses tanggal 06 mei 2008.
- Greenwood, D., Slack, R.C.B., Peutherer, J.F., 1992, *Medical Microbiology*, Low Priced Edition, British Government, London.

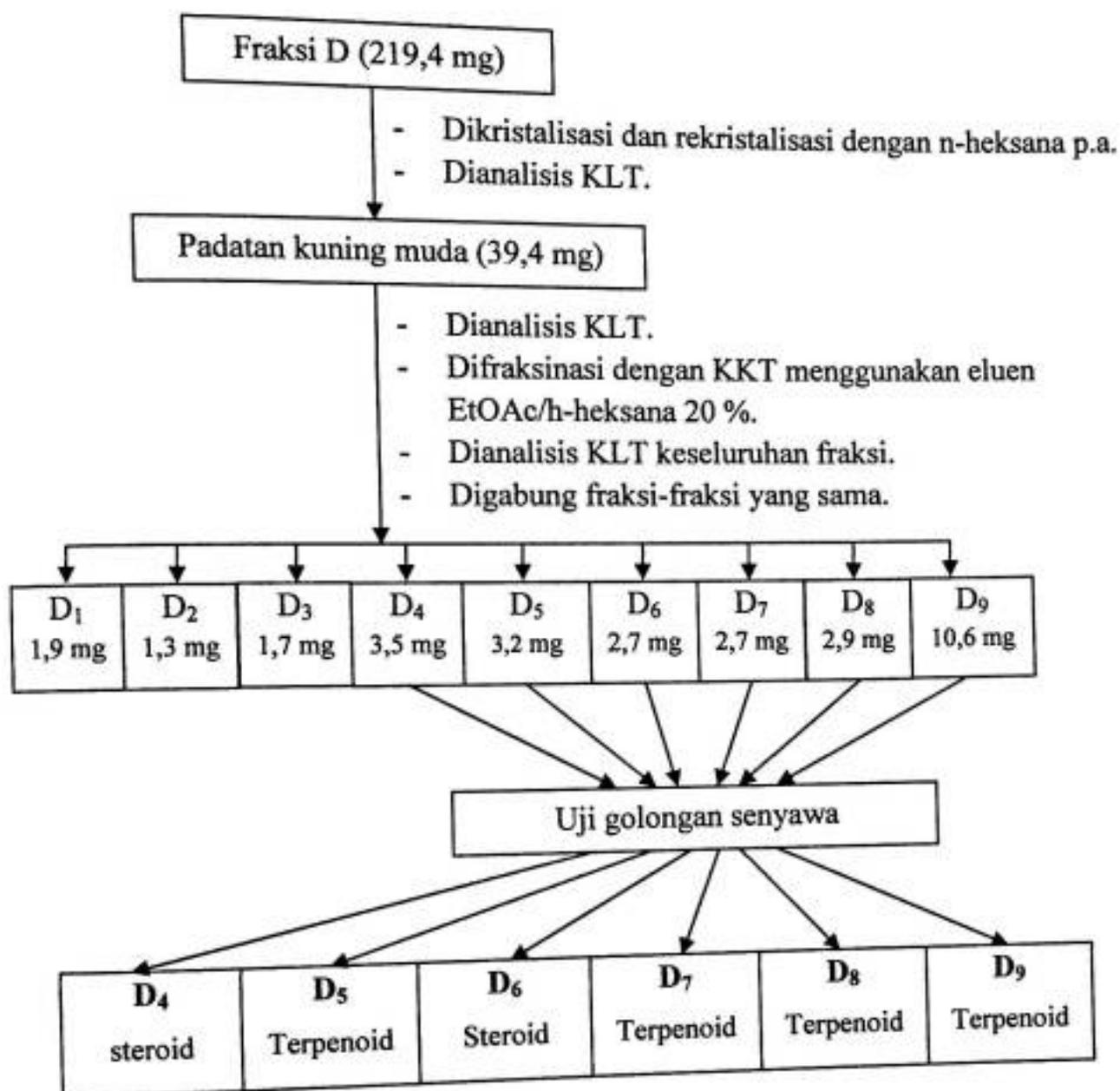
- Gunawan, I. W. G., Bawa, I. G. A. G., sutrisnayanti, N. L., 2008, Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Terpenoid Yang Aktif Antibakteri Pada Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn), *Jurnal Kimia*, **2** (1).
- Harborne, J.B., 1987, *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, diterjemahkan oleh Kosasih Padjinawinata, ITB, Bandung.
- Kiansantang, P., 2006, *Cinta Indonesia Di Masa Kini*, (online), <http://cimag.multiply.com/journal/item/30/Suryakanta>, diakses tanggal 02 April 2008
- Lin, C.T., Chu, F.H., Tseng, Y.H., Tsai, J.B., Chang, S.T., Wang, S.Y., 2007, Bioactivity Investigation Of Lauraceae Trees Grown in Taiwan, *Taylor and Francis Ltd.* **45** (8).
- Lin, F.W., Wu, P.L., Wu, T.S., 2001, Alkaloids From The Leaves Of *Cryptocarya chinensis* Hemsl, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **49** (10).
- Mahon, C.R., Manuselis, G., 1995, *Texbook of Diagnostic Microbiology*, W.B. Saunders Company, Tokyo.
- Markham, K.R., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, Terjemahan oleh Kokasih Padmawinata, 1988, ITB, Bandung.
- Mbambezeli, G., 2005, *Cryptocarya woodii* engl., (online), <http://www.plantzafrica.com/planted/cryptocarwood.htm>, diakses tanggal 31 Maret 2008
- Pelczar, H.S., Chan, E.C.S. diterjemahkan oleh Hadioetomo, R.S., Imas T., Tjitrosomo, S.S., Angka, L.A., 1988, *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, Jilid 1, UI Press, Jakarta.
- Setyaningsih, I., 2004, *Resistensi Bakteri dan Antibiotik Alami dari Laut*, (online), http://tumoutou.net/pps702_9145/iriani_setyaningsih.pdf, diakses tanggal 10 Februari 2006
- Sulistia, G., 1995, *Farmakologi dan Terapi, Edisi IV*, Fakultas Kedokteran UI, Jakarta.
- Usman, H., 2006, *Isolasi, Karakterisasi Dan Uji Bioaktivitas Metabolit Sekunder Dari Tumbuhan *Cryptocarya costata**, Disertasi Tidak Diterbitkan, Jurusan Kimia Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Usman, H., Jalaluddin, M.N., Harlim, T., Hakim, E.H., Achmad, S.A., Syah, Y.M., Latip, J., Said, I.M., 2005, Senyawa Kalkon Baru Bersifat Anti-Bakteri Dari Tumbuhan *Cryptocarya costata* (Lauraceae), *Berkala Ilmiah MIPA* **16** (1).

- Usman, H., Hakim, E.H., Harlim, T., Jalaluddin, M.N., Syah, Y.M., Achmad, S.A., Takayama, H., 2005, Cytotoxic Chalcones and Flavanones From the Bark of *Cryptocarya costata*, *Z. Naturforsch*, **61**, 184-188.
- Usman, H., Hakim, E.H., Achmad, S.A., Harlim, H., Jalaluddin, M.N., Syah, Y.M., Juliawaty, L.D., Makmur, L., Katajima, M., 2005, 2',4'-Dihidroksi-3',5',6'-Trimetoksi Calkon Suatu Senyawa Antitumor Dari Kulit Batang Tumbuhan *Cryptocarya costata* (Lauraceae), *Jurnal Matematika Dan Sains* **10** (3).
- Zenta, F., Kumanireng, H.A.S., 2003, *Teknik Laboratorium dan Penuntun Praktikum Kimia Organik*, Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Hasanuddin, Makassar.

Lampiran 1. Bagan Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder Fraksi Kloroform



Lampiran 2. Bagan Kerja Fraksi D



Lampiran 3a. Kromatogram hasil maserasi metanol



EtOAc : n-heksana = 3 : 7

Lampiran 3b. Kromatogram hasil partisi kloroform



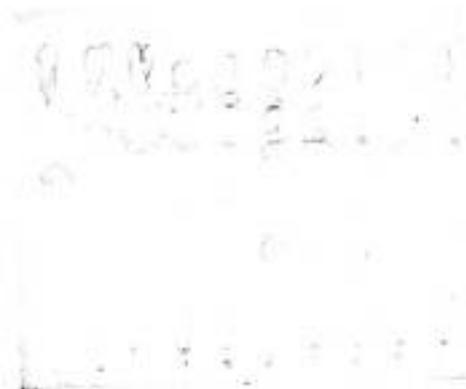
EtOAc : n-heksana = 4 : 6

Lampiran 4a. Kromatogram eluen yang sesuai untuk ekstrak kloroform



EtOAc : n-heksana = 2 : 8

Lampiran 4b. Kromatogram hasil fraksinasi ekstrak kloroform



EtOAc : n-heksana = 4 : 8

Lampiran 5a. Kromatogram eluen yang sesuai untuk fraksi D



EtOAc : n-heksana = 2 : 8

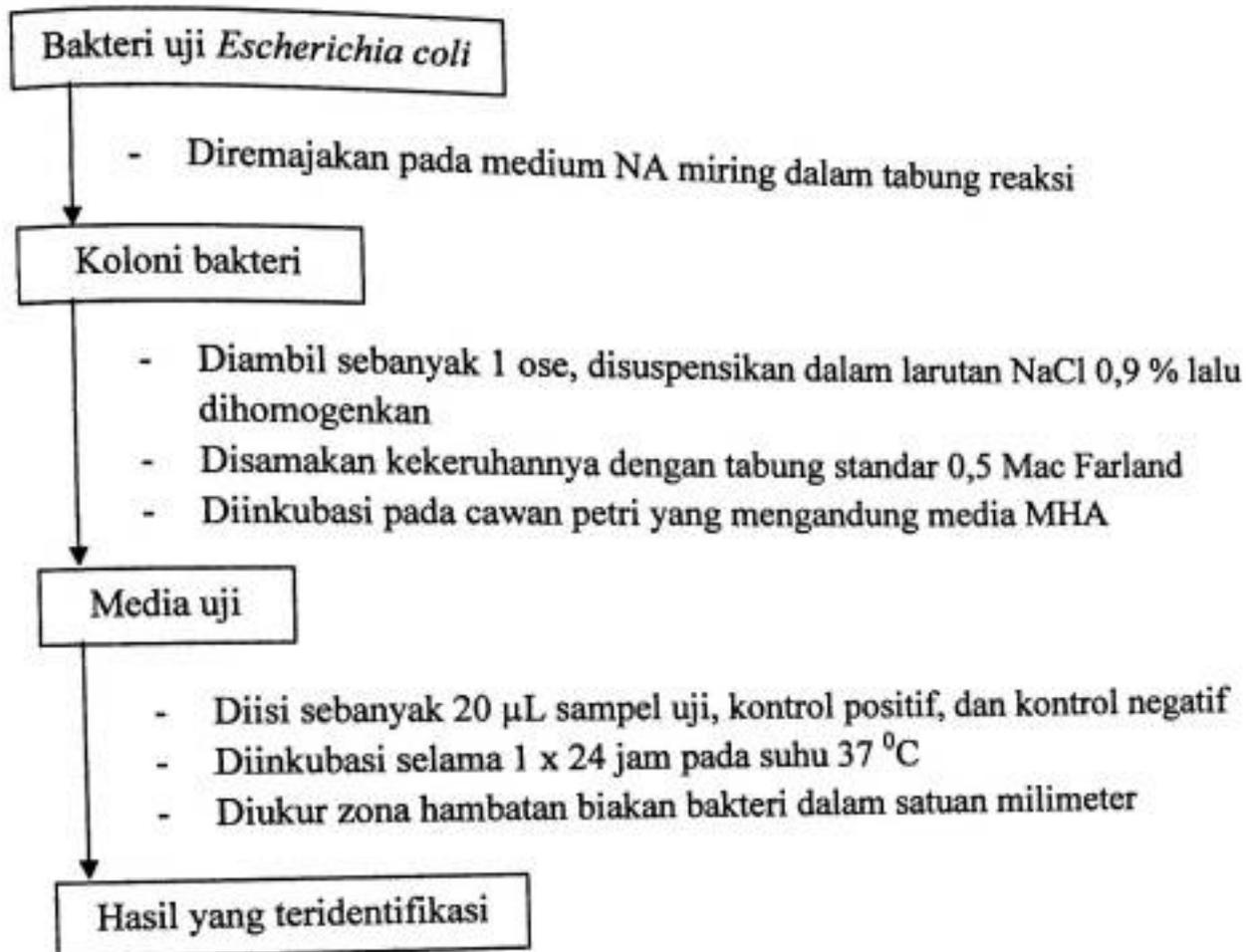


Lampiran 5b. Kromatogram hasil fraksinasi fraksi D



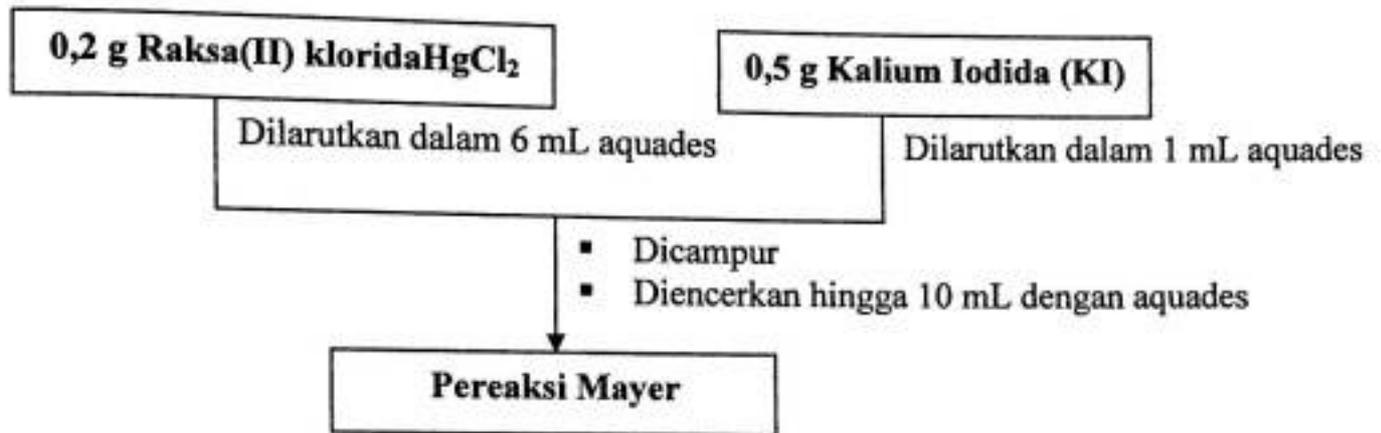
EtOAc : n-heksana = 1 : 9

Lampiran 6. Bagan Kerja Uji Antibakteri

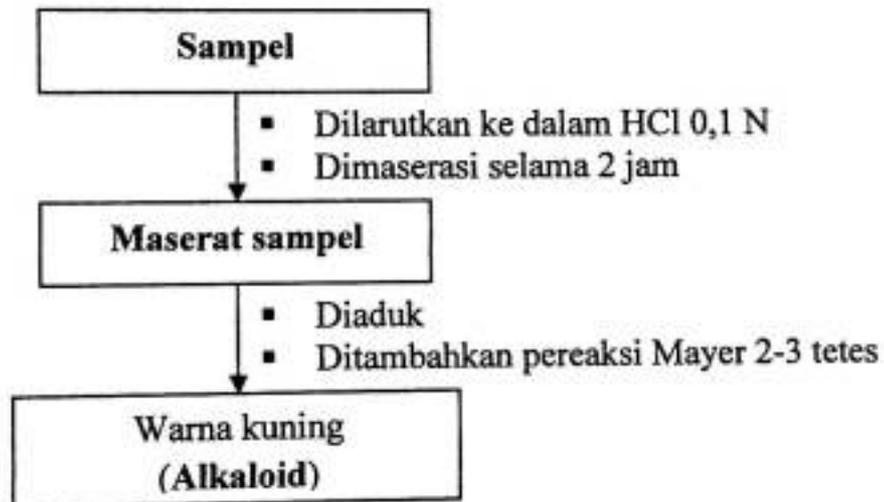


Lampiran 7. Bagan kerja uji senyawa alkaloid

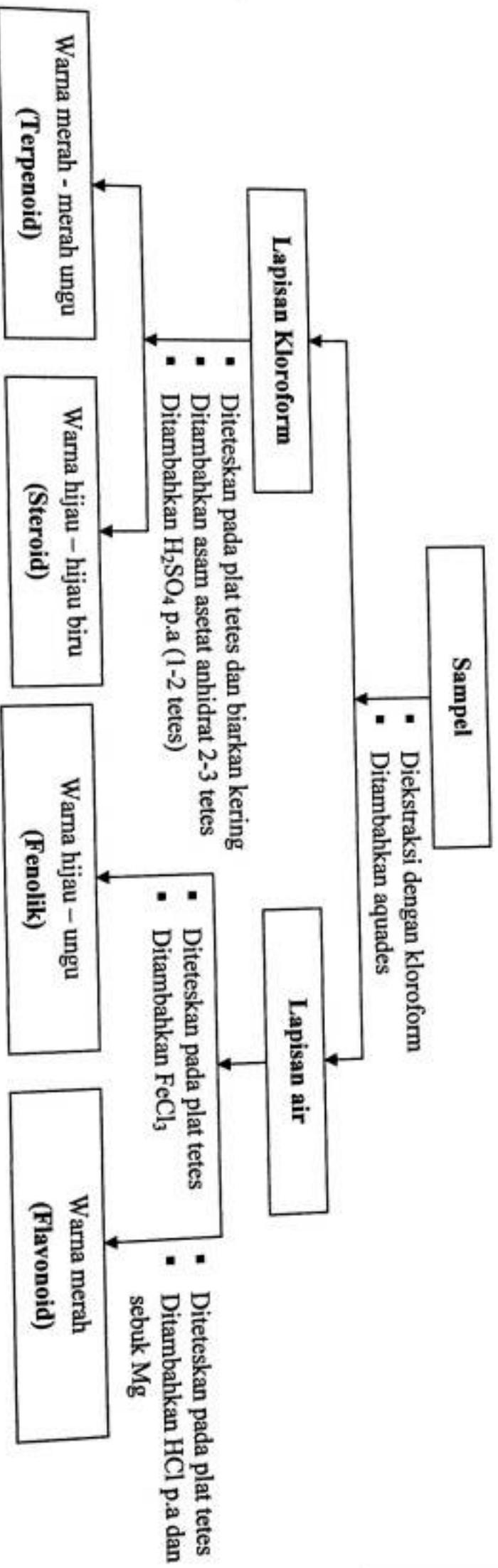
1. Pembuatan pereaksi Meyer.



2. Uji kualitatif terhadap alkaloid

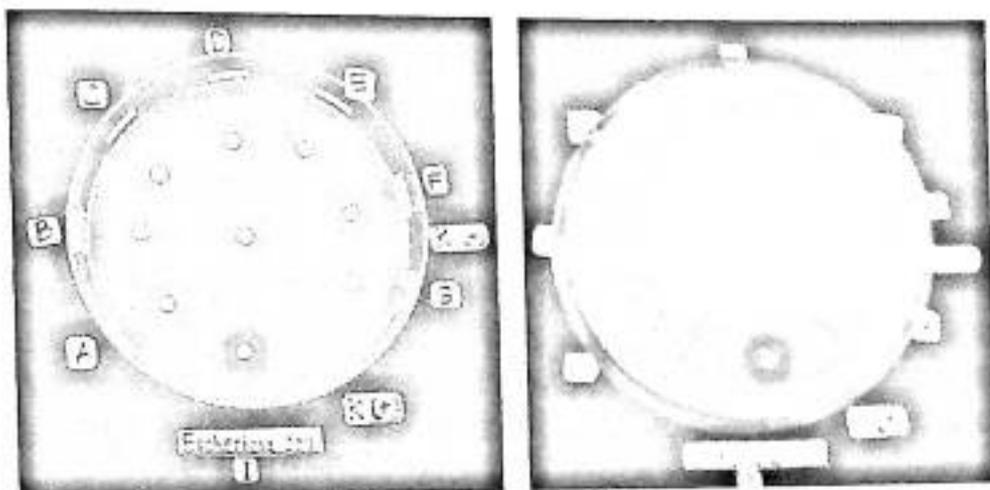


Lampiran 8. Bagan Kerja Uji Senyawa Terpenoid, Steroid, Fenolik, dan Flavonoid

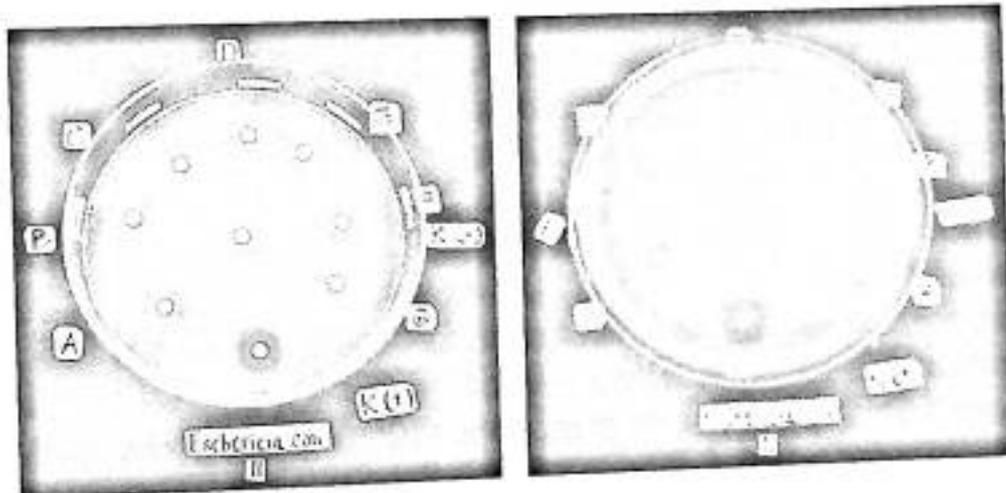


Lampiran 9a. Foto hasil uji daya hambat fraksi D₄ – D₉ dan senyawa fraksi C dengan konsentrasi 5 % pada masa inkubasi 24 jam.

Singplo:

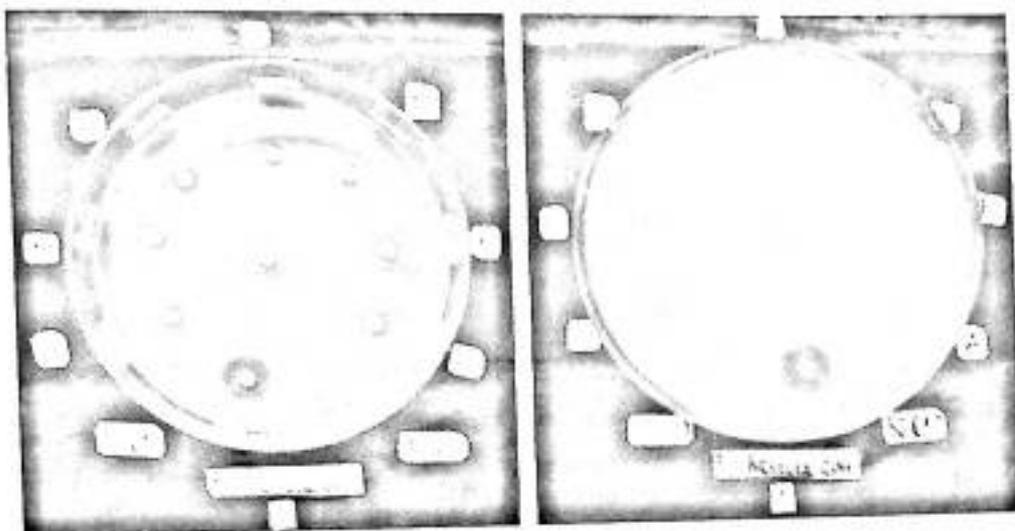


Duplo :

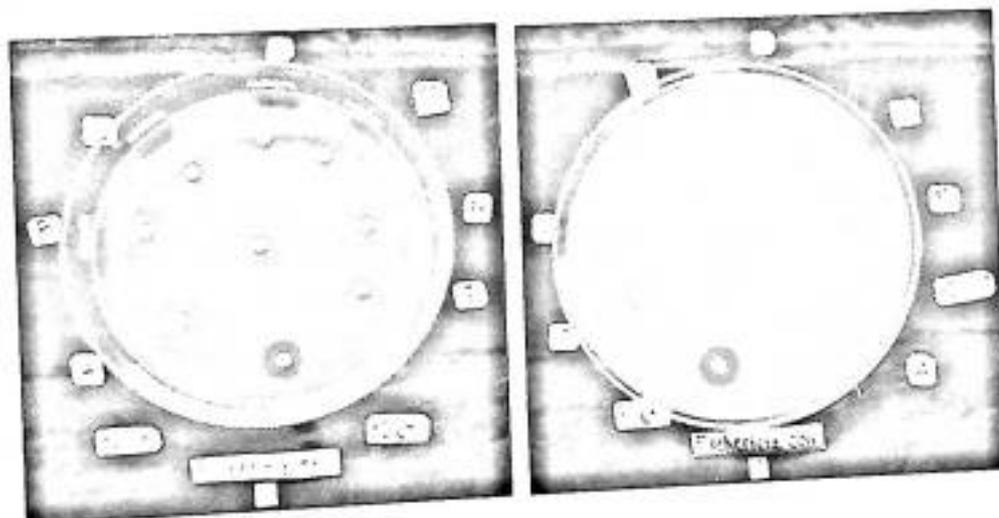


Lampiran 9b. Foto hasil uji daya hambat fraksi D₄ – D₉ dan senyawa fraksi C dengan konsentrasi 5 % pada masa inkubasi 48 jam.

Singplo :

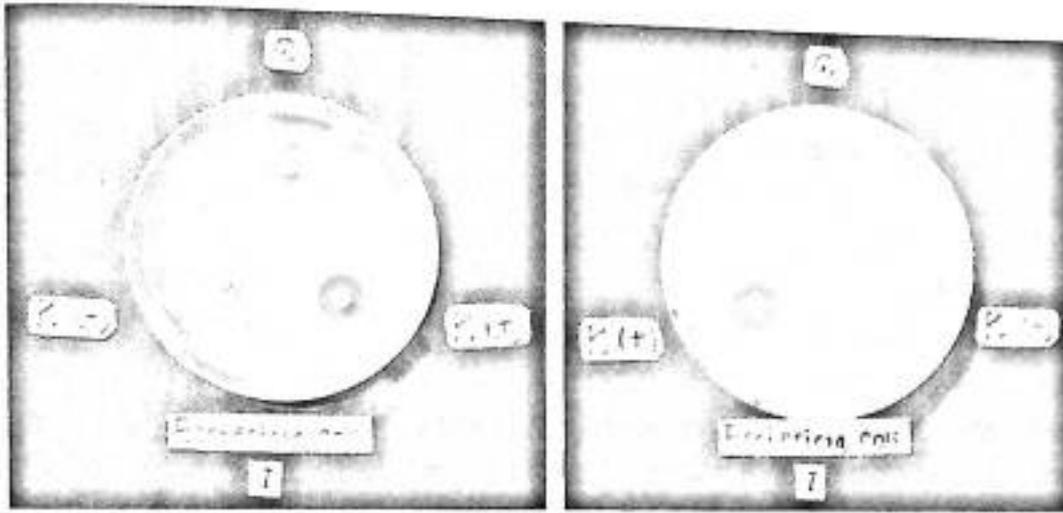


Duplo :

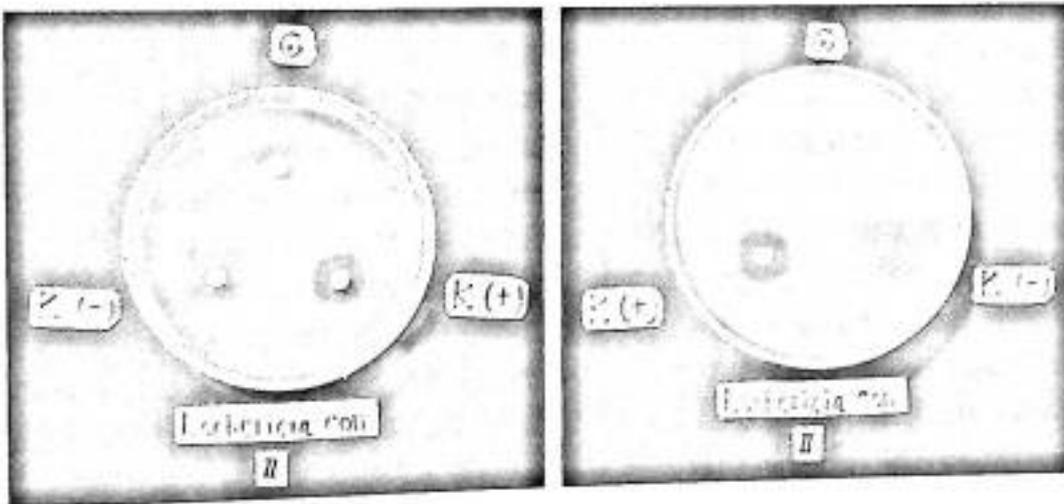


Lampiran 10a. Foto hasil uji daya hambat fraksi D₉ dengan konsentrasi 15 % pada masa inkubasi 24 jam.

Singlo :

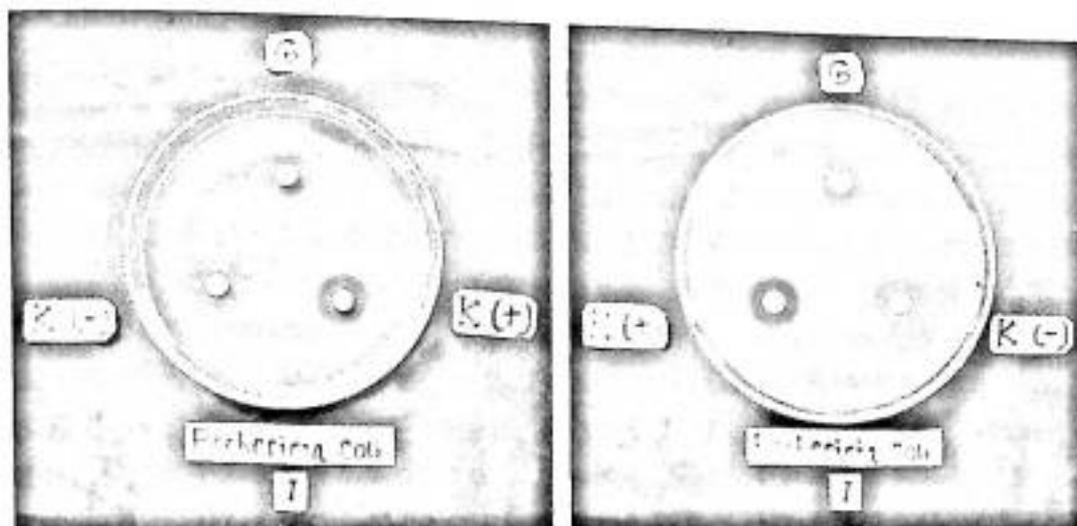


Duplo :

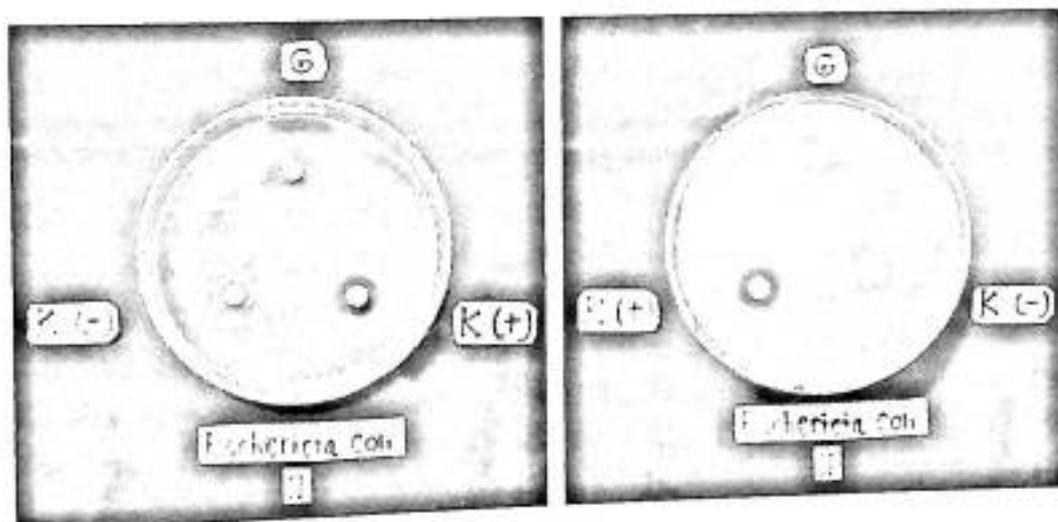


Lampiran 10b. Foto hasil uji daya hambat fraksi D₉ dengan konsentrasi 15 % pada masa inkubasi 48 jam.

Singplo :



Duplo :



Lampiran 11a. Hasil pengukuran diameter daerah hambatan fraksi D₄ – D₉ dan senyawa fraksi C dengan konsentrasi 5 % pada masa inkubasi 24 jam.

No.	Fraksi	Ulangan ke	Diameter hambatan (mm)		
			Singplo	Duplo	Total rata-rata
1.	Senyawa Faksi C	1	8,60	8,70	8,7
		2	9,20	8,05	
		3	8,95	8,70	
		Rata-rata	8,92	8,48	
2.	D ₄	1	8,90	8,45	8,41
		2	8,35	8,15	
		3	8,30	8,30	
		Rata-rata	8,52	8,3	
3.	D ₅	1	8,85	9,90	9,46
		2	8,90	9,95	
		3	9,45	9,70	
		Rata-rata	9,07	9,85	
4.	D ₆	1	8,80	9,55	9,215
		2	8,20	9,45	
		3	9,35	9,95	
		Rata-rata	8,78	9,65	
5.	D ₇	1	8,90	8,30	8,375
		2	7,70	8,40	
		3	8,40	8,55	
		Rata-rata	8,33	8,42	
6.	D ₈	1	10,25	10,25	10,62
		2	11,10	10,80	
		3	10,35	10,80	
		Rata-rata	10,57	10,62	
7.	D ₉	1	11,60	11,60	11,395
		2	10,30	11,80	
		3	11,15	11,90	
		Rata-rata	11,02	11,77	
8.	Kontrol Positif	1	17,45	17,70	17,875
		2	17,40	18,95	
		3	17,50	18,25	
		Rata-rata	17,45	18,3	
7.	Kontrol Negatif	-	-	-	-

Lampiran 11b. Hasil pengukuran diameter daerah hambatan fraksi D₄ – D₉ dan senyawa fraksi C dengan konsentrasi 5 % pada masa inkubasi 48 jam.

No.	Fraksi	Ulangan ke	Diameter hambatan (mm)		
			Singplo	Duplo	Total rata-rata
1.	Senyawa Fraksi C	1	8,05	7,40	8,275
		2	9,00	8,70	
		3	9,00	7,500	
		Rata-rata	8,68	7,87	
2.	D ₄	1	7,00	5,40	6,915
		2	8,50	6,50	
		3	7,70	6,70	
		Rata-rata	7,63	6,20	
3.	D ₅	1	8,35	9,00	9,04
		2	9,20	10,00	
		3	8,70	9,00	
		Rata-rata	8,75	9,33	
4.	D ₆	1	8,00	9,10	9,05
		2	8,80	10,05	
		3	8,75	9,60	
		Rata-rata	8,52	9,58	
5.	D ₇	1	8,05	8,30	8,87
		2	9,10	9,30	
		3	9,00	9,45	
		Rata-rata	8,72	9,03	
6.	D ₈	1	11,30	11,40	11,44
		2	11,30	11,50	
		3	11,45	11,70	
		Rata-rata	11,35	11,53	
7.	D ₉	1	12,50	12,45	12,6
		2	12,80	12,60	
		3	12,55	12,70	
		Rata-rata	12,62	12,58	
8.	Kontrol Positif	1	18,20	18,35	18,305
		2	18,40	18,20	
		3	18,40	18,30	
		Rata-rata	18,33	18,28	
7.	Kontrol Negatif	-	-	-	-

Lampiran 12a. Hasil pengukuran diameter daerah hambatan fraksi D₉ dengan konsentrasi 15 % pada masa inkubasi 24 jam.

No.	Fraksi	Ulangan ke	Diameter hambatan (mm)		
			Singplo	Duplo	Total rata-rata
1.	D ₉	1	10,90	11,20	11,217
		2	11,30	11,40	
		3	11,00	11,50	
		Rata-rata	11,067	11,367	
2.	Kontrol positif	1	13,05	13,25	13,266
		2	13,80	13,00	
		3	13,50	13,00	
		Rata-rata	13,45	13,083	
3.	Kontrol negatif	-	-	-	-

Lampiran 12b. Hasil pengukuran diameter daerah hambatan fraksi D₉ dengan konsentrasi 15 % pada masa inkubasi 48 jam.

No.	Fraksi	Ulangan ke	Diameter hambatan (mm)		
			Singplo	Duplo	Total rata-rata
1.	D ₉	1	12,50	12,05	12,225
		2	12,25	12,20	
		3	12,30	12,05	
		Rata-rata	12,35	12,1	
2.	Kontrol positif	1	14,15	14,20	14,15
		2	14,10	14,05	
		3	14,30	14,10	
		Rata-rata	14,183	14,117	
3.	Kontrol negatif	-	-	-	-