

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Keanekaragaman hayati di Indonesia memiliki banyak manfaat yang dapat digunakan oleh Masyarakat, khususnya dalam bidang kesehatan untuk menangani berbagai macam penyakit yang umumnya terjadi di masyarakat. Salah satu penyakit yang sering terjadi dimasyarakat adalah penyakit infeksi. (Frieri et al., 2017). Penyakit infeksi tersebut terjadi dikarenakan adanya mikroorganisme yang bersifat patogen salah satunya disebabkan oleh bakteri yang memiliki kemampuan untuk menyerang dan menyebabkan infeksi (Pertwi et al., 2021). Bakteri patogen seperti *Entrococcus faecalis*, *Salmonela typhi*, *Staphylococcus aureus*, dan *E.coli* dapat menyebabkan diare, inflamasi, penyakit kulit, infeksi saluran pernapasan, Infeksi Saluran Kemih (ISK) dan penyakit lainnya (Kurniawan et al., 2019; Prihatiningtyas et al., 2018; Primawati, 2013). Ada berbagai biomolekul antimikroba saat ini. Antibiotik merupakan obat yang paling umum digunakan selama bertahun-tahun. Konsumsi antibiotik yang berlebihan, telah menyebabkan resistensi bakteri patogen yang sangat berbahaya, menimbulkan masalah kesehatan bagi masyarakat di seluruh dunia (Ayaz et al., 2019 dan Langeveld et al., 2014). Resistensi antimikroba sangat besar, diperkirakan lebih dari 670.000 kasus infeksi oleh bakteri patogen terjadi setiap tahun. di Uni Eropa saja, mengklaim lebih dari 33.000 nyawa yang terinfeksi (ECDC, 2022).

Sejak dulu, salah satu cara mengurangi kasus resistensi antimikroba adalah dengan Penggunaan tanaman sebagai pilihan dalam berbagai pengobatan penyakit (Alaribe & Motaung, 2019). Spesies tanaman yang mengandung senyawa bioaktif seperti antioksidan, antimikroba, antiparasit, antidiabetik, antikanker dan beberapa fungsi lainnya yang berguna untuk memelihara kesehatan (Jamil et al., 2022). Salah satu tanaman yang digunakan sebagai pengobatan adalah batang Sanrego (*Lunasia amara* Blanco), yang termasuk flora endemik Sulawesi Selatan yang berkhasiat sebagai obat, dimana masyarakat menggunakannya dengan cara memotong kayu kecil-kecil dan dicampur dengan beberapa ramuan lainnya yang disebut (jamu) untuk meningkatkan stamina. Selain itu, masyarakat setempat juga memanfaatkannya sebagai pengobatan seperti bengkak, penyakit kulit dan iritasi mata (Takahashi et al., 2012).

Penelitian terdahulu mengungkapkan bahwa ekstrak sanrego (*L.amara*) memiliki aktivitas antikanker (Zubair et al., 2016), antiinflamasi (Hasnaeni et al., 2017), dan antibakteri (Darwin V Totaan et al., 2018). Beberapa penelitian



tersebut menunjukkan bahwa senyawa alkaloid, quinolon dan sesquiterpen adalah senyawa yang aktif dalam tanaman ini. Tanaman ini sebagian besar mengandung quinolin dan alkaloid seperti *lunamarine*, *lunacrine*, *hydroxy lunacrin*, *lunakridine* dan *lunakridine line* (Macabeo & Aguinaldo, 2008). batang Sanrego (*L.amara*) mengandung senyawa metabolit sekunder seperti steroid, fenolik, saponin, alkaloid dan flavonoid (Sari & Aminah, 2019). Sebuah penelitian yang telah dilakukan

menunjukkan bahwa senyawa metabolit sekunder yang berada dalam batang sanrego (*L.amara*) seperti alkaloid dan quinolon mampu menghambat DNA Topoisomerase II yang dimana mekanisme tersebut dapat menghambat proliferasi sel sehingga bakteri tidak dapat bereplikasi (Totaan et al., 2018).

Untuk memperoleh senyawa metabolit sekunder pada tanaman dibutuhkan pelarut yang efektif untuk menarik senyawa tersebut. Pelarut organik sering digunakan dalam menarik senyawa pada tanaman karena memiliki sifat toksik yang lebih rendah dibandingkan pelarut lainnya (Kesuma et al., 2018). Pelarut yang digunakan untuk menarik senyawa pada tanaman tersebut dapat dilakukan dengan metode ekstraksi.

Salah satu metode ekstraksi modern yang digunakan saat ini adalah *Microwave Assited Extraction* (MAE), beberapa keuntungan metode ini seperti membutuhkan sedikit volume pelarut ekstraksi dan waktu yang lebih singkat dibandingkan dengan metode konvensional (Yingngam et al., 2020). Prinsip metode MAE menggunakan gelombang mikro dengan cara memanaskan dan menguapkan air dari dalam sel sampel, akibatnya sel mengalami pembengkakan, meregang dan pecah sehingga memudahkan senyawa metabolik untuk keluar dan terekstrak oleh pelarut (Putranto et al., 2018). Faktor-faktor seperti suhu, waktu ekstraksi, pelarut dan daya gelombang mikro mempengaruhi hasil ekstraksi (Alchera et al., 2024).

Senyawa yang terkandung pada batang sanrego (*L.amara*) dapat diidentifikasi dengan salah satu cara menggunakan KLT-Densitometer, dengan prinsip kerja yaitu mengkombinasikan teknik kromatografi lapis tipis untuk pemisahan senyawa dan densitometer mengukur intensitas warna. KLT-Densitometer dapat mengkuantifikasi senyawa dengan cara sederhana, cepat dan akurat (Savitri & Megantara, 2019). Banyaknya data yang didapatkan maka diperlukan metode analisis untuk mereduksi data dan mempertahankan data penting. Salah satu metode yang dapat digunakan adalah metode kemometrik. Analisis kemometrik menggunakan metode *Principal Componen Analysis* (PCA) yang efektif untuk mengurangi kompleksitas data, meningkatkan pemahaman struktur data, mengevaluasi variasi data, mendapatkan hubungan antara variabel, mengidentifikasi kluster dan kemiripan karakteristik variabel (Arina et al., 2022).

Berdasarkan penelitian Zubair et al., (2016) membuktikan bahwa ekstrak etil asetat kayu sanrego (*Lunasia amara* Blanco) memiliki kandungan alkaloid total sebesar $10,46 \pm 0,28$ % (b/b) dan lunakrin $3,55 \pm 0.26$ % (b/b). Penelitian sebelumnya juga melaporkan bahwa ekstrak etanol daun sanrego dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* pada konsentrasi 20% dengan rata-



65 mm (Dasor et al., 2021).

Sehingga di atas maka akan dilakukan penelitian pengaruh jenis alkaloid total yang terekstraksi dari batang sanrego (*L.amara*) menggunakan metode *assisted extraction* (MAE) serta uji aktivitas antibakteri dan

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana jenis pelarut asam dapat mengekstraksi senyawa alkaloid pada batang sanrego (*L.amara*)?
2. Berapa kadar alkaloid total yang terkandung dalam batang sanrego (*L.amara*) yang diekstraksi dengan pelarut asam?
3. Apakah batang sanrego (*L.amara*) yang diekstraksi menggunakan pelarut asam mempunyai aktivitas antibakteri?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui apakah pelarut asam dapat mengekstraksi senyawa alkaloid pada batang sanrego (*L.amara*).
2. Untuk mengetahui berapa kadar alkaloid total yang terkandung dalam batang sanrego (*L.amara*) yang diekstraksi dengan pelarut asam?
3. Untuk mengetahui apakah batang sanrego (*L.amara*) yang diekstraksi menggunakan pelarut asam mempunyai aktivitas antibakteri.

1.4 Manfaat Penelitian

Memberikan informasi dan menjadi landasan yang kuat dalam pengembangan ilmu pengetahuan dalam ilmu farmasi khususnya dalam ekstraksi senyawa metabolit sekunder dengan metode *Microwave Assisted Extraxtion* (MAE) pada batang sanrego (*L.amara*) dan sebagai aktivitas antibakteri yang diekstraksi menggunakan jenis pelarut asam.



BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini berupa eksperimental laboratorium, dikerjakan yaitu pengaruh jenis asam terhadap alkaloid total yang terekstraksi dari sanrego batang sanrego (*L.amara*) secara *microwave assisted extraction* (MAE) serta uji aktivitas antibakteri dan analisis kemometrik.

2.2 Lokasi Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di laboratorium fitokimia, laboratorium biofarmaka, laboratorium kimia farmasi, dan laboratorium mikrobiologi Fakultas farmasi Universitas Hasanuddin. Penelitian ini dijadwalkan dilakukan pada bulan juli 2024.

2.3 Alat Dan Bahan

Alat alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *microwave assisted esxraction*, mikropipet, timbangan analitik, oven, corong Büchner, hotplate stirrer, grinder, peralatan gelas, cawan petri, tabung reaksi, paper disk, inkubator, autoklaf plat KLT, lampu UV 254 dan 366 nm, lemari asam, alat *microwave assisted extraction* (MAE), *Biosafety Cabinet* (BSC), Spektrofotometri Uv-Vis, timbangan digital, lemari pendingin, spoit 1cc, spoit 5cc, microplate, chamber, pipet tetes, mcfarland densitometer dan vortex.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquadest, medium *Nutrient Agar*, etil asetat, etanol 96%, metanol, ekstrak sanrego *Lunasia amara* Blanco, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, etil asetat, N-heksan, asam asetat, asam sitrat, asam tartrat, asam klorida, H₂SO₄, pereaksi dragendorff, bromocresol green.

2.4 Pengambilan Dan Penyiapan Sampel Penelitian

2.4.1 Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan adalah batang sanrego (*L.amara*) yang diperoleh dari Dusun Birue, Desa Siawung, Kecamatan Barru, Kabupaten Barru, Provinsi Sulawesi Selatan. Batang sanrego yang dipilih dalam kondisi sehat, tidak menunjukkan tanda-tanda kerusakan fisik. Hanya bagian batang primer yang digunakan. Selain itu, batang yang diambil berasal dari tanaman dewasa yang telah mencapai pertumbuhan optimal, karena tanaman yang lebih tua cenderung memiliki kandungan senyawa bioaktif yang lebih tinggi.

2.4.2 Penyiapan Sampel

Batang Sanrego (*L.amara*) di ambil dari Dusun Birue, Desa Siawung, Kecamatan Barru, Kabupaten Barru, Provinsi Sulawesi Selatan. Kemudian sampel batang dicuci bersih dengan air mengalir dan dikeringkan, setelah itu diukur diameter batang batang sanrego. Sampel yang telah diukur diameternya diserut kemudian diblender dan diayak menggunakan mesh 20 sehingga didapatkan serbuk simplisia.

2.5 Pembuatan pelarut asam

Asam asetat glasial 15% dan asam klorida 10% dibuat dengan mencampur 15 ml asam asetat glasial dengan mencukupkan aquadest hingga 100 ml, asam klorida 10 ml dicukupkan dengan aquadest hingga 100 ml, asam sitrat dan asam tartrat ditimbang masing-masing 10 g dan ditambahkan 100 ml aquadest. Larutan asam masing-masing ditambahkan beberapa tetes pada aquadest steril 100 ml hingga mencapai pH 3,0. Larutan tersebut diukur menggunakan pH meter.



Sampel Menggunakan *Microwave Assisted Extraction* MAE

digunakan pelarut asam dengan mencampur 10 g serbuk kering kemudian ditambahkan pelarut (asam asetat, asam sitrat, asam tartrat dan asam klorida) sebanyak 100 ml. Sampel tersebut dituangkan ke dalam bejana alas datar, diekstraksi menggunakan metode *Microwave-Assisted Extraction* (MAE) dengan suhu 100°C, waktu 30 menit, hasil ekstraksi disaring menggunakan vakum dan ditampung,

setelah itu pH ekstrak pelarut asam masing-masing di basakan dengan NaOH sampai pH 10 yang diukur dengan pH meter (Masuko et al., 2005).

2.7 Partisi ekstrak batang sanrego (*L.amara*)

Ekstrak cair batang sanrego (*L.amara*) yang diperoleh dipisahkan dengan metode partisi cair-cair menggunakan corong pisah dengan pelarut etil asetat:air dengan perbandingan 1:1 (v:v), dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali dengan volume perbandingan yang sama. Terjadi 2 lapisan, lapisan pertama larut etil ditampung pada cawan porselin dan lapisan kedua yang tidak larut etil ditampung pada cawan porselin berbeda kemudian diaapkan.

2.8 Kromatografi lapis tipis

Metode ini mengikuti prosedur uji kromatografi lapisan tipis dengan sedikit modifikasi. Menggunakan N-hexan:etil asetat (1:1 v/v) sebagai fase gerak dan plat silika gel 60 GF254 sebagai fase diam. Ekstrak fraksi larut etil asetat ditotolkan menggunakan pipa kapiler pada lempeng KLT 10 x 5 cm dengan jarak 1 cm dari tepi bawah dan 0,5 cm dari ujung atas. Plat KLT diamati di bawah sinar UV pada 254 nm dan 366 nm. Kemudian disemprotkan dengan pereaksi dragendorff dan (H₂SO₄) (Anam et al., 2013).

2.9 Analisis KLT-Densitometer

Masing-masing ekstrak asam ditimbang 10 mg dan ditambahkan 1 ml metanol kemudian di homogenkan menggunakan vortex, setelah itu ditotolkan pada lempeng KLT 10x20 cm dengan jarak totalan 1 cm menggunakan pipet mikro sebanyak 0,5 µl, lempeng KLT dilusi dengan eluen N-hexan:etil asetat (1:1) dalam 30 ml pada chamber. Dilanjutkan pemindaian (*scanning*) densitometri "CAMAG TLC-scanner" yang dilengkapi dengan perangkat lunak *winCATS*.

2.10 Analisis Kuantitatif dengan metode Spektrofotometri Uv-Vis

2.10.1 Pembuatan Larutan Baku

Sebanyak 0,25 g kafein dilarutkan dengan aquades kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 250 ml sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. (Arwangga et al., 2016).

2.10.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan baku kafein 1000 ppm diambil sebanyak 1 mL, kemudian ditambahkan 2 ml buffer fosfat dan 2 ml larutan BCG. Kemudian ditambahkan dengan 3 mL kloroform dilakukan sebanyak 3 kali. Fase kloroform dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL kemudian tambahkan kloroform sampai tanda batas dan kocok hingga homogen. Kemudian diamkan selama waktu *operating time*, setelah itu diukur serapan panjang gelombang dengan rentang 200-400 nm. Panjang gelombang maksimum tersebut digunakan untuk mengukur serapan dari sampel batang sanrego (*L.amara*) (Fahmi Arwangga et al., 2016)

2.10.3 Pembuatan Larutan Seri Konsentrasi baku

Pembuatan larutan seri konsentrasi baku mengikuti prosedur Arwangga et al., (2016) Diambil larutan baku kemudian dibuat seri konsentrasi 30; 60; 90; 120 dan 150 ppm. Kemudian dianalisis menggunakan spektrofotometer Uv-Vis pada Panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh sebelumnya.

2.10.4 Pembuatan Larutan uji dan Penentuan Kadar Alkaloid Total

Sebanyak 4 mg ekstrak batang sanrego (*L.amara*) kemudian dilarutkan dengan pelarut sesuai, diambil 2 ml ekstrak batang sanrego (*L.amara*) kemudian ditambahkan 2 ml buffer fosfat dan *mocresol Green*). Ditambahkan 3 ml kloroform dilakukan sebanyak 3 kali dan Diambil fase kloroform dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan oform sampai batas volume. Lalu diukur absorbansi sampel pada panjang an maksimum baku yang telah diperoleh dan dilakukan perhitungan kadar bagai berikut.



$$\text{Kadar} = \frac{x \cdot v \cdot fp}{g}$$

Keterangan :

x : Konsentrasi Sampel (mg/L)

v : volume ekstrak (mL)

fp : Faktor pengenceran

g : Bobot sampel (g)

2.11 Uji Aktivitas Antibakteri

2.11.1 Sterilisasi Alat

Alat- alat yang diperlukan dicuci terlebih dahulu dengan menggunakan detergen, dan terakhir dibersihkan dibilas dengan air suling. Alat-alat dikeringkan dengan posisi terbalik diudara terbuka, setelah kering disemprotkan dengan alkohol 96% selanjutnya dibungkus dengan kertas. Tabung reaksi dan erlenmayer disumbat kapas pada mulut alat kemudian dibungkus. Alat-alat kaca yang tidak memiliki skala dioven pada suhu 180°C selama 2 jam. Alat-alat yang memiliki skala, alat-alat plastik dan medium yang sudah dibuat disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

2.11.2 Pembiakan Bakteri Uji

Koloni tunggal yang tumbuh pada media diambil dengan jarum ose, digoresekan ke dalam medium NA (*Nutrient agar*) miring pada tabung reaksi secara zig-zag. Pengerjaan dilakukan di *Biological Safety Cabinet* (BSC). Selanjutnya diinkubasi menggunakan inkubator pada suhu 37°C selama 1x24 jam (Hudzicki, 2009).

2.11.3 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Diambil bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* menggunakan jarum ose bulat 1-2 ose dari kultur bakteri, dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi NaCl 0,9% sebanyak 5 ml. kemudian dihomogenkan dengan vortex, kemudian di ukur menggunakan larutan McFarland densitometer (Hudzicki, 2009).

2.11.4 Pembuatan Media Uji

Ditimbang sebanyak 5,6 g medium NA (*Nutrient agar*) kemudian dilarutkan dengan aquadest steril sebanyak 200 ml dengan pH 7,0-7,4. Dipanaskan hingga mendidih dan medium larut sempurna. Disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Diamkan pada suhu ruangan sampai medium mencapai suhu 40°C-50°C (Hudzicki, 2009).

2.11.5 Uji Aktivitas Antibakteri

Metode pengujian aktivitas antibakteri yang digunakan yaitu metode difusi cakram *Kirby Bauer* berdasarkan literatur *American Society for Microbiology*, dengan sedikit modifikasi. Dimasukkan medium *Nutrient Agar* yang telah di sterilkan ke dalam cawan petri sampai memadat kemudian diinokulasikan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* menggunakan *cotton swab* steril secara zig-zag. Masing-masing ekstrak asam batang sanrego (*L.amara*) diteteskan sebanyak 20 µL pada *paper disc* dengan diameter 6 mm dan diuapkan sampai kertas cakram mengering, kontrol negatif paper disk blank dan kontrol positif kloramfenikol. Diletakkan kedalam cawan petri yang mengandung medium NA dan suspensi bakteri. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong (Hudzicki, 2009).



T densitometri dari berbagai jenis ekstrak asam batang sanrego (*L.amara*) dan data aktivitas antibakteri ekstrak sanrego (*L.amara*) terhadap diameter zona hambat ri *S. aureus* dan *E. coli* dianalisis menggunakan aplikasi *Minitab 18* metode *Principal s* (PCA).