

KARAKTERISASI SIMPLISIA DAN EKSTRAK SERTA ISOLASI SENYAWA AKTIF ANTIBAKTERI DARI DAUN KARAMUNTING (*Rhodomyrtus tomentosa* (W.Ait) Hassk)

¹Krisyanella, ²Dachriyanus, ²Marlina
1 Pasca sarjana prodi.Farmasi Universitas Andalas
² Fakultas Farmasi Universitas Andalas

Abstract

Karamunting has traditionally been used to cure some infection diseases, such as diarrhea. The objective of this research is characterized the simplisia of leaves karamunting, and find it's antibacterial compound that can be used as marker compound. An antimicrobial compound was isolated from ethyl acetate extract from characterized dried leaves of Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (W.Aitt) Hassk). From IR, UV and NMR spectrum known that the isolate is Rhodomirtosone C, an acylphloroglucinol. It was obtained as yellowish solid form, with molecular formula $C_{41}H_{54}O_8$. This isolate has antimicrobial activity towards *Salmonella thypimurium* ATCC 14028 and *Eschericia coli* ATCC 25992, but not toward *Vibro parahaemolyticus* 8070. The antimicrobial activity and Minimum Inhibitory Concentration measurement are determine with dilution method using 96 well microtitter plate. The MIC of isolate against *E.coli*, *S.thypimurium* and *V.parahaemolyticus* were 3.125; 6.25 and 6.25 ppm respectively. The result of the equivalence test of isolate using Ciprofloksazin showed that 1 μ g of isolate was equivalent to 0.018 ; 0.14 and 4.11 x 10⁻⁵ μ g/mL of Ciprofloksazin towards those bacterias respectively. The isolate concentration measurement toward extract and simplisia done by using HPLC Shim-pack VP ODS (250 x 4.6 mm), normal phase, using methanol 100% as eluen with flow rate 1 mL/minute, and the result showed that the isolate rate from ethyl acetate extract was 8.488 % \pm 0.27 and 0.2771 % \pm 0.008 toward characterized simplisia.

Keyword: *R.tomentosa*, antibacterial, MIC, rhodomirtosone C

Pendahuluan

Indonesia kaya akan sumber bahan obat alam dan tradisional yang secara turun temurun telah digunakan sebagai ramuan obat tradisional. Pengobatan tradisional dengan tanaman obat diharapkan dapat dimanfaatkan dalam pembangunan kesehatan masyarakat. Kemajuan pengetahuan dan teknologi modern tidak mampu menggeser peranan obat tradisional, bahkan pada saat ini pemerintah tengah menggalakkan pengobatan kembali ke alam (*back to nature*) (Wijayakusuma, 1999).

Pengembangan obat tradisional diusahakan agar dapat sejalan dengan pengobatan modern. Berbagai penelitian dan pengembangan yang memanfaatkan kemajuan teknologi juga dilakukan sebagai upaya peningkatan mutu dan keamanan produk yang diharapkan dapat lebih meningkatkan kepercayaan terhadap manfaat obat tradisional tersebut. Pengembangan obat tradisional juga didukung oleh Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia, tentang fitofarmaka, yang berarti diperlukan adanya pengendalian mutu

simplisia yang akan digunakan untuk bahan baku obat atau sediaan galenic (BPOM, 2005; Tjitrosoepomo,G., 1994).

Salah satu cara untuk mengendalikan mutu simplisia adalah dengan melakukan standarisasi simplisia. Standarisasi diperlukan agar dapat diperoleh bahan baku yang seragam yang akhirnya dapat menjamin efek farmakologi tanaman tersebut (BPOM, 2005). Standarisasi simplisia mempunyai pengertian bahwa simplisia yang akan digunakan untuk obat sebagai bahan baku harus memenuhi persyaratan tertentu. Parameter mutu simplisa meliputi susut pengeringan, kadar air, kadar abu, kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol serta kadar senyawa identitas. Penetapan kadar senyawa identitas yang akan dilakukan disini adalah senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri. Dimana penetapan kadar disini akan dilakukan dengan menggunakan metoda Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Sebagai data pelengkap, dilakukan pemeriksaan organoleptik,

mikroskopis, makroskopis, identifikasi kimia simplisia, serta uji cemaran mikrobiologisnya (Depkes, 2000). Dari penelusuran literatur yang ada data-data mengenai karakteristik yang terkait dengan parameter mutu standar daun karamunting baik secara makroskopik maupun mikroskopis belum terlengkap sempurna.

Pengetahuan akan kandungan kimia suatu tumbuhan merupakan suatu langkah awal pemahaman tumbuhan tersebut sebagai obat. Hal ini dapat digunakan untuk mengatasi permasalahan penyakit yang berkembang di masyarakat, salah satunya adalah penyakit infeksi. Saat ini penyakit infeksi masih menjadi masalah yang serius di Indonesia, ditambah lagi dengan semakin meluasnya resistensi bakteri terhadap obat-obatan yang ada. Hal tersebut mendorong pentingnya penggalan sumber obat-obat antibakteri dari bahan alam salah satunya dari tumbuh-tumbuhan.

Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa*) adalah salah satu tumbuhan obat yang sering digunakan oleh masyarakat. Tumbuhan ini termasuk ke dalam famili Myrtaceae dan mempunyai nama internasional Rosemyrtle. Secara tradisional, daun tumbuhan ini digunakan untuk mengobati luka, kudis, sakit perut, diare, sakit kepala, mencegah infeksi dan pendarahan setelah melahirkan (Burkill, 1966). Buahnya digunakan sebagai antibisa dan obat diare. Sari akarnya digunakan untuk mengobati sakit jantung, mengurangi rasa sakit setelah melahirkan, obat diare, infeksi kulit dan untuk perawatan bekas luka pada kornea mata (Burkill, 1966; Bailey, 1930). Berdasarkan penggunaan-penggunaan tradisional diatas, yang mana dimanfaatkan sebagai pencegah infeksi, maka diduga tumbuhan ini memiliki aktivitas terhadap bakteri.

Berdasarkan penelusuran literatur dan penelitian yang telah dilakukan diperoleh informasi bahwa ekstrak dan kandungan senyawa murni dari daun Karamunting memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, selain itu juga memiliki aktivitas antihepatitis. Tanaman mengandung senyawa golongan flavonoid, steroid, triterpenoid, tannin, galat, kuinolon dan unsur natrium, kalsium, serta magnesium. Dari daun karamunting telah diisolasi dua senyawa aktif sitotoksik yaitu rhodomyrtone dan combretol (Dachriyanus, 2004). Rhodomyrtone ini juga memiliki aktivitas antibakteri yang baik terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Pada penelitian selanjutnya telah diisolasi beberapa derivat dari rhodomyrtone ini seperti rhodomyrtosone A, rhodomyrtosone B, rhodomyrtosone C, dan rhodomyrtosone D (Asadhawut, H, 2008) Kemudian dari daun karamunting ini ditemukan juga senyawa turunan floroglusinol yang aktif terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* (Salni, 2003)

Pada proses isolasi pertama-tama dilakukan ekstraksi secara maserasi berkesinambungan. Pemisahan senyawa aktif dilakukan secara kromatografi meliputi kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis dan kromatografi radial. Setelah senyawa didapatkan kemudian dilakukan pengujian aktivitas antibakterinya. Karakterisasi senyawa hasil isolasi dilakukan dengan cara penentuan titik leleh, spektroskopi yang meliputi spektroskopi ultraviolet, inframerah, dan Spektroskopi Resonansi Magnet Inti (NMR).

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metoda dilusi. Ekstrak diuji aktivitas antibakterinya terhadap bakteri *Salmonella thypimurium* ATCC 14028, *Vibrio parahaemolyticus* 8070, dan *Escherichia coli* ATCC 25922. Ekstrak yang paling aktif kemudian dilanjutkan pemisahannya sehingga diperoleh senyawa murni. Kemudian senyawa murni tersebut diujikan aktivitas antibakteri dan penentuan Konsentrasi Hambat Minimumnya (KHM), serta penentuan potensinya bila dibandingkan dengan antibiotik siprofloksasin.

Metoda Penelitian

Alat

Alat yang akan digunakan pada proses ekstraksi, isolasi, dan penetapan parameter mutu simplisia adalah seperangkat alat gelas, satu set mikroskop, seperangkat alat destilasi, seperangkat alat *rotary evaporator* (Eyela[®]), wadah maserasi (botol gelap), cawan penguap, krus porselen, tang krus, timbangan analitik, vial, oven (Memmert[®]), desikator, bejana KLT (*chamber*), penangas air, kolom kromatografi dengan berbagai ukuran, lampu UV 254 nm dan 365 nm, spektrofotometer UV-VIS 1601 (Shimadzu[®]), spektrofotometer IR (Perkin Elmer 735 B[®]), *Fisher Jhon Melting Point Apparatus*.

Alat yang digunakan pada uji aktivitas antibakteri adalah cawan petri, jarum ose, inkubator (Memmert[®]), autoklaf,

Spektrofotometer (Shimadzu®), *Laminar air flow* (LAF), *Microplate reader* (Bio-Rad®), *96-well microtiter plate*.

Alat yang digunakan pada penetapan perolehan kadar relatif isolat adalah KCKT (Shimadzu®), detektor UV-Vis SPD 10AVP, pompa ganda / *gradient*, rekorder Shimadzu CLASS - VP V6.14 SP2, kolom Shim – pack VP-ODS 250 x 4,6mm, timbangan analitik Libror AEG – 80 SM (Shimadzu®), desikator, labu ukur berbagai ukuran, gelas ukur, pipet ukur, pipet tetes, penyaring milipore, penyaring vakum, vial.

Bahan

Bahan yang digunakan pada proses isolasi dan ekstraksi adalah daun karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (W. Ait.) Hassk), *n*-heksana, etil asetat, metanol, kloroform, aquadestilata, aquabidestilata, asam klorida, asam sulfat pekat, asam sulfat 2N, asam asetat anhidrat, natrium sulfat, besi (II) klorida, kloralhidras, arang aktif, logam Mg, pereaksi Meyer, pereaksi Dragendorff, natrium hidroksida 1 %, etanol, amoniak, silika gel 60 GF₂₅₄ (Merck®), plat KLT GF₂₅₄.

Bahan yang digunakan pada uji aktivitas antibakteri adalah bakteri *Eschericia coli* ATCC 25922, *Salmonella thypimurium* ATCC 14028, *Vibrio parahaemolyticus* 8070, Nutrien Agar (NA) (Merck®), Nutrien Broth (NB) (Oxoid®), Potato Dextrosa Agar (PDA) (Merck®), aquadest steril, metanol, etanol 70%, antibiotik Siprofloksasin.

Bahan yang digunakan pada penetapan kadar relatif isolat adalah metanol Pa (Merck®) dan aquabidest.

Pengambilan Sampel dan Identifikasi Sampel

Sampel diambil di Kebun Tumbuhan Obat Universitas Andalas, Padang, Su
Sampel diambil di Kebun Tumbuhan Obat Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat. Tumbuhan diidentifikasi di Herbarium Universitas Andalas (ANDA), Padang, Sumatera Barat.

Pembuatan Simplisia (Depkes, 1989)

Simplisia *Rhodomyrtus tomentosa* dibuat dengan mengeringkan daun karamunting pada kondisi terlindung dari sinar matahari langsung dalam rumah kaca. Sampel dibiarkan selama seminggu. Setelah kering, daun karamunting dihancurkan hingga berbentuk serbuk dengan menggunakan mesin penghalus (grinder) hingga ukuran kehalusan tertentu.

Identifikasi Simplisia (Depkes, 1989)

Identikasi simplisia dilakukan dengan memeriksa pemerian dan melakukan pengamatan simplisia baik secara makroskopik maupun secara mikroskopik.

Karakterisasi Simplisia (Depkes, 1989 ; Depkes, 1979)

1. Penetapan Susut Pengerinan

1 gram simplisia ditimbang seksama dan dimasukkan ke dalam krus porselen bertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara. Simplisia diratakan dalam krus porselen dengan menggoyangkan krus hingga merata. Masukkan ke dalam oven, buka tutup krus, panaskan pada temperatur 100°C sampai dengan 105°C, timbang dan ulangi pemanasan sampai didapat berat yang konstan.

$$\text{Susut pengerinan} = \frac{\text{Berat sebelum pemanasan} - \text{Berat akhir}}{\text{Berat sebelum pemanasan}} \times 100\%$$

2. Penetapan Kadar Abu Total

2 gram simplisia ditimbang seksama, dimasukkan ke dalam krus porselen yang telah dipijarkan dan ditara, kemudian dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, didinginkan dan ditimbang. Jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, ditambahkan air panas, diaduk, disaring melalui kertas saring bebas abu. Kertas saring beserta sisa penyaringan dipijarkan dalam krus yang sama. Filtrat dimasukkan ke dalam krus, diuapkan dan dipijarkan hingga bobot tetap. Kadar abu total dihitung terhadap berat ekstrak, dan dinyatakan dalam % b/b.

$$\text{Kadar abu total} = \frac{\text{Berat abu sisa pijar}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

3. Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total dididihkan dengan 25 ml asam Klorida P, dicuci dengan air panas, pijar hingga bobot tetap. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap berat simplisia, dinyatakan dalam % b/b.

$$\text{Kadar abu tidak larut asam} = \frac{\text{Berat abu sisa pijar}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

4. Penetapan Kadar Sari Larut Etanol

5 gram serbuk simplisia dimaserasi dengan 100 ml etanol selama 24 jam seperti tertera pada monografi, menggunakan labu bersumbat sambil sekali-sekali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian didiamkan. Disaring cepat, 20 ml filtrat diuapkan dalam cawan dangkal

berdasar rata (yang telah ditara) diatas penangas air hingga kering, panaskan sisa pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar dalam persen dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara.

$$\text{Kadar sari larut etanol} = \frac{\text{Berat ekstrak} \times 5}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

5. Penetapan Kadar Sari Larut Air

5 gram serbuk simplisia dimaserasi dengan 100 ml kloroform *P* (2,5 mL kloroform dalam 1000 mL aquadest) selama 24 jam menggunakan labu bersumbat sambil sekali-sekali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian didiamkan. Disaring cepat, 20 ml filtrat diuapkan dalam cawan dangkal berdasar rata (yang telah ditara) di atas penangas air hingga kering, sisa dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar dihitung dalam persen terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara.

$$\text{Kadar sari larut air} = \frac{\text{Berat ekstrak} \times 5}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

6. Penetapan Angka Kapang/Khamir (Hadiotomo, 1990; Depkes, 2000)

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan terlebih dahulu dicuci bersih dan dikeringkan. Tabung reaksi, erlenmeyer, gelas ukur, dan pipet ditutup mulutnya dengan kapas, kemudian dibungkus dengan kertas perkamen. Cawan petri dibungkus terpisah dengan perkamen, kemudian semua alat disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 15 lbs selama 15 menit. Spatel dan pinset disterilkan dengan cara *flambier* pada lampu spiritus. Lemari aseptis dibersihkan dengan menggunakan metanol 70%.

b. Pembuatan Media Pembenihan

Sebanyak 39 g serbuk Potato Dextrose Agar dilarutkan dengan 1 liter air suling dalam erlenmeyer menggunakan *hotplate* dan *magnetic stirrer* hingga diperoleh larutan yang jernih. Media ini kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 15 lbs selama 15 menit.

c. Pembuatan Sampel Uji dan Analisa Angka Kapang

Sebanyak 1 g serbuk simplisia dilarutkan dalam 10 ml aquadest steril sehingga didapatkan konsentrasi suspensi dengan konsentrasi 10%. Disiapkan 4 tabung reaksi yang masing-masing telah diisi 9 ml aquadest

steril. Dari hasil homogenisasi pada penyiapan contoh dipipet 1 ml pengenceran 10^{-1} ke dalam tabung yang berisi pengenceran aquadest steril hingga diperoleh pengenceran 10^{-2} , dan dikocok sampai homogen. Dibuat pengenceran hingga 10^{-5} . Dari masing-masing pengenceran dipipet 0,5 ml, dituangkan pada permukaan PDA, segera digoyang sambil diputar agar suspensi tersebar merata dan dibuat duplo. Untuk mengetahui sterilitas media dan pengencer, dilakukan uji blangko. Ke dalam satu cawan petri dituangkan media dan dibiarkan memadat. Ke dalam cawan petri lainnya dituangkan media dan pengencer, kemudian dibiarkan memadat. Seluruh cawan petri diinkubasi pada suhu 20-25°C selama 3-4 hari. Sesudah 3 hari inkubasi, dicatat jumlah koloni jamur yang tumbuh, pengamatan terakhir pada inkubasi 4 hari. Koloni ragi dibedakan karena bentuknya bulat kecil-kecil putih hampir menyerupai bakteri. Lempeng agar yang diamati adalah lempeng dimana terdapat 40-60 koloni Kapang.

7. Uji Profil Fitokimia (Simes, *et.al.*, 1995)

Uji profil fitokimia kandungan metabolit sekunder dilakukan terhadap ekstrak kental etanol daun karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (W. Ait.) Hassk). Sebanyak 5 gram serbuk dimaserasi dengan menggunakan menggunakan etanol, kemudian dididihkan, disaring dalam keadaan panas, dan filtratnya dikeringkan diatas penangas air. Kemudian ditambahkan air dan kloroform sama banyak (5:5), lalu dikocok kuat dan dibiarkan selama beberapa saat sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan air digunakan untuk uji senyawa flavonoid, fenolik dan saponin. Lapisan kloroform digunakan untuk uji senyawa terpenoid, steroid, dan alkaloid.

a. Uji Alkaloid

Beberapa tetes lapisan kloroform ditambahkan beberapa tetes asam sulfat 2N, dikocok kuat, kemudian didiamkan hingga terjadi pemisahan. Lapisan asam diambil dan ditambahkan 1-2 tetes pereaksi Mayer atau pereaksi Dragendorff, jika terbentuk endapan putih dengan pereaksi mayer atau warna jingga dengan pereaksi Dragendorff menunjukkan hasil yang positif untuk alkaloid.

b. Uji Flavonoid

Beberapa tetes lapisan air pada plat tetes ditambah 10 butir logam magnesium dan beberapa tetes asam klorida pekat, terjadinya warna jingga, merah muda sampai merah menandakan adanya senyawa flavonoid.

c. Uji Fenolik

Beberapa tetes lapisan air pada plat tetes ditambah 1-2 tetes larutan besi (III) klorida 1 %. Bila terbentuk warna hijau sampai biru, berarti terdapat senyawa fenolik.

d. Uji Saponin

Lapisan air dalam tabung reaksi dikocok. Apabila terbentuk busa yang bertahan selama 5 menit, berarti positif adanya saponin.

e. Uji Terpenoid dan Steroid

Lapisan kloroform disaring melalui pipet yang berisi norit. Hasil saringan dipipet 2-3 tetes dan dibiarkan mengering pada plat tetes. Setelah kering ditambahkan pereaksi Lieberman-Burchard (2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat). Terbentuknya warna merah / merah jambu / violet berarti positif terpenoid, sedangkan jika berwarna hijau atau biru berarti positif adanya steroid.

8. Ekstraksi Serbuk Simplisia

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi, dengan sistem *Step Gradient Polarity*. Simplisia daun Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (W. Ait.) Hassk) sebanyak 1.800 gram yang telah dikeringkan dan dihaluskan, dimaserasi dengan *n*-heksan, etil asetat dan metanol hingga terendam di dalam botol berwarna gelap masing-masingnya 3 kali selama 5 hari. Maserat atau hasil penyaringan diuapkan *in vacuo* sampai didapatkan ekstrak kental *n*-heksan, etil asetat dan metanol.

9. Uji Aktivitas Antibakteri, Penetapan Konsentrasi Hambat Minimum dan Potensi Ekstrak dan Isolat terhadap Bakteri Uji

Uji aktivitas antibakteri ekstrak dilakukan terhadap bakteri *Eschericia coli* ATCC 25922, *Salmonella thypimurium* ATCC 14028, dan *Vibrio parahaemolyticus* 8070. Pengujian dilakukan dengan metoda dilusi.

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang akan digunakan disiapkan dan disterilisasi terlebih dahulu.

b. Pembuatan Media Pembenuhan

- Nutrient Broth (NB)

13 gram serbuk Nutrient Broth dilarutkan dalam 1 liter aquadest dalam erlenmeyer, kemudian dipanaskan di atas *hotplate* sambil diaduk sampai terbentuk larutan yang jernih. Kemudian mulut erlenmeyer disumbat dengan kapas yang dibalut kain kasa. Kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 15 lbs selama 15 menit.

- Nutrient Agar (NA)

20 gram serbuk Nutrient Agar dilarutkan dalam 1 liter aquadest dalam erlenmeyer, kemudian dipanaskan sambil diaduk sampai terbentuk larutan yang jernih. Kemudian mulut erlenmeyer disumbat dengan kapas yang dibalut kain kasa. Kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 15 lbs selama 15 menit.

c. Peremajaan Mikroba Uji

Mikroba uji dari stok kultur murni ditanam pada media agar miring NA dengan cara menggoreskan satu mata ose biakan mikroba pada permukaan agar miring, lalu diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Peremajaan dilakukan setiap dua minggu sekali.

d. Pembuatan Stok Kultur Suspensi dan Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Sebanyak satu ose koloni bakteri diambil dari biakan murni kemudian disuspensikan dalam 10 ml media NB, khusus untuk bakteri *V.parahaemolyticus* NB yang digunakan harus mengandung NaCl 3%, kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 18-24 jam dengan suhu 37°C, ini disebut sebagai stok kultur suspensi bakteri. Kemudian transmitan dari suspensi ini diukur dengan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 580 nm sebesar 25% T. Transmitan diatur dengan cara menambahkan bakteri atau media cair.

e. Penyiapan Sampel Uji

Sampel uji terdiri dari ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan metanol. Sebanyak 10 mg ekstrak ditimbang dan dilarutkan dalam 1 mL metanol sehingga didapatkan konsentrasi larutan induk 10.000 ppm (1% b/v). Untuk Isolat, ditimbang seksama 10 mg isolat kemudian dilarutkan dalam 10 mL metanol sehingga didapatkan konsnetrasi larutan induk isolat 1000 ppm. Untuk penetapan potensi disiapkan larutan induk siprofloksasin 10.000 ppm.

f. Pengujian Aktivitas Antibakteri dengan Metoda Dilusi

Pada lubang ke-1 *microtiterplate 96-well* dimasukkan 180 µl suspensi kultur bakteri, sedangkan pada lubang 2 - 10 dimasukkan 100 µl, pada lubang ke 11 dan ke 12 dimasukkan berturut turut 90 µl untuk kontrol positif dan kontrol negatif. Kemudian pada lubang pertama ditambahkan 20 µl larutan uji, dihomogenkan dengan cara mengaduk dengan pipet mikro, kemudian dipipet 100 µl suspensi dari lubang pertama dan dimasukkan pada

lubang kedua dan dihomogenkan, dari lubang kedua dipipet 100 µl dan dimasukkan pada lubang ketiga dan dihomogenkan begitu seterusnya sampai pada lubang ke 10, 100 µl larutan terakhir dibuang. Untuk kontrol positif ditambahkan 10 µl larutan antibakteri siprofloksasin (10 µg/mL) pada lubang ke 12 dan 10 µl metanol pada lubang ke 11 sebagai kontrol negatif. *Mikrotiterplate 96-Well* diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan dengan mengukur absorbannya pada λ 580 nm dengan menggunakan alat *Mikroplate Reader* (Bio-Rad®) setelah masa inkubasi. Apabila absorban perlakuan lebih kecil dari absorban kontrol negatif, hal ini menunjukkan bahwa terdapatnya aktivitas antibakteri. Konsentrasi terkecil yang menyebabkan tidak terjadinya pertumbuhan bakteri merupakan nilai KHM-nya.

10. Isolasi dan Pemurnian Senyawa Antibakteri

Pemisahan komponen-komponen yang terdapat di dalam fraksi dilakukan dengan Kromatografi Kolom dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Uji KLT dilakukan dengan cara berbagai perbandingan pelarut, mulai dari pelarut yang non polar hingga pelarut yang bersifat polar. Uji KLT ini dilakukan untuk tujuan Kualitatif.

Pemisahan dalam jumlah besar digunakan Kromatografi Kolom, lalu dielusikan dengan pelarut organik dengan meningkatkan kepolarannya secara bertahap, dapat tunggal atau kombinasi. Sedangkan pemurnian dilakukan dengan rekristalisasi, yaitu berdasarkan kemampuan melarutkan zat yang dimurnikan. Proses rekristalisasi diulang beberapa kali sehingga didapatkan senyawa yang berbentuk kristal.

11. Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi

Karakterisasi senyawa hasil isolasi meliputi pemeriksaan organoleptis, sifat kimia, fisika dan sifat fisikokimia. Pemeriksaan organoleptis dilakukan secara visual yang meliputi pengamatan warna dan bentuk dari senyawa hasil isolasi. Pemeriksaan sifat fisika meliputi sifat kelarutan dan jarak titik leleh. Pemeriksaan fisiko kimia dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS, spektrofotometer Inframerah dan NMR.

12. Penetapan Kadar Isolat dalam Ekstrak dan Simplisia

Penetapan kadar isolat dari dalam ekstrak dan simplisia ini dilakukan dengan

menggunakan Kromatografi Cair kinerja Tinggi. Dimana larutan uji berupa larutan isolat 4AB1 dan larutan ekstrak etil asetat dari simplisia kering daun *R.tomentosa*. Masing-masing larutan tersebut diinjeksikan secara terpisah dan dilakukan dengan KCKT dalam kondisi yang sama meliputi , ukuran dan panjang kolom (Shim-pack VP ODS (250x4,6 mm) Shimadzu), fasa diam, detektor UV pada panjang gelombang 262 nm, fasa gerak metanol 100%, laju aliran 1 mL/menit, dan volume penyuntikan yang sama (20 µL).

a. Pembuatan Ekstrak

Sebanyak 45,955 gram simplisia *R.tomentosa* ditimbang, kemudian diekstrak dengan menggunakan metoda sokletasi. Pelarut yang digunakan mengikuti *Step Gradient Polarity*, dimana dimulai dari n-heksan, etil asetat dan metanol, masing-masing sebanyak 370 ml. Ekstrak cair yang didapatkan kemudian dipekatkan dengan menggunakan *Rotary evaporator*. Ekstrak kering yang didapatkan sebanyak 2,3 gram ekstrak n-heksana, 1,5 gram ekstrak etil asetat dan 0,9 gram ekstrak metanol. Larutan ekstrak dalam metanol disiapkan dengan cara melarutkan 50 mg ekstrak etil asetat *R.tomentosa* kedalam 100 mL metanol, sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 500 µg/mL (500 ppm). Larutan ini kemudian dapat diencerkan kembali dengan menggunakan metanol hingga absorbannya tidak melebihi 2,00 bila diukur dengan spektrofotometer UV 262 nm.

b. Pembuatan Larutan Standar Isolat (1.080 µg/mL)

Ditimbang seksama lebih kurang 10,8 mg isolat 4AB1 yang sebelumnya telah dikeringkan pada suhu 25°C sampai berat konstan, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL. Kemudian ditambahkan metanol, diaduk sampai larut, kemudian dicukupkan dengan metanol sampai tanda batas, kemudian dihomogenkan. Larutan ini kemudian menjadi larutan induk isolat 1.080 µg/mL.

c. Penetapan Linieritas dan Kurva Kalibrasi

Penetapan linieritas dilakukan dengan analisa seri larutan standar isolat 4AB1. Konsentrasi yang digunakan adalah 54 µg/mL; 43,2 µg/mL; 32,4 µg/mL; 21,6 µg/mL dan 10,8 µg/mL. Masing-masing larutan tersebut diinjeksikan pada alat KCKT dengan menggunakan loop 20 µl. Kurva kalibrasi dibuat dengan memplot luas area yang didapat dari analisa terhadap konsentrasi standar.

Linieritas ditentukan oleh harga r (koefisien korelasi).

d. Penetapan Presisi

Presisi yang dilakukan mencakup presisi sistem dan presisi metoda. Presisi sistem atau uji kesesuaian sistem dilakukan dengan penyuntikan berulang larutan standar yang diketahui konsentrasinya sebanyak 6 kali dengan batas presisi $\leq 2\%$. Presisi metoda dilakukan terhadap sampel ekstrak sebanyak 6 kali pengulangan.

e. Penentuan Sensitifitas

Sensitifitas dilakukan dari perhitungan nilai LOD dan LOQ.

f. Penetapan Kadar Isolat dalam Ekstrak dan Simplisia

Ditimbang seksama lebih kurang 50 mg ekstrak etil asetat, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian dilarutkan dengan metanol, diaduk sampai larut. Kemudian dicukupkan dengan metanol sampai dengan tanda batas, kemudian dihomogenkan, sehingga didapatkan larutan ekstrak dengan konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$. Larutan ini kemudian dapat diencerkan, dengan tujuan agar absorbansi larutan sampel ini tidak lebih dari 2,000 bila dihitung pada panjang gelombang 262 nm. Konsentrasi larutan sampel yang digunakan disini adalah 40,24 $\mu\text{g/mL}$. Kemudian larutan ini disaring dengan kertas saring Whatman, kemudian sebanyak 20 μl larutan ini diinjeksikan kedalam alat KCKT. Kadar isolat dalam ekstrak ditentukan dengan menggunakan persamaan regresi.

g. Penetapan Persen (%) Perolehan Kembali

Penetapan % perolehan kembali ini dilakukan dengan cara menambahkan sejumlah isolat yang diketahui kadarnya ke dalam larutan ekstrak. Dari larutan induk isolat 4AB1 (1.080 $\mu\text{g/mL}$) dipipet sebanyak 0,3; 0,4 dan 0,5 mL, kemudian dimasukkan kedalam 10 mL larutan ekstrak (40,24 $\mu\text{g/mL}$). Larutan ini kemudian diinjeksikan dengan tiga kali pengulangan kedalam sistem KCKT untuk tiap-tiap konsentrasi.

Hasil

Proses pembuatan simplisia diawali dengan pengambilan bahan baku. Bahan simplisia daun *Rhodomyrtus tomentosa* diambil di Kebun Tumbuhan Obat (KTO) Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat (Gambar 1). Selanjutnya sampel tersebut diidentifikasi di

Herbarium Biologi Universitas Andalas (ANDA). Hasil identifikasi menunjukkan bahwa sampel tersebut adalah *Rhodomyrtus tomentosa* (W.Ait) Hassk dari Famili Myrtaceae.



Gambar 1. *Rhodomyrtus tomentosa* (W.Ait) Hassk

Selanjutnya dilakukan sortasi basah. Sortasi basah adalah proses pemilahan tanaman yang masih segar. Sortasi dilakukan terhadap tanah, kerikil, rumput – rumputan, bagian tanaman yang rusak, serta bagian tanaman lain yang tidak digunakan. Kemudian dicuci dengan air mengalir, setelah itu dikeringkan di rumah kaca. Proses pengeringan ini bertujuan untuk menghentikan reaksi enzimatik, dimana enzim menjadi tidak aktif sehingga tidak terjadi penguraian bahan kimia. Selain itu proses pengeringan ini juga berguna untuk mengurangi kandungan air dari simplisia, sehingga tidak dapat ditumbuhi jamur. Dengan demikian akan didapatkan simplisia yang awet dan dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama. Pengeringan dilakukan dengan menghindari terpaparnya simplisia dari panas matahari langsung. Hal ini dimaksudkan untuk meminimalisasi rusak atau terurainya senyawa-senyawa termolabil serta menghindari rusaknya simplisia akibat pemanasan

Sortasi kering merupakan tahapan akhir dalam penyiapan simplisia. Sortasi kering bertujuan untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tumbuhan yang tidak diinginkan atau pengotor-pengotor lain yang masih tertinggal pada simplisia kering tersebut. Simplisia kemudian disimpan dalam wadah tertutup baik dan kedap udara, yang bertujuan agar simplisia dapat tahan lama, terhindar dari lembab, dan bebas dari kontaminasi mikroba. Dari hasil proses pengeringan ini didapatkan simplisia dengan pemerian berupa lembaran daun berwarna kuning kecoklatan dan tidak berbau. Dari 8 kg

daun basah didapatkan simplisia kering sebanyak 2,5 kg. Simplisia yang telah kering dan bersih ini kemudian dihaluskan dengan menggunakan grinder. Serbuk simplisia yang didapatkan adalah sebanyak 2,38 kg.

Identifikasi Simplisia

Identifikasi simplisia dilakukan dengan memeriksa pemerian dan melakukan pengamatan simplisia secara makroskopik dan mikroskopik. Pemerian simplisia meliputi pengamatan terhadap bentuk, bau, warna dan rasa. Pemeriksaan makroskopik dilakukan terhadap karakter daun simplisia, sedangkan uraian mikroskopik mencakup pengamatan terhadap penampang melintang simplisia atau bahagian simplisia terhadap fragmen pengenalan serbuk simplisia. Tujuan dilakukannya pengamatan ini adalah untuk memeriksa bahagian-bahagian spesifik yang terdapat pada

organ tumbuhan yang digunakan (Depkes, 1979 ; Depkes, 1995).

Secara makroskopik, daun *R.tomentosa* terlihat daun merupakan daun tunggal, berbentuk lonjong, panjang daun 4 – 5 cm, lebar 1,5 – 2 cm, pinggir daun rata, permukaan daun sebelah atas berwarna hijau tua atau muda dengan permukaan yang licin, daun agak tebal, permukaan bawah daun berwarna coklat agak kasar, dan tulang daunnya menyirip.

Berdasarkan pengamatan pada penampang melintang daun *R.tomentosa* dengan menggunakan mikroskop, tampak terdapat kutikula, epidermis dan mesofil. Pada bahagian Mesofil terdapat polisade dan bunga karang dan spons. Selain itu terdapat juga stomata tipe anomositik, jaringan ikat pembuluh dan trikome. Rambut penutup tampak berbentuk batang.

Karakterisasi Simplisia

Dari hasil karakterisasi simplisia didapatkan hasil seperti yang terlihat pada tabel I

Tabel I. Karakterisasi Simplisia *R.tomentosa*

No.	Karakterisasi Simplisia	Hasil perhitungan			Rata-rata ± Simpangan baku
		Replika 1	Replika 2	Replika 3	
1	Susut Pengeringan	11,410 %	11,691 %	10,865 %	11,322 % ± 0,420
2	Kadar abu total	2,190 %	2,171 %	2,081 %	2,147 % ± 0,057
3	Kadar abu tidak larut asam	0,484 %	0,524%	0,469%	0,492 % ± 0,028
4	Kadar sari larut air	10,694 %	10,769 %	10,995 %	10,829 % ± 0,1535
5	Kadar sari larut etanol	14,093 %	14, 195 %	13,793 %	14,027 % ± 0,208
6	Profil Fitokimia	Mengandung flavonoid, terpenoid dan fenolik			
7	Angka Kamir Kapang	1 koloni pada pengenceran 10 ⁻⁴			

Simplisia tersebut kemudian diekstraksi dengan cara maserasi dengan sistem kepolaran meningkat, dimulai dari pelarut *n*-heksan, etil asetat dan metanol. Ekstrak yang didapatkan kemudian dipekatkan dengan *Rotary evaporator*. Dari 1.800 gram serbuk simplisia didapatkan ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan metanol berturut-turut sebanyak 75,572 gram, 99,567 gram dan 64,989 gram.

Selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas antibakteri dari masing-masing fraksi terhadap bakteri uji dengan menggunakan metoda dilusi. Dari hasil pengamatan didapatkan informasi bahwa ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan metanol memiliki aktivitas yang baik terhadap bakteri uji (Tabel II)

Tabel II. Data KHM dan Potensi Ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan metanol terhadap Bakteri Uji

Bakteri	Konsentrasi Hambat Minimum (ppm)			Potensi dibandingkan dengan Sipro (Per tiap 1mg/mL ekstrak)		
	H	E	M	H	E	M
VP	7,8125	3,9063	62,5	$7,52 \times 10^{-5}$	$1,778 \times 10^{-4}$	$1,93 \times 10^{-6}$
ST	15,625	31,25	62,5	1,677	0,64	1,152
EC	3,9063	15,625	31,25	0,061	0,00489	0,00178

Ket : VP: *Vibrio parahaemolyticus* 8070 ; ST : *Salmonella thypimurium* ATCC 14028

EP: *Eschericia coli* ATCC 25922

H : heksan ; E : etil asetat ; M : metanol

Isolasi senyawa antibakteri dilakukan terhadap ekstrak etil asetat, karena pada penelusuran diberberapa literatur, rhodomyrtone dan turunannya ditemukan pada fraksi etil asetat ini. Sebelum dilakukan isolasi, ekstrak ini dikarakterisasi terlebih dahulu, dan hasilnya dapat dilihat pada tabel III. Proses isolasi dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom dengan menggunakan fasa diam silica GF 60 dengan menggunakan system pelarut *step gradient polarity*. Dari hasil isolasi didapatkan isolat 4AB1 berupa serbuk putih

kekuningan dengan titik leleh 148-149°C, larut dalam etil asetat dan metanol. Isolat ini kemudian diujikan aktivitas antibakterinya dan potensinya bila dibandingkan dengan antibiotika siprofloksasin. Dari hasil pengujian tampak bahwa, isolat memiliki aktivitas antibakteri yang baik terhadap bakteri *E.coli* ATCC 25922 dan *S.Thypimurium* ATCC 14028, namun tidak memiliki aktivitas yang baik terhadap *V.parahaemolyticus* 8070 (Tabel IV).

Tabel III. Karakterisasi Ekstrak Etil acetat

No.	Karakterisasi Simplisia	Hasil perhitungan			Rata-rata ± Simpangan baku
		Replika 1	Replika 2	Replika 3	
1	Susut Pengeringan	28,113%	28,703%	28,440%	28,419±0,2956
2	Kadar abu total	0,0600%	0,1399%	0,0999%	0,099±0,04
3	Kadar sari larut air	4,698%	4,897%	4,498%	4,698±0,199
4	Kadar sari larut etanol	14,094%	14,193%	13,796%	14,0270,20
5	Profil Fitokimia	Fenol dan Terpenoid			

Tabel IV. Data KHM dan Potensi Isolat 4AB1 Terhadap Bakteri Uji

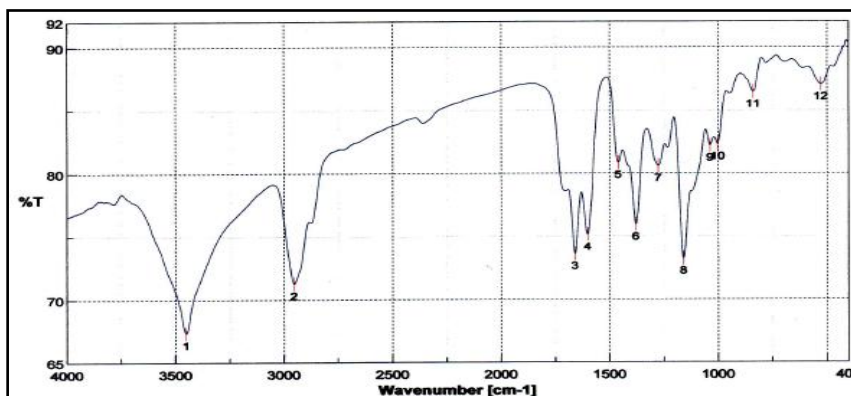
Bakteri	KHM (ppm)	Potensi Terhadap Sipro (per tiap 1 µg/mL larutan isolat)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 8070	6,25	$4,11 \times 10^{-5}$ µg/mL
<i>Salmonella thypimurium</i> ATCC 14028	6,25	0,14 µg/mL
<i>Eschericia coli</i> ATCC 25922	3,125	0,018 µg/mL

Isolat kemudian dikarakterisasi dengan menggunakan spektrofotometer inframerah, Uv-Visibel dan NMR. Pemeriksaan dengan menggunakan spektrofotometer Inframerah dapat dilihat pada Gambar 2, Tabel V. Pita pada panjang gelombang 3450 cm^{-1}

(meruncing dan melebar) menunjukkan adanya gugus hidroksil (OH). Gugus OH ini adalah gugus OH yang berasal dari suatu alkohol, karena memberikan serapan yang melebar pada 3500-3300 cm^{-1} . Selain itu diperkuat dengan serapan C-O pada sekitar

1300-1000 cm^{-1} . Pita pada 2953 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus CH_3 . Pita pada 1660,41 cm^{-1} dan 1602,56 cm^{-1} menunjukkan adanya rangkai $\text{C}=\text{O}$ pada cincin aromatik, yang berasal dari gugus keton. Pita pada 1460 cm^{-1} menunjukkan

adanya gugus CH dan pada 1379,82 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus CH_3 . Pita pada 1277,61 cm^{-1} menunjukkan rangkai $\text{C}-\text{O}$ dari suatu eter ($=\text{C}-\text{O}-\text{C}=\text{C}$). Pita pada 1159 cm^{-1} menunjukkan adanya rangkai $\text{C}-\text{O}$ ($\equiv\text{C}-\text{O}-$).

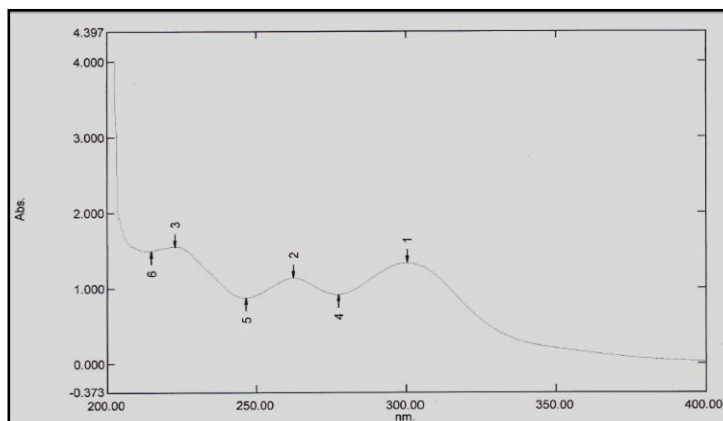


Gambar 2. Spektrum Inframerah Isolat 4AB1

Tabel V. Data Spektroskopi Inframerah Isolat

No	Panjang Gelombang	Gugus
1.	3450,03	Renggang O-H
2.	2952,48	C-H Alifatis
3.	1660,41	C=O
4.	1601,59	C=C
5.	1460,81	C-H bending
6.	1377,89	C-H bending
7.	1277,61	Renggang C-O
8.	1159	C-O stretching

Pemeriksaan dengan menggunakan spektrofotometer Uv-Visibel dapat dilihat pada Gambar 3, Tabel VI.



Gambar 3. Spektrum Ultraviolet Isolat dalam Metanol

Tabel VI. Data Spektroskopi UV Isolat dalam Metanol

No	Panjang Gelombang Maksimum	Absorban
1.	300,40	1,329
2.	262,0	1,136
3.	222,60	1,552

Berdasarkan pita serapan maksimum yang diperoleh dari spektrum UV terindikasi adanya ikatan rangkap berkonyugasi, karena sistem konyugasi ini menyerap cahaya pada panjang gelombang di atas 200 nm. Pada panjang gelombang 300,40 nm menunjukkan adanya eksitasi elektron dari $n-\pi^*$ yang diduga berasal dari gugus C=C-O. Pada panjang gelombang 262,0 dan 222,60 nm menunjukkan adanya eksitasi electron dari $\pi-\pi^*$ yang diduga berasal dari gugus C=C (Cresswell, 1982).

Penggunaan Metanol sebagai pelarut dalam pengukuran spektrum UV ini dikarenakan senyawa hasil isolasi larut baik dalam Metanol, disamping itu Metanol merupakan pelarut polar yang lebih berikatan hidrogen dibandingkan pelarut nonpolar (*n*-heksana). Energi yang diperlukan untuk transisi π ke π^* pada molekul yang berantaraksi (senyawa hasil

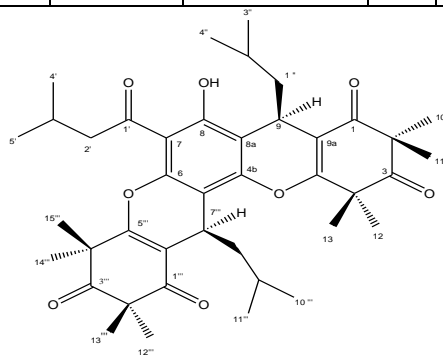
isolasi) dengan pelarut polar (Metanol) lebih kecil daripada energi yang diperlukan untuk transisi π ke π^* dalam pelarut non polar (*n*-heksana). Oleh karena itu, keadaan tereksitasi akan lebih dimantapkan oleh Metanol daripada keadaan dasar dan absorpsi akan terjadi pada panjang gelombang yang lebih stabil dan optimum.

Berdasarkan hasil analisa spektrum UV, IR, $^{13}\text{C-NMR}$, H-NMR, HMQC, HMBC, COSY yang telah dianalisis pada masing-masing spektrumnya dilakukan studi literatur untuk menentukan struktur senyawa isolat 4 AB1. Dari studi literatur diketahui bahwa 4AB1 adalah 7-hydroxy-8,14-diisobutyl-2,2,4,4,10,10,12,12-octamethyl-6-(3-methylbutyryl)-4,8,12,14-tetrahydro-5,13-dioxapentaphene-1,3,9,11-tetraone (Rhodomirtosone C) dengan rumus molekul $\text{C}_{41}\text{H}_{54}\text{O}_8$, dan struktur pada gambar 4

Tabel VII. Perbandingan Data $^{13}\text{C-NMR}$ dan $^1\text{H-NMR}$ Isolat 4AB1 Dengan Rodomyrtosone C (Asadhawut. H, 2008; Dachriyanus, 2004)

No	Isolat 4AB1		Rhodomirtosone C		No	Isolat 4AB1		Rhodomirtosone C	
	$\delta\text{C ppm}$	$\delta\text{H ppm}$	$\delta\text{C ppm}$	$\delta\text{H ppm}$		$\delta\text{C ppm}$	$\delta\text{H ppm}$	$\delta\text{C ppm}$	$\delta\text{H ppm}$
1	197,49		197,4		5`	22,59	0,97	22,6	1,04 (d)
2	56,37		56,0		1"	45,94	3,15; 3,33	45,4	1,5
3	211,00		211,6		2"	42,02	2,19	25,3	1,5
4	47,33		47,2		3"	26,64	1,35	23,3	0,83 (d)
4a	166,84		166,7		4"	23,18	0,868	23,3	0,90 (d)
4b	150,74		152,4		1'''	210,76		197,6	
5	104,45		105,7		2'''	55,03		56,2	
6	150,74		150,5		3'''	212,26		211,4	
7	109,41		107,6		4'''	54,49		47,3	
8	161,62		160,6		5'''	153,71		166,8	
8a	108,67		107,8		6'''	114,79		113,5	
9	25,17	4,27 (dd)	25,6	4,35 (t)	7'''	25,37	1,73 (m)	25,2	4,39 (t)
9a	100,75		114,3		8'''	46,47	3,86 (d,d)	46,8	1,5
10	30,37	1,53 (s)	24,9	1,40 (s)	9'''	25,66	1,87 (m)	25	1,5
11	29,87	1,24 (s)	24,4	1,37 (s)	10'''	20,99	1,16 (d)	23,4	0,84 (d)

12	24,6	1,35 (s)	24,7	1,64 (s)	11'''	24,37	1,01(d)	23,8	0,98 (d)
13	24,37	0,887	25	1,48 (s)	12'''	23,46	1,39 (s)	24,2	1,44 (s)
1'	205,64		204,6		13'''	24,1	1,53	23,8	1,42 (s)
2'	54,24	2,78 ; 2,65	53,9	3,23 (dd) ; 3,02 (dd)	14'''	24,78	1,37 (s)	25,3	1,66 (s)
3'	24,24	2,27 (m)	24,5	2,40 (m)	15'''	25,13	1,62 (s)	24,9	1,52 (s)
4'	22,81	1,51 (s)	22,81	1,05 (d)					



Gambar 4. Struktur Rhodomyrtosone C

Penetapan Kadar Isolat dalam Ekstrak dan Simplisia dengan Metoda KCKT

Penetapan kadar isolat dari ekstrak dan simplisia *R.tomentosa* dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Kondisi sistem yang digunakan adalah kolom absorpsi fasa normal, fasa gerak yang digunakan adalah metanol 100%, laju alir 1 mL/menit, detector UV pada panjang gelombang 262 nm, dan volume penyuntikan 20 µL. Sampel diinjeksikan dengan menggunakan injektor sistem pipa dosis (*loop valve*) sebanyak 20 µL.

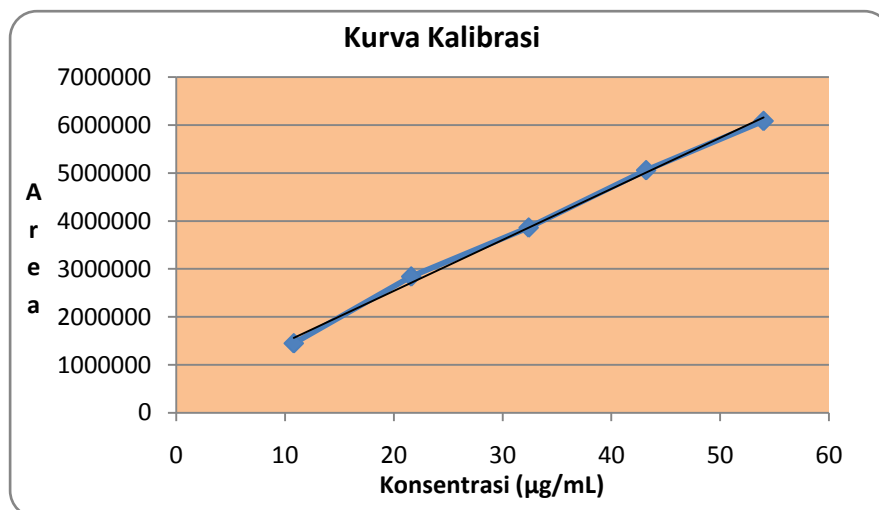
Penetapan Linieritas dan Kurva Kalibrasi

Penetapan linieritas merupakan suatu metode analisis yang menggambarkan kemampuan suatu alat untuk memperoleh hasil pengujian yang sebanding dengan kadar analit dalam zat uji pada rentang kadar tertentu. Linieritas metode penentuan kadar isolat 4AB ditentukan dengan cara membuat kurva hubungan antara konsentrasi standar pada sumbu *x* dan luas area pada sumbu *y*. Konsentrasi larutan isolat 4AB1 yang digunakan adalah 10,8 ; 21,6; 32,4; 43,2 dan 54 ppm. Masing-masing larutan tersebut diinjeksikan pada alat KCKT dengan sistem yang sama sebanyak 20 µl. Dari hasil pengujian didapatkan data luas area seperti yang terlihat pada tabel VIII

Tabel VIII. Data Linearitas dan Kurva Kalibrasi Isolat

Konsentrasi (µg/mL)	Area	Waktu Retensi	Area %	Height	% Height
10,8	1448261	4.503	70.19	258485	76.68
21,6	2841164	4.507	70.21	510807	76.44
32,4	3861706	4.513	71.86	698133	77.79
43,2	5058637	4.517	71.60	913318	77.60
54	6085819	4.513	75.69	1120624	81.11

Dari data tersebut didapatkan persamaan garis $y = 411340,7 + 106412,8611x$ dimana koefisien korelasinya (*r*) sebesar 0,9962



Pada saat dilakukan uji T student untuk membuktikan adanya hubungan antara konsentrasi dengan luas puncak pada taraf kepercayaan $P = < 0,01$ ternyata t hitung = 0,023 , maka H_0 ditolak, yang berarti ada korelasi yang bermakna antara konsentrasi dengan luas area.

Penetapan Sensitifitas

Kepekaan metode analisa ditentukan oleh batas deteksinya (LOD) sedangkan batas kuantitas terkecil yang masih dapat dianalisa oleh suatu metode dengan cermat diistilahkan sebagai LOQ. Limit deteksi ini ditentukan dari persamaan regresi linear kurva standar hasil penentuan uji linearitas (Funk, *et. al.*, 1992). Hasil perhitungan LOD dan LOQ analisa isolat 4AB diperoleh dari persamaan regresi larutan standar adalah

LOD= 3,154 µg/mL dan LOQ= 10,513 µg/mL.

Penetapan Presisi

Presisi yang dilakukan meliputi uji kesesuaian sistem dan metoda. Pada uji kesesuaian sistem (presisi sistem) dilakukan penyuntikan berulang larutan standar yang diketahui konsentrasinya sebanyak 6 kali penyuntikan, hal ini bertujuan untuk melihat kinerja alat pada kondisi dan hari pengujian dengan batas presisi $RSD \leq 2\%$. Dari hasil pengujian didapatkan harga *Relatif Standar Deviasi* (RSD) dari 6 kali penyuntikan larutan standar adalah sebesar 2,714 % . Hal ini berarti metode yang digunakan belum memenuhi persyaratan Farmakope Indonesia edisi IV, dimana harus kecil atau sama dengan 2%.

Tabel IX. Data Hasil Uji Presisi Sistem Larutan Isolat 4AB1 Konsentrasi 64,8 µg/mL

No	Waktu Retensi	Area	Konsentrasi (µg/mL)
1	4,52	7559514	67,17396023
2	4,527	7808462	69,5134143
3	4,5	7304832	64,78062171
4	4,52	7559514	67,17396023
5	4,52	7418740	65,85105623
6	4,5	7304832	64,78062171
Rata-rata	4,5145	7492649	66,54560574
SD	0,01155422	192194,0159	1,806116421
RSD	0,25594%	2,56510%	2,71410%

Presisi metoda dilakukan dengan replikasi atau keberulangan sampel ekstrak

etil asetat *R.tomentosa* dengan cara yang sama sebanyak 6 kali pengulangan . metoda

dikatakan memenuhi persyaratan apabila nilai RSD $\leq 2\%$ (USP, 2000). Konsentrasi ekstrak yang digunakan pada pengujian ini adalah 40,24 $\mu\text{g/mL}$, dimana memberikan absorbansi 1,635 pada panjang gelombang 262 nm. Larutan ini kemudian disaring dengan kertas saring Whatman 0,45 μm sebelum diinjeksikan ke dalam KCKT. Dari

pengujian bahwa presisi metode pengujian Isolat dalam ekstrak etil asetat *R.tomentosa* adalah sebesar 3,192 % (Tabel 18, Lampiran 2 Gambar 41-46). Hal ini menunjukkan bahwa metode ini belum memenuhi persyaratan, karena nilai RSD yang didapatkan besar dari 2% (USP, 2000).

Tabel X. Data Hasil Uji Presisi Metoda

No	Berat Ekstrak Tertimbang (mg)	Kadar yang Diinjeksikan ($\mu\text{g/mL}$)	Luas Puncak		Kadar ($\mu\text{g/mL}$)	% b/b
			Perlakuan	Rata-rata		
1	50,3	40,24	785370	789285,5	3,55168	8,826%
			793201			
2	50,1	40,08	775280	770560	3,37571	8,422%
			765840			
3	50,1	40,08	771701	773973	3,40778	8,502%
			776245			
4	50,3	40,24	781411	780689	3,47089	8,625%
			779967			
5	50,2	40,16	751452	753760,5	3,21784	8,013%
			756069			
6	50,1	40,08	775280	775762,5	3,42460	8,544%
			776245			
Rata-Rata				774005,08	3,4080	8,489%
SD				13221,7714	0,1242	0,271%
RSD				1,708%	3,646%	3,192%

Penetapan Kadar Isolat dalam Ekstrak dan Simplisia

Pada penetapan kadar relatif isolat dari ekstrak etil asetat, didapatkan data kadar relatif isolat tersebut sebesar $8,488\% \pm 0,27$ (Tabel X). Sedangkan kadar relatif isolat

dalam simplisia yang digunakan (45,955 gram) adalah sebesar $0,2771\% \pm 0,0088\%$ (Tabel XI).

Tabel X. Data Hasil Penetapan Kadar Relatif Isolat dalam Ekstrak Etil Asetat

No	Berat Tertimbang* (mg)	Kadar Larutan ($\mu\text{g/mL}$)**	Luas Puncak		Kadar (%)
			Perlakuan	Rata-rata	
1	50,3	40,24	785370	789285,5	8,826%
			793201		
2	50,1	40,08	775280	770560	8,422%
			765840		
3	50,1	40,08	771701	773973	8,502%
			776245		
4	50,3	40,24	781411	780689	8,625%
			779967		
5	50,2	40,16	751452	753760,5	8,013%
			756069		

6	50,1	40,08	775280	775762,5	8,544%
			776245		
Rata-Rata				774005,083	8,489%
SD				13221,7714	0,271%

* Ekstrak tersebut dilarutkan dalam 100 mL metanol (50 mg/100 mL)

* *kadar larutan yang diinjeksikan ke KCKT, dimana disiapkan dengan cara memipet 0,8 mL dari 50mg/100 mL dan dilarutkan dalam metanol ad 10 mL

Tabel XI. Kadar Relatif Isolat dalam Simplisia *R.tomentosa*

No	Berat ekstrak (g)	Kadar dalam Ekstrak (% b/b)	Kadar dalam Simplisia (%)
1	50,3	8,8263%	0,288%
2	50,1	8,4224%	0,275%
3	50,1	8,5025%	0,278%
4	50,3	8,6255%	0,282%
5	50,2	8,0126%	0,262%
6	50,1	8,5444%	0,279%
Rata-rata		8,4889%	0,2771%
SD		0,2709%	0,0088%

Penetapan Persen (%) Perolehan Kembali

Pada penetapan persen (%) perolehan kembali sejumlah isolat yang diketahui kadarnya ditambahkan ke dalam larutan sampel. Larutan sampel yang digunakan adalah larutan sampel 40,24 µg/mL sebanyak 10 mL, dimana kadar isolat dalam larutan tersebut adalah 3,48 µg/mL (34,8µg/10mL). Kemudian sejumlah isolat dimasukkan kedalam larutan tersebut.

Sebanyak 0,3 mL; 0,4 mL dan 0,5 mL larutan isolat dipipet dari larutan induk isolat 1080 µg/mL, sehingga kadar yang ditambahkan berturut-turut sebesar 324 ; 432 ; dan 540 µg. Pengujian dilakukan 2 hari. Dari hasil pengamatan didapatkan data % perolehan kembali dapat dilihat pada Tabel XII dan Tabel XIII

Tabel XII. Data % Perolehan Kembali Hari Pertama

Isolat 4AB1		Perolehan Kembali (%)	Rerata (%)	SD	RSD
Ditambahkan (µg)	Terukur (µg)				
324	326,967	100,916%	101,60%	0,9735%	0,9582%
324	327,8198	101,179%			
324	332,8066	102,718%			
432	460,417	106,578%	107,26%	0,7375%	0,6876%
432	462,9174	107,157%			
432	466,7431	108,042%			
540	602,2079	111,520%	113,75%	2,0138%	1,7704%
540	617,1786	114,292%			
540	623,356	115,436%			

Tabel XIII. Data % Perolehan Kembali Hari Kedua

Isolat 4AB1		Perolehan Kembali (%)	Rerata (%)	SD	RSD
Ditambahkan (µg)	Terukur (µg)				
324	319,1018	98,488%	98,08%	0,4846%	0,4941%
324	316,0374	97,542%			
324	318,1624	98,198%			
432	441,2026	102,130%	103,04%	0,7899%	0,7666%
432	446,7903	103,424%			
432	447,3898	103,562%			
540	583,6376	108,081%	108,52%	0,5744%	0,5293%
540	589,5234	109,171%			
540	584,8835	108,312%			

Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan terhadap simplisia *R. tomentosa* dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

- 1) Pemeriksaan organoleptis/makroskopis simplisia yaitu berupa lembaran daun berwarna coklat dan tidak berbau. Pemeriksaan mikroskopik adanya fragmen pengenal seperti rambut penutup berbentuk batang dan stomata tipe anomositik.
- 2) Dari karakterisasi simplisia didapatkan hasil susut pengeringan $11,322\pm 0,420$, kadar abu $2,147\pm 0,057$, kadar abu tidak larut asam $0,492\pm 0,028$, kadar senyawa terlarut dalam campuran air:kloroform $10,829\pm 0,1535\%$, dan kadar senyawa terlarut dalam etanol $14,027\pm 0,208$, dan simplisia mengandung senyawa fenolik, flavonoid dan terpenoid.
- 3) Dari karakterisasi ekstrak aktif antibakteri (etil asetat) didapatkan hasil susut pengeringan $28,419\pm 0,2956$, kadar abu $0,0999\pm 0,04$, kadar senyawa terlarut dalam campuran air:kloroform $4,698\pm 0,199$, dan kadar senyawa terlarut dalam etanol $14,027\pm 0,20$.
- 4) Ekstrak *n*-Heksan, Etil asetat, Metanol dan Isolat 4AB1 memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Salmonella thypimurium* ATCC 14028, *Vibrio parahaemolyticus* 8070 dan *Eschericia coli* ATCC 25922. Namun berdasarkan potensinya bila dibandingkan dengan antibakteri Siprofloksasin, ekstrak *n*-

Heksan, Etil asetat, Metanol dan Isolat 4AB1 tidak menunjukkan aktivitas antibakteri yang baik terhadap bakteri *Vibrio parahaemolyticus* 8070.

- 5) Dari hasil isolasi senyawa aktif antibakteri dari ekstrak etil asetat didapatkan isolat 4AB1 yang diidentifikasi sebagai senyawa Rhodomyrtosone C berdasarkan data Spektrum IR, Spektrum UV, C-NMR, H-NMR, DEPT, HMBC, HMQC dan COSY. Isolat ini berbentuk serbuk putih kekuningan dengan titik leleh $148-149\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 6) Dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan kolom fasa normal, pelarut metanol 100% dengan kecepatan aliran 1mL/menit didapatkan hasil kadar relatif isolat dalam ekstrak etil asetat sebesar $8,489\% \pm 0,271\%$ dan $0,27\% \pm 0,008\%$.

Saran

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, perlu dilakukan pengembangan metode yang digunakan pada KCKT agar hasil yang didapatkan dapat memenuhi parameter validasi yang baik.

DAFTAR PUSTAKA

Adamovics. J.A., "Chromatographic analysis of Pharmaceuticals", Marcell Dekker, New York, 1990

- Asadhawut. H., Wilawan. M. (2008), *New acylphloroglucinols from the leaves of rhodomyrtus tomentosa*. Journal Tetrahedron 64. 11193-11197.
- Bailey, L. H. (1930). *The Standart Cyclopedia of Horticulturae*, Vol. III, The Macmillan Company, New York.
- Berghe, D. A. V. and A. J. Vlietinck. (1991). Screening Methods for Antibacterial and Antiviral Agents from Higher Plants. in Hostettmann (Ed), *Methods in Plant Biochemistry*, 6, 47-68.
- Burkill, I. H. (1966). *A Dictionary of Economic Product of The Malay Peninsula*, Vol. II, Government of Malaysia and Singapore by The Ministry of Agriculture and Cooperatives, Kuala Lumpur, Malaysia.
- Cresswell, C.J. (1982). *Analisis Spektrum Senyawa Organik*. (Edisi 2). Bandung: ITB
- Dachriyanus. (2004). *Cytotoxic Compounds from Karamunting (Rhodomyrtus tomentosa)*. Padang: Universitas Andalas.
- Depkes Republik Indonesia. (1989). *Materia Medika Indonesia* (Jilid V). Jakarta : Depkes Republik Indonesia.
- Depkes Republik Indonesia. (2000). *Parameter Standar Umum Pembuatan Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Depkes Republik Indonesia.
- Depkes Republik Indonesia. (1979). *Farmakope Indonesia* (Edisi III). Jakarta : Depkes Republik Indonesia.
- Info POM. (2005). *Standarisasi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia, Salah Satu Tahapan Penting Dalam Pengembangan Obat Asli Indonesia*. Badan POM RI, Vol.6, No. 4, 1-5.
- Simes, J. J. H., J. G. Tracey, L. J. webb, and W. J. Dunstan. (1995). *An Australian Phytochemical Survey*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization.
- Tjitrosoepomo,G. (1994). *Taksonomi Tumbuhan Obat-obatan*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 421-423
- Wijayakusuma, H.M.H. (1999). *Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia*, Jilid 1, Prestasi Insan Indonesia. Jakarta. 8-15.