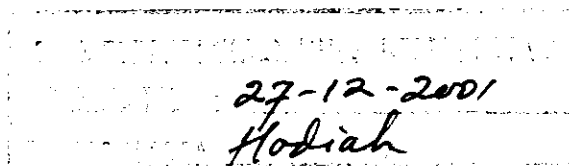


LAPORAN PENELITIAN

ISOLASI KOMPONEN UTAMA FRAKSI AKTIF ANTIBAKTERI DARI DAUN TUMBUHAN MELATI MEDAN (*Clerodendron fragrant Vent*)



H
624/K/2001-i1/2
574.192.85.150 - 11

Oleh

Dra. Isnietti, M.Si

PROYEK PENGEMBANGAN DIRI (PPD)
HEDS PROYEK TAHUN 2000

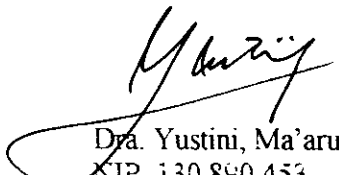
JAGA DAN PERSILAKANLAH KOLEKSI
MILITARY BAK
KEMENTERIAN PERTANIAN
JALAN SUDIRMAN NO. 100
JAKARTA 10110

JURUSAN KIMIA FMIPA
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2000


**PROYEK PENGEMBANGAN DIRI (PPD)
HEDS PROYEK TAHUN 2000**

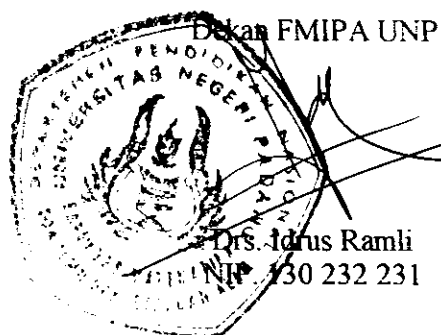
Judul	: Isolasi Komponen Utama Fraksi Aktif Antibakteri dari Daun Tumbuhan Melati Medan (<i>Clerodendron Fragrant Vent</i>)
Jenis Kegiatan	: Penelitian Mandiri
Organisasi	: Jurusan Kimia FMIPA-Universitas Negeri Padang
Pimpinan Proyek	:
Nama	: Dra. Isniyetti, M.Si
Umur	: 52 Tahun
Pangkat/Jabatan	: IV a / Lektor
Nama Alamat Instansi	: Jl. Prof Dr. Hamka Air Tawar Padang
Bidang Keahlian	: Kimia Organik
Jumlah Anggota dalam Tim	: -
Lama Waktu yang diusulkan	: 6 bulan (Juni 2000 – Desember 2000)
Biaya	: Rp. 1.500.000,- (Satu Juta Lima Ratus Ribu Rupiah)

Mengetahui :
Ketua Jurusan Kimia
FMIPA UNP


Dra. Yustini, Ma'aruf, M.Si
NIP. 130 890 453

Padang, 5 Desember 2000
Pimpinan Proyek


Dra. Isniyetti, M.Si
NIP. 130 365 650



KATA PENGANTAR

Berkat rahmat Allah subhanahuwata'ala, penelitian yang berjudul “Isolasi Komponen Utama Fraksi Aktif Antibakteri dari Daun Tumbuhan Melati Medan (*Clerodendron fragrant Vent*)”, telah selesai dilaksanakan.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada : (1) Direktur Eksekutif HEDS dan staf yang telah memberikan dana untuk penelitian ini, (2) Rektor UNP dan Dekan FMIPA UNP yang memberikan kesempatan untuk melaksanakan penelitian ini, (3) Rekan Dosen Jurusan Kimia FMIPA-UNP dan Laboran Laboratorium Kimia Jurusan Kimia FMIPA – UNP yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini, (4) Mahasiswa bimbingan Ismarita dan Wedi Rinaldi yang telah membantu kerja di Laboratorium, (5) semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

Mudah-mudahan hasil penelitian ini dapat memberikan manfaat untuk pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi umumnya dan kimia bahan alam khususnya.

Padang, 5 Desember 2000

Penulis

RINGKASAN

Tumbuhan merupakan sumber utama metabolit sekunder yang mempunyai berbagai aktifitas penting dalam pengobatan seperti antiinfluenza, antihipertensi, antikanker, antibakteri, antijamur dan lain-lain.

Uji pendahuluan kandungan kimia terhadap tumbuhan *Clerodendron fragrans* Vent menunjukkan bahwa tumbuhan tersebut mengandung flavonoid dan steroid. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan senyawa dari fraksi yang aktif antibakteri serta menentukan jenis senyawa hasil isolasi.

Metoda yang dipakai untuk mengisolasi senyawa metabolit sekunder ini merujuk pada metoda yang biasa digunakan untuk mengisolasi metabolit sekunder bahan alam yang mengandung flavonoid. Untuk uji aktifitas antibakterinya digunakan metoda difusi agar dengan menggunakan kertas cakram.

Dua kilogram sampel daun segar yang telah dirajang dimaserasi dengan metanol selama 3 kali berturut-turut masing-masing 5 hari. Ekstrak metanol diuapkan pelarutnya sampai diperoleh ekstrak kental (300 ml), kemudian ditambah dengan 300 ml air panas, diaduk, didiamkan semalam dan didekantasi diperoleh fraksi yang larut dalam air. Fraksi air kemudian berturut-turut difraksinasi dengan n-heksana dan etil asetat, selanjutnya diuapkan pelarutnya di vacuum dan diuji aktifitas antibakterinya. Terlihat bahwa fraksi etil asetat memberikan aktifitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* masing-masing yaitu 17,3 dan 20,4 mm daerah hambatan pertumbuhannya.

Dari 26,3 g fraksi etil asetat yang aktif anti bakteri tersebut dikromatografi kolom menggunakan silika gel 60 (230-400 mesh) sebagai fasa diam dengan pengelusi heksana-etil asetat yang kepolarannya secara berangsur ditingkatkan, berhasil dipisahkan satu senyawa flavonoid (24 mg), padat berbentuk plat berwarna kuning pucat, meleleh pada 283,6 – 286,3 °C.

Berdasarkan analisis data dengan pereaksi warna, Kkt-2A, spektrum UV, IR diduga bahwa senyawa flavonoid hasil isolasi tergolong aglikon flavon

DAFTAR ISI

	Hal
KATA PENGANTAR	i
RINGKASAN	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR LAMPIRAN	v
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Tinjauan Botani Tumbuhan <i>Clerodendron fragrant Vent</i>	4
2.2 Kandungan Kimia dan Aktifitas Biologis Tumbuhan <i>Clerodendron fragrant Vent</i>	4
2.3 Flavonoid	5
2.4 Pengujian Aktifitas Antibakteri	10
III METODOLOGI PENELITIAN	11
3.1 Waktu dan Tempat	11
3.2 Alat dan Bahan	11
3.3 Metoda	11
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	17
4.1 Hasil.....	17
4.2 Pembahasan.....	17
V KESIMPULAN DAN SARAN	19
5.1 Kesimpulan	19
5.2. Saran	19
DAFTAR PUSTAKA	20
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Tabel	Hal
1. Reaksi Warna Flavonoid dengan NaOH, H ₂ SO ₄ dan Mg-HCl.....	8
2. Hasil pengukuran diameter daerah hambatan pertumbuhan bakteri.....	17

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Hal
1. Gambar tumbuhan Melati Medan (<i>Clerodendron fragrant</i> Vent).....	21
2. Hasil pemeriksaan kandungan kimia tumbuhan <i>Clerodendron fragrant</i> Vent...	22
3. Foto percobaan uji aktifitas antibakteri.....	23
4. Skema kerja isolasi komponen utama fraksi aktif antibakteri daun <i>Clerodendron fragrant</i> Vent.....	26
5. Spektrum ultraviolet flavonoid hasil isolasi dengan MeOH, pereaksi geser NaOH ,ALCL ₃ , ALGL ₃ /HCL, NaOAc/H ₃ BO ₃	27
6. Spektrum inframerah flavonoid hasil isolasi.....	29
7. Distribusi flavonoid pada kromatografi kertas dua arah dengan pengembang BAA/HOAc 15%.....	30

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Sebagai suatu negara yang kaya dengan tumbuhan tropis, masyarakat Indonesia semenjak dahulu telah mengenal tumbuhan sebagai obat tradisional. Usaha untuk meneliti tumbuhan yang dapat digunakan sebagai sumber obat masih dalam tingkat percobaan dan belum meluas, sehingga penggunaannya sampai saat ini hanya didasarkan atas pengalaman yang merupakan warisan secara turun-temurun. Di luar negeri penggunaan obat tradisional dianggap lebih efektif dan aman dalam penyembuhan karena umumnya obat ini mempunyai efek samping yang lebih sedikit.

Dalam kaitan dengan riset penemuan senyawa obat, sumber daya alam hayati merupakan suatu perpustakaan kimia yang dapat dimanfaatkan melalui proses ekstraksi dan skrining aktifitas biologisnya. Penggunaan tumbuhan sebagai obat tradisional, jelas berkaitan dengan kandungan kimia yang terdapat dalam tumbuhan tersebut terutama zat aktif biologisnya, sebab tanpa adanya suatu senyawa yang bioaktif secara umum tumbuhan tersebut tidak akan bisa digunakan sebagai obat. Senyawa bioaktif tersebut biasanya merupakan metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, terpenoid, steroid dan lain-lain.

Survey fitokimia merupakan salah satu pendekatan yang dilakukan ilmuwan untuk mencari tumbuhan yang mengandung zat bioaktif. Survey ini memegang peranan penting untuk mengetahui kandungan kimia utama tumbuhan terutama komponen yang bioaktif, yang sekaligus merupakan langkah awal untuk memahami penggunaan tumbuhan sebagai obat tradisional oleh masyarakat.

Sebagai kelanjutan dari penelitian-penelitian kandungan kimia tumbuhan obat terdahulu, dirasakan perlu untuk meneliti kandungan kimia dan melakukan uji bioaktifitasnya dalam rangka validitas penggunaan obat tradisional.

Clerodendron fragrant Vent (lampiran 1) di Sumatera Barat dikenal dengan tumbuhan "melati medan" secara tradisional bahagian bunganya digunakan oleh masyarakat sebagai campuran obat panas, bagian batangnya sebagai ramuan obat dan daunnya sebagai ramuan obat kulit. Menurut Burkill

dalam (Bor, Raizoda, 1954) masyarakat telah menggunakan tumbuhan ini sebagai obat tradisional yaitu sebagai obat luar, pengobatan reumatik, demam dan dapat digunakan dalam terapi penyakit kulit.

Hasil pemeriksaan pendahuluan terhadap senyawa metabolit sekunder tumbuhan ini memperlihatkan reaksi positif dengan Lieberman-Burchard, Cianidin tes dan besi (III) klorida yang merupakan indikasi adanya steroid, flavonoid dan fenolik.

Dari penelusuran literature melalui dan Agricola (1997) belum ditemukan laporan tentang kandungan kimia ataupun bioaktifitas dari tumbuhan tersebut.

Dari genus yang sama yaitu *Clerodendron inerme* telah dilaporkan mengandung senyawa diterpen neo klerodane dengan struktur 15-metoksi-14,15 dihiro-3-epikarioptin (Achari, et al, 1992). Senyawa ini dapat menghambat perkembangan serangga dan antifiden (Rao, et al, 1993). Ekstrak dari tumbuhan *Clerodendron trichotomum* memberikan efek pada tekanan darah dan fungsi ginjal (Lu, et al, 1994). *Clerodendron celebrikanum* telah dilaporkan mengandung senyawa glikosida sterol yaitu 3-O-(β -D-glukosida) klerosterol (Goswani, et al, 1996). Daun dan bunga *Clerodendron phlomidis* dilaporkan mengandung senyawa glikosida kalkon yaitu 2-hidroksi-6-metoksi kalkon-4,4'-D diglikosida (Roy, Pandery, 1994).

Clerodendron siphonanthus R.Br telah dilaporkan mengandung senyawa flavon yaitu skutelarein dan metil skutelarein dengan aktifitas biologis masing-masing vasokonstriksi, simpatomimetik dan penekanan SSP, (Mon, dkk, 2000).

Berdasarkan hal tersebut di atas, pada penelitian ini dicoba untuk mengisolasi komponen utama fraksi aktif antibakteri dari daun *Clerodendron fragrant* Vent. Isolasi pada penelitian ini dimulai dengan ekstraksi secara maserasi dengan pelarut metanol, kemudian difraksinasi dengan berbagai pelarut dan diperiksa komponen utamanya dengan kromatografi lapis tipis serta diuji aktifitas anti bakterinya dengan metoda difusi agar menggunakan kertas cakram. Fraksi yang aktif antibakteri di kolom kromatografi dan dimurnikan secara rekristalisasi. Terhadap senyawa hasil isolasi dilakukan uji dengan pereaksi

warna, penentuan jarak titik, pemeriksaan kromatogram, pemeriksaan spekstroskopi ultraviolet dan infra merah.

1.2. Perumusan Masalah

Masalah dalam penelitian ini adalah : senyawa metabolit apakah yang dikandung oleh fraksi yang aktif antibakteri dari daun *Clerodendron fragrant* Vent ?.

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk

1. Mengisolasi komponen utama fraksi aktif antibakteri dari daun *Clerodendron fragrant* Vent.
2. Menentukan jenis metabolit sekunder hasil isolasi fraksi aktif anti bakteri.

1.4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi tentang komponen utama fraksi aktif antibakteri dari daun *Clerodendron fragrant* Vent, serta kemungkinan pemanfaatan tumbuhan ini dalam pengobatan.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Botani Tumbuhan *Clerodendron fragrant* Vent.

Clerodendron fragrant Vent adalah salah satu spesies dari *Clerodendron*. secara taksonomi dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Divisio	: Sphermatophyta
Sub divisio	: Angiospermae
Klas	: Dicotyledone
Sub klas	: Sympetaleae
Ordo	: Tubiflorae
Genus	: <i>Clerodendron</i>
Spesies	: <i>Clerodendron fragrant</i> Vent

Spesies ini tumbuh secara liar di pekarangan, kebun dan pinggir jalan. Penyebaran tumbuhan ini aslinya dari Cina yang juga tumbuh secara liar. Tumbuhan ini berupa perdu dengan tinggi kira-kira 0,5 – 3 m, batangnya berlobang di tengah. Berbunga ganda, berlapis-lapis seperti mawar kecil, berwarna putih dan merah jambu serta mempunyai bau yang wangi. Daun saling berhadapan, berbentuk bulat telur yang lebar dan sedikit mengecil di ujung daun, sehingga hampir menyerupai hati. Tumbuhan ini menyebar dengan cepat dan menebar tunas yang banyak, suka ditempat rindang dan lembab serta tahan di tempat kering (Raizoda, 1954).

2.2 Kandungan Kimia dan Aktifitas Biologis Tumbuhan *Clerodendron*

Dari penelusuran literature, *Clerodendron inerme* ditemukan mengandung senyawa diterpenoid neo-klerodane yang mempunyai aktifitas menghambat perkembangan serangga dan antifidant (Rao, et, al, 1993). Secara spektroskopi strukturnya adalah 15-metoksi-14,15-dihidro-3-epikarioptin (Achari, et. al, 1992).

Clerodendron celebrikanum mengandung senyawa glikosida sterol yaitu 3-0-(β -D-glukosida) klerosterol (Goswani, et al, 1996). Ekstrak dari tumbuhan *Clerodendron trichotomum* dapat menurunkan tekanan darah dan memberikan

efek terhadap vasodilasi ginjal (Lu, et.al, 1994). Daun dan bunga *Clerodendron phlomidis* mengandung senyawa glikosida kalkon bersama dengan pektolarigenin, 7-hidroksifalvon dan 7-hidorksi flavanon-7-O-glukosida. Struktur dari glikosida kalkon dilaporkan sebagai 2'-hidroksi-6'-metoksi kalkon-4,4'-diglikosida (Roy, et al, 1994).

2.3 Flavonoid

Kerangka umum flavonoid adalah $C_6-C_3-C_6$, artinya dua cincin benzena terikat pada suatu rantai propane. Flavonoid (1,3-diarilpropana) merupakan senyawa fenol alam yang secara meluas terdapat dalam tumbuhan, senyawa ini merupakan zat warna merah, ungu dan biru dan sebagian zat warna kuning. Senyawa flavonoid terdapat dalam semua bagian tumbuhan tinggi seperti bunga, daun, ranting, buah, kulit kayu dan akar. Akan tetapi senyawa flavonoid tertentu sering kali terkonsentrasi dalam suatu jaringan tertentu saja, misalnya antosianin adalah zat warna yang hanya terdapat pada bunga, buah dan daun. Sebagian besar flavonoid ini ditemukan dalam bentuk glikosida, dimana inti flavonoid terikat pada suatu molekul gula. Pigmen flavonoid yang bebas gula disebut sebagai aglikon (Achmad, 1986).

2.3.1 Klasifikasi

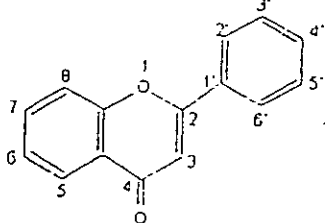
Senyawa flavonoid yang terdapat di alam, berdasarkan pada tingkat oksidasi dari rantai propane pada sistim 1,3-diarilpropana, dapat dikelompokkan atas beberapa jenis yakni flavon, flavonol, antosianidin, dihidrokalkon, kalkon, flavan, katekin, leukoantosianidin, flavanon, biflavonoid, garam flavilium dan auron. Struktur dasar beberapa diantara jenis tersebut adalah flavon (1), flavonol (2), flavanon (3), flavanonol (4), antosianidin (5), kalkon (6) dan auron (7). Dari jenis-jenis tersebut, lima jenis diantaranya yaitu kalkon, auron, dihidrokalkon, flavanon dan dihidroflavonol terdapat dalam jumlah yang terbatas sehingga dikatakan sebagai flavonoid minor. Banyaknya jenis senyawa flavonoid ini disebabkan karena modifikasi struktur yang terjadi pada proses biosintesis menghasilkan penambahan atau pengurangan gugus hidroksil, metilasi gugus hidroksil terhadap inti flavonoid, metilasi gugus ortodihidroksi, dimerisasi untuk pembentukan biflavonoid, pembentukan bisulfat, dan gugus hidroksil untuk

pembentukan flavonoid-o-glikosida atau glikosilasi inti flavonoid untuk pembentukan flavonoid-C-glikosida (Markham, 1988 dan Harborne, 1994).

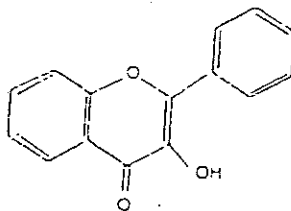
1) Aglikon Flavonoid

Aglikon adalah pigmen flavonoid yang bebas-gula, misalnya aglikon flavon seperti apigenin dan luteolin dan aglikon flavonol seperti kuersetin dan mirisetin.

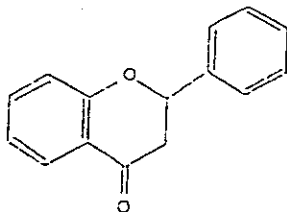
(1)



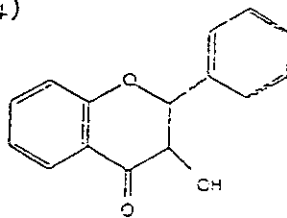
(2)



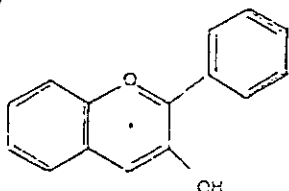
(3)



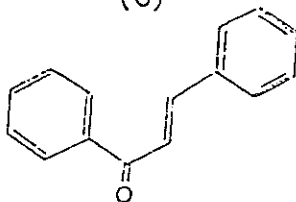
(4)



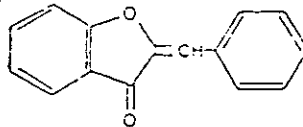
(5)



(6)



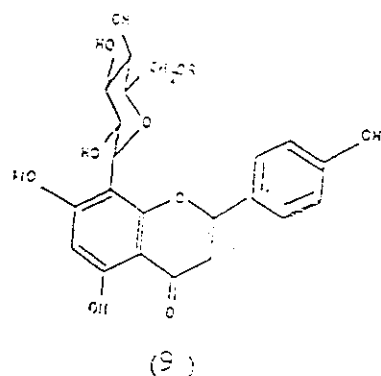
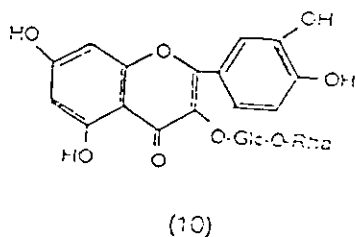
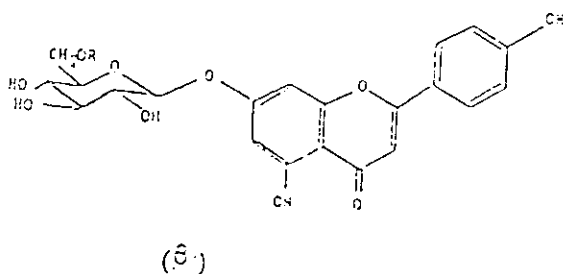
(7)



2) Glikosida flavonoid

Glikosilasi gugus hidroksil dari aglikon menghasilkan flavonoid O-glikosida dengan ikatan C-O (apigenin-7-O glukosida) (8) dan glikosida inti flavonoid menghasilkan flavonoid C-glikosida dengan ikatan C-C (apigenin-8-C-β-D-glukopiranosida) (9). Sebagian besar flavonoid terdapat sebagai flavonoid

O-glikosida, dimana satu atau lebih gugus hidroksil terikat pada satu atau lebih molekul gula dengan ikatan hemi asetal yang tidak tahan asam. Walaupun gugus hidroksil pada setiap posisi dalam inti flavonoid dapat diglikosilasi, kenyataannya bahwa gugus hidroksil pada tempat tertentu mempunyai peluang yang lebih besar untuk terglykosilasi ketimbang tempat lainnya. Sebagai contoh untuk flavon, gugus hidroksil pada posisi 7 yang lebih mudah terglykosilasi seperti (apigenin-7-O glukosida). Gugus hidroksil pada posisi 3 dan 7 yang lebih banyak terglykosilasi seperti rutin (3',4',7'-trihidroksi flavonol-3-O-rannoglukosida (10). Glikosa merupakan gula yang paling umum ditemukan, gula lain yang juga ditemui diantaranya adalah galaktosa, rannosa, silosa dan arabinosa (monosakarida), dan soforosa, gentibiosa, rutinosa dan neohesperidosa (disakarida) (Markham, 1988).



2.3.2. Identifikasi

Senyawa flavonoid hasil isolasi dikarakterisasi berdasarkan warna, bentuk kristal dan titik lelehnya dan kemudian dianalisa berdasarkan antara lain;

(1) Reaksi Warna

Mereaksikan senyawa flavonoid dengan pereaksi-pereaksi tertentu menjadi senyawa berwarna merupakan suatu cara untuk menentukan jenis flavonoid apakah termasuk flavon, flavonol atau antosianidin (Finar, 1976). Pereaksi tersebut adalah larutan natrium hidroksida 10 % asal sulfat pekat dan magnesium-asam klorida (Mg-HCl). Perubahan warna yang terjadi dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1: Reaksi warna flavonoid dengan NaOH, H₂SO₄ dan Mg/HCl.

Jenis	Larutan NaOH	H ₂ SO ₄	Mg/HCl
Antosianin	Biru sampai violet	Orange kekuning	Merah (pudar-pink)
Flavon	Kuning	Kuning sampai orange	Kuning sampai merah
Flavonol	Kuning sampai orange	Kuning sampai orange	Merah sampai magenta

(2) Metoda Kromatografi

Letak bercak pada kromatografi kertas dua arah (pengembang BAA/HOAc 15 %) serta bercak yang kelihatan dibawah sinar ultraviolet baik sebelum dan sesudah diberi penampak noda, merupakan informasi yang sangat bernilai dalam menentukan jenis suatu flavonoid (Markham, 1988 dan Mabry, et al, 1970). Distribusi flavonoid pada kromatografi kertas dua arah dapat dilihat pada lampiran (8).

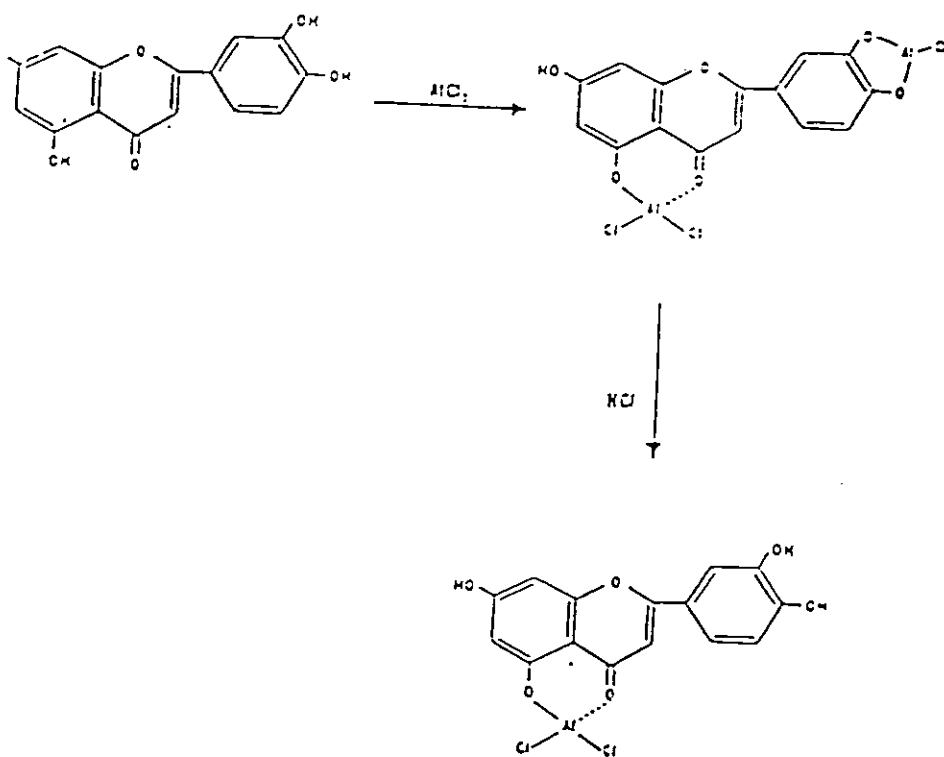
Larutan aluminium klorida 5% yang digunakan untuk spektrum UV-VIS, jika disemprotkan pada kromatogram kromatografi kertas yang kemudian dikeringkan, menunjukkan 5-hidroksi-flavonoid sebagai bercak berfluoresensi bila dilihat dibawah sinar UV (366 nm). Selain itu bercak yang semula tidak tampak menjadi terlihat (Markham, 1988).

(3) Metode Fisiko Kimia

Senyawa flavonoid hasil isolasi diidentifikasi strukturnya dengan metoda spektroskopi. Menurut Markham (1988), sepektroskopi serapan ultraviolet dan sinar tampak (sepektroskopi UV-VIS), merupakan suatu cara yang paling berguna untuk menganalisis struktur flavonoid karena dapat mengidentifikasi jenis flavonoid dan menentukan pola oksigenasinya. Spektrum flavonoid biasanya diambil dengan menggunakan pelarut methanol. Spektrum metanol dari flavonoid terdiri dari dua puncak absorpsi utama dalam daerah 240 – 384 nm. Kedua puncak ini umumnya dirujuk sebagai pita I (biasanya 300 – 385 nm) dan pita II (biasanya 240 – 280 nm). Pita I berhubungan dengan absorpsi yang disebabkan oleh sistim sinamil cincin B, dan pita II dengan absorpsi sistim benzoil cincin A. Disamping itu, kedudukan gugus hidroksil fenol bebas pada inti flavonoid dapat ditentukan dengan penambahan

peraksi-pereaksi geser larutan natrium metoksida (NaOMe), larutan aluminium klorida (AlCl_3) dalam metanol, larutan asam klorida (HCl), serbuk natrium asetat (NaOAc) dan serbuk asam borat (H_3BO_3) ke dalam larutan cuplikan dalam metanol dan mengamati pergeseran puncak serapan yang terjadi.

Spektrum "NaOMe" merupakan spektrum flavonoid yang gugus hidroksil fenolnya sampai batas tertentu terionisasi, oleh sebab itu merupakan petunjuk yang berarti dalam pola hidroksilasi, mendeteksi gugus hidroksil yang lebih asam dan tidak tersubstitusi. Terjadinya perubahan spektrum setelah waktu tertentu merupakan petunjuk adanya gugus hidroksil yang peka terhadap basa. Spektrum "NaOAc" hanya menyebabkan pengionan yang berarti pada gugus hidroksil yang paling asam sehingga digunakan untuk mendeteksi adanya gugus 7-OH bebas dan spektrum "NaOAc/ H_3BO_3 " digunakan untuk mendeteksi keberadaan gugus hidroksil pada gugus orto-dihidroksil sebab H_3BO_3 menjembatani kedua gugus orto - dihidroksi. Spektrum " AlCl_3 " digunakan untuk mendeteksi keberadaan gugus hidroksil pada C_5 dan gugus orto-hidroksi pada cincin B. Penambahan AlCl_3 akan membentuk kompleks yang tahan asam antara gugus hidroksil C_5 dengan gugus keton pada C_4 dan kompleksnya yang tidak tahan asam sesuai dengan gugus ortodihidroksi pada cincin B.



Dengan demikian spektrofotometer UV-VIS secara tidak langsung berguna untuk menentukan kedudukan molekul gula atau gugus metil yang terikat pada satu gugus hidroksi fenol. Dengan adanya berbagai jenis spektrum rujukan yang lengkap, akan membantu dalam penafsiran spektrum serapan UV-VIS dari senyawa flavonoid (Markham, 1988).

Spektrum serapan infra merah berguna untuk menentukan gugus-gugus fungsi yang terdapat pada senyawa flavonoid, dimana setiap gugus fungsi akan memberikan puncak serapan yang khas pada frekuensi antara $4000-400\text{ cm}^{-1}$. Gugus C=O karbonil menyerap dalam daerah $1820-1660\text{ cm}^{-1}$, OH : $3600-3300\text{ cm}^{-1}$, C=C aromatik 1650 cm^{-1} - 1450 cm^{-1} , C-O eter $1300-1000\text{ cm}^{-1}$, C-H aromatik di kiri 3000 cm^{-1} , dan C-H sp^3 $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ (Pavia, Lampman dan Kriz, 1988).

2.4. Pengujian Aktifitas Antibakteri

Staphylococcus aureus merupakan bakteri gram positif. Bakteri ini merupakan bakteri patogen yang dapat menyebabkan terjadinya proses sporatif pada tempat terjadinya infeksi, bakteri ini dapat ditemukan pada kulit dan usus. Infeksi akan terjadi apabila *Staphylococcus aureus* masuk ke dalam tubuh melalui luka atau membran mukosa (Pelczar, 1988).

Metoda Pengujian Aktifitas Antibakteri

Salah satu cara pengujian aktifitas anti bakteri adalah dengan metoda difusi agar menggunakan kertas cakram. Zat yang akan diuji aktifitasnya berdifusi dari cakram kertas sebagai pencadang dalam medium agar yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji. Hambatan akan terlihat berupa daerah bening yang bergantung pada daya serap zat ke dalam agar dan kepekaan bakteri terhadap zat tersebut selama inkubasi. Setelah selesai inkubasi dilakukan pengukuran luas diameter daerah hambatan pertumbuhan bakteri (Pelczar, 1988).

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan dilaboratorium Penelitian Kimia dan Mikrobiologi FMIPA UNP Padang dari bulan Juli-Desember 2000.

3.2. Alat Dan Bahan

3.2.1 Alat-alat yang digunakan

Satu set alat destilasi, rotary evaporator, bejana kromatografi, corong biasa, corong pemisah, erlenmeyer dengan berbagai ukuran, pipet, kertas saring, batang pengaduk, gelas ukur, lumpang, plat tetes, tabung reaksi, pisau, spatula, kolom kromatografi. Plat KLT kiesel gel 60 GF 254, lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm, oven, spektrofotometer infra merah Perkin-Elmer 735B, spektrofotometer UV-Vis (Secomam 1000 PC), cawan petri, jarum ose, jangka sorong, autoklaff, inkubator, lampu bunsen, penangas air.

3.2.2 Bahan-bahan yang digunakan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tumbuhan *Clerodendron fragrant* Vent. Bahan-bahan kimia dan pelarut yang digunakan adalah metanol, etanol, etil asetat, n-heksana, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, asam klorida pekat, air suling amonia pekat, kloroform, logam magnesium, besi (III) klorida, silika gel 60 (230-400) mesh, larutan NaCl fisiologis, medium nutrient agar (NA), bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*.

3.3 Metoda

Penelitian ini dilakukan dengan cara maserasi daun (sampel) dengan metanol difraksi dengan n-heksana dan etil asetat. Masing-masing fraksi diuji aktifitas antibakteri, fraksi yang mempunyai daerah daya hambat pertumbuhan bakteri yang paling menonjol diisolasi kandungan kimia utamanya dengan kolom kromatografi, kemudian ditentukan jenis senyawanya. Skema kerja pada lampiran 5.

3.3.1. Pengambilan dan persiapan sampel

Sampel penelitian adalah daun melati medan (*Clerodendron fragrant* Vent) diambil di daerah Siteba kecamatan Nanggalo Kodya Padang Sumatera Barat pada bulan Juli 2000. Identifikasi tumbuhan dilakukan diherbarium Biologi Universitas Andalas Padang.

3.3.2. Identifikasi Kandungan Kimia

a. Pemeriksaan Alkaloid

Pemeriksaan alkaloid ini dilakukan dengan metoda Culvenor Fitzgerald (Culvenor and Fitzgerald, 1963), dengan cara mengambil lebih kurang 4 gram sampel segar dipotong kecil, digerus dalam lumpang porselen dengan bantuan pasir bersih, basahi dengan 10 ml kloroform. Kemudian tambahkan 10 ml kloroform-amonia 0,05 N, dan gerus lagi, saring kedalam tabung reaksi. Selanjutnya tambahkan 10 tetes asam sulfat 2N, kocok perlahan dan biarkan memisah, ambil lapisan asamnya pindahkan kedalam tabung reaksi lain, kemudian tambahkan beberapa tetes pereaksi Mayer, timbul endapan putih yang jelas menunjukkan sampel mengandung alkaloid.

b. Pemeriksaan Flafonoid

Sampel segar lebih kurang 4 gram dididihkan dengan etanol (25ml), saring selagi panas, filtrat yang diperoleh diuapkan sampai tinggal setengahnya. Tambahkan asam klorida dan serbuk magnesium, perhatikan perubahan warna menjadi merah/pink menunjukkan sampel mengandung senyawa flavonoid. Hasil dapat dilihat pada lampiran 2.

c. Pemeriksaan Steroid, Triterpenoid, Saponin dan fenol.

Pemeriksaan ini dilakukan dengan metoda Simes et al yang telah dimodifikasi (Arbain dan Tamin, 1995). Sampel segar kurang lebih 4 gram dipotong kecil, di didihkan dalam etanol (25ml) selama 15 menit, saring dalam keadaan panas, uapkan pelarutnya sampai kering. Ekstrak dikocok kuat dengan kloroform kemudian ditambahkan air. Untuk pemeriksaan steroid dan triterpenoid diambil fraksi kloroform, di teteskan pada plat tetes biarkan sampai kering, setelah itu pada salah satunya tambahkan asam asetat anhidrat, kemudian tambahkan

asam sulfat pekat pada keduanya. Terpenoid umumnya memberikan warna merah yang berbeda dari kontrol (yang hanya ditambahkan dengan asam sulfat pekat saja), sedangkan untuk steroid berwarna biru atau hijau yang juga berbeda dari kontrolnya. Pereaksi ini disebut pereaksi Lieberman-Burchard).

Untuk pemeriksaan saponin, lapisan air tersebut dikocok kuat dalam tabung reaksi. Adanya busa yang mantap selama 5 menit setinggi 1 cm menandakan adanya saponin.

Untuk pemeriksaan senyawa fenolik diambil lapisan air, kemudian tambahkan larutan besi (III) klorida, timbulnya warna menandakan adanya senyawa fenolik.

Data lengkap hasil pemeriksaan kandungan kimia dapat dilihat pada lampiran 2.

3.3.3. Uji aktivitas antibakteri hasil fraksinasi

Pengujian aktivitas anti bakteri dilakukan dengan metoda difusi agar memakai kertas cakram. Untuk contoh uji digunakan fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, sebagai bakteri ujinya *Staphylococcus aureus* (bakteri gram positif) dan *Eschericia coli* (bakteri gram negatif). Medium pembenihan digunakan Nutrient-agar (NA). Larutan uji dibuat dengan melarutkan ekstrak kental masing-masing fraksi dalam etanol dengan konsentrasi 70%.

a. Sterilisasi alat dan bahan

Alat-alat berupa tabung reaksi, gelas ukur, vial, pipet, cawan petri yang akan disterilkan terlebih dahulu dicuci bersih dan dikeringkan, semua alat-alat ditutup mulutnya dengan kapas, dibungkus dengan kertas perkamen, juga cawan petri dibungkus dengan kertas perkamen kemudian semuanya disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Jarum ose dan pinset disterilkan dengan membakar pada lampu spiritus atau bunsen.

b. Pembuatan medium

Medium yang digunakan untuk membiakkan bakteri adalah Nutrien-Agar (NA), seberat 20 gram serbuk NA dilarutkan dalam 1 L air suling, dipanaskan diatas penangas air sampai mendidih, kemudian sterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

c. Pembuatan suspensi mikroba uji

Bakteri pada stok kultur diremajakan pada media miring, diambil dengan jarum ose dan disuspensikan ke dalam larutan NaCl fisiologis sampai diperoleh kekeruhan atau turbiditas 25% T yang diukur dengan spektromik pada panjang gelombang 580 nm.

d. Inokulasi media perbenihan dengan mikroba uji

Suspensi bakteri uji diambil sebanyak 0.1 ml dengan mikropipet steril, kemudian diletakkan di tengah-tengah cawan petri steril. Diambil sebanyak 15 ml medium agar cair dituangkan ke dalam cawan petri, digoyang hingga campuran homogen dengan suspensi mikroba uji lalu biarkan sampai memadat.

e. Pelaksanaan uji aktivitas antibakteri

Dengan menggunakan pinset steril, kertas cakram dimasukkan ke dalam larutan uji (ekstrak dengan konsentrasi 70 % dalam etanol) pada permukaan media perbenihan atau lempeng agar. Kemudian letakkan cawan petri secara terbalik dalam inkubator dan diinkubasikan pada suhu 35-37 °C selama 24 jam.

f. Evaluasi

Larutan yang diuji dikatakan mempunyai aktifitas jika dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Daerah hambatan terlihat sebagai bagian yang bening disekeliling kertas cakram, diameter hambatan diukur dengan jangka sorong. (Hasil dapat dilihat pada lampiran 4)

3.3.4. Ekstraksi dan fraksinasi

a. Ekstraksi

Daun segar yang telah dirajang halus dimaserasi dengan metanol (3x8Lx5 hari). Ekstrak metanol dipisahkan dengan cara penyaringan, kemudian dipekatan *in vacuo* hingga diperoleh ekstrak kental \pm 300 ml.

b. Fraksinasi

Ekstrak metanol ditambah dengan 300 ml air panas, lalu diaduk didiamkan semalam dan didekantasi, diperoleh fraksi yang larut dalam air. Dengan menggunakan corong pisah, fraksi air difraksinasi dengan n-heksana (3x150 mL). Fraksi n-heksana dipisahkan, fraksi air difraksinasi lagi dengan etil asetat (3x150 ml). Fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat masing-masing diuapkan pelarutnya *in vacuo*. Terhadap masing-masing fraksi diuji aktifitas anti bakterinya.

3.3.5. Pemisahan Komponen Utama Fraksi Aktif Anti Bakteri.

Fraksi etil asetat sebanyak 26,3 g yang memperlihatkan ada daerah hambatan pertumbuhan bakteri setelah dimonitor dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan pengelusi heksana-etil asetat (1:1) memberikan indikasi kuat adanya senyawa flavonoid atau fenolik. Selanjutnya ekstrak kental etil asetat di kromatografi kolom menggunakan silika gel 60 (230-400 mesh), (50 g) melalui cara preadsorpsi, dielusi dengan fasa gerak heksana : etil asetat (7:3, 1:1, 1:2, 1:4) etil asetat masing-masing 100 mL.

Fraksi yang keluar ditampung dengan Vial \pm 10 mL diperoleh 50 vial. Fraksi 6-9 memberikan endapan berwarna kuning kehijauan. Setelah dimonitor dengan KLT, dibawah lampu UV 256 nm dan diberi larutan $FeCl_3$ ternyata memperlihatkan satu noda utama, kemudian digabung. Gabungan endapan vial 6-9 dilarutkan dengan metanol panas dan biarkan mengendap. Endapan dilarutkan dalam heksana-etilasetat (1:1) biarkan mengendap dan pisahkan filtratnya. Lakukan secara berulang sehingga diperoleh endapan (24 mg) yang setelah dimonitor dengan KLT memberikan satu noda dengan $R_f = 0,56$.

3.3.6. Karakterisasi senyawa hasil Isolasi

a. Pemeriksaan titik leleh

Hasil pemisahan dengan kromatografi kolom terhadap fraksi etil asetat yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri, 17,3 mm terhadap *S. aureus* dan 20,4 mm terhadap *E. coli*. Setelah dilakukan rekristalisasi diperoleh senyawa murni yang juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan daerah hambatan pertumbuhan 10 mm untuk *S. aureus* dan 13,9 mm untuk *E. coli*. Aktivitas anti bakteri senyawa ini ternyata rendah jika dibandingkan dengan aktivitas fraksi etil asetat, ini mungkin karena masih ada komponen aktif lain yang belum terpisahkan. Kromatogram KLT senyawa ini dengan pengelusi heksana : etil asetat (1:1) dan penampak noda larutan FeCl_3 memperlihatkan noda tunggal dengan $R_f = 0,56$, diduga senyawa ini bersifat agak polar. Senyawa ini dengan larutan NaOH berwarna kuning kehijauan, dengan H_2SO_4 pekat berwarna kuning dan dengan Mg-HCl berwarna orange. Dengan Kkt-2A memberikan noda tunggal berwarna ungu dengan lampu UV, kuning dengan uap NH_3 dan letak bercak pada kromatogram pada bagian kiri. Berpedoman pada data ini dan distribusi flavonoid (Markham, 1988) diduga senyawa hasil isolasi adalah flavonoid tergolong aglikon flavon.

Hasil pengukuran spektrum UV senyawa ini dalam metanol memberikan serapan maksimum pada 334,6 nm (pita I) dan 274,9 nm (pita II). Data ini mirip dengan serapan flavon (Markham, 1988). Penambahan pereaksi geser NaOH menyebabkan pergeseran batokromik 56,4 nm pada pita I diiringi naiknya intensitas serapan merupakan karakteristik OH pada C_4' . Munculnya pita baru pada panjang gelombang 327,2 nm menunjukkan adanya OH pada C_7 . Penambahan AlCl_3/HCl menyebabkan pergeseran batokromik 22,9 nm relatif terhadap spektrum MeOH menunjukkan adanya gugus OH pada C_5 . Serapan penambahan HCl terhadap AlCl_3 tidak menyebabkan pergeseran yang berarti, ini menunjukkan tidak adanya gugus O di-OH pada cincin B. Penambahan NaOAc menyebabkan pergeseran batokromik 12,6 nm pada pita II, ini merupakan ciri khas OH bebas pada C_7 . Penambahan H_3BO_3 relatif tidak terjadi pergeseran, ini menunjukkan tidak ada O di-OH pada cincin A maupun B.

Hasil analisa spektrum IR senyawa ini menunjukkan adanya gugus fungsi OH pada bilangan gelombang 3125 cm^{-1} , ini diperkuat dengan adanya fibrasi ulur CO pada 1380 cm^{-1} dan 1125 cm^{-1} , C=O pada 1660 cm^{-1} , C=C aromatik pada 1600 cm^{-1} , C-O-C eter pada 1555 cm^{-1} dan pada 840 cm^{-1} menunjukkan tekuk C-H luar bidang.

Berdasarkan analisa data yang dikemukakan di atas dan dibandingkan dengan data yang ada pada literatur (Mabry, et. Al. 1970) maka dapat diduga bahwa senyawa ini adalah aglikon flavon

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Hasil uji aktifitas antibakteri, menunjukkan fraksi etil asetat memberikan aktifitas yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* 17,3 mm dan *Eschericia coli* 20,4 mm.
2. Fraksi etil asetat daun melati medan (*Clerodendron fragrant* Vent) ditemukan mengandung flavonoid yang diduga golongan flavon

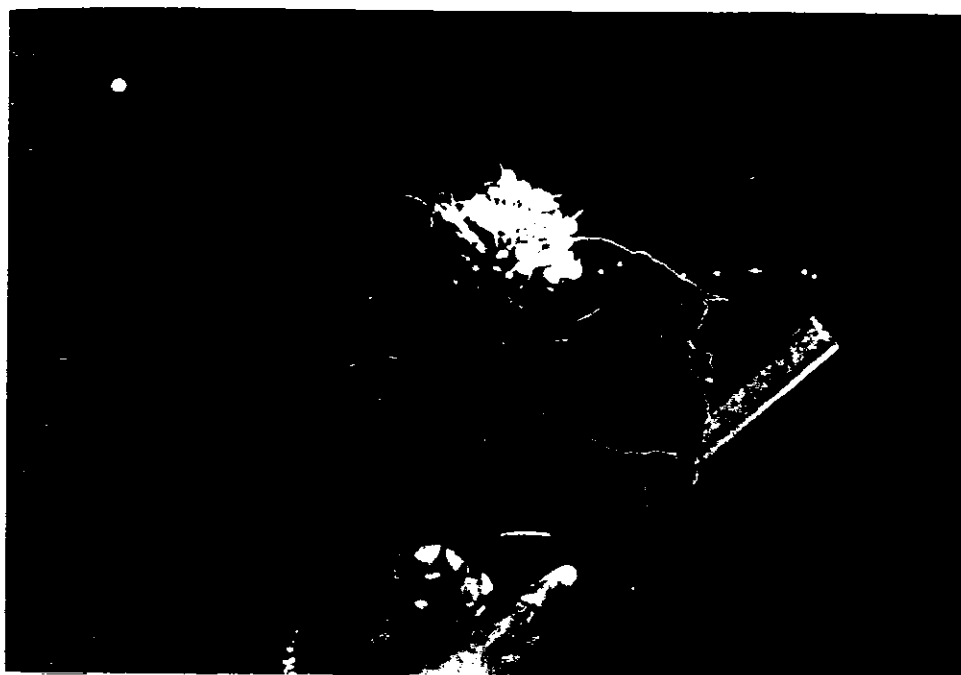
5.2. Saran

Diharapkan penelitian ini bisa dilanjutkan untuk melengkapi data spektroskopi ¹H-RMI, ¹³C-RMI dan Spektroskopi Massa dalam rangka identifikasi struktur serta kemungkinan penggunaan senyawa hasil isolasi sebagai obat.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S.A., (1986). Kimia Organik Bahan Alam. Modul Universitas Terbuka, Dept. P dan K.
- Finar, I.L., (1976). Organic Chemistry. Volume Two, Stereochemistry and the Chemistry of Natural Products, Fourth edition, Low- Price Textbook
- Pelczar, M.J.Jr., and E.C.S. chan, (1986). Elements of Microbiology. Terjemahan Ratna Sri Hadioetomo, Teja Imas, S. Sutarni Tjitrosomo, Sri Lestari Angka, Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta
- Rao, L.J.J.Pereira. K.N. Garudnt, (1993), Neo Clerodane Diterpen from *Clerodendron Interme*. *Phytochemistry*, Oxford, 34,(2), 572-574
- Achari, B., C. Giri, C.R Saha, P.K Dutta, S.C. Pakraski, (1992). A New *Clerodane diterpen* from *Clerodendron interme*. *J. Phytochemistry*, 31, (1), 338-400.
- Lu, G.W., K.Miura. T. Yukimura and K. Yamamoto, (1994), Effect of Extract from *Clerodendron trichotomum* on Blood pressure and Renal Function in Rats and Dogs, *J. Ethnopharmacol.*,42, (2), 77-82.
- Goswami.P., J. Kotoky. Z.n Chen, Y.Lu, (1996), Asterol Glicosida from Leaves of *Clerodendron celebrikiamum*, *Phytochemistry*, 41,(1), 279-281.
- Roy, R., V.B. Pandery, (1994), A *Chalcone Glicosida* from *Clerdendron phlomidis*, *Phytochemistry*. Oxford, 37(6), 1775-1776.
- Markham, K.R., (1998), Techniques of Flavonoid Identification, (Cara Mengidentifikasi Flavonoid), Terjemahan oleh K. Padmawinata, Penerbit ITB Bandung.
- Bor. N.L and Raizoda N.B, (1954), Some Beautiful Indian Climbers and Shrubs Bombay.
- Marby, T.J., K.R. Markham and M.B. Thomas. (1970). The Systematic Identification of Flavonoids, Springer-verlag, New York, Heiderdeg, Berlin.
- Irma Mon, M. Husni Mukhtar, Amri Bakhtiar dan Dayar Arbain,(2000), Isolasi Komponen Utama fraksi Aktif Farmakologis dari tumbuhan Pitalo (*Clerodendron Siphonantus* R.Br). *Andalas*, 12(31), 85-93.

Lampiran I : Gambar Tumbuhan Melati Medan (*Clerodendron fragrant* Vent)



Lampiran 2 : Hasil pemeriksaan kandungan kimia tumbuhan (*Clerodendron fragrant* Vent)

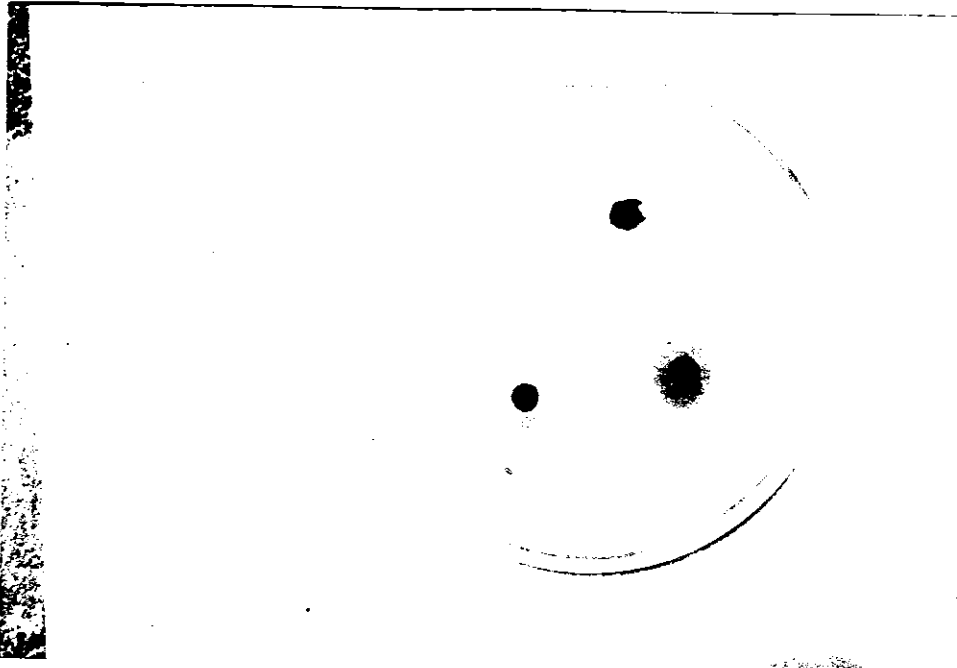
No	Kandungan Kimia	Pereaksi	Hasil
1	Alkaloid	Mayer	(-)
2	Fenolik	FeCl ₃	(- - +)
3	Flavonoid	Mg dan HCl	(- - +)
4	Steroid/Terpenoid	Lieberman-Burchard	(-) ; (-)
5	Saponim	Busa	(-)

Keterangan : (+ + +) = kuat
 (+ +) = lemah
 (+) = sangat lemah
 (-) = tidak terdeteksi

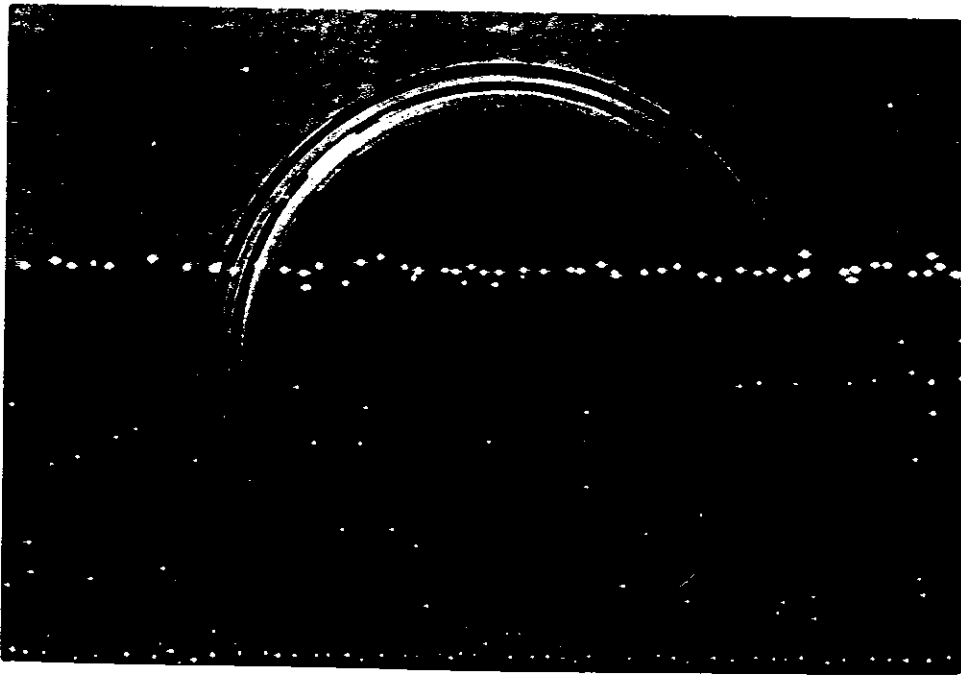
Lampiran 3 :Foto percobaan uji aktifitas antibakteri

a) *Staphylococcus aureus*

b) *Eschericia coli*



a)

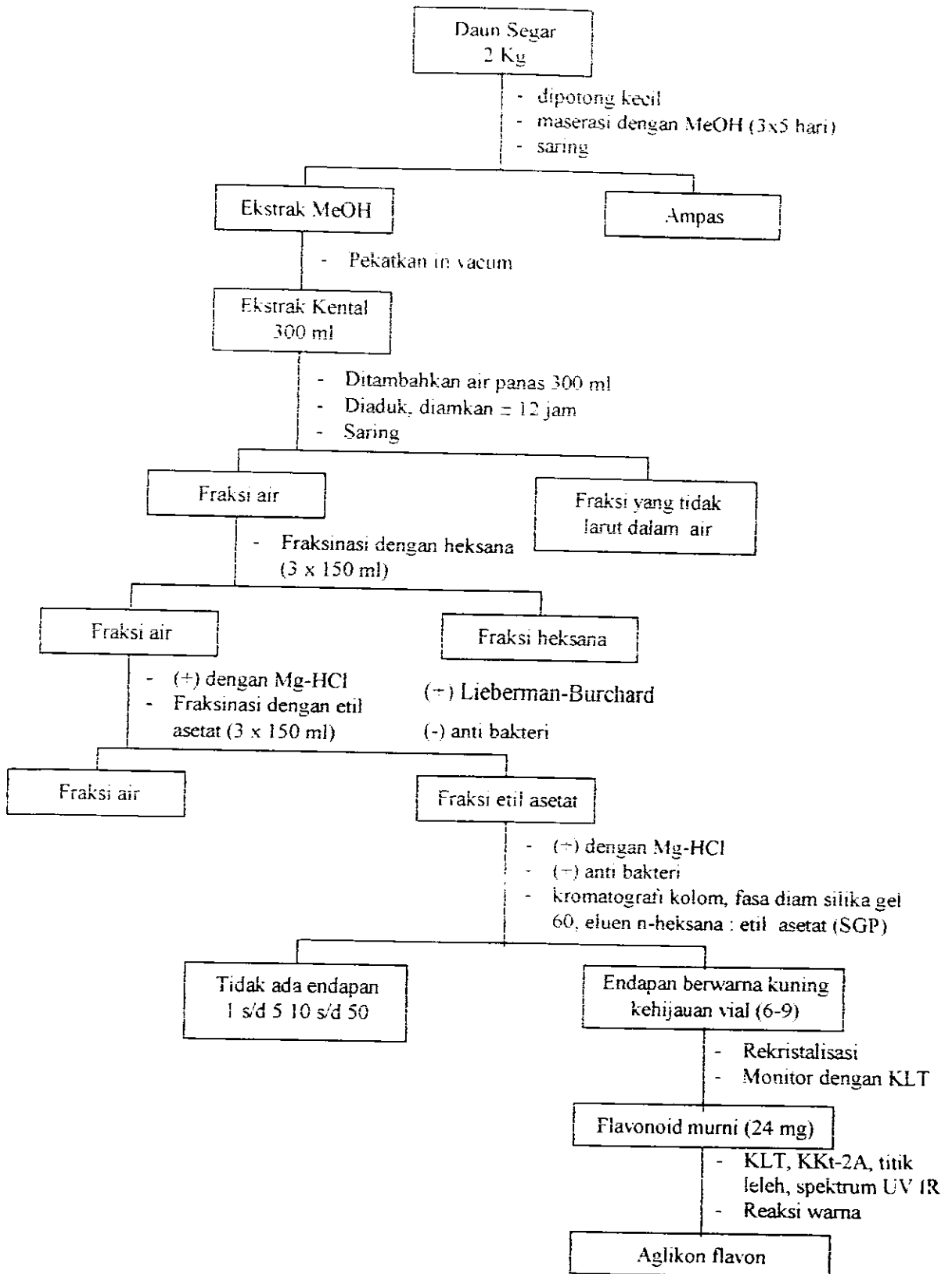


b)

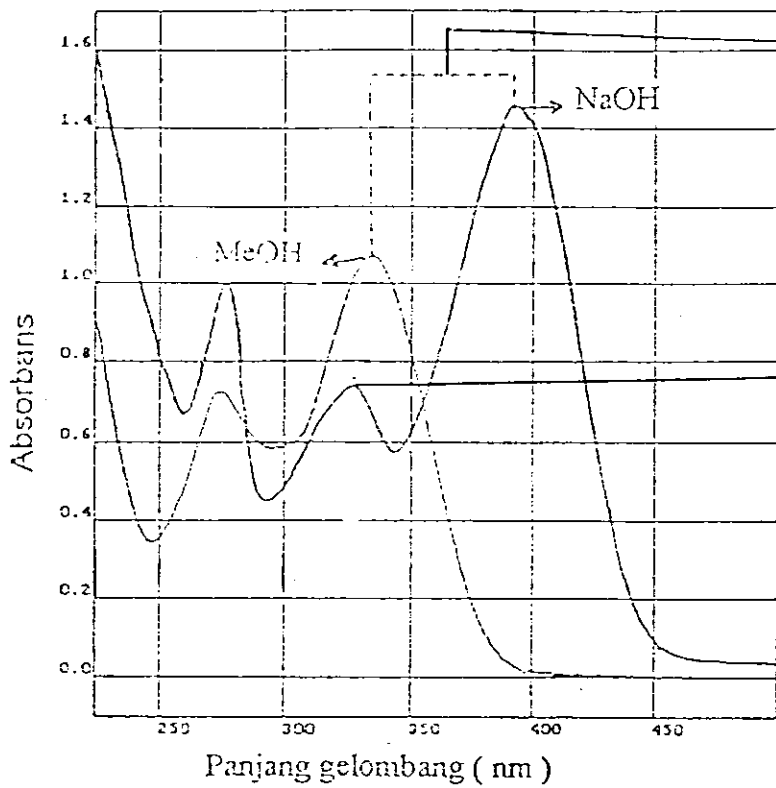
Lampiran 4 : Hasil pengukuran daerah hambat pertumbuhan bakteri

No	Larutan Sampei	Diameter Daerah Hambat (m.m)	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1	Ekstraksi metanol	13	17.6
2	Fraksi heksana	-	-
3	Fraksi etilasetat	17.3	20.4
4	Senyawa murni	10	13.9

Lampiran 5 : Skema kerja isolasi komponen utama fraksi aktif antibakteri daun *Clerodendron fragrans* Vent



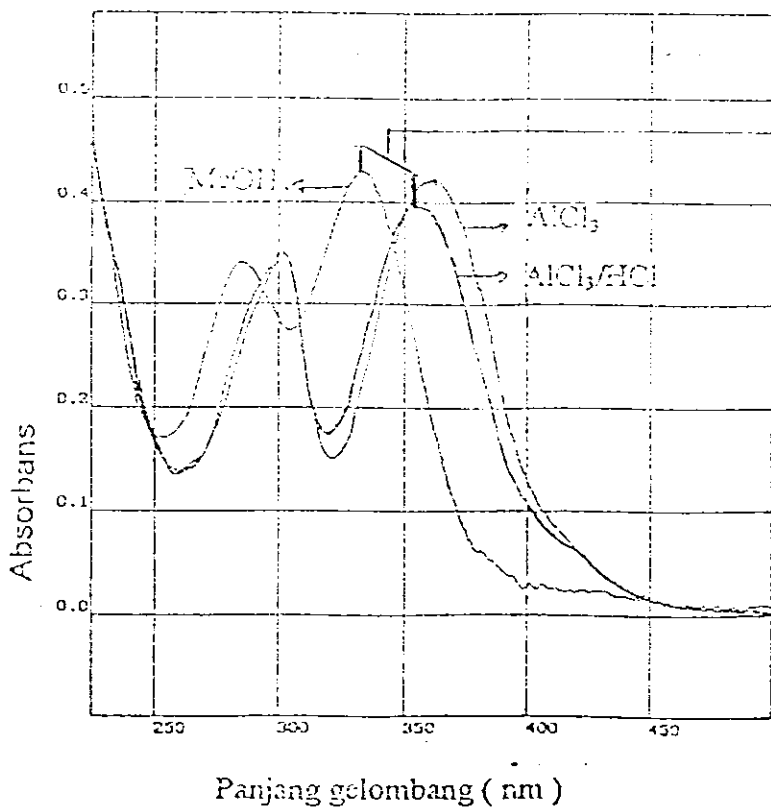
Lampiran 6. Spektrum ultraviolet flavonoid hasil isolasi dengan MeOH, pereaksi geser NaOH, AlCl₃, AlCl₃/HCl, NaOAc, NaOAc/H₃BO₃



Pergeseran batokromik
56,4 nm ada OH pada C₄'

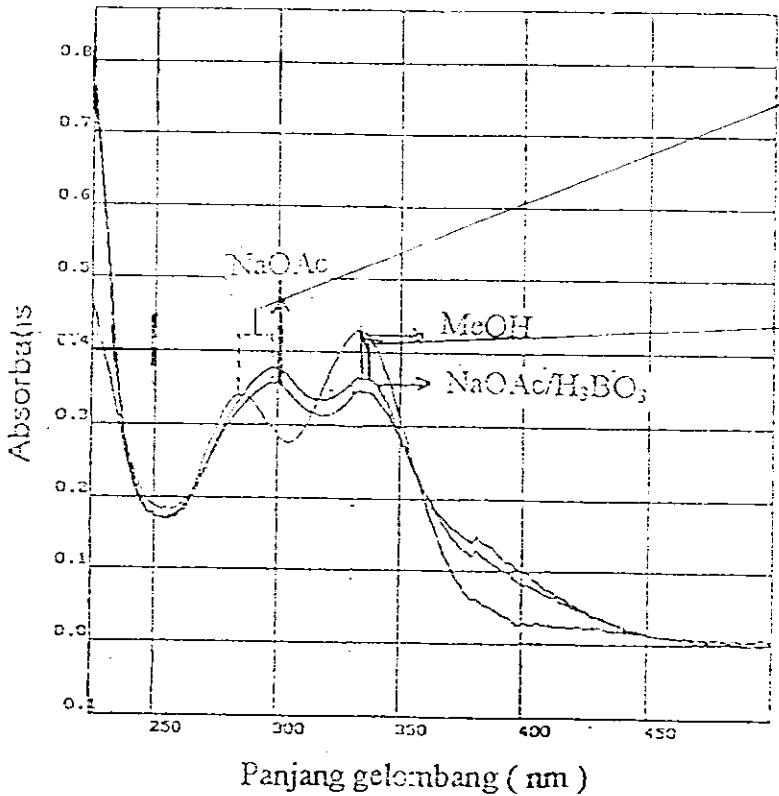
Pita baru pada 327.2 nm
ada OH pada C₇

Peaks of SPR2
274.9 Abs = 0.727
334.6 Abs = 1.071
Peaks Of SP3
276.3 Abs = 0.999
327.2 Abs = 0.741
391.0 Abs = 1.459



Pergeseran Batokromik
22.9 nm ada OH pada C₅

Peaks of SP2
284.6 Abs = 0.341
332.1 Abs = 0.431
Peaks of SP5
301.3 Abs = 0.349
362.0 Abs = 0.424
Peaks of SP6
300.7 Abs = 0.352
355.0 Abs = 0.397

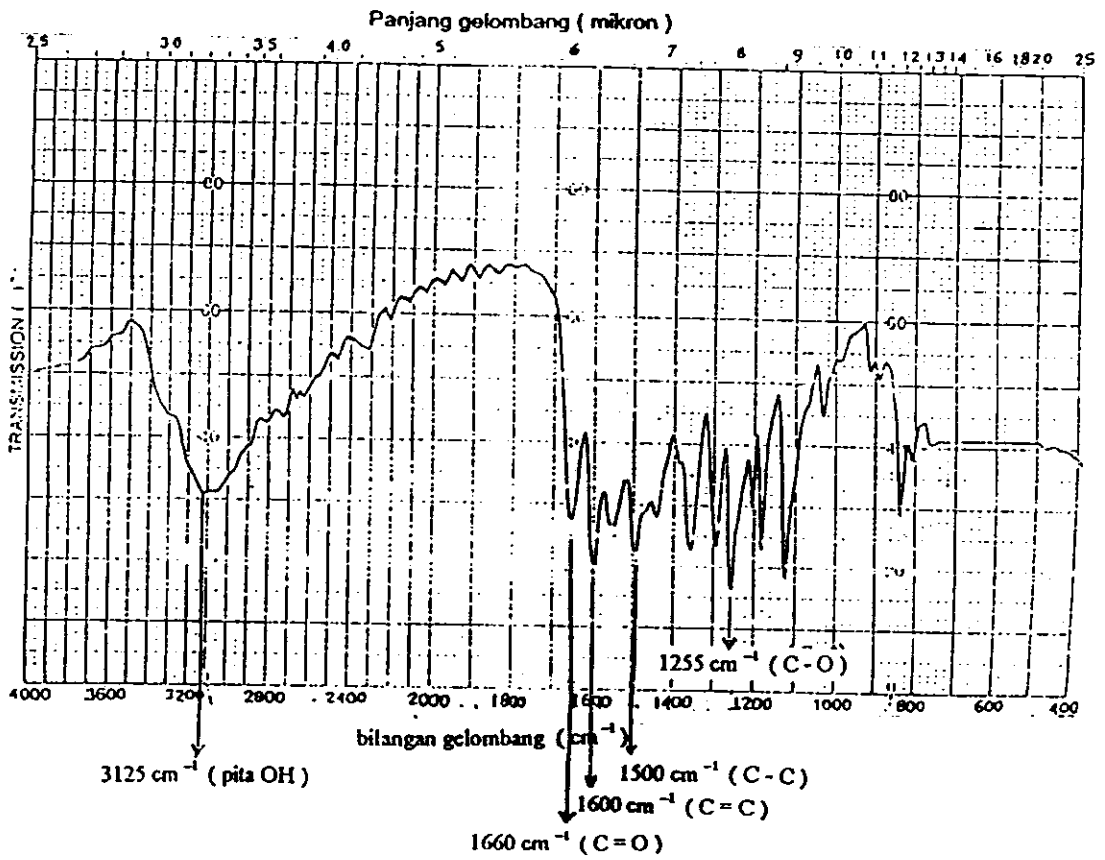


Pergeseran batokromik
12,6 nm ada OH pada C₇

Pergeseran batokromik
<<< tidak ada o - di - OH
pada cincin A dan
cincin B

- Peaks of SP2
- 284.6 Abs = 0.341
- 332.1 Abs = 0.431
- Peaks of SP8
- 297.2 Abs = 0.357
- 332.6 Abs = 0.347
- Peaks of SP9
- 297.2 Abs = 0.377
- 332.6 Abs = 0.365

Lampiran 7 : Spektrum infra merah flavonoid hasil isolasi



Lampiran 8 : Distribusi flavonoid pada kromatografi kertas dua arah dengan pengembang BAA/HOAc 15 % (Markham, 1988)

