

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil

4.1.1. Isolasi kulit batang tumbuhan *Polyalthia sp* (Annonaceae)

Sebanyak 2 Kg kulit batang tumbuhan *Polyalthia sp* (Annonaceae) kering yang telah dihaluskan dimaserasi dengan pelarut metanol, hingga diperoleh ekstrak total metanol sebanyak 51,279 gram, ekstrak kental yang diperoleh berwarna coklat kehitaman.

4.1.2. Pengujian ekstrak total metanol dengan KLT

ekstrak total metanol dilakukan pemeriksaan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis. Hal ini dilakukan untuk mengetahui jumlah komponen yang dikandung pada ekstrak. Hasil uji KLT dapat dilihat pada Tabel 2 dan kromatogram pada Lampiran 3.

Tabel 2. Hasil uji KLT ekstrak total metanol

| Eluen | Harga Rf | Keterangan |
|----------------------------|------------------------|------------|
| Heksan : etil asetat (8:2) | 0,46;0,54;0,64;0,8;0,9 | 5 noda |

4.1.3. Pemisahan dengan corong pisah

Ekstrak kental metanol tersebut difraksinasi menggunakan corong pisah dengan dua pelarut heksan dan diclorometan sehingga diperoleh ekstrak heksan sebanyak 0,7 gram, ekstrak diclorometan sebanyak 5,822 gram dan ekstrak metanol sebanyak 3,774 gram.

4.1.4. Pengujian hasil fraksinasi dengan KLT

Hasil fraksinasi diuji dengan Plat KLT. Eluen yang digunakan yaitu, heksan : etil asetat (2:8). Hasil uji KLT dapat dilihat pada tabel 3 dan kromatogram dapat dilihat pada lampiran 4

Tabel 3. KLT hasil fraksinasi

| Sampel | Harga Rf | Keterangan |
|---------------------|----------|----------------|
| Fraksi heksan | 0,57 | Noda memanjang |
| Fraksi diclorometan | 0,45 | Noda memanjang |
| Fraksi metanol | 0,51 | Noda memanjang |

4.1.5. Hasil uji aktivitas antibakteri

Hasil uji antibakteri terhadap fraksi metanol dan fraksi diclorometan memperlihatkan aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* dan *Stapylococcus aureus*. Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap fraksi metanol dan fraksi diclorometan dapat dilihat pada Tabel 4. Bentuk diameter daerah hambatan terhadap pertumbuhan bakteri dapat dilihat pada Lampiran 9.

Tabel 4. Hasil uji antibakteri terhadap fraksi metanol dan fraksi diclorometan

A.Konsentrasi sampel 60 µg

| Sampel uji | Diameter Daerah Hambatan (mm) | | |
|---------------------|-------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| | <i>Escherichia coli</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| Fraksi metanol | 10 | 10 | 10 |
| Fraksi diclorometan | 11,5 | 14 | 15 |

B.Konsentrasi sampel 80 µg

| Sampel uji | Diameter Daerah Hambatan (mm) | | |
|---------------------|-------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| | <i>Escherichia coli</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| Fraksi metanol | 10 | 10 | 10 |
| Fraksi diclorometan | 14 | 15 | 17,5 |

C.Konsentrasi sampel 100 µg

| Sampel uji | Diameter Daerah Hambatan (mm) | | |
|---------------------|-------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| | <i>Escherichia coli</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| Fraksi metanol | 15 | 11 | 10 |
| Fraksi diclorometan | 14 | 15 | 18,5 |

4.1.6. Pemisahan dengan kromatografi kolom

Pemisahan dengan kromatografi kolom menggunakan fraksi diclorometan. Pengelusian dilakukan dengan berbagai eluen yang memiliki kepolaran yang meningkat, dari n-heksan : etil asetat = 1:1 sampai etil asetat : metanol = 1:1 dengan kenaikan kepolaran 10 %. Dari hasil pemisahan dengan kromatografi kolom diperoleh 60 vial.

4.1.7. Pengujian hasil kromatografi kolom dengan KLT

Fraksi diclorometan yang dikromatografi kolom diuji dengan KLT. Eluen yang digunakan yaitu, heksan : etil asetat (3:7). Hasil KLT dapat dilihat pada tabel 5. dan kromatogramnya pada lampiran 5.

Tabel 5. Hasil uji KLT kromatografi kolom fraksi diclorometan

| No Vial | Harga Rf | Keterangan |
|---------|-----------------------|------------------------------------|
| 14 | 0,62;0,76;0,84 | 3 noda |
| 17 | 0,41;0,58;0,76 | 3 noda |
| 20 | 0,45;0,50;0,56 | 3 noda |
| 25 | 0,49;0,56 | 2 noda |
| 30 | 0,56 | 1 noda |
| 35 | 0,19;0,56 | 2 noda memanjang |
| 40 | 0;0,19;0,56 | 2 noda memanjang 1 noda tidak naik |
| 45 | 0;0,19;0,47;0,56 | 3 noda memanjang 1 noda tidak naik |
| 50 | 0;0,19;0,41;0,49;0,56 | 4 noda memanjang 1 noda tidak naik |
| 55 | 0;0,19;0,41;0,49;0,56 | 4 noda memanjang 1 noda tidak naik |
| 60 | 0;0,29 | 2 noda, 1 noda tidak naik |

Vial no. 18-29 digabungkan dan di uji KLT dengan eluen heksan : etil asetat (3:7). Hasil uji KLT dapat dilihat pada tabel 6. dan kromatogramnya dapat dilihat pada lampiran 5.

Tabel 6. Hasil uji KLT fraksi gabungan V18-V29

| Eluen | Harga Rf | Keterangan |
|----------------------------|---------------|------------|
| Heksan : etil asetat (3:7) | 0,48;0,6;0,76 | 3 noda |

Vial no. 18-29 di gabungan dan dilakukan pemisahan menggunakan kolom kromatografi yang fase diamnya berupa sephadex. Pengelusan dilakukan menggunakan eluen yaitu, diclorometan : metanol (4:1). Dari hasil pemisahan diperoleh 4 vial, kemudian diuji KLT, eluen yang digunakan yaitu,



n-heksan : etilasetat (2:8). Hasil KLT dapat dilihat pada tabel 7.dan kromatogramnya dapat dilihat pada lampiran 6.

Tabel 7. Hasil uji KLT kromatografi kolom fraksi gabungan V18-V29

| No. Vial | Harga Rf | Keterangan |
|----------|-----------|------------|
| 1 | 0,6;0,72 | 2 noda |
| 2 | 0,51;0,64 | 2 noda |
| 3 | 0,51;0,64 | 2 noda |
| 4 | 0,64;0,72 | 2 noda |

4.1.8. Pemisahan dengan flash kromatografi

Vial no. 2 dan no. 3 digabungkan dan dipisahkan dengan menggunakan flash kromatografi dan di uji KLT. Dari hasil pemisahan diperoleh 16 vial. Hasil KLTnya dapat dilihat pada tabel 8. dan kromatogramnya dapat dilihat pada lampiran 7.

Tabel 8. Hasil uji KLT flash kromatografi

| No. Vial | Harga Rf | Keterangan |
|----------|----------------|------------|
| 1 | 0,53;0,68;0,83 | 3 noda |
| 4 | 0,53;0,65 | 2 noda |
| 7 | | - |
| 10 | 0,60 | 1 noda |
| 12 | 0,53 | 1 noda |
| 15 | | - |

Dari tabel 8 menunjukkan bahwa Vial 12 merupakan 1 noda, Vial tersebut dilakukan uji KLT lagi secara tersendiri dan hasilnya masih menunjukkan 1 noda. Dari hasil uji ini diasumsikan senyawa tersebut sudah murni. Senyawa tersebut berbentuk minyak dan berwarna orange kekuningan yang diberi kode PsH12. Hasil KLTnya dapat dilihat pada tabel 9 dan kromatogramnya dapat dilihat pada lampiran 8

Tabel 9. Hasil uji KLT senyawa PsH12

| Eluen | Harga Rf | Keterangan |
|-----------------------------|----------|------------|
| n-heksan : etilasetat (3:7) | 0,53 | 1 noda |

4.2. Pembahasan

4.2.1. Isolasi senyawa kimia kulit batang tumbuhan *Polyalthia sp*

(Annonaceae)

Isolasi dimulai dengan menghaluskan kulit batang tumbuhan *Polyalthia sp* (Annonaceae), ini bertujuan untuk memperbesar luas permukaan sampel agar kontak antara sampel dengan pelarut semakin besar sehingga memperbesar kelarutan senyawa kimia yang ada pada sampel. Sebanyak 2 Kg sampel kering *Polyalthia sp* (Annonaceae) yang telah dihaluskan dimaserasi dengan pelarut metanol selama \pm 24 jam, sebelum maserat disaring dilakukan ultrasonikasi selama \pm 30 menit, ini bertujuan untuk memperbesar kelarutan senyawa kimia kedalam pelarut. Gelombang ultrasonik yang dikeluarkan alat ini dapat mengetarkan sampel sehingga senyawa kimia yang ada dalam sampel akan keluar dan larut dalam pelarut. Maserat yang diperoleh disaring dengan kapas kemudian digabungkan dan pelarut nya diuapkan dengan alat *rotary evaporator*. Alat ini bekerja dalam keadaan divakum, sehingga tekanan uap pelarut akan menjadi turun dan pelarut akan mendidih pada temperatur lebih rendah dari titik didihnya sehingga senyawa yang dievaporasi tidak rusak oleh panas. Ekstrak kental metanol yang diperoleh berwarna coklat kehitaman sebanyak 51,279 gram.

Untuk memisahkan senyawa-senyawa kimia pada ekstrak metanol, dilakukan fraksinasi menggunakan corong pisah. Dengan memakai dua pelarut yaitu, heksan dan diclorometan sehingga diperoleh 3 fraksi yaitu ,fraksi heksan, fraksi diclorometan dan fraksi metanol. Fraksinasi ini dilakukan berdasarkan perbedaan kelarutannya, senyawa yang non polar akan terdistribusi kedalam pelarut non polar yaitu n-heksan dan senyawa yang semi polar akan terdistribusi kedalam pelarut semi polar yaitu diclorometan sedangkan senyawa yang polar akan terdistribusi kedalam pelarut polar yaitu metanol.

Hasil fraksinasi diuji aktifitas antibakteri terhadap bakteri *S. Aureus*, *B. Subtilis* dan *E. Coli*. Uji aktifitas antibakteri menggunakan metoda difusi agar.

Sampel mengandung senyawa aktif yang ditandai dengan adanya zona bening disekitar cakram pada media agar, dari hasil uji aktifitas ternyata fraksi diclorometan paling besar daya hambatnya terhadap bakteri yang ditandai dengan diameter zona beningnya yang paling besar. Hasil uji aktifitas tersebut dapat dilihat pada tabel

Satu gram fraksi diclorometan dipisahkan dengan menggunakan kromatografi kolom dengan perbandingan sampel dan silika 1:15. Fase diam yang digunakan adalah silika gel. Eluen yang digunakan yaitu, n-heksan, etilasetat dan metanol. Pengelusan menggunakan sistim step gradient polarity (SGP) atau tingkat kepolaran ditingkatkan secara perlahan-lahan sehingga didapatkan pemisahan sampel yang cukup baik. Sebelum sampel dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom, terlebih dahulu sampel dipreadsorpsi agar sampel terserap dan terpisah dengan baik. Kepolaran ditingkatkan 10%, hasil pemisahan dengan kromatografi kolom diperoleh 60 vial. Semua hasil kromatografi kolom di KLT untuk mengetahui hasil pemisahan dan harga Rfnya. Jika pada hasil KLT mempunyai harga Rf yang sama, maka fraksi-fraksi tersebut bisa digabungkan menjadi satu fraksi gabungan. Dari hasil KLT pada vial no. 18-29 mempunyai harga Rf yang hampir sama sehingga bisa digabungkan. Setelah diKLT ternyata masih menunjukkan 3 noda kemudian dilakukan pemisahan lagi dengan kromatografi kolom. Fase diam yang digunakan adalah sephadex. Hasil pemisahannya diperoleh 4 vial. Vial no.2 dan no. 3 digabung kemudian diKLT ternyata masih menunjukkan 2 noda, kemudian dilakukan pemisahan lagi dengan flash kromatografi. Hasil pemisahannya diperoleh 16 Vial dan di KLT. Dari hasil KLT vial no. 12 dan 13 menunjukkan satu noda dan harga Rf nya sama yang berarti menunjukkan satu senyawa. Senyawa ini diberi kode PsH12 yang berbentuk minyak dan berwarna orange kekuningan.

4.2.2. Uji aktifitas antibakteri

Metoda uji aktifitas antibakteri yang digunakan adalah metoda difusi agar. Metoda ini sangat umum digunakan dalam tes antimikrobal yang dikenal dengan tes Kirby-Bauer. Metoda difusi agar dipilih karena metoda ini relatif sederhana dan hasil yang didapat cukup baik untuk mengetahui adanya aktifitas anti

mikrobal. Zona bening disekitar cakram yang berisi sampel uji menandakan tidak adanya pertumbuhan mikroba, hal ini menunjukkan sampel uji mampu menghambat pertumbuhan mikroba. Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini bersifat patogen terhadap manusia yang sebagian besar ditemukan pada kulit dan saluran pencernaan. Bakteri tersebut yaitu, *B. subtilis* (gram positif), *S. aureus* (gram positif) dan *E. coli* (gram negatif).

Hasil uji aktifitas antibakteri hasil fraksinasi yaitu fraksi diclorometan dan fraksi metanol menunjukkan bahwa masing-masing fraksi mengandung senyawa aktif. Fraksi diclorometan lebih aktif menghambat pertumbuhan bakteri dari pada fraksi metanol yang ditandai dengan melihat diameter zona bening yang ada disekitar cakram, diameter zona bening fraksi diclorometan lebih besar dari pada fraksi metanol.

Aktifnya fraksi diclorometan dan fraksi metanol terhadap bakteri uji disebabkan adanya gugus-gugus aktif yang terdapat pada senyawa kimia dari fraksi tersebut. Gugus aktif ini dapat mengganggu permeabilitas dari membran plasma sel bakteri tersebut. Rusaknya lapisan peptidoglikan pada sel akan mempengaruhi pertumbuhan sel bakteri.

Perbedaan zona bening disekitar cakram dipengaruhi oleh konsentrasi mikroba dalam medium, ketebalan media pada cawan petri, perbedaan sifat dan karakter dari bakteri uji dan adanya perbedaan gugus aktif pada senyawa uji.