

UJI KANDUNGAN FENOLIK TOTAL DAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK KULIT BUAH ASAM PAYA (*Eleiodoxa conferta* (Griff.) Burret) TERHADAP *Staphylococcus aureus*.

Febrina Claudia Elisabeth Sitorus¹⁾, Endang Dwi Wulansari^{1*)}, Indah Sulistyarini¹⁾

¹⁾Stifar Yayasan Pharmasi Semarang

Jl. Letjen Sarwo Edi Wibowo Km.1 Plamongsari Pucanggading Semarang

^{*)} email: dewi_stifar@yahoo.com

Abstract

Asam paya (Eleiodoxa conferta (Griff.) Burret) contains phenolic compounds which can function as antibacterial agents against Staphylococcus aureus. Extraction using soxhlet with multilevel polarity, namely n-hexane and ethanol. The antibacterial activity test by TLC contact-bioautography showed that the phenolic compounds in the ethanol extract had antibacterial activity, and the diffusion test results showed that the ethanol extract had a larger inhibition zone diameter than the n-hexane extract. The total phenolic compound of extract was determined using the Folin-Ciocalteu reagent. The total phenolic compounds of Eleiodoxa conferta (Griff.) Burret. ethanolic extract is $7,326 \pm 0,0989$ mg GAE/gram sample. The ethanol extract was fractionated using a separating funnel, followed by purification with preparative TLC. The phenolic isolates obtained were tested for purity by three eluent TLC. The results of antibacterial activity diffusion test and TLC contact-bioautography test showed that phenolic isolates had antibacterial activity against Staphylococcus aureus.

Keywords : *Eleiodoxa conferta (Griff.) Burret, total phenolic, TLC-contact bioautography, soxhlet, Staphylococcus aureus*

1. PENDAHULUAN

Asam Paya (*Eleiodoxa conferta* (Griff.) Burret) adalah satu tanaman yang berasal dari Kalimantan Barat yang berasal dari famili Araceae. Asam paya juga dikenal sebagai asam kelubi atau salak hutan. Tumbuhan ini banyak ditemukan di beberapa negara dengan rawa-rawa air tawar seperti Thailand, Malaysia dan Indonesia. Sekilas pohon dan buah asam paya mirip dengan salak (Safitri dkk, 2017). Buah asam paya memiliki tekstur kulit bersisik berwarna kuning gading saat masih muda dan berubah menjadi warna coklat saat matang. Tekstur kulit buah ini keras dan

lebih tebal.

Asam paya secara tradisional dimanfaatkan sebagai obat sariawan dan digunakan masyarakat sebagai pemberi rasa asam dalam masakan (Afriani dkk, 2014). Telah dilaporkan bahwa air buah asam paya dapat memberikan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (Sari dkk, 2019). *Staphylococcus aureus* merupakan penyebab infeksi tersering, termasuk bisul, infeksi luka, pneumonia, endokarditis, dan septikemia (Neal, 2006). Beberapa penyakit kulit seperti jerawat, eksim, bisul, impetigo, campak, kudis, dan kurap juga dapat disebabkan

karena bakteri *Staphylococcus aureus* (Sudigdodadi, 2014).

Ekstrak dan fraksi metanol buah asam paya (*Eleiodoxa conferta* (Griff.) Burret) dilaporkan mengandung senyawa flavonoid, fenolik, dan saponin (Lenny, 2006). Uji kandungan kimia air buah asam paya mengandung senyawa alkaloid, saponin, flavanoid dan fenol hidrokuinon. Kandungan senyawa fenolik dalam asam paya dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri. Senyawa fenolik adalah senyawa yang memiliki gugus hidroksil yang menempel pada cincin aromatik (Vermeris dan Nicholson, 2006). Fenol telah dipelajari secara ekstensif sebagai desinfektan yang mempunyai aktivitas antibakteri berspektrum luas terhadap bakteri gram positif dan gram negatif. Fenol dalam konsentrasi tinggi dapat menembus dan mengganggu dinding sel bakteri dan mempresipitasi protein dalam sel bakteri. Fenol konsentrasi yang lebih rendah dapat menginaktifkan sistem enzim penting dalam sel bakteri (Oliver dkk, 2001).

Kulit buah asam paya sebagai bagian yang tidak banyak digunakan menjadi potensi yang perlu diketahui manfaatnya sebagai antibakteri. Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dilakukan penelitian untuk mengetahui kandungan fenolik total dan aktivitas antibakteri ekstrak etanol kulit buah asam paya (*Eleiodoxa conferta* (Griff.) Burret) serta pemisahan senyawa fenolik yang berpotensi sebagai antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan uji KLT bioautografi kontak.

2. METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan adalah kulit buah asam paya yang diperoleh dari daerah Kumai Kalimantan Tengah., etanol, n-heksan, dietil eter, etil asetat, aquadest, n-butanol, asam asetat glasial, air, amonia, toluene, kloroform, dragendorff, metanol, anisaldehyd, H₂SO₄, etil asetat, FeCl₃, Na₂CO₃, pereaksi darah, asam galat, *Folin-Ciocalteu*, media *Nutrient Agar* (Oxoid), media *Nutrient Broth* (Oxoid), media *Mannitol Salt Agar* (Oxoid), Klindamisin HCl, larutan ½ Mc. Farland, serta DMSO.

Alat yang digunakan adalah spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu-1240), LAF (*Laminar Air Flow*), serta *autoclave*. Beberapa alat gelas untuk keperluan KLT preparatif juga digunakan seperti lempeng kaca, *chamber* KLT, serta lampu UV 254 nm dan 365 nm.

Ekstraksi

Ekstraksi bertingkat dengan menggunakan alat soxhlet dengan pelarut n-heksana dan etanol. Ekstraksi dilakukan dari pelarut yang tingkat kepolarannya tinggi sampai yang tingkat kepolarannya rendah, dengan harapan dapat menyari senyawa yang ada didalam kulit buah asam paya berdasarkan tingkat kepolarannya. Ekstrak yang didapat, dipekatkan dengan penguap vakum berputar, sehingga diperoleh ekstrak kental n-heksana dan ekstrak etanol.

Uji kandungan kimia ekstrak

Uji kandungan kimia ekstrak dilakukan dengan cara kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan fase

gerak yang sesuai. Ekstrak *n*-heksana dan ekstrak etanol diuji KLT bioautografi kontak menggunakan 1 macam fase gerak yang sesuai untuk mengetahui kandungan senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri. Uji aktivitas antibakteri secara difusi sumuran dilakukan dengan media MSA (Kristianto, dkk., 2019), dilakukan untuk mengetahui ekstrak yang memiliki aktivitas antibakteri. Uji secara difusi sumuran dilakukan 3 kali replikasi.

Uji kandungan fenolik total

1. Penentuan panjang gelombang maksimum (λ_{maks})

Penentuan panjang gelombang maksimum asam galat dilakukan dengan mengukur larutan asam galat dengan konsentrasi 60 ppm pada range panjang gelombang 500-800 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan diperoleh panjang gelombang maksimum yaitu 765 nm.

2. Pengukuran larutan baku asam galat

Larutan asam galat dibuat konsentrasi 40, 50, 60, 70, 80, dan 90 ppm dari larutan baku 100ppm, kemudian ditambahkan 0,4 ml reagen *Folin-Ciocalteu*, dikocok dan dibiarkan 4-8 menit. Masing-masing ditambah 4,0 ml larutan Na_2CO_3 , dan dihomogenkan. Larutan kemudian ditambah aquadest hingga 10 ml dan didiamkan selama 90 menit. Absorbansi larutan baku dianalisis pada panjang gelombang maksimum.

3. Penentuan kadar fenolik total ekstrak etanol kulit buah asam paya (*Eleiodoxa conferta* (Griff.) Burret).

Penentuan kadar fenolik total pada ekstrak kulit buah asam paya (*Eleiodoxa conferta* (Griff.) Burret) dengan cara menimbang 10 mg ekstrak etanol kulit buah asam paya kemudian dilarutkan

dengan 10 ml etanol p.a dan dihomogenkan. Sebanyak 1,0 ml larutan tersebut, ditambah 0,4 ml reagen *Folin Ciocalteu* kemudian dikocok dan dibiarkan selama 4-8 menit. Lalu ditambahkan 4,0 ml larutan Na_2CO_3 dan aquadest hingga 10,0 ml. Larutan dikocok dan didiamkan selama 90 menit. Absorbans larutan ekstrak diamati pada panjang gelombang maksimum. Replikasi dilakukan sebanyak 5 kali.

Pemisahan dan pemurnian senyawa

Ekstrak dengan aktivitas antibakteri terbesar dilakukan pemisahan dengan metode partisi cair-cair. Pemurnian lanjut dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) menggunakan fase gerak etil asetat: metanol: air (100: 13,5: 10). Uji kemurnian isolat yang diperoleh dilakukan dengan cara KLT menggunakan 3 macam fase gerak.

Uji aktivitas antibakteri

Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan isolat fenolik dengan konsentrasi 5% dengan metode difusi sumuran dilakukan dengan cara mengukur 10 ml media *Mannitol Salt Agar* (MSA) cair, dituang ke dalam cawan petri, dan dibiarkan memadat (sebagai lapisan dasar). Empat buah silinder cup diletakkan pada media yang telah memadat. Sebanyak 20 ml media MSA dicampur dengan 10 μ l suspensi bakteri dalam erlenmeyer, kemudian dituang diatas lapisan dasar dan dibiarkan memadat (lapisan kedua). Setelah lapisan kedua memadat, silinder cup diambil. Sebanyak 50 μ l sampel dimasukkan ke dalam masing-masing lubang sumuran. Sampel berupa ekstrak etanol dan isolat fenolik konsentrasi 5%, kontrol positif klindamisin (50 μ g/ml),

serta kontrol negatif DMSO. Cawan petri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Uji dilakukan 3 kali replikasi. Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri di sekitar sumuran diukur menggunakan jangka sorong.

Analisa data

Data diameter zona hambat dianalisis secara statistika dengan program SPSS. Data penelitian diameter zona hambat yang diperoleh dilakukan analisis secara statistika parametrik dengan uji anava satu jalan, dan dilanjutkan dengan pengujian pasca anava (*post hoc*).

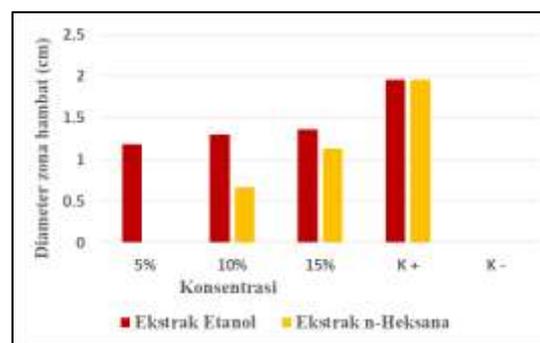
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Kulit buah asam paya disokhletasi dengan cairan penyari *n*-heksana dan etanol, kemudian ekstrak yang didapat diuapkan sehingga didapat ekstrak kental. Hasil uji kandungan kimia ekstrak menunjukkan bahwa ekstrak etanol mengandung fenolik, flavonoid, triterpenoid dan saponin. Sedangkan ekstrak *n*-heksana mengandung terpenoid. Uji KLT bioautografi kontak menunjukkan bahwa kandungan senyawa fenolik dalam ekstrak etanol kulit buah asam serta kandungan terpenoid dalam ekstrak etanol maupun ekstrak *n*-heksana memiliki daya hambat antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Kandungan terpenoid dan fenolik dalam ekstrak kulit buah asam paya dilaporkan mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri lain yaitu *Streptococcus mutans* (Sasmito, dkk., 2020).

Terpenoid bekerja sebagai antibakteri dengan melibatkan kerusakan

membran. Terpenoid dapat bereaksi dengan porin (protein transmembran) pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat dan merusak porin, mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri sehingga sel bakteri kekurangan nutrisi, pertumbuhan bakteri terhambat atau mati (Retnowati, dkk., 2011).

Senyawa flavonoid merupakan salah satu senyawa kimia yang terkandung dalam kulit buah asam paya yang bersifat bakteriostatik. Mekanisme kerja flavonoid adalah dengan mendenaturasi protein membran sel bakteri, sehingga merusak membran sel tersebut. Kerusakan membran sel bakteri dapat menyebabkan bocornya metabolit penting dan menginaktifkan sistem enzim bakteri. Kerusakan ini memungkinkan nukleotida dan asam amino keluar dan mencegah masuknya bahan-bahan aktif ke dalam sel, keadaan ini dapat menyebabkan kematian bakteri. Mekanisme fenolik sebagai antibakteri adalah dengan merusak dinding sel dan merusak enzim-enzim pada bakteri (Mhaske, dkk. 2012)



Gambar 1. Aktivitas Antibakteri Ekstrak *n*-Heksana dan Ekstrak Etanol Kulit Buah Asam Paya (*Eleiodoxa conferta* (Griff.) Burret). Terhadap *Staphylococcus aureus*

Uji aktivitas antibakteri secara difusi sumuran menunjukkan bahwa

ekstrak etanol memiliki aktivitas antibakteri tinggi. Zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ekstrak etanol lebih besar dibandingkan dengan ekstrak *n*-heksana (Gambar 1.). Ekstrak etanol dengan konsentrasi 5% sudah dapat memberikan aktivitas antibakteri dibandingkan dengan ekstrak *n*-heksana yang tidak menunjukkan aktivitas dengan konsentrasi yang sama.

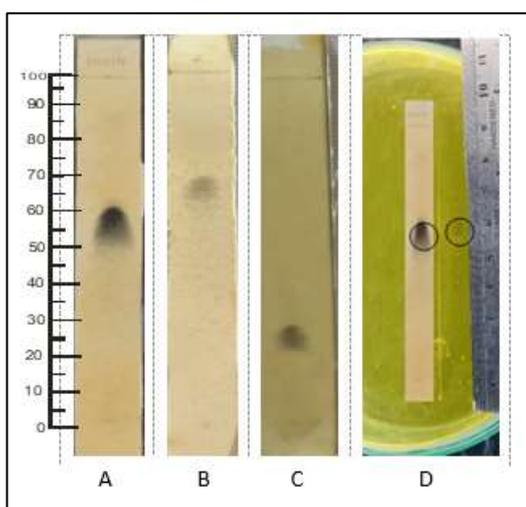
Senyawa fenolik merupakan senyawa dalam tumbuhan dengan ciri memiliki cincin aromatik dengan sekurang-kurangnya mengandung satu gugus hidroksil. Uji kandungan fenolik total dilakukan dengan menggunakan reagen *Folin-Ciocalteu*. Reagen *Folin-Ciocalteu* digunakan karena senyawa fenolik dapat bereaksi dengan Folin membentuk larutan berwarna yang menghasilkan absorbansi yang terukur. Prinsip dari metode *Folin-Ciocalteu* adalah pembentukan senyawa kompleks berwarna biru yang dapat diukur pada panjang gelombang 765 nm. Pereaksi ini mengoksidasi fenolat (garam alkali) atau gugus fenolik-hidroksil mereduksi asam heteropoli (fosfomolibdat-fosfotungstat) yang terdapat dalam pereaksi *Folin-Ciocalteu* menjadi suatu kompleks molybdenum-tungsten. Senyawa fenolik bereaksi dengan reagen *Folin-Ciocalteu* dalam suasana basa agar terjadi disosiasi proton pada senyawa fenolik menjadi ion fenolat, dan untuk membuat kondisi basa digunakan Na_2CO_3 7%. Gugus hidroksil pada senyawa fenolik bereaksi dengan reagen *Folin-Ciocalteu* membentuk kompleks molybdenum-tungsten berwarna biru yang dapat dideteksi dengan spektrofotometer. Semakin besar konsentrasi senyawa fenolik maka semakin banyak ion fenolat yang akan

mereduksi asam heteropoli (fosfomolibdat-fosfotungstat) menjadi kompleks molybdenum-tungsten sehingga wana biru yang dihasilkan semakin pekat. Asam galat digunakan sebagai baku karena senyawa ini mempunyai gugus hidroksil dan ikatan rangkap yang terkonjugasi pada masing-masing cincin benzena yang menyebabkan senyawa ini sangat efektif untuk membentuk senyawa kompleks dengan reagen *Folin-Ciocalteu*. Selain itu, asam galat tersedia dalam kemurnian yang tinggi, stabil dan harga yang relative lebih murah (Mongkolsilp dkk., 2004).

Berdasarkan hasil pengukuran absorbansi larutan baku asam galat pada berbagai konsentrasi maka dapat dibuat kurva baku asam galat kemudian diperoleh persamaan regresi linier yaitu, $y = 0,0104x + 0,17443$. x adalah konsentrasi (ppm) dan y adalah absorbansi. Hasil uji kandungan fenolik total ekstrak kulit buah asam paya yaitu sebesar $7,326 \pm 0,0989$ mg GAE/gram sampel.

Ekstrak etanol difraksinasi menggunakan pelarut dietil eter, etil asetat dan air, kemudian diuji secara KLT. Hasil KLT fenolik fraksi dietil eter memiliki noda dengan R_f yang sama dengan ekstrak etanol yang telah diuji bioautografi kontak. Maka dapat diasumsikan bahwa fenolik pada fraksi dietileter memiliki aktivitas antibakteri, sehingga dilakukan pemurnian dengan KLTP dengan fase gerak etil asetat: metanol: air (100 :13,5 :10). Isolat fenolik yang didapat, diuji kemurnian dengan KLT 3 fase gerak menggunakan (A) etil asetat: metanol: air (100: 13,5: 10), (B) kloroform: etil asetat: asam formiat (5: 4: 1), (C) kloroform: metanol:

air (64: 50: 10), dan dideteksi dengan penampak bercak larutan $FeCl_3$ menunjukkan warna biru kehitaman. Kromatogram menunjukkan masing-masing positif satu noda dengan Rf berturut-turut 0,58; 0,68; dan 0,27. Hasil uji kemurnian menunjukkan bahwa isolat fenolik relatif murni dengan KLT 3 fase gerak, dan hasil uji KLT bioautografi kontak isolat fenolik menggunakan fase gerak A, menghasilkan zona bening pada Rf 0,58 (D) (Gambar 2.).



Gambar 2. Kromatogram Isolat Fenolik Dengan 3 Macam Fase Gerak dan Hasil Uji KLT-Bioautografi Kontak

Hasil pengujian antibakteri secara difusi sumuran pada ekstrak etanol dan isolat fenolik menunjukkan bahwa pada konsentrasi 5% memiliki aktivitas antibakteri yang ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar lubang sumuran. Rerata diameter zona hambat pertumbuhan bakteri ekstrak dan isolat ditunjukkan di Tabel 1.

Ekstrak etanol memiliki aktivitas antibakteri lebih besar dibandingkan dengan isolat fenolik pada konsentrasi 5%. Hasil penetapan kadar fenolik total dalam satu gram ekstrak etanol kulit buah asam paya (*Eleiodoxa conferta*

(Griff). Burret) yang menunjukkan bahwa terdapat $7,326 \pm 0,0989$ mg fenolik yang setara asam galat, memberikan kontribusi terhadap aktivitas antibakteri ekstrak etanol kulit buah asam paya (*Eleiodoxa conferta* (Griff.) Burret). Selain isolat fenolik yang merupakan salah satu kandungan fenolik dalam ekstrak etanol, ekstrak etanol juga mengandung senyawa terpenoid yang juga bersifat antibakteri berdasarkan hasil uji KLT bioautografi kontak. Senyawa fenolik dan terpenoid dalam ekstrak dimungkinkan dapat bekerja secara sinergis, sehingga memberikan zona hambat pertumbuhan bakteri yang lebih besar. Data tersebut juga menjelaskan bahwa pada kontrol negatif yang digunakan (DMSO) tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri, sehingga aktivitas antibakteri berasal dari ekstrak etanol dan isolat fenolik kulit buah asam paya, bukan dari pelarut yang dipakai. Daya antibakteri pada ekstrak etanol tersebut disebabkan adanya kandungan fenolik dan terpenoid. Hasil *post hoc* menunjukkan perbedaan signifikan antara kelompok sampel, baik ekstrak etanol maupun isolat fenolik. Isolat fenolik kulit buah asam paya (*Eleiodoxa conferta* (Griff). Burret) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

Tabel 1. Rerata Diameter Zona Hambat Ekstrak Etanol dan Isolat Fenolik Kulit Buah Asam Paya (*Eleiodoxa conferta* (Griff.) Burret) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

<i>Sampel</i>	Rerata Diameter Zona Hambat (cm)
<i>Ekstrak 5%</i>	$1,1844 \pm 0,0436$
<i>Isolat fenolik 5%</i>	$0,903 \pm 0,023$
<i>Kontrol +</i>	$1,915 \pm 0,0670$
<i>Kontrol -</i>	0

4. KESIMPULAN

Golongan senyawa yang terdapat didalam ekstrak *n*-heksana dan ekstrak etanol kulit buah asam paya (*Eleiodoxa conferta* (Griff). Burret) berpotensi sebagai antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Kadar fenolik total yang terdapat dalam ekstrak etanol kulit buah asam paya (*Eleiodoxa*

Submit : 12 –10 –2020

Accepted : 25 – 10 – 2020

Published : 30 –10 –2020

5. DAFTAR PUSTAKA

- Afriani S., Indiwati N., Destiarti L., Arianie L., 2014, Uji Aktivitas Antioksidan Daging Buah Asam Paya (*Eleiodoxa conferta* Burret) Dengan Metode DPPH dan Tiosianat, *JKK*, 3 (1), 49-56
- Kristianto Y.B., Sulistyarini, I., Suharsanti, R., 2019, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol, Air Buncis (*Phaseolus vulgaris* L.) dan Fraksi-fraksinya Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*, *Media Farmasi Indonesia*, 14 (2), 1546-1550
- Lenny, S., 2006, *Senyawa Terpenoida dan Steroida*, USU Press, Medan
- Mhaske, M., Samad, B. N., Jawade, R., Bhansali, A., 2012, Chemical Agents in Control of Dental Plaque in Dentistry: An Overview of Current Knowledge and Future Challenges, *Pelagia Research Library*, 3 (1), 268- 272
- Mongkolsilp, M., Pongbupakit, I., Sae, L.N. and Sitthithaworn, W., 2004, Radical scavenging activity and total phenolic content of medicinal plants used in primary health care, *SWU. J Pharm. Sci.*, 9, 32-35
- Neal, M. J., 2006, *At a Glance Farmakologis Medis*, Edisi kelima, Diterjemahkan oleh Safitri, A., Penerbit Erlangga, Jakarta
- Oliver, S. P., B. E. Gillespie, M. J. Lewis, S. J. Ivey, R. A. Almeida, D. A. Luther, D. L. Johnson, K. C. L. amar, H. D. Moorehead and H. H. Dowlen., 2001, Efficacy Of A New Premilking Teat Disinfectant Containing A Phenilic Combination For The Prevention of Mastitis, *J. Dairy Sci*, 84 (3), 1545-1549
- Retnowati, Y., Nurhayati, B., Nona, W.P., 2011, Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* pada Media yang Diekspos dengan Infus Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*), *Saintek*, 6 (2)

- Safitri G.L., Wibowo M.A., Indriawati N., 2017, Uji Aktivitas Ekstrak Kasar Buah Asam Paya (*Eleiodoxa conferta* (Griff.) Burret) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Dan *Salmonella thypi*, *JKK*, 6 (1), 17-20
- Sari, R. P., Nazrun, Surtina, Mahardika, R. G., 2019, Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri pada Air Kelubi (*Eleiodoxa conferta*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Prosiding Seminar Nasional Penelitian & Pengabdian Pada Masyarakat*, ISBN: 978-602-61545-0-7
- Sasmito, S.P.T., Wulandari, Wulansari, E.D., 2020, Senyawa Fenolik Dalam Fraksi Aktif Kulit Buah *Eleiodoxa conferta* Yang Berpotensi Antibakteri Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans*, *Pharmacy Medical Journal*, 3(1), 28-33
- Sudigdodadi, S., 2014, *Mikrobiologi pada Infeksi Kulit*, Universitas Padjajaran, Bandung
- Vermerris, W., Nicholson, R., 2006, *Phenolic Compound Biochemistry*, The Springer, Netherlands