

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK FRAKSI ASAM DAUN TUMBUHAN
PULAI (*Alstonia scholaris* R.Br) DARI DESA KOTARAJA LOMBOK TIMUR**

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST EKSTRAK OF ACID FRACTION OF PULAI
PLANT LEAVES (*Alstonia scholaris* R.Br) FROM KOTARAJA VILLAGE
LOMBOK TIMUR**

NINA TUNMI¹, SURYA HADI², MURNIATI³

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mataram, Indonesia
Jl. Majapahit no. 62, Gomong, Kec. Selaparang, Kota Mataram, Nusa Tenggara Barat 83126

Email: ninatunmi05@gmail.com, murniati@unram.ac.id

Abstrak. Tumbuhan pulai (*Alstonia scholaris* R.Br) merupakan salah satu tumbuhan lokal Pulau Lombok yang banyak digunakan sebagai obat diare, diabetes, penyakit beri-beri dan sebagai antibakteri. Daun pulai memiliki kandungan metabolit sekunder seperti golongan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin dan triterpenoid. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi golongan senyawa kimia yang terdapat pada fraksi asam daun pulai menggunakan GC-MS dan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari fraksi asam daun pulai. Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan meliputi, persiapan sampel, ekstraksi sampel dengan maserasi, uji fitokimia, pemisahan menggunakan kolom kromatografi gravitasi (KKG), uji aktivitas antibakteri serta uji analisis GC-MS. Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan fraksi asam, fraksi 1, fraksi 2, dan fraksi 3 memiliki aktivitas antibakteri. Fraksi 3 menunjukkan zona hambat paling tinggi. Hasil uji fitokimia fraksi asam, fraksi 1, fraksi 2 dan fraksi 3 positif mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, triterpenoid dan saponin, tetapi berbeda dengan hasil analisis GC-MS pada fraksi asam, fraksi 2 dan fraksi 3 hanya teridentifikasi senyawa golongan asam lemak dan senyawa golongan triterpenoid. Pada fraksi 1 senyawa yang teridentifikasi hanya senyawa golongan asam lemak yaitu asam palmitat.

Kata Kunci : Aktivitas Antibakteri, Fraksi asam, GC-MS, Pulai

Abstract. The pulai plant (*Alstonia scholaris* R.Br) is one of the local plants of Lombok Island which is widely used as a medicine for diarrhea, diabetes, beriberi and as an antibacterial. Pulai leaves contain secondary metabolites such as alkaloids, flavonoids, saponins and triterpenoids. This study aims to identify the class of chemical compounds contained in the acid fraction of pulai leaves using GC-MS and to determine the antibacterial activity of the acid fraction of pulai leaves. This study consisted of several stages including sample preparation, sample extraction by maceration, phytochemical test, separation using a gravity chromatography column (KKG), antibacterial activity test and GC-MS analysis test. The results of the antibacterial activity test showed that the acid fraction, fraction 1, fraction 2, and fraction 3 had antibacterial activity. Fraction 3 shows the highest inhibition zone. The results of the phytochemical test of the acid fraction, fraction 1, fraction 2 and fraction 3 were positive for alkaloids, flavonoids, triterpenoids and saponins, but differed from the results of the GC-MS analysis on the acid fraction, fraction 2 and fraction 3,

only fatty acids and fractions were identified. triterpenoid compounds. In fraction 1 the compounds identified were only fatty acid group compounds, namely palmitic acid.

Keywords: Antibacterial Activity, Acid fraction, GC-MS, Pulai

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi merupakan masalah kesehatan utama di Indonesia yang mengakibatkan tingginya angka kematian. Penyakit infeksi disebabkan oleh masuknya mikroorganisme bakteri ke dalam tubuh sehingga menimbulkan kerusakan pada jaringan tubuh. Berdasarkan data Kemenkes RI pada tahun 2022, terdapat sekitar 1,27 juta orang meninggal setiap tahun karena resisten terhadap obat (Kemenkes RI, 2022). Pengobatan infeksi yang paling umum dilakukan adalah dengan menggunakan antibiotik. Penggunaan antibiotik untuk penyakit infeksi yang kurang tepat dan penggunaan obat jangka panjang dapat menimbulkan resistensi terhadap bakteri. Hal ini menunjukkan perlu dilakukannya penelitian untuk mengembangkan antibakteri baru, khususnya dari bahan alam (Sutrisno, 2014). Oleh karena itu, perlu pemeriksaan skrining fitokimia dan analisis untuk mengetahui lebih banyak senyawa bioaktivitas (Ogueke,dkk., 2014).

Salah satu jenis tumbuhan yang dimanfaatkan secara tradisional oleh masyarakat adalah tumbuhan Pulai. Tumbuhan Pulai (*Alstonia Scholaris* R.Br) merupakan salah satu tumbuhan lokal Pulau Lombok yang banyak digunakan sebagai obat. Tanaman pulai termasuk dalam *family Apocynaceae* yang tumbuh pada ketinggian 900 m di atas permukaan laut (Hadi, 2008). Masyarakat Lombok telah menggunakan larutan ekstrak dari daun atau kulit pohon yang masih muda (3-5 tahun) untuk mengobati malaria. Rebusan daun pulai yang masih muda bisa diminum sebagai obat penyakit beri- beri (Wuart, 2006).

Berdasarkan penelitian tumbuhan pulai yang telah dilakukan sebelumnya oleh Hadi (2002), daun, batang serta akar dari tumbuhan pulai yang tumbuh di Pulau Lombok positif mengandung senyawa alkaloid. Penelitian Hadi (2009) berhasil mengisolasi senyawa alkaloid indol baru yaitu senyawa *mataranine* dari fraksi basa daun pulai yang berasal dari Lombok melalui ekstraksi asam. Sedangkan dalam Syarifuddin, dkk., (2021)

menyimpulkan ekstrak daun tanaman pulai mengandung senyawa alkaloid, saponin, dan flavonoid. Hasil penelitian Rambe (2017) menunjukkan bahwa hasil uji aktivitas antibakteri pada ekstrak metanol daun pulai menunjukkan zona hambat yang efektif terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* pada konsentrasi 500 mg/mL dengan diameter zona hambat masing-masing 10,2 mm dan 10,7 mm. Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, pengujian sampel hanya lebih banyak dilaporkan pada fraksi basa (alkaloid) tumbuhan pulai, ekstrak metanol dan fraksi kloroform daun pulai Rambe (2017), sementara pada fraksi asam yang merupakan fraksi terbanyak tidak ada dilaporkan.

Mengacu pada uraian diatas, penelitian ini diarahkan untuk mengetahui komposisi kimia metabolit sekunder yang terdapat pada fraksi asam daun pulai yang tumbuh di Pulau Lombok. Setiap jenis tumbuhan dapat memproduksi kelompok metabolit yang berbeda-beda tergantung pada kondisi lingkungan, waktu serta intensitas stres, komposisi dan fleksibilitas genetik tanaman (Zhao, 2005). Selain itu, penelitian ini juga diarahkan untuk menguji aktivitas antibakteri pada fraksi asam daun pulai dengan jenis bakteri Gram positif (*E. coli*, *S. typhi*, *V. harveyi*, *S. dysenteriae*) dan Gram negatif (*S. aureus*, *B. cereus*).

Salah satu teknik analisis komposisi kimia dalam ekstrak daun yaitu menggunakan instrumen GC-MS (*Gas Chromatography-Massa Spectrometry*). Penggunaan metode ini didasari oleh selektivitas dan sensitivitas instrumen GC-MS dalam menganalisis senyawa kimia. Metode analisis ini penting dilakukan sebagai identifikasi awal untuk mengetahui jumlah senyawa dan perkiraan struktur senyawa yang terkandung dalam sampel (Al-As'Ari, 2014). Karakterisasi senyawa kimia sering didahului dengan kegiatan skrining (penapisan) fitokimia yang berguna untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam tumbuhan.

MATERI DAN METODE

Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Lanjut C 1.4, Laboratorium Kimia Analitik, dan di Laboratorium Biologi Lanjut C. 3.2 Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mataram.

Prosedur Kerja

Pelaksanaan penelitian ini terdiri dari beberapa tahap yaitu pertama, persiapan sampel, sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pulai (*Alstonia scholaris* R.Br) segar sebanyak 2 kg yang diperoleh dari desa Kotaraja Kabupaten Lombok Timur. Daun pulai dipisahkan dengan rantingnya kemudian dicuci hingga bersih dan dikering anginkan pada suhu kamar hingga kandungan air berkurang. Sampel kemudian ditimbang dan di blender hingga menjadi simplisia yang halus.

Sebanyak 200 g simplisia halus daun pulai diekstraksi dengan cara maserasi (perendaman) dengan pelarut metanol, perendaman dilakukan selama 2x24 jam, kemudian semua filtrat yang diperoleh disaring dan dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40 °C sehingga diperoleh ekstrak kental metanol, kemudian ditimbang untuk mengetahui ekstrak kental yang didapatkan.

Setelah diperoleh ekstrak kental metanol selanjutnya dilakukan ekstraksi asam basa. Ekstrak kental metanol daun pulai dilarutkan dengan pelarut metanol, kemudian diukur pH awal. Setelah itu ditambahkan asam asetat glasial (CH_3COOH) 5% sampai dengan pH 3-4 dan dipartisi dengan diklorometana (DCM) (1:3) sampai terbentuk dua fase. Dipisahkan fase air (lapisan atas) dengan fase organik yang disebut dengan fraksi asam (lapisan bawah).

Ekstrak fraksi asam yang sudah diperoleh kemudian dilakukan uji skrining fitokimia yang dilakukan untuk identifikasi golongan metabolit sekunder yang terdapat pada fraksi asam daun pulai (*Alstonia Scholaris* R.Br), dilakukan uji fitokimia yaitu uji alkaloid, flavonoid, steroid, terpenoid dan saponin. Ekstrak metanol dan Fraksi asam dilarutkan dalam pelarut yang sesuai. Kemudian 2 mL dimasukkan ke dalam masing-masing tabung dan ditambahkan 2-3 tetes larutan H_2SO_4 . Mengamati perubahan yang terjadi, jika terbentuk warna merah tua atau kuning menunjukkan positif mengandung flavonoid. Ekstrak metanol dan Fraksi asam dilarutkan dalam pelarut yang sesuai. Masing-masing 2 mL ekstrak metanol dan fraksi asam dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 mL H_2SO_4 . Dipanaskan selama 30 menit kemudian masing-masing diambil dan di bagi 3 tabung reaksi. Tabung 1 ditambahkan 3 tetes pereaksi wagner , tabung 2 ditambahkan 3 tetes pereaksi Meyer, dan tabung 3 ditambahkan 3 tetes pereaksi

Dragendorff. Uji alkaloid ini ditandai dengan endapan coklat pada tabung yang ditambahkan pereaksi Wagner, endapan putih pada tabung yang ditambahkan pereaksi Meyer dan warna jingga jika ditambahkan pereaksi Dragendorff. Ekstrak metanol dan Fraksi asam disiapkan sebanyak 3-7 tetes, ditambahkan 2 mL kloroform dikocok kemudian disaring. Ditambahkan 2 tetes asam asetat glasial pada filtrat kemudian ditambahkan 2 tetes asam sulfat dan diamati perubahan warna yang terjadi. Terbentuknya warna biru atau ungu yang menandakan positif mengandung steroid. Ekstrak metanol dan Fraksi asam ditimbang sebanyak 1 g, ditambahkan 2 mL kloroform dikocok kemudian disaring. Ditambahkan 2 tetes asam asetat glasial pada filtrat kemudian ditambahkan 2 tetes asam sulfat dan diamati perubahan warna yang terjadi, jika terbentuk warna merah jingga atau merah menandakan adanya triterpenoid. Ekstrak metanol dan fraksi asam dilarutkan dengan pelarut yang sesuai. Kemudian 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan Aquades 1 mL (1:1) dan dikocok selama 1 menit. Terbentuk busa yang bertahan selama 10 menit menunjukkan positif saponin.

Tahapan selanjutnya, fraksi asam daun tumbuhan pulai difraksinasi menggunakan teknik Kromatografi kolom gravitasi dengan fase diam silika gel G60 (230-400 mesh) Merck nomor katalog 7733 dan fase gerak menggunakan perbandingan pelarut adalah *n*-heksana dan etil asetat. Fraksi asam daun pulai (8 g) diimpregnasi ke dalam silika gel, kemudian dimasukkan ke dalam kolom Kromatografi kolom gravitasi yang sudah disiapkan *n*-heksana dan etil asetat. Elusi dengan menggunakan pelarut *n*-heksana dan etil asetat yang ditingkatkan kepolarannya mulai dari 100% *n*-heksana sampai dengan 100% etil asetat (8:2; 2:8; 7:3; 7:3; 6:4). Hasil Kromatografi kolom tersebut ditampung menggunakan botol vial dan dimonitor menggunakan KLT untuk mengetahui pola noda yang sama digabungkan untuk kemudian di monitor lebih lanjut. Hasil monitoring KLT menunjukkan bahwa adanya fraksi yang berpotensi untuk dilanjutkan ke tahap pemurnian, terlihat dari terbentuknya noda tunggal pada plat KLT. Fraksi tersebut selanjutnya diidentifikasi menggunakan GC-MS untuk mengetahui metabolit sekunder yang diperoleh dari daun pulai.

Tahapan selanjutnya, uji aktivitas antibakteri pada daun Pulai dilakukan dengan metode difusi sumuran yang dilakukan berdasarkan penelitian (Wangkanusa dkk., 2016).

Bakteri uji yang digunakan adalah bakteri Gram negatif (bakteri *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Vibrio harveyi*, *shigella dysenteriae*) dan bakteri Gram positif (bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus cereus*). Kontrol positif yang digunakan adalah siprofloksasin dan aquades sebagai kontrol negatif. Adapun tahap pengujian aktivitas antibakteri dari fraksi asam dan 3 fraksi gabungan daun pulai sebagai berikut:

Pengujian aktivitas antibakteri fraksi asam dan fraksi gabungan daun pulai dilakukan dengan menggunakan kontrol positif siprofloksasin dan aquades sebagai kontrol negatif. Tahapan awal yang dilakukan yaitu, media MHA ditanamkan bakteri uji dan diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 35 °C, kemudian koloni yang terbentuk disuspensikan ke dalam tabung reaksi yang berisi NaCl 0,9%. Tahapan selanjutnya dibuat tiga sumuran yang berdiameter 6 mm pada media dalam cawan petri. Sumur pertama yang sudah terbentuk pada media agar diisi dengan fraksi asam sedangkan sumuran kedua dan ketiga merupakan pengulangan fraksi asam daun pulai. Cawan petri diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 24 jam. Zona hambat yang terbentuk di sekitar sumuran menunjukkan bahwa agen senyawa tersebut mengandung senyawa aktif antibakteri. Kategori kekuatan daya hambat antibakteri didasarkan pada parameter nilai zona hambat, jika nilai zona hambat lebih dari 12 mm dikategorikan kuat, jika nilai zona hambat 7-12 mm dikategorikan sedang dan tidak aktif jika nilai zona hambat kurang dari 7 mm (Paliling dkk., 2016).

Fraksi asam dan fraksi gabungan dianalisis menggunakan GC-MS untuk mengetahui komponen senyawa yang terkandung di dalamnya. Dalam analisis ini, spektrometri massa digabungkan dengan metode kromatografi gas. Terlebih dahulu senyawa dianalisis dengan kromatografi gas dan selanjutnya dianalisis menggunakan spektrometri massa. Kondisi alat GC-MS yang digunakan adalah suhu injeksi 260 °C, pada suhu kolom awal 150 °C (ditahan 5 menit) hingga 270 °C (ditahan 2 menit) dengan laju kenaikan temperatur sebesar 5 °C/menit.

HASIL DAN DISKUSI

Daun Pulai (*Alstonia Scholaris R.Br.*) yang diambil di Desa Kotaraja, Kabupaten Lombok Timur dicuci terlebih dahulu menggunakan air mengalir untuk menghilangkan

kotoran dan getah yang menempel di daun. Sampel kemudian dikering anginkan selama 7 hari dalam suhu ruang (25 °C). Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air yang terkandung di dalam sampel yang dilakukan tanpa terkena sinar matahari, bertujuan untuk menghindari kerusakan atau terurainya senyawa aktif yang terkandung di dalam sampel yang tidak tahan terhadap panas (Jones dan Kinghorn, 2006).

Daun pulai yang sudah kering angin kemudian dihaluskan dengan mesin blender. Penghalusan ini bertujuan untuk memperbesar luas permukaan sampel, sehingga peluang untuk terekstraknya senyawa aktif oleh pelarut yang digunakan semakin besar. Simplisia pulai sebanyak 200 g dimaserasi menggunakan pelarut metanol. Penggunaan metanol ini bertujuan untuk menarik semua senyawa organik yang bersifat polar hingga non polar (Astarina, dkk., 2013). Selanjutnya, dilakukan pemisahan ekstrak metanol dan residunya dengan proses penyaringan. Proses ini dilakukan selama 2×24 jam dan dilakukan pergantian pelarut setiap satu kali sehari, selain itu juga dilakukan pengadukan untuk menghomogenkan senyawa kontak dan cairan penyari sehingga didapatkan hasil yang maksimal.

Ekstrak metanol yang didapatkan dari simplisia pulai berwarna coklat kehijauan, disebabkan karena adanya kandungan klorofil yang keluar dari serat daun akibat dari proses maserasi. Kemudian ekstrak metanol yang diperoleh dipekatkan menggunakan rotary evaporator, sehingga diperoleh ekstrak kental metanol yang berwarna coklat kehijauan. Berdasarkan hasil pengukuran, didapatkan berat ekstrak kental sebesar 26,02 g dari 200 g sampel yang digunakan sehingga diperoleh hasil rendemen (%) dari maserasi yaitu 13,01 %.

Pengujian kandungan fitokimia ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui gambaran golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak daun pulai (Kristanti, dkk., 2008). Pengujian ini dilakukan secara kualitatif dengan penambahan berbagai pereaksi sehingga dapat diketahui kandungan metabolit dari ekstrak daun pulai (Rahmadhani, dkk., 2022). Uji fitokimia ini merupakan uji pendahuluan yang sangat penting dalam pencarian senyawa baru yang dapat menjadi *precursor* untuk obat-obatan. Pada uji ini, golongan senyawa yang diidentifikasi yaitu golongan senyawa alkaloid, saponin, steroid/terpenoid dan flavonoid. Berdasarkan hasil uji fitokimia ekstrak kental

metanol dan fraksi asam daun pulai menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi mengandung beberapa golongan senyawa metabolit sekunder yang disajikan pada Tabel Hasil uji fitokimia ekstrak kental metanol dan fraksi asam daun tumbuhan pulai

Golongan No.	Golongan senyawa	Hasil Uji		Keterangan	
		Pustaka	Pengamatan	Ekstrak metanol	Fraksi Asam
1.	Alkaloid Meyer	Terbentuk endapan putih	Terbentuk endapan putih, warna larutan hijau kecoklatan	+	+
	Wagner	Terbentuk endapan coklat	Terbentuk endapan coklat, warna larutan coklat kehijauan	+	+
	Dragendorff	Terbentuk endapan jingga	Terbentuk endapan jingga	+	+
2.	Flavonoid	Terbentuk warna kuning dan warna merah	warna kuning tua	-	+
3.	Saponin	Terbentuk Busa	Ada busa	+	+
4.	Steroid	Terbentuk warna biru atau ungu	Tidak berwarna biru	-	-
5.	Triterpenoid	Terbentuknya warna merah, jingga atau ungu,	Terbentuknya warna ungu	+	+

Keterangan : (+) = Reaksi positif ; (-) = Reaksi negatif

Tabel menunjukkan hasil uji fitokimia dari ekstrak metanol dan fraksi asam daun tumbuhan pulai. Pada tabel tersebut terlihat bahwa ekstrak metanol daun tumbuhan pulai positif mengandung senyawa golongan Alkaloid, saponin, triterpenoid sedangkan pada fraksi asam daun pulai positif mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, saponin, triterpenoid. hasil yang di dapat sama dengan penelitian yang dilakukan oleh (Pankti, dkk., 2013) yang menyatakan daun pulai mengandung alkaloid, flavonoid, steroid, terpenoid, dan saponin. Meskipun demikian, ekstrak metanol dan fraksi asam daun pulai pada penelitian

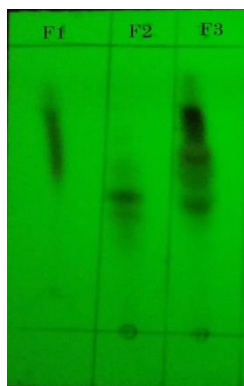
ini tidak teridentifikasi senyawa golongan steroid. Hal ini diduga karena lingkungan tempat tumbuh yang berbeda. Faktor lingkungan sangat mempengaruhi produksi metabolit sekunder yang dapat berasal dari faktor biotik maupun abiotik. Produksi metabolit sekunder tersebut berkaitan dengan mekanisme pertahanan makanan sebagai respon adanya abiotik, seperti sinar UV dan salinitas, maupun tekanan biotik, seperti serangan patogen tanaman dan gulma (Crozier, dkk., 2008).

Sebanyak 10 g ekstrak kental metanol sampel daun tumbuhan pulai selanjutnya diekstraksi menggunakan metode ekstraksi asam basa. Ekstraksi ini bertujuan untuk memisahkan komponen asam dan basa yang terkandung di dalam sampel. Kemudian ekstrak kental metanol ditambahkan asam asetat glasial 5 % sampai dengan pH 3-4. Penambahan asam bertujuan untuk mendapatkan alkaloid menjadi garam yang terlarut dalam fasa air. Penggunaan asam asetat glasial 5 % bertujuan untuk menjaga zat aktif yang terdapat dalam ekstrak tidak terkomposisi atau mengalami kerusakan.

Tahap selanjutnya dilakukan pemisahan filtrat asam dengan penambahan DCM. Proses ekstrak menggunakan pelarut DCM menghasilkan dua fase yaitu lapisan atas dan lapisan bawah pada corong pisah. Jika dilihat dari massanya, massa jenis DCM lebih besar dari pada massa jenis ekstrak metanol. Hal ini menyebabkan terbentuknya dua fase yaitu fase air dan fase organik. Fase organik berada di bagian bawah sedangkan fase air berada di bagian atas. Fase organik yang didapatkan inilah yang disebut fraksi asam, dimana fraksi asam selanjutnya digunakan untuk uji antibakteri dan analisis GC-MS.

Fraksi asam yang didapatkan dari hasil ekstraksi asam basa, kemudian difraksinasi atau dilakukan pemisahan sebanyak 5 g menggunakan metode Kromatografi kolom gravitasi (KKG). Kromatografi kolom gravitasi merupakan alat yang digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa organik terutama terhadap senyawa yang memiliki sifat semi polar pada konstanta dielektrik 2 hingga 10. Silika gel digunakan sebagai fase diam dan eluen yang terpilih yakni *n*-heksana-etil asetat (6:4) digunakan sebagai fase gerak. Hasil Kromatografi kolom tersebut ditampung menggunakan botol vial dan dimonitor menggunakan KLT untuk mengetahui pola noda masing-masing fraksi dalam vial. Noda yang terbentuk kemudian dideteksi menggunakan lampu UV (254 nm). Pemisahan

didapatkan sebanyak tiga fraksi yang memiliki spot noda yang berbeda, yakni fraksi 1, fraksi 2, dan fraksi 3. Ketiga fraksi tersebut dapat di lihat pada Gambar



Gambar KLT Fraksi gabungan

Berdasarkan Gambar didapatkan 3 fraksi yang kemudian akan di analisis kandungan senyawa yang dimiliki menggunakan instrumen GC-MS dan di uji aktivitas antibakterinya.

Hasil analisis komposisi senyawa kimia fraksi asam daun pulai yang dilakukan menggunakan metode GC-MS menunjukkan hasil pemisahan senyawa yang terkandung dalam fraksi asam daun pulai dengan waktu retensi selama 19 menit didapatkan 10 puncak senyawa yang teridentifikasi. Dari 10 puncak yang teridentifikasi sebanyak 7 senyawa dan 3 senyawa tidak teridentifikasi. Puncak senyawa tersebut dirincikan pada Tabel dibawah ini:

Puncak	Waktu retensi (menit)	SI	Area (%)	Rumus Molekul	Golongan Senyawa	Nama Senyawa
1	11.165	97	2.04	$C_{18}H_{36}O$	Asam Lemak	2-Pentadecanone
2	11.885	87	2.97	$C_{29}H_{58}O_2$	Asam Lemak	Octacosanoic Acid
3	12.015	95	4.94	$C_{16}H_{32}O_2$	Asam Lemak	Hexadecanoic Acid
4	12.690	95	14.49	$C_{18}H_{36}O_2$	Asam Lemak	Octadecanoic Acid
6	13.025	93	4.19	$C_{26}H_{54}$	Asam Lemak	Hexacosane
8	14.260	84	5.77	$C_{24}H_{48}O_2$	Asam Lemak	Palmitic Acid
9	14.655	97	2.55	$C_{24}H_{38}O_4$	Triterpenoid	1,2-Benzenedicarboxylic acid

SI = similarity Index

Berdasarkan hasil analisis GC-MS yang ditampilkan pada tabel terdapat 7 senyawa yang teridentifikasi. Terdapat Senyawa yang memiliki % area paling tinggi adalah Octadecanoic Acid, yang terdapat pada puncak 4 dengan % area sebesar 14,45 % dengan rumus molekul $C_{18}H_{36}O_2$ dan termasuk dalam golongan asam lemak. Senyawa ini secara luas digunakan untuk antibakteri dan antioksidan (Muflihunnah, dkk 2021).

Dari puncak yang teridentifikasi terdapat senyawa dari golongan triterpenoid yakni 1,2-Benzenedicarboxylic acid memiliki rumus molekul $C_{24}H_{38}O_4$ dan mempunyai berat molekul 390 (Suhada dan Pranomo, 2013). Senyawa 1,2-Benzenedicarboxylic acid muncul pada puncak 8 dengan persen area 5,77%. 1,2-Benzenedicarboxylic acid diketahui memiliki sifat anti mikroba, antioksidan dan anti peradangan (Mastuti, 2014). Senyawa 1,2-Benzenedicarboxylic acid merupakan senyawa yang berpotensi sebagai antibakteri dengan cara menghancurkan dinding sel dan menghambat sintesis dinding sel.

Hasil analisis GC-MS untuk fraksi 1 daun pulai dapat dilihat pada Tabel di bawah ini:

Puncak	Waktu retensi (menit)	SI	Area (%)	Rumus Molekul	Golongan Senyawa	Nama Senyawa
1	12.020	96	0.13	$C_{16}H_{32}O_2$	Asam lemak	Asam palmitat

Senyawa yang teridentifikasi yaitu senyawa asam palmitat, dimana memiliki persen area sebesar 0,13%, dengan waktu retensi 12.020 menit dan memiliki rumus molekul $C_{16}H_{32}O_2$ dan termasuk dalam golongan asam lemak. Asam palmitat atau *Hexadecanoic acid* bermanfaat sebagai antibakteri dan antifungi.

Hasil analisis GC-MS untuk fraksi 2 daun pulai terdapat 10 puncak senyawa yang terdeteksi oleh GC-MS pada fraksi 2 daun pulai. Berikut uraian senyawa hasil analisis GC-MS fraksi 2 daun pulai pada tabel.

Tabel Komposisi senyawa kimia fraksi 2 daun pulai

Puncak	Waktu retensi (menit)	SI	Area (%)	Rumus Molekul	Golongan Senyawa	Nama Senyawa
1	11.615	96	1.80	$C_{18}H_{36}O$	Asam Lemak	2-Pentadecanone
2	11.675	96	1.62	$C_{15}H_{30}O_2$	Asam	Pentadecanoic Acid

3	11.890	85	5.09	$C_{21}H_{42}O_2$	Lemak Asam	Eicosanoic Acid
4	12.020	95	36.32	$C_{16}H_{32}O_2$	Lemak Asam	Hexadecanoic Acid
5	12.350	95	1.29	$C_{17}H_{34}O_2$	Lemak Asam	Heptadecanoic acid
6	12.445	84	1.53	$C_{24}H_{50}$	Lemak Alkana	Tricosane
7	12.505	84	4.14	$C_{15}H_{26}O_3$	Terpenoid	2,6-dimethyl-8-tetrahydropyranyloxy-2,6-octadien-1-ol
8	12.535	97	13.29	$C_{20}H_{40}O$	Terpenoid	2-Hexadecen-1-ol
9	12.625	93	27.01	$C_{18}H_{32}O_2$	Asam lemak	9,12-Octadecadienoic Acid
10	12.695	95	7.90	$C_{18}H_{36}O_2$	Asam Lemak	Octadecanoic Acid

Berdasarkan hasil analisis dengan menggunakan GC-MS, puncak-puncak yang teridentifikasi tidak jauh beda dengan hasil analisis pada fraksi asam daun pulai. Ada 3 senyawa teridentifikasi memiliki persen area tertinggi yakni puncak 4 dengan persen area sebesar 36,32 % dan waktu retensi 112.020 menit, puncak nomor 9 waktu retensi 12.623 menit dengan persen area sebesar 27,01 % dan puncak nomor 8 waktu retensi 12.505 dengan persen area sebesar 13,29 %. Puncak nomor 8 merupakan salah satu senyawa dari golongan terpenoid yaitu 2-Hexadecen-1-ol, memiliki rumus molekul $C_{20}H_{40}O$ dan mempunyai berat molekul 296.53.

Berdasarkan hasil Kromatogram GC-MS fraksi 3 daun pulai teridentifikasi 10 puncak yaitu dengan 5 puncak teridentifikasi memiliki senyawa. Puncak yang teridentifikasi dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

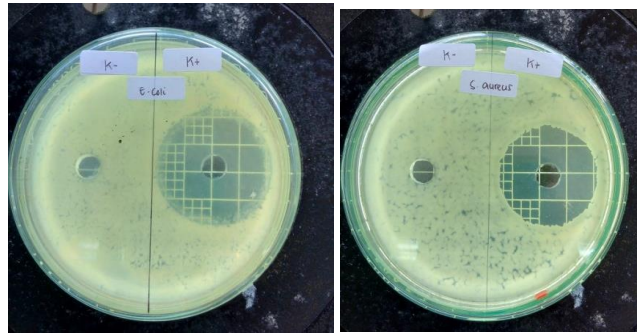
Puncak	Waktu retensi (menit)	SI	Area (%)	Rumus Molekul	Golongan Senyawa	Nama Senyawa
1	11.955	87	4.45	$C_{35}H_{72}$	Terpenoid	Pentatriacontane
3	12.015	83	5.87	$C_{16}H_{32}O_2$	Asam lemak	Asam palmitat
6	14.240	97	2.92	$C_{26}H_{54}$	Alkana	Hexacosane

8	14.650	97	5.53	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	Triterpenoid	1,2-Benzenedicarboxylic Acid
9	17.115	97	3.53	C ₄₀ H ₈₂	Alkana	Tetracontane

Puncak 3 merupakan major dari komponen fraksi ini dengan luas area 5,87 %, puncak ini diidentifikasi sebagai asam palmitat, dengan rumus molekul C₁₆H₃₂O₂ dan termasuk ke dalam golongan asam lemak. hasil analisis GC-MS dari semua sampel didominasi oleh golongan asam lemak. Hal ini dimungkinkan karena adanya beberapa faktor pada sampel seperti terdapat lapisan lilin yang tebal pada daun pulai yang menyebabkan kandungan asam lemak relatif tinggi, sehingga golongan senyawa lain yang memiliki jumlah kandungan senyawa rendah tidak bisa teridentifikasi oleh GC-MS.

Sampel yang diuji antibakterinya dalam penelitian ini yaitu, sampel 1 (fraksi asam), sampel 2 (fraksi 1), sampel 3 (fraksi 2) dan sampel 4 (fraksi 3) daun tumbuhan pulai. Uji aktivitas antibakteri fraksi-fraksi dari ekstrak daun tumbuhan pulai dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode difusi secara sumuran, karena metode ini merupakan metode umum yang praktis, cepat dalam pembacaan hasil dan efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri (Faatih dkk., 2005).

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri Gram negatif (*E. coli*, *S. typhi*, *V. harveyi*, *S. dysenteriae*) dan Gram positif (*S. aureus*, *B. cereus*). Ada dua kontrol yang digunakan untuk uji antibakteri daun pulai yaitu kontrol negatif (aquades) dan kontrol positif (siprofloksasin). Hasil pengamatan zona hambat aktivitas antibakteri pada kontrol negatif (aquades) dapat dilihat pada Gambar.



(a)

(b)

Pengamatan zona hambat aktivitas antibakteri pada kontrol negatif dan kontrol positif (a) *E.coli* dan (b) *S.aureus*.

Berdasarkan hasil pengamatan zona hambat aktivitas antibakteri pada kontrol negatif (*aquades*), tidak terdapat zona hambat pada kontrol negatif yang digunakan, hal ini menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri tidak dipengaruhi oleh faktor pelarut. Pemilihan *aquades* didasarkan pada sifatnya yang tidak mempengaruhi aktivitas tumbuh bakteri uji. Hal ini dapat dibuktikan dengan tidak terdapatnya zona hambat pada uji aktivitas antibakteri yang telah dilakukan dan kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah siprofloksasin.

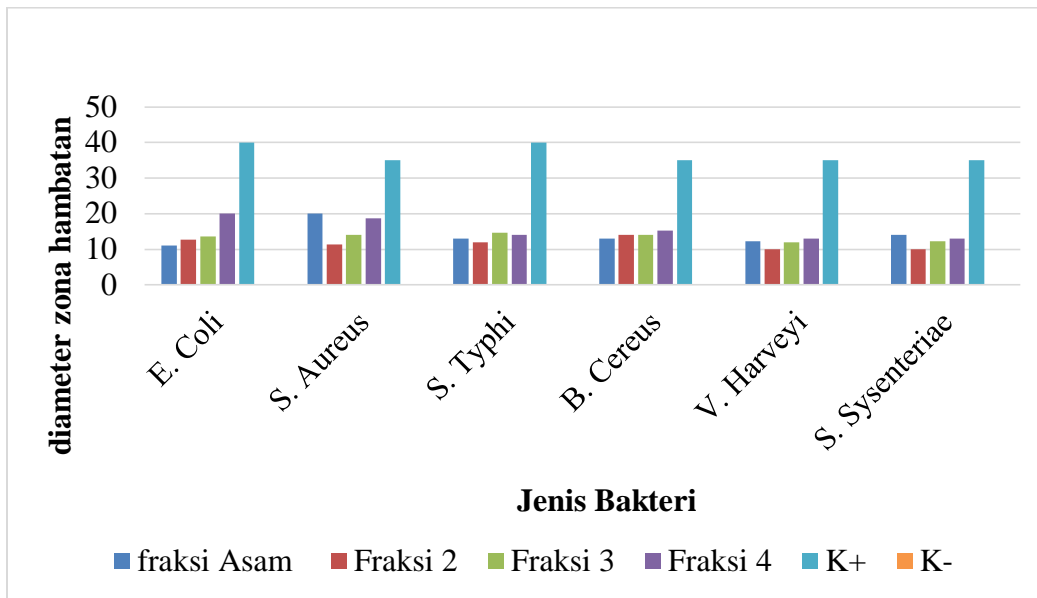
Menurut Jawetz, dkk. (2007), siprofloksasin memiliki efek antibakteri yang besar. Siprofloksasin dipilih sebagai kontrol positif karena merupakan golongan obat fluorokuinolon yang berfungsi untuk menghambat sintesis DNA bakteri (Lombogia, 2016), dan sebagai antibiotik umum yang digunakan untuk penyakit yang disebabkan oleh bakteri uji yang akan digunakan.

Berdasarkan hasil pengamatan, kontrol positif (*siprofloksasin*) menghambat bakteri uji yang digunakan, hal ini ditandai dengan adanya zona hambat yang terlihat pada cawan petri. Hasil zona hambat dari siprofloksasin digunakan sebagai kontrol terhadap ekstrak daun pulai, yang diuji dengan berbagai bakteri Gram positif dan Gram negatif. Hasil uji aktivitas antibakteri dari fraksi asam, fraksi 1, fraksi 2 dan fraksi 3 disajikan pada tabel Diameter zona hambat setiap Fraksi daun pulai

No	Bakteri	Rata-rata Diameter Zona Hambat				Keterangan (Ada/Tidak) Zona Hambat
		F. Asam	F1	F2	F3	
1.	<i>Eschericia coli</i>	11	12.6	13.6	20	Ada
2.	<i>Staphyloccocus aureus</i>	20	11.3	14	18.6	Ada
3.	<i>Salmonella Typhi</i>	13	12	14.6	14	Ada
4.	<i>Bacillus cereus</i>	13	14	14	15.3	Ada
5.	<i>Vibrio harveyi</i>	12.3	10	12	13	Ada
6.	<i>Shigella dysenteriae</i>	14	10	12.3	13	Ada

Berdasarkan hasil pengamatan, setiap fraksi memiliki aktivitas antibakteri yang hal ini dilihat dari zona hambat. Zona hambat diukur setelah bakteri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, suhu ini merupakan suhu optimum bakteri untuk dapat bertahan hidup dan berkembang. Hasil yang didapatkan ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan untuk uji aktivitas antibakteri dengan menggunakan fraksi kloroform daun pulai (Rambe dan Azhari, 2017) yang menunjukkan hasil positif dimana bakteri mampu menghambat jenis bakteri Gram positif dan Gram negatif pada konsentrasi 500 mg/ml dengan diameter zona hambat-masing 11,2 mm dan 15,5 mm.

Pada penelitian ini konsentrasi yang digunakan dari ke empat fraksi daun pulai yang digunakan lebih besar dibandingkan dengan penelitian sebelumnya. Hasil yang diperoleh setiap fraksi mampu menghambat aktivitas antibakteri dengan baik pada bakteri Gram negatif (*E. coli*, *S. typhi*, *V. harveyi*, *S. dysenteriae*) dan Gram positif (*S. aureus*, *B. cereus*). Hasil perbandingan zona hambatan sampel fraksi asam, fraksi 1, fraksi 2, dan fraksi 3 terhadap berbagai bakteri uji dapat dilihat pada Gambar.



Gambar Perbandingan zona hambatan sampel fraksi asam dan fraksi gabungan terhadap berbagai jenis bakteri.

Berdasarkan grafik di atas pada keempat fraksi, fraksi 3 merupakan fraksi yang paling baik menghambat ke enam jenis bakteri dibandingkan dengan fraksi 1 dan fraksi 2. Semua jenis bakteri mampu dihambat aktivitasnya dibandingkan dengan fraksi lainnya. Semua jenis bakteri yang digunakan pada uji aktivitas antibakteri ini merupakan bakteri penyebab penyakit dalam kehidupan manusia. Untuk membandingkan hasil uji aktivitas antibakteri tersebut, maka diambil dua contoh bakteri dari dua jenis bakteri yang berbeda yaitu bakteri dari jenis Gram positif yaitu *S.aureus* dan Bakteri dari Gram negatif yaitu *E. coli*.

Berdasarkan grafik perbandingan zona hambat, fraksi yang lebih baik pada bakteri Gram positif (bakteri *S. aureus*) dibandingkan dengan bakteri Gram negatif (bakteri *E. coli*). Hal ini sesuai dengan sifat dinding sel yang dimiliki bakteri tersebut. Menurut (Lestari, 2016) struktur dinding sel bakteri Gram negatif lebih kompleks dibandingkan struktur dinding sel bakteri Gram positif. Bakteri Gram negatif memiliki dinding sel yang terdiri dari 3 lapisan yaitu, lapisan luar, lapisan tengah dan lapisan dalam. Sedangkan, bakteri Gram positif hanya mempunyai lapisan tunggal pada dinding selnya. (Siswandono, 2000) menambahkan struktur dinding sel bakteri Gram negatif yang relatif kompleks akan menyebabkan senyawa antibakteri lebih sukar masuk ke dalam sel.

Berdasarkan hasil uji aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri oleh 4 fraksi, fraksi asam, fraksi 1, fraksi 2, dan fraksi 3 menunjukkan hasil yang positif yaitu terdapat zona hambat disekitar sumuran yang dapat dikatakan semua fraksi dapat menghambat pertumbuhan bakteri, namun belum dapat dipastikan senyawa aktif mana yang terlibat dalam penghambatan tersebut. Hal ini disebabkan oleh fraksi-fraksi yang digunakan bukan merupakan senyawa tunggal melainkan campuran senyawa dari hasil ekstraksi asam basa yang telah dilakukan.

Data hasil analisis GC-MS menunjukkan sebagian fraksi asam daun pulai mengandung senyawa terpenoid, yaitu golongan senyawa monoterpenoid yang sebagian besar strukturnya memiliki gugus hidroksil. Fungsi terpenoid sebagai antibakteri berkaitan dengan gugus hidroksil yang dimilikinya. Gugus Hidroksil dapat menyebabkan kerusakan dan mengganggu fungsi pertahanan terluar bakteri karena memiliki kemampuan melarutkan lipid pada membran luar bakteri sehingga bakteri mengalami lisis (Sepvianti dan Kususmaningrum, 2019).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diperoleh kesimpulan bahwa :

- a. Berdasarkan hasil analisis fitokimia ekstrak dan fraksi daun tumbuhan pulai (*Alstonia Scholaris* R.Br.) positif mengandung Alkaloid, flavonoid, saponin dan triterpenoid dan berdasarkan analisis GC-MS hanya teridentifikasi jenis senyawa golongan triterpenoid dan asam lemak.
- b. Hasil analisis menggunakan GC-MS pada daun tumbuhan pulai menunjukkan bahwa pada fraksi asam senyawa yang teridentifikasi yaitu senyawa golongan asam lemak (*2-pentadecanone, octadecanoic acid*, asam palmitat, asam stearat, *hexacosane, Hexadecanoic Acid*,) dan golongan triterpenoid (*1,2-Benzenedicarboxylic acid*). Sedangkan untuk fraksi 1, fraksi 2, dan fraksi 3 juga teridentifikasi senyawa golongan asam lemak (*2-pentadecanone, octadecanoic acid*, asam palmitat, asam stearat, *hexacosane*) dan golongan triterpenoid (*1,2-Benzenedicarboxylic acid, 2,6-dimethyl-8-tetrahydropyran-2-yl-2,6-octadien-1-ol* dan *2-Hexadecen-1-ol*).

- c. Uji aktivitas antibakteri untuk setiap fraksi asam, fraksi 1, fraksi 2, dan fraksi 3 daun tumbuhan pulai menunjukkan bahwa terlihat adanya zona hambat karena mampu menghambat bakteri Gram positif dan Gram negatif, dimana fraksi 3 menunjukkan zona hambat yang paling tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-As'Ari, M. 2014. Analisis Alkaloid Daun Pulai (*Alstonia scholaris* R.Br) Asal Pulau Lombok Menggunakan GC-MS. Universitas Mataram.
- Astarina, N. W. G., Astuti, K. W., dan Warditiani, N. K., 2013, Skrini Fitokimia Ekstrak Metanol Rimpang Bangle. Jurnal Farmasi Udayana. 2(4), 1-6.
- Hadi, S., 2002. Bioactive Alkaloid from Medicinal Plants of Lombok, Tesis, Program Studi Kimia, Universitas Wollongong, Australia.
- Hadi, S., 2008. Mataranine A dan B : A New Diastomeric Indole Alkaloid Frpm *Alstonis Scholaris* R. Br Of Lombok Island. Indonesia Journal Chemistry, 9(3), 505-508.
- Hadi, S., & Bremner, J. B. 2001. Initial Studies on Alkaloids from Molekules. Journal Molecules, 6, 117-129.
- Hadi, S., Asnawati, D., dan Febrianti, N. 2010. Structure Elucidation of Alkaloids From leaves of Voacanga (BI.) rolfe of LombokIsland. Jurnal Kimia, Universitas Mataram.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2022, Profil Kesehatan Indonesia 2022, Kementerian Kesehatan RI, Jakarta.
- Kristanti, A. N., N.S. Aminah, M. Tanjung, dan B. Kuriadi. 2008. Buku Ajar Fitokimia. Surabaya Airlangga University Press. Hal. 23-47..
- Lenny, S. 2006. Senyawa Flavonoid, Fenil Propanoida, dan Alkaloida. Karya Ilmiah.
- Muflihunna, A., A. Mu'nisa, Yusminah H., dan Hasri. 2019. Gas Chromatography- Mass Spectrometry (GC-MS) Analysis and Antioxidant Activity of Sea-Cucumber (Holothurian Atra and Holothurian edulis) From Selayar Island. Journal of Physics 1-5.
- Ogueke, C. C., uwaleke, J., Owuamanam, C. I., dan Okolue, B., 2014, Antimicroial Activitie of Alstonia bonneri stem bark,a Nigeria Traditional Medicinal Plant, Asian Pacific Journal of Trofikal Disease 4(2): 954-962.
- Paliling, A., Posangi, J., & Anindita, P. S. 2016. Uji Daya Hambat Ekstrak Bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) Terhadap Bakteri Porphyromonas gingivalis. Jurnal e-GiGi (eG), 4(2), 229-234.
- Puspita, R. T., 2020, Efektivitas Kombinasi Minyak Atsiri Sereh Wangi (*Cymbopogon nardus*) dan Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) pada Pembutan Lilin Aromatik Pengusir Nyamuk Aedes dan Culex (*Culicidae*), Skripsi, Jurusan Pendidikan Biologi Fakultas Tarbiyah dan Keguruan Universitas Islam Negri Raden Intan, Lampung.

- Rambe, A. Z. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol dan Fraksi Kloroform dari Daun Pulau (*Alstonia scholaris* R.Br). jurnal Universitas Sumatera Utara.
- Rahmadhani, F. A., Poppy P. M., Anisa R. D., Ade, S. S. 2022. Skrining Fitokimia Disinfektan Alami dari Ekstrak Etanol Daun Pulau (*Alstonia Scholaris*). Jurnal Teknologi Separasi 8(1) : 280-286.
- Sepvianti, W., dan Kusumaningrum, S. B. C., 2019, Aktivitas Antibakteri Senyawa 2-hidroksi-4,6 dimetoksikalkon, Journal of Health 6(1): 1-3.
- Sutrisno, J. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Biji Pinang (*Areca catechu* L.) Terhadap *Staphylococcus* secara In Vitro. Pontianak: Universitas Tanjung Pura.
- Supratman, Unang. 2010. Elusidasi Struktur senyawa Organik (Metode Spektroskopi untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik). Widya Padjajaran. Bandung.
- Syarifuddin, R. N., Trisnawaty A. R., Andi, n., 2021, Identifikasi Senyawa Kimia pada Tanaman Pulau (*Alstonia scholaris*) sebagai Peptisida Nabati untuk Pengendali Hama, Jurnal Galung Trofika 10(1): 40-47.
- Wangkanusa, D., Lolo, W. A., & Wewengkang, D. S. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri Dari Ekstrak Daun Prasman (*Eupatorium triplinerve* Vahl.) Terhadap Pertmbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* Dan *Pseudomonas aeruginosa*. Jurnal Ilmiah Farmasi, 5(4), 203-210.
- Wiat, C. 2006. Medicinal Plant of the Acia-Pacific: Drugs for the Future. Singapore: World Scientific Publishing Co.Pte.Ltd.
- Zhao, X., F. C. Yuan, W. Du, dan D. Liu. 2015. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: enzyme immobilization, process simulation and optimization. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 44(7), 182-197.
- Ziegler J., and Facchini PJ. 2008. Alkaloid biosynthesis: Metabolism and trafficking. Annual Revision of Plant Biology. 59(1), 735-769.