

Aktivitas Antibakteri dan Penetapan Kadar Flavonoid Fraksi Daun Kalangkala (*Litsea angulata*) Serta Profil Kromatografi Lapis Tipis

Antibacterial Activity and Determination of Flavonoid Levels of Kalangkala Leaf Fraction (*Litsea angulata*) and Thin Layer Chromatography Profile

Rohama ^{1*}

Melviani ²

Rahmadani ³

Sari Mulia University,
Banjarmasin City, South
Borneo 70238, Indonesia

*email: apt.rohama@gmail.com

Abstrak

Secara tradisional masyarakat Kalimantan menggunakan kalangkala (*Litsea angulata*) untuk mengobati berbagai penyakit, salah satunya adalah diare. Diketahui kalangkala mengandung flavonoid yang memiliki aktivitas antibakteri. Ekstrak daun kalangkala di uji aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* yang merupakan salah satu bakteri penyebab diare secara difusi dan dilusi. Kemudian kadar flavonoid ditetapkan dengan metode spektrofotometri UV-Vis serta melihat bagaimana profil kromatografi lapis tipis pada tingkatan fraksi untuk mengetahui seberapa banyak senyawa flavonoid. Hasil menunjukkan ekstrak daun kalangkala memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E.coli* secara difusi diperoleh diameter zona hambat sudah terlihat pada konsentrasi 20 mg/ml. Secara dilusi diperoleh nilai KHM pada konsentrasi 50% dan KBM pada konsentrasi 100%. Kadar flavonoid pada ekstrak sebesar 71,367 mg QE(Quercetin Equivalen)/g, pada fraksi n-Heksan sebesar 8,367 mg QE(Quercetin Equivalen)/g, pada fraksi etil asetat sebesar 6,700 mg QE(Quercetin Equivalen)/g dan pada fraksi aquadest sebesar 5,700 mg QE(Quercetin Equivalen)/g. Profil Kromatografi Lapis Tipis fraksi n-Heksan dengan eluen n-Heksan : Etil Asetat (8:12) tampak 7 noda, fraksi etil asetat dengan eluen Etil Asetat : N-Heksan (3:7) tampak 5 noda dan fraksi aquadest dengan eluen butanol : asam asetat : aquadest (4:1:5) tampak 2 noda.

Kata Kunci:

Kalangkala
Antibakteri
Flavonoid
Fraksi

Keywords:

Kalangkala
Antibacterial
Flavonoid
Fraction

Abstract

Traditionally the people of Kalimantan use kalangkala (*Litsea angulata*) to treat various diseases, one of which is diarrhea. It is known that kalangkala contains flavonoids that have antibacterial activity. Kalangkala leaf extract was tested for antibacterial activity against *Escherichia coli* which is one of the bacteria that causes diarrhea by diffusion and dilution. Then flavonoid levels are determined by the Spectrophotometry UV-Vis method and see how thin layer chromatography profiles at the fraction level to find out how much flavonoid compounds there are. The results showed that kalangkala leaf extract has antibacterial activity against *E.coli* by diffusion obtained the diameter of the inhibitory zone already visible at a concentration of 20 mg / ml. Dilutionally obtained the value of KHM at a concentration of 50% and KBM at a concentration of 100%. Flavonoid levels in the extract were 71,367 mg QE(Quercetin Equivalen)/g, at the n-Hexane fraction of 8,367 mg QE(Quercetin Equivalen)/g, at the ethyl acetate fraction of 6,700 mg QE(Quercetin Equivalen)/g and at the aquadest fraction of 5,700 mg QE(Quercetin Equivalen)/g. Profile of Thin-Layered Chromatography of the n-Hexane fraction with n-Hexane : Ethyl Acetate (8:12) eluene appeared 7 stains, ethyl acetate fraction with ethyl acetate : N-Hexane (3:7) eluene appears 5 stains and aquadest fraction with butanol : acetic acid : aquadest (4:1:5) eluent appears 2 stains.



© 2023 The Authors. Published by Institute for Research and Community Services Universitas Muhammadiyah Palangkaraya. This is Open Access article under the CC-BY-SA License (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>). DOI: <https://doi.org/10.33084/jsm.v9i1.5194>.

PENDAHULUAN

Infeksi merupakan penyakit yang menjadi permasalahan di banyak negara termasuk Indonesia. Resistensi bakteri menjadi salah satu faktor penyebab pencarian senyawa aktif yang berpotensi sebagai antibakteri. Tanaman sebagai bahan alam dapat dimanfaatkan untuk

mengurangi penggunaan bahan sintetik dalam pengobatan selain dipercaya memiliki efek samping yang minim (Melviani et al. 2022). Secara tradisional masyarakat Kalimantan menggunakan tumbuhan kalangkala (*Litsea* sp) untuk mengobati penyakit seperti diare, sakit perut, dyspepsia, gastroenteritis, diabetes, dll. (Kuspradini, et al., 2018). Penelitian sebelumnya

diketahui daun kalangkala mengandung senyawa flavonoid yang memiliki kemampuan sebagai antibakteri dan bentuk sediaanya sebagai *mouthwash* memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus mutans* (Rohama, et al., 2021). Penelitian lain juga melaporkan bahwa ekstrak daun kalangkala memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus mutans* dan *Staphylococcus aureus* (Kuspradini, et al., 2018). Penelitian aktivitas antibakteri kalangkala terhadap bakteri *Escherichia coli* belum pernah dilakukan. *E.coli* merupakan bakteri gram negative penyebab utama morbiditas dan mortalitas di dunia melalui infeksi gangguan pencernaan. Penetapan kadar flavonoid perlu dilakukan untuk mengetahui seberapa besar kadar flavonoid yang terkandung didalam daun kalangkala yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri.

METODOLOGI

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu Rotary evaporator, spektrofotometer UV-Vis, lampu UV, BSC, Inkubator, autoklaf, hotplate, kuvet, corong pisah.

Bahan yang digunakan yaitu Daun Kalangkala (*Litsea angulata*), etanol 96%, n-heksan, etil asetat, aquadest, bakteri *E.coli*, media *Nutrient Agar*, *Media Mullen Hilton Agar*, *Media Nutrient Broth*, kuersetin.

Metode Pelaksanaan

Persiapan Alat dan Bahan

Pembuatan ekstrak etanol daun kalangkala (*Litsea angulata*) menggunakan metode maserasi sehingga diperoleh ekstrak kental (Rohama, et al., 2021). Kemudian dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E.coli* dengan metode Difusi (Rohama, et al., 2021) dan dilusi (Jannah, et al., 2021)

Tahapan pembuatan fraksi daun Kalangkala

- a. 10 gram ekstrak daun kalangkala dilarutkan dengan 50 ml aquadest masukkan dalam corong pisah.
- b. Tambahkan 50 ml n-Heksan (1:1) lalu gojok homogen dan diamkan hingga terbentuk 2 fase

- c. Ambil fraksi n-heksan. Tambahkan etil asetat (1:1) kedalam corong pisah, gojok dan diamkan sampai terbentuk 2 fase.
- d. Ambil fraksi etil asetat dan aquadest.
- e. Ketiga fraksi yang diperoleh di pekatkan menggunakan *rotary evaporator* (Mu'awwanah, et al., 2013)

Ekstrak dan fraksi yang diperoleh dilakukan identifikasi senyawa flavonoid dengan pereaksi warna, kemudian dilihat Profil Kromatografi Lapis Tipis nya dengan variasi eluen untuk melihat eluen yang paling optimal dalam memisahkan senyawa. (Rohama, et al., 2021).

Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak dan Fraksi

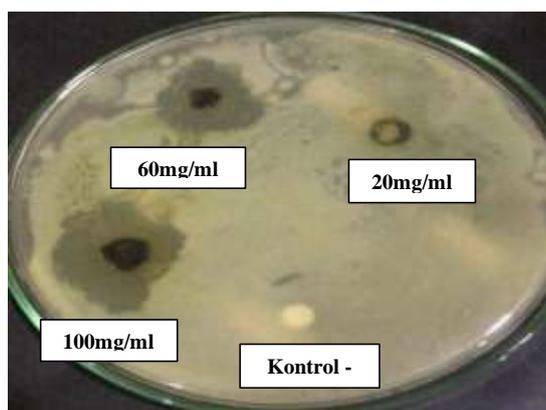
- a. Pembuatan larutan baku induk kuersetin 100 ppm
10 mg kuersetin dilarutkan dengan etanol 96%, tambahkan etanol 96% ad 100 ml dalam labu ukur.
- b. Penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin
Ambil 1 ml baku induk, tambahkan 1 ml AlCl_3 10% dan 8 ml asam asetat 5%. Tentukan panjang gelombang maksimum pada 370-450 nm
- c. Penetapan *Operating time*
Ambil 1 ml baku induk, tambahkan 1 ml AlCl_3 10% dan 8 ml asam asetat 5%. Tentukan absorbansi dengan panjang gelombang yang telah diperoleh. Dengan interbal waktu 2 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil.
- d. Pembuatan kurva standar kuersetin
Ambil baku induk dan buat seri konsentrasi yaitu 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm dan 12 ppm. Masing-masing di ambil 1 ml, tambahkan 1 ml AlCl_3 10% dan 8 ml asam asetat 5% diamkan selama *operating time* dan ukur absorbansinya.
- e. Pembuatan larutan baku induk fraksi daun kalangkala
Ambil 1 ml fraksi tambahkan 1 ml AlCl_3 10% dan 8 ml asam asetat 5%, diamkan selama *operating time*. Lakukan pengukuran dengan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang yang diperoleh (Asmorowati, et al., 2019)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada proses maserasi menggunakan simplisia kering sebanyak 898,25 gram. Kemudian diekstraksi dengan pelarut etanol 96% setiap 3x24 jam menghasilkan ekstrak kental sebanyak 55,97 gram. Rendemen ekstrak yang didapatkan sebesar 6,23%. Pemilihan etanol 96% dikarenakan mampu menyari sebagian besar kandungan kimia tanaman serta etanol juga memiliki beberapa sifat seperti absorpsi yang baik, bersifat netral, tidak beracun dan kapang sulit tumbuh dalam etanol 20% ke atas (Noval et al. 2019).

Uji Aktivitas Antibakteri Metode Difusi

Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kalangkala terhadap *Escherichia coli*, didapatkan hasil sebagai berikut:



Gambar I. Hasil Uji Daya Hambat

Tabel I. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kalangkala terhadap *Escherichia coli*.

Perlakuan	Diameter (mm)	Daya Hambat
Kontrol (-)	0	Lemah
20 mg/ml	10	Sedang
60 mg/ml	20	Kuat
100 mg/ml	26	Sangat kuat
Kontrol (+)	55	Sangat kuat

Keterangan (Hapsari, et al., 2015):

Diameter zona hambat >20 mm : Daya hambat sangat kuat

Diameter zona hambat 10-20 mm : Daya hambat kuat

Diameter zona hambat 5-10 mm : Daya hambat sedang

Diameter zona hambat 0-5 mm : Daya hambat lemah

Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kalangkala dilakukan dalam kondisi steril di dalam BSC (*Bio Safety Cabinet*). Kertas cakram yang digunakan dalam metode difusi ini adalah kertas cakram dengan diameter 6 mm. Bakteri yang digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kalangkala berupa bakteri gram negatif yaitu *Escherichia coli*. Terdapat 5 perlakuan yang diberikan terhadap bakteri, diantaranya kontrol negatif dengan DMSO, kontrol positif dengan ciprofloxacin dan ekstrak daun kalangkala dengan pengenceran 20, 60 dan 100 mg/ml. Sebelum dilakukan pengujian, ekstrak kental diencerkan terlebih dahulu dengan DMSO. Alasan penggunaan DMSO sebagai pengencer ekstrak dikarenakan DMSO digunakan dalam kontrol negatif sehingga bias yang ditimbulkan saat penelitian dapat diminimalisir dan dalam pengenceran ekstrak perlakuan lebih baik menggunakan senyawa yang sama dengan kontrol negatif (Noval et al. 2020). Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah DMSO, karena DMSO tidak memiliki fungsi antibakteri dan umumnya hanya digunakan sebagai pelarut (Rachmawati, et al., 2016). Sedangkan kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah ciprofloxacin yang biasa digunakan dalam pengobatan diare karena infeksi bakteri *E.coli*.

Berdasarkan hasil pengamatan tersebut kekuatan antibakteri ekstrak etanol daun kalangkala terhadap *E. coli* mulai terlihat pada konsentrasi 20 mg/ml dan kekuatan aktivitas antibakterinya akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak yang digunakan.

Uji Aktivitas Antibakteri Metode Dilusi Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Hasil pengujian konsentrasi hambat minimum (KHM) diperoleh hasil sebagai berikut:

Tabel II. Hasil pengujian konsentrasi hambat minimum (KHM) ekstrak daun kalangkala (*Litsea angulata*) terhadap bakteri *Escherichia coli*

Perlakuan	Replikasi		
	I	II	III
Kontrol negatif (DMSO)		+	
Kontrol positif (Ciprofloxacin)		-	
Konsentrasi 6,25%	+	+	+
Konsentrasi 12,5%	+	+	+
Konsentrasi 25%	+	+	+
Konsentrasi 50%	-	-	-
Konsentrasi 100%	-	-	-

Keterangan:

Tanda negatif (-) : tidak ada pertumbuhan bakteri

Tanda positif (+) : adanya pertumbuhan bakteri

Berdasarkan hasil pada tabel diatas dapat dilihat bahwa ekstrak daun kalangkala (*Litsea angulata*) memiliki konsentrasi hambat minimum terhadap bakteri *Escherichia coli* diperoleh rata-rata kejernihannya berada pada konsentrasi 50%

Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)

Hasil pengujian konsentrasi bunuh minimum (KBM) diperoleh sebagai berikut:

Tabel III. Hasil pengujian konsentrasi bunuh minimum (KBM) ekstrak daun kalangkala (*Litsea angulata*) terhadap bakteri *Escherichia coli*

Perlakuan	Replikasi		
	I	II	III
Konsentrasi 50%	+	+	+
Konsentrasi 100%	-	-	-

Keterangan:

Tanda negatif (-) : tidak ada pertumbuhan bakteri

Tanda positif (+) : adanya pertumbuhan bakteri

Berdasarkan hasil pada tabel diatas dapat dilihat bahwa ekstrak daun kalangkala (*Litsea angulata*) memiliki konsentrasi bunuh minimum terhadap bakteri *Escherichia coli* diperoleh rata-rata kejernihannya berada pada konsentrasi 100%.

Pengujian aktivitas antibakteri konsentrasi hambat minimum (KHM) menggunakan metode dilusi cair dengan media *Nutrient Broth* (NB). Menurut (Maryadi, et al., 2017), pengujian KHM ialah salah satu pengujian yang digunakan untuk mengetahui suatu sensitivitas dari mikroba pada zat bioaktif (Kurniawati et al. 2021). Metode dilusi merupakan pengujian kekuatan antibakteri dalam media cair yang telah diberikan agen antibakteri dan di inkubasi selama 1x24 jam. Ekstrak daun kalangkala menggunakan konsentrasi yaitu 100%, 50%, 25%, 12,5% dan 6,25% yang dibuat dalam larutan stok sebanyak 5 ml. Menurut (Sariadi, et al., 2019), dalam menentukan suatu nilai KHM yaitu dipilih dari konsentrasi terendah yang masih menunjukkan kejernihan (Noval, et al. 2021).

Pada tabel 2 dapat dilihat kontrol negatif terjadi kekeruhan, artinya pertumbuhan bakteri yang terjadi karena DMSO diketahui tidak mempunyai aktivitas antibakteri. Tabung kontrol positif terlihat jernih artinya tidak terjadi pertumbuhan bakteri, hal ini sesuai dengan fungsi dari ciprofloxacin yang merupakan antibiotic yang sensitive terhadap bakteri *e.coli*. Tabung yang berisi ekstrak daun kalangkala menunjukkan kejernihan pada konsentrasi 50% sehingga dapat disimpulkan nilai KHM terdapat pada konsentrasi 50%.

Tabung ekstrak yang merupakan nilai KHM dilanjutkan dengan pengujian untuk melihat nilai KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum), nilai KBM dapat dilihat pada tabel 3, tabung yang menunjukkan kejernihan terdapat pada konsentrasi 100%, artinya nilai KBM terdapat pada konsentrasi 100%.

Adanya aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kalangkala terhadap bakteri *Escherichia coli* sesuai dengan fungsi senyawa metabolit yang terkandung pada ekstrak tersebut, antara lain: flavonoid, alkaloid,

saponin dan tanin. Flavonoid berperan secara langsung sebagai antibiotik dengan membentuk kompleks dengan protein sel bakteri melalui ikatan hidrogen. Struktur dinding sel dan membran sitoplasma bakteri yang mengandung protein menjadi tidak stabil dan rusak. Hal ini menyebabkan sel bakteri kehilangan fungsi biologisnya sehingga fungsi permeabilitas sel bakteri terganggu dan berakibat pada kematian sel bakteri. Selain itu, perubahan membran sel bakteri umumnya diikuti oleh masuknya air yang tidak terkontrol ke dalam sel bakteri sehingga terjadi pembengkakan dan lisis (Hapsari, et al., 2015) (Harborne, 1987).

Alkaloid memiliki aktivitas antibakteri dengan tingginya senyawa aromatik kuartener yang berkontribusi untuk membentuk interkhelat dengan DNA bakteri dan menghambat enzim topoisomerase sel bakteri (Rachmawati, et al., 2016) (Ningsih, et al., 2013) sehingga menyebabkan sel mengalami mutasi atau kerusakan genetik (Amalia, et al., 2014) (Putri, et al., 2019). Selain itu menurut Darsana (2012), mekanisme kerja alkaloid sebagai antibakteri adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk sempurna dan sel bakteri itupun akhirnya akan mati.

Saponin sebagai antibakteri berdifusi melewati peptidoglikan dan dinding sel kemudian akan mengikat membran dan menyebabkan sitoplasma keluar dari sel, proses ini dapat mengakibatkan kematian sel (Putri, et al., 2019). Saponin dapat merusak membran sitoplasma dan mengakibatkan sifat permeabilitas membran sel berkurang transport zat ke dalam dan keluar sel menjadi tidak terkontrol. Zat-zat yang berada di dalam sel seperti ion organik enzim, asam amino, dan nutrisi dapat keluar dari dalam sel. Jika enzim keluar dari dalam sel bersama zat lain seperti air dan nutrisi maka proses metabolisme akan terhambat sehingga terjadi penurunan ATP yang diperlukan sel untuk pertumbuhan dan perkembangbiakannya, hal inilah yang akan mengakibatkan kematian sel bakteri (Retnowati, et al., 2011).

Tanin merupakan senyawa kimia golongan polifenol yang diduga dapat mengikat salah satu protein bakteri yaitu adhesin. Jika hal ini terjadi, maka dapat merusak reseptor pada permukaan sel bakteri. Tanin dibuktikan dapat membentuk kompleks senyawa yang irreversible dengan prolin (protein lengkap) karena ikatan ini mempunyai efek penghambatan sintesis protein dalam pembentukan dinding sel (Hapsari, et al., 2015). Selain itu menurut Ningsih (2013), tanin dapat bereaksi dengan membran sel untuk menginaktivasi enzim dan mendestruksi fungsi materi genik dengan membentuk kompleks protein melalui ikatan hidrogen dan ikatan hidrofobik. Tanin dalam konsentrasi rendah dapat berfungsi menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan pada konsentrasi tinggi dapat berfungsi sebagai antibakteri dengan cara mengkoagulasi protoplasma bakteri sehingga terbentuk ikatan yang stabil dengan protein bakteri.

Pada proses fraksinasi menggunakan pelarut n-Heksan, etil asetat dan air/aquadest. Adapun hasil fraksinasi dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Tabel IV. Hasil Fraksinasi Daun Kalangkala (*Litsea angulata*)

Berat Ekstrak	Pelarut	Volume Pelarut	Berat Fraksi	Rendemen Fraksi
10 gram	N-Heksan	50 ml	1,79 gram	17,9%
	Etil Asetat	50 ml	3,52 gram	35,2%
	Aquadest	50 ml	3,09 gram	30,9%

Fraksinasi dari ekstrak kental daun Kalangkala dilakukan dengan prinsip perbedaan tingkat kepolaran dan konstanta dielektrik antar pelarut. Pada proses fraksinasi terbentuk dua lapisan yang berbeda karena perbedaan kepolaran dari kedua pelarut.

Hasil identifikasi Senyawa Flavonoid dengan menggunakan serbuk Mg dan HCl Pekat. Adapun hasil uji senyawa flavonoid dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Tabel V. Hasil Analisis Kualitatif dengan Perekasi Warna

No	Sampel	Hasil	Keterangan
1	Ekstrak	Kuning	+
2	Fraksi N-Heksan	Kuning	+
3	Fraksi Etil Asetat	Kuning	+
4	Fraksi Aquadest	Merah Jingga	+

Identifikasi flavonoid dilakukan menggunakan HCl pekat dengan serbuk magnesium. Tujuan penambahan HCl pekat dan serbuk Mg pada uji warna senyawa flavonoid adalah untuk mereduksi inti α benzopyron yang terdapat didalam struktur flavonoid sehingga terbentuk garam flavilium. HCl pekat dan serbuk Mg bereaksi dengan membentuk gelembung gas H₂ (Illing, et al., 2017). Hasil positif flavonoid menunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga (Dewi, et al., 2021).

Hasil Profil Kromatografi Lapis Tipis Senyawa Flavonoid.

Fraksi n-Heksan

Hasil Profil Kromatografi Lapis Tipis Senyawa Flavonoid pada Fraksi N-Heksan dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel VI. Hasil Profil Kromatografi Lapis Tipis Fraksi N-Heksan

Eluen	Sinar Tampak	UV 254	UV 366
n-Heksan : Etil asetat (8:12)	0,08	0,08	0,08
	-	0,30	-
	0,46	0,46	-
	0,66	0,66	-
	0,83	0,83	-
	0,98	0,98	0,98
			-
n-Heksan	0,05	0,05	-
Diklorometana (8:12)	0,11	0,11	0,11
	0,50	0,50	0,50
	0,70	0,70	0,70
Diklorometana : Etil asetat (10:10)	0,16	0,16	0,16
	0,40	0,40	0,40
	0,60	0,60	0,60

Fraksi etil asetat

Hasil Profil Kromatografi Lapis Tipis Senyawa Flavonoid pada Fraksi Etil Asetat dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel VII. Hasil Profil Kromatografi Lapis Tipis Fraksi Etil Asetat

Eluen	Sinar Tampak	UV 254	UV 366
Etil Asetat : n- Heksan (3:7)	0,06	0,06	0,58
	0,16	0,16	0,74
	0,48	0,48	-
Etil Asetat : n- Heksan (9:1)	0,94	0,94	0,98
Etil Asetat : n- Heksan : Asam	0,4	0,4	0,9
	0,9	0,9	-
Asetat Glisial (6:3:1)	0,96	0,96	0,96

Fraksi aquadest

Hasil Profil Kromatografi Lapis Tipis Senyawa Flavonoid pada Fraksi Aquadest dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel VIII. Hasil Profil Kromatografi Lapis Tipis Fraksi Aquadest

Eluen	Sinar Tampak	UV 254	UV 366
Butanol : asam asetat : aquadest (4:1:5)	0,66	0,66	-
	0,86	0,86	0,86
Metanol : aquadest (7:3)	0,78	0,78	0,78
Etil asetat : metanol : aquadest (4:1:5)	-	-	-

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan metode kromatografi yang paling sering digunakan, peralatan dan bahan yang dibutuhkan untuk pemisahan dan analisis senyawa metabolit sekunder cukup sederhana yaitu sebuah bejana tertutup (chamber) yang berisi pelarut dan lempeng KLT (Wulandari, 2011). Pada proses KLT terdiri atas dua fase yaitu fase gerak (eluen) dan fase diam (lempeng KLT).

Penentuan eluen terbaik dilakukan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan variasi eluen pada metabolit sekunder flavonoid. Pengujian dilanjutkan dengan visualisasi menggunakan tiga macam sinar yaitu pada sinar tampak, sinar UV 254 nm, dan sinar UV 366 nm. Eluen terbaik akan dipilih jika memiliki banyak bercak atau noda yang terpisah dan terjadi

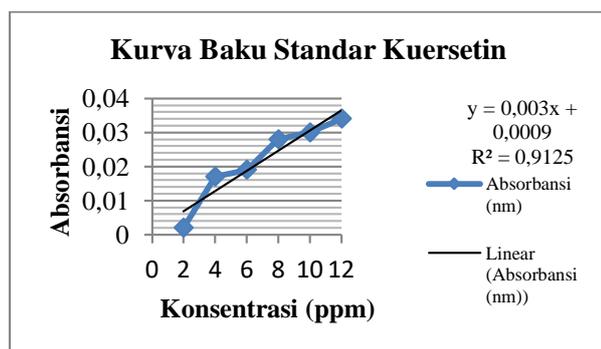
perubahan warna setelah dilakukan penguapan amonia. Hal ini terjadi dikarenakan perbedaan kepolaran dari fase gerak (eluen), apabila senyawa flavonoid semakin mendekati kepolaran eluen maka akan terbawa dan terpisah oleh fase gerak. Sehingga dapat dikatakan noda terbanyak terdapat pada eluen yang sifat nya mirip. Setelah dilakukan penguapan dengan amonia terbentuklah bercak noda berwarna kuning kecoklatan yang menandakan positif flavonoid. Hal tersebut terjadi karena adanya pembentukan quinoid pada β -ring yang mengandung ikatan terkonjugasi yang lebih panjang (Warsi, et al., 2017).

Hasil penetapan kadar flavonoid

- Hasil panjang gelombang maksimum kuersetin pada rentang 370-450 nm didapatkan sebesar 411 nm.
- Hasil *Operating time* didapatkan pada menit ke 18.
- Hasil pengukuran absorbansi larutan kurva baku kuersetin sebagai berikut:

Tabel IX. Hasil Pengukuran Absorbansi Larutan Kurva Baku Kuersetin

Konsentrasi (ppm)	2	4	6	8	10	12
Absorbansi	0,002	0,016	0,018	0,028	0,029	0,034
Rata-rata	0,002	0,017	0,019	0,028	0,030	0,034



Gambar 2. Grafik Kurva Baku Standar Kuersetin

d. Hasil pengukuran absorbansi sampel sebagai berikut:

Tabel X. Penentuan Absorbansi Sampel Daun Kalangkala

Sampel	Absorbansi	Rata-rata
Ekstrak	0,220	0,221
	0,221	
	0,222	
Fraksi n-Heksan	0,026	0,026
	0,027	
	0,020	
Fraksi Etil Asetat	0,021	0,021
	0,021	
	0,018	
Fraksi Aquadest	0,018	0,018
	0,018	
	0,018	

e. Kadar Flavonoid Total

Tabel XI. Penentuan Kadar Flavonoid Total Daun Kalangkala

Sampel	y (absorbansi)	b	x (mg/L)	KFT		
				Mg QE/g	%	
Ekstrak	0,221		71,367			
Fraksi N-Heksan	0,026	0,003	8,367	71,367	7,137	
Fraksi Etil Asetat	0,021		6,700			0,837
Fraksi Aquadest	0,018		5,700			0,67

Analisis kuantitatif kadar flavonoid daun Kalangkala (*Litsea angulata*) dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis. Spektrofotometri UV-Vis digunakan untuk analisis senyawa dalam bentuk larutan berwarna ataupun senyawa dalam bentuk larutan yang dapat direaksikan hingga terbentuk warna. Kuersetin digunakan sebagai baku pembanding karena merupakan salah satu jenis flavonoid golongan flavonol yang memiliki gugus keto pada atom C-4 dan juga gugus hidroksil pada atom C-3 dan C-5 yang bertetangga (Vonna, et al., 2015). Prinsip penetapan kadar flavonoid menggunakan metode aluminium klorida ($AlCl_3$) adalah terjadinya pembentukan senyawa kompleks antara

aluminium klorida dengan gugus keto pada atom C-4 dan gugus hidroksil pada atom C-3 atau C-5 yang bertetangga dari golongan flavon dan flavonon sehingga menghasilkan warna kuning (Suharyanto, et al., 2020). Penetapan gelombang maksimum adalah panjang gelombang yang dihasilkan suatu senyawa pada serapan maksimum, bertujuan untuk mengetahui panjang gelombang saat mencapai serapan maksimum, selain itu juga memiliki daya serap yang relatif konstan. Penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin dilakukan dengan cara membaca serapan larutan baku standar kuersetin 100 ppm pada rentang panjang gelombang 370-450 nm (Asmorowati, et al., 2019). Hasil yang diperoleh yaitu 411 nm.

Penentuan *operating time* bertujuan untuk mengetahui waktu pengukuran yang stabil yaitu ketika sampel bereaksi sempurna dan membentuk senyawa kompleks. *Operating time* dilakukan dengan menggunakan larutan baku standar kuersetin 100 ppm dengan interval waktu 2 menit selama 60 menit (Asmorowati, et al., 2019). Hasil penentuan *operating time* didapatkan hasil pada menit ke-18 hingga menit ke-22. Pada rentang waktu tersebut absorbansi senyawa terukur relatif lebih stabil. Kestabilan absorbansi ini menandakan reaksi pembentukan sudah optimum. Dari pengukuran *operating time* didapatkan absorbansi pada menit ke-18. Penentuan kurva standar kuersetin dilakukan dengan cara mengukur absorbansi dari larutan baku standar kuersetin dengan berbagai konsentrasi yaitu 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm yang kemudian di diamkan selama 18 menit dan diukur dengan panjang gelombang 411 nm. Penentuan kurva standar kuersetin dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh persamaan regresi linear yang akan digunakan sebagai penentuan kadar dari sampel. Hasil pengukuran absorbansi menunjukkan bahwa konsentrasi berbanding lurus dengan nilai absorbansi yang didapat yaitu semakin tinggi konsentrasi maka semakin tinggi pula nilai absorbansi yang didapatkan (Asmorowati, et al., 2019). Sedangkan pada persamaan regresi linear kurva standar kuersetin

yang diperoleh adalah $y=0,003x + 0,0009$ dengan nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,9125. Nilai (r) yang diperoleh mendekati angka 1 menunjukkan bahwa persamaan regresi tersebut adalah linier, sehingga dapat dikatakan bahwa absorbansi dan konsentrasi memiliki korelasi yang sangat kuat (Asmorowati, et al., 2019). Penentuan kadar flavonoid total dalam daun Kalangkala (*Litsea angulata*) dilakukan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dengan larutan baku kuersetin. Agar mendapatkan data yang lebih akurat pengujian dilakukan sebanyak tiga kali replikasi. Pada penetapan kadar flavonoid larutan sampel ditambahkan $AlCl_3$ maka terjadi pembentukan kompleks antara flavonoid dengan $AlCl_3$ sehingga menyebabkan pergeseran panjang gelombang kearah sinar visibel yang ditandai dengan adanya warna kuning pada larutan. Pembentukan senyawa kompleks terjadi ketika $AlCl_3$ bereaksi dengan gugus keto pada C-4 dan gugus hidroksil pada C-3 atau C-5 pada senyawa flavonoid (Suharyanto & Prima, 2020). Penambahan asam asetat berfungsi untuk mempertahankan panjang gelombang pada daerah visibel (tampak) (Asmorowati, et al., 2019)

Berdasarkan data pada penelitian sampel diperoleh kadar flavonoid total daun Kalangkala (*Litsea angulata*) pada ekstrak sebesar 71,367 mg $QE^{(Quersetin\ Equivalen)}/g$, pada fraksi n-Heksan sebesar 8,367 mg $QE^{(Quersetin\ Equivalen)}/g$, pada fraksi etil asetat sebesar 6,700 mg $QE^{(Quersetin\ Equivalen)}/g$ dan pada fraksi aquadest sebesar 5,700 mg $QE^{(Quersetin\ Equivalen)}/g$.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, disimpulkan bahwa aktivitas antibakteri ekstrak daun kalangkala terhadap bakteri *Escherichia coli* memiliki nilai KHM pada konsentrasi 50% dan nilai KBM pada konsentrasi 100% sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun kalangkala masuk dalam golongan *Bactericid*. Kadar flavonoid total daun Kalangkala (*Litsea angulata*) pada ekstrak sebesar 71,367 mg $QE^{(Quersetin\ Equivalen)}/g$, dan pada

fraksi kadar flavonoid terbesar terdapat pada fraksi n-Heksan yaitu sebesar 8,367 mg QE^(Quercetin Equivalen)/g.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang baik secara langsung maupun tidak langsung telah terlibat dalam penelitian ini. Serta terimakasih dan apresiasi sebesar-besarnya kepada Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset dan Teknologi yang mendanai penelitian ini melalui skema hibah “Penelitian Dosen Pemula” di tahun 2022.

REFERENSI

- Amalia Sri, Wahdaningsih Sri dan Untari Eka Kartika. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi n-Heksan Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus* Britton & Rose) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Trad Med: Vol. II.* - hal. ISSN 1410-5918.
- Asmorowati H dan Lindawati N. 2019. Penetapan Kadar Flavonoid Total Alpukat (*Persea americana* Mill.) dengan Metode Spektrofotometri. *Jurnal Ilmiah Farmasi: Vol. II.* - hal. 51–63.
- Dewi I, Saptawati T dan Rachma F. 2021. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit dan Biji Terong Belanda (*Solanum betaceum* Cav.). *Prosiding Seminar Nasional UNIMUS: hal.* 1210–1218.
- Hapsari dan Maria Endah. 2015. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Herba Meniran (Phyllanthus niruri) terhadap Pertumbuhan Bakteri Bacillus cereus dan Escherichia coli.* Yogyakarta : Universitas Sanata Dharma
- Harborne J. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan.* Bandung : ITB Bandung
- Illing I, Safitri W dan Erfiana. 2017. Uji Fitokimia Ekstrak Buah Dengen. *Jurnal Dinamika: hal.* 66-84.
- Jannah R, Darsono P, V dan Rohama. 2018. SCREENING OF PHYTOCHEMICALS AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF DADANGKAK ROOTS EXTRACTS (*Hydrolea spinosa* L.) AGAINST *Streptococcus mutans.* *International Conference on Health and Science: Vol. I.*
- Kurniawati, D. 2021. Formulasi dan Uji Aktivitas Antiseptik dari Bahan Alam Kulit Jeruk Nipis, Daun Sirih dan Tanaman Bundung terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Candida albican.* *FARMASIS: Jurnal Sains Farmasi, 2(1),* 25-31.
- Kuspradini H. 2018. Phytochemical, antioxidant and antimicrobial properties of *litsea angulata* extracts. *National Library of Medicine: hal.* I-11.
- Kuspradini H, Putri A, S dan Diana R. 2018. *Potensi Tumbuhan Genus Litsea.* Mulawarman University Press
- Melviani, M., Rohama, R., & Noval, N. 2022. Penggunaan Tanaman Sebagai Obat pada Masyarakatan Suku Banjar, Dayak, dan Bugis di Kalimantan Selatan. *Jurnal Surya Medika (JSM): 8(2),* 171-177.
- Mu'awwanah A dan Ulfah M. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi n-Heksan Ekstrak Etanol Daun Karika (*Carica pubescens*) dan Identifikasi Senyawa Alkaloid dan Flavonoidnya. *Journal of Chemical Information and Modeling: Vol. 9.* - hal. 1689-1699.
- Ningsih Ayu Putri, Nurmiati dan Agustien. 2013. Anthoni Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kental Tanaman Pisang Kepok Kuning (*Musa paradisiaca* Linn.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli.* Universitas Andalas Padang : Jurnal Biologi
- Noval, N., Kurniawati, D., Rahmadani, R., Budi, S., & Nastiti, K. 2021. Activity and Stability Test of Antiseptic Preparations from The Formulation Combination of Betel Leaf (*Piper betle* L), Lime Peel (*Citrus aurantifolia*) and Bundung Plant (*Actinoscirpus grossus*). *In International Conference on Health and Science: (Vol. I, No. 1, pp.* 703-721).
- Noval, N., Melviani, M., Novia, N., & Syahrina, D. 2020. Formulasi Dan Evaluasi Sediaan Obat Kumur (Mouthwash) Dari Ekstrak Etanol Tanaman Bundung (*Actinoscirpus Grossus*) Sebagai Antiseptik Mulut. *Jurnal Surya Medika (JSM): 6(1),* 112-120.
- Noval, N., Yuwindry, I., & Syahrina, D. 2019. Phytochemical Screening and Antimicrobial

Activity of Bundung Plants Extract by Dilution Method. *Jurnal Surya Medika (JSM)*: 5(1), 143-154.

Putri Nadya Haqqe Santosa. 2019. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Tangkai dan Daun Begonia multangula Blume. terhadap Porphyromonas gingivalis. *Jurnal Biologi*.

Rachmawati dan Umi Dhinary. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol, Etil Asetat dan Petroleum Eter Rambut Jagung Manis (Zea mays sacarata Strut) terhadap Bakteri Staphylococcus aureus dan Escherichia coli. Malang : Universitas Islam Negeri

Retnowati Yuliana, Bialangi Nurhayati dan Posangi Nona Wingti. 2011. Pertumbuhan Bakteri Staphylococcus aureus pada Media yang Diekspos dengan Infus Daun Sambiloto (Andrographis paniculata). *Jurnal Saintek*: 6 : Vol. II.

Rohama dan Melviani. 2021. Formulasi dan Evaluasi Sediaan Obat Kumur (Mouthwash) dari Ekstrak Etanol Daun Kalangkala (Litsea angulata) sebagai Antiseptik Mulut. *Jurnal Surya Medika (JSM)*: Vol. I. - hal. 248-256.

Rohama dan Zainuddin Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder pada Ekstrak Daun Gayam (Inocarpus Fagifer Fosb) dengan Menggunakan KLT. *Jurnal Surya Medika (JSM)*: Vol. II. - hal. 125-129.

Sariadi K, Sembiring M dan Litbangkes B Kajian Pustaka: Uji Kepekaan Antibiotik pada Corynebacterium diphtheriae. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*: hal. 121-133.

Vonna A dan Nurismi R. 2015. Wound Healing Activity of Unguentum Dosage Form of Ethanol Extracts of Areca catechu L. Nut in Mus musculus albinus. *Jurnal Natural Unsyiah*: Vol. 2. - hal. 115085.

Warsi dan Sholichah A. 2017. Phytochemical screening and antioxidant activity of ethanolic extract and ethyl acetate fraction from basil leaf (Ocimum basilicum L.) by DPPH radical scavenging method. *IOP Conference Series: Materials Science and Engine*: 59 : Vol.

Wulandari L. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*: In Taman Kampus Presindo.