

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA KIMIA SERTA UJI AKTIVITAS
ANTICANDIDAISIS SERBUK DAUN SIRIH DUDUK
(*Piper sarmentosum* Roxb. Ex Hunter)**

Suwandri, Hartiwi Diastuti

Jurusan Kimia, Program Sarjana MIPA Unsoed Purwokerto

ABSTRACT

Sirih duduk or *Piper sarmentosum* Roxb. ex Hunter have been long used the people in Indonesia for traditional medicine to cure various diseases. One of them was used to treat fungoid diseases. This research was aimed to examine the anticandidaisis activity from extract of *P. sarmentosum* leaves and to isolate and identify the anticandidaisis compounds from *P. sarmentosum* leaves. The isolation bioactive compounds of *P. sarmentosum* leaves was performed by extraction the powder of *P. sarmentosum* leaves using methanol and the bioactivity tests were performed against *Candida albicans*. The methanol extracts was then fractionated using organic solvents such as n-hexane, benzene, chloroform, and ethyl acetate. Identification of the bioactive compounds was carried out using ultraviolet-visible spectrometry, fourier transform infra red spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry. The result showed that the chloroform fraction of methanol extract of *P. sarmentosum* leaves have activity against *C. albicans*. The fractionation was performed by coloumn chromatography using *n*-hexane-ethyl acetate(1:1) eluent. A bioactive compound of sinamic acid derivative was 4-ethoxy-2-hidroxy-3,5-dimethoxy sinamic acid could be purely isolated

Keywords: Piper sarmentosum, bioactivity test, C. albicans.

PENDAHULUAN

Sejak munculnya peradaban di muka bumi ini, tumbuhan telah digunakan manusia untuk berbagai keperluan. Selain sebagai bahan pangan, sandang, papan dan bahan bakar, tumbuhan juga menghasilkan bahan-bahan kimia yang telah digunakan sebagai bahan obat-obatan, insektisida, wangi-wangian, zat warna, dan kosmetik.

Indonesia merupakan negara tropis yang kaya akan keanekaragaman jenis tumbuhan. Di wilayah hutan tropis Indonesia terdapat sekitar 30.000 spesies tumbuhan. Berdasarkan inventarisasi dan identifikasi yang dilakukan oleh Heyne, (1987) 1000 spesies di antaranya dinyatakan sebagai tumbuhan yang dapat digunakan sebagai obat. Tetapi hanya sekitar 350 spesies tumbuhan yang benar-benar telah digunakan sebagai bahan

baku obat oleh masyarakat dan industri jamu dan obat Indonesia (Muhlisah, 2000). Hal ini mengisyaratkan masih terbukanya peluang usaha penggalian dan pemanfaatan tumbuhan obat untuk kesehatan dan kesejahteraan masyarakat.

Salah satu tumbuhan obat Indonesia adalah sirih duduk atau *Piper sarmentosum* Roxb. ex Hunter yang sekarang belum banyak diteliti. Tumbuhan ini termasuk famili *Piperaceae*. Di beberapa bagian negara di Asia, tumbuhan ini telah dikenal sebagai tumbuhan berkhasiat obat. Di antaranya air rebusan tumbuhan ini digunakan untuk mengobati sakit gigi, asma, batuk, nyeri tulang, dan infeksi jamur serta untuk membersihkan vagina (Kasahara, 1995). Pada mulanya alasan penggunaan tumbuhan ini hanya

berdasarkan pengalaman secara turun-temurun. Setelah dilakukan penelitian, dilaporkan bahwa ekstrak tumbuhan *Piper sarmentosum* memiliki aktivitas antimikrobia (Masuda, 1991), efek hipoglycemic (Peungvicha, 1998), menghilangkan nyeri otot (Riditid, 1998), dan antimalarial (Rahman, 1999).

Kandungan kimia metabolit sekunder sirih duduk sampai saat ini belum banyak diketahui. Pada tahun 1991, Masuda melaporkan bahwa senyawa antimikrobia yang ditemukan dalam daun sirih duduk adalah dari golongan fenil propanoid. Senyawa tersebut berhasil diisolasi dari ekstrak benzena dan diuji bioaktivitasnya terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*. Dengan demikian tidak tertutup kemungkinan ditemukannya senyawa lain yang juga memiliki aktivitas antimikrobia terutama terhadap jamur *Candida albicans* pada daun atau bagian lain dari tumbuhan ini.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas *anticandidaisis* serbuk daun sirih duduk secara *in vitro* serta mengisolasi dan mengidentifikasi kandungan kimia dari daun sirih duduk melalui ekstraksi dengan pelarut metanol

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan yang digunakan untuk penelitian adalah daun sirih duduk (*Piper sarmentosum* Roxb. Ex hunter) yang diambil di desa Purwosari Kecamatan Baturraden Purwokerto. Sedangkan bahan kimia yang digunakan adalah : pelarut organik seperti metanol, etil asetat, kloroform, benzena dan *n*-heksana; silika gel 60 GF₂₅₄, media pertumbuhan jamur, yaitu *bacto-agar*, *bacto-trytone*, *bacto-yeast extract*; jamur *C. albicans*, akuades, NaCl, kertas saring, dan *paper dish*.

Peralatan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : seperangkat alat

soxkletasi, *rotaryevaporator*, *hot plate*, neraca analitis, autoklaf, inkubator, pipet mikro, kawat ose, peralatan gelas serta spektrofotometer UV-Vis, IR, dan GC-MS.

Prosedur Percobaan

1. Isolasi dan identifikasi senyawa kimia serbuk daun sirih duduk

Daun sirih duduk segar yang telah dibersihkan dari kotoran yang menempel, dikeringkan di tempat terbuka kemudian digiling halus. Serbuk kering yang diperoleh (125,6 g) disokletasi dengan metanol. Pelarut diuapkan dengan *rotary evaporator*.

Ekstrak metanol selanjutnya diekstraksi berturut-turut dengan *n*-heksana, benzena, kloroform dan etil asetat. Masing-masing ekstrak yang terlarut dalam *n*-heksana, benzena, kloroform, etil asetat dan metanol diuapkan pelarutnya. Ekstrak yang telah kering selanjutnya diuji aktivitasnya terhadap *C. albicans*. Ekstrak dari pelarut tertentu yang memiliki aktivitas terhadap *C. albicans* digunakan untuk tahap isolasi dan identifikasi senyawa kimianya.

Ekstrak dari pelarut yang memiliki aktivitas terhadap *C. albicans* selanjutnya dicampur dengan silika gel, digerus hingga terbentuk butiran halus. Ekstrak yang telah berbentuk butiran halus ini dimasukkan ke dalam kolom kromatografi yang telah diisi dengan silika 60 GF₂₅₄ dan eluen *n*-heksana. Selanjutnya dilakukan elusi sistem gradien kepolaran, dengan eluen *n*-heksana, etil asetat, kloroform dan metanol atau dengan campuran keempat eluen tersebut. Senyawa murni dari hasil kromatografi, kemudian diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer uv-vis, FTIR, dan GC-MS

2. Uji bioaktivitas *anticandidaisis*

Sebelum dilakukan pengujian bioaktivitas *anticandidaisis*, maka perlu dibuat larutan media pertumbuhan mikroba. Media yang digunakan adalah

media LB (Luria-Bertani) cair dan media LB (Luria-Bertani) padat. Untuk uji aktivitas ekstrak yang digunakan adalah 10 µl dengan konsentrasi 1 mg/mL.

Media LB cair dibuat dengan melarutkan 1,0 gram *bacto-tryptone*, 0,5 gram *bacto-yeast extract* dan 1,0 gram NaCl ke dalam 100 mililiter akuades. Larutan kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 250°F dan tekanan 15 psi selama 30 menit. Untuk pembuatan media LB padat hampir sama dengan pembuatan LB cair, hanya saja perlu penambahan *bacto-agar* sebanyak 1,5% (b/v).

Pengujian bioaktivitas dilakukan dengan metoda difusi agar menggunakan *paper dish*. Metoda ini paling banyak digunakan dalam pengujian aktivitas antibiotik. Pada pengujian ini semua bahan dan alat yang akan digunakan harus dalam keadaan steril, agar hasil yang diperoleh tidak terkontaminasi oleh mikroba yang lain.

Prosedur pengujian aktivitas adalah sebagai berikut : jamur *C. albicans* ditumbuhkan dalam media LB cair 48 jam pada suhu 37°C. Kondisi tersebut adalah kondisi optimum untuk pertumbuhan jamur. Sebanyak 200 µL kultur mikroba cair disebarkan secara merata di atas media LB padat. Selanjutnya *paper dish* berukuran 6 mm diletakkan di atas media padat tersebut dan pada *paper dish* diteteskan 10 µL ekstrak tumbuhan. Masing-masing kultur diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Setiap ekstrak diulang sebanyak 2 kali. Kemudian diukur daerah hambat (daerah bening di sekitar *paper dish*) dari masing-masing mikroba untuk setiap fraksi ekstrak tumbuhan. Untuk kontrol negatif digunakan pelarut dari fraksi ekstrak tumbuhan. Adanya daerah bening di sekitar *paper dish* menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki aktivitas *anticandidaisis*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi serbuk daun sirih duduk dengan cara sokletasi menggunakan pelarut metanol menghasilkan ekstrak kering sebanyak 6,4 gram dari 125,6 gram. Dengan demikian prosentase hasil ekstraksi adalah sebesar 5,1 % b/b. Ekstrak metanol diuji aktivitas anticandidaisis terhadap *C. albicans* dan menunjukkan diameter hambat sebesar 20,0 mm. Sebagai kontrol positif digunakan miconazol yang menunjukkan diameter hambat 30 mm.

Ekstrak metanol selanjutnya difraksinasi dengan menggunakan pelarut berturut-turut n-heksana, benzena, kloroform, dan etilasetat. Ekstrak yang dihasilkan dari fraksinasi tersebut masing-masing sebesar 84,5; 65,6; 104,6 dan 127,2 mg.

Hasil uji anticandidaisis ekstrak metanol yang larut dalam n-heksana, benzena, kloroform dan etilasetat terhadap jamur *C. albicans* menunjukkan ekstrak metanol yang larut dalam kloroform memiliki aktivitas paling besar dibandingkan ekstrak lainnya namun masih lebih kecil dibandingkan kontrol positif. Hasil uji anticandidaisis dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji anticandidaisis ekstrak sirih duduk terhadap *C. albicans*

No	Ekstrak	Diameter hambat (mm)		
		I	II	Rata-rata
1.	n-Heksana	11	8	9,5
2.	Benzena	13	8	10,5
3.	Kloroform	20	13	16,5
4.	Etilasetat	10	12	11,0
5.	Miconazol	30	30	30,0

Selanjutnya ekstrak kloroform digunakan untuk tahap berikutnya, yaitu isolasi dan identifikasi senyawa kimia. Ekstrak kloroform difraksinasi menggunakan kolom kromatografi dengan elusi sistem gradien kepolaran. Pelarut yang digunakan antara lain n-

heksana, kloroform, etil asetat, dan metanol. Hasil kromatografi kolom ini diperoleh 5 fraksi, yaitu : A (5 mg), B (22 mg), C (35 mg), D (10 mg), dan E (12 mg).

Fraksi C difraksinasi menggunakan kromatografi kolom dengan eluen n-heksana-etilasetat (1:1). Kromatografi kolom fraksi C yang dilanjutkan dengan KLT menghasilkan empat fraksi masing-masing dengan berat dan warna sebagai berikut : fraksi I (6,4 mg, kuning), II (8,3 mg, kuning), III (7,5 mg, hijau) dan IV (10,2 mg, coklat). Kemudian fraksi II diidentifikasi dengan spektrometri UV-Vis, FTIR dan GC-MS.

Hasil analisis dengan KLT dengan tiga macam eluen yang berbeda dan GCMS menunjukkan bahwa fraksi II merupakan senyawa tunggal. Nilai Rf fraksi II untuk setiap eluen adalah sebagai berikut : eluen kloroform : metanol (1:1) nilai Rf = 0,3, eluen kloroform : metanol (2:3) nilai Rf = 0,4 dan eluen kloroform : metanol (1:7) nilai Rf = 0,7. Sedangkan hasil GCMS kromatogram menunjukkan satu puncak dengan waktu retensi 14,03 menit dan massa molekul 268.

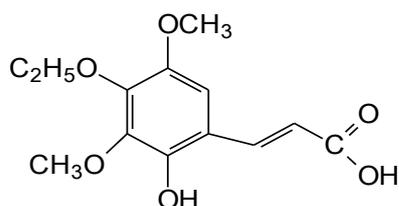
Pengukuran fraksi II dengan spektrometer *Uv-Vis* dengan menggunakan pelarut metanol menghasilkan absorbansi maksimum pada panjang gelombang (λ_{maks}) 226, 274, dan 326nm dan penambahan pereaksi geser NaOH menyebabkan pergeseran panjang gelombang pada puncak ketiga yaitu dari 326 nm menjadi 387 nm. Pengukuran dengan spektrometer FTIR (*Fourier Transform Infra Red*), menunjukkan adanya pita-pita serapan utama pada bilangan gelombang (ν_{maks}) 3403,8 ; 2995,7; 2854,5; 1700,1; 1600,6; 1512,2 ;1450,1; 1445,8 ; 1375,8 dan 1320,6 cm^{-1} . Sedangkan pada spektrum massa menunjukkan puncak ion molekul (M^+) pada m/e 268. Puncak-puncak utama ion fragmen dari fraksi II ditunjukkan dengan nilai m/e 268, 251

(puncak dasar), 250, 253, 239, 240, 237, 223, dan 197.

Berdasarkan spektrum ultraviolet, fraksi II mengabsorpsi pada panjang gelombang 226 dan 274 nm. Hal ini berarti pada fraksi II mengandung kromofor ikatan rangkap dua dari cincin benzen sedangkan absorpsi pada panjang gelombang di atas 300 nm, yaitu 326 nm menunjukkan bahwa cincin benzen mengalami perpanjangan konjugasi. Dari spektrum ultra violet tersebut dapat diperoleh informasi bahwa, diperkirakan struktur kimia fraksi II adalah senyawa aromatik dengan cincin benzen yang mengalami perpanjangan konjugasi. Penambahan pereaksi geser larutan NaOH terhadap fraksi II menunjukkan pergeseran panjang gelombang pada 326 nm menjadi 387 nm. Hal ini berarti pada fraksi II terdapat gugus hidroksil yang terikat langsung pada cincin benzen.

Dari spektrum infra merah, pita serapan pada 3403,8 cm^{-1} menunjukkan vibrasi ulur dari gugus hidroksil (-OH). Serapan pada 2995,7, dan 2854,5 cm^{-1} memperlihatkan vibrasi ulur dari -C-H aromatik, yang didukung dengan adanya serapan pada 1512,2, cm^{-1} . Serapan pada 1700,1 cm^{-1} merupakan serapan gugus karbonil (C=O) untuk asam karboksilat. Sedangkan serapan pada 1600,6 cm^{-1} memperlihatkan adanya ikatan rangkap dua dari sistem alifatik untuk ikatan rangkap terkonjugasi dari sistem aromatik. Serapan pada 1450,1 diduga merupakan serapan gugus metoksi (-OCH₃). Serapan pada 1375,8 cm^{-1} menunjukkan vibrasi ulur dari -C-H alifatik. Sedangkan serapan di bawah bilangan gelombang 900 cm^{-1} diduga merupakan serapan dari sistem aromatik yang tersubstitusi. Dari pita-pita serapan yang ditunjukkan oleh spektrum infra merah maka dapat diperoleh informasi bahwa, fraksi II diperkirakan merupakan senyawa aromatik (benzena) yang tersubstitusi oleh gugus hidroksil, gugus metoksi dan gugus alifatik.

Adanya puncak ion molekul pada m/e 268 dari spektrum massa, memberikan informasi bahwa berat molekul fraksi II adalah 268, yang berarti pula bahwa fraksi II tidak mengandung atom nitrogen. Berdasarkan pola fragmentasi spektrum massa, yang didukung pula oleh spektrum ultra violet dan infra merah, maka diduga fraksi II mempunyai struktur seperti pada Gambar 1 di bawah ini.



Gambar 1. Struktur molekul fraksi II

Pola-pola fragmentasi fraksi II meliputi fragmentasi pada m/e 253 yang menunjukkan lepasnya gugus metilen (CH_3) dari ion molekul (M^+) pada m/e 268. Sedangkan fragmentasi lainnya adalah lepasnya gugus OH membentuk fragmen dengan m/e 251 dan lepasnya molekul air membentuk fragmen dengan m/e 250. Senyawa diduga tersubstitusi pula oleh gugus etoksi. Hal ini ditunjukkan dengan adanya fragmen pada m/e 223 dan 239, yang menunjukkan lepasnya gugus etoksi ($-\text{OC}_2\text{H}_5$) dan etilen (C_2H_5). Sedangkan adanya fragmen pada m/e 237 ditunjukkan dengan lepasnya gugus metoksi ($-\text{OCH}_3$). Fragmen pada m/e 223 diduga pula akibat lepasnya gugus karboksilat (COOH) dimana molekul kehilangan massa sebesar 45. Sedangkan adanya fragmen pada m/e 197 menunjukkan molekul kehilangan massa sebesar 71 yang berasal dari gugus propenoat ($\text{CH}=\text{CHCOOH}$).

Berdasarkan data spektrum Uv-Vis, infra merah dan spektroskopi massa maka fraksi II diduga merupakan senyawa turunan asam sinamat, yaitu senyawa asam 4-etoksi 2-hidroksi,-3,5-

dimetoksi sinamat dengan struktur seperti pada Gambar 1 di atas.

KESIMPULAN

Hasil isolasi dan uji aktivitas terhadap *C. albicans* ekstrak daun sirih duduk diperoleh senyawa turunan asam sinamat, yaitu senyawa asam 4-etoksi 2-hidroksi,-3,5-dimetoksi sinamat.

DAFTAR PUSTAKA

- Heyne, K., 1987, *Tumbuhan Berguna Indonesia*, Jilid II, Badan Litbang Kehutanan. Jakarta.
- Kasahara, 1995, *Medical Herb Index in Indonesia*, Edisi-2, Esai Indonesia, Jakarta.
- Masuda, T., 1991, Antimicrobial Phenylpropanoid from *Piper sarmentosum*, *Phytochemistry*, Vol. 30, No. 10, 3227-3228.
- Muhlisah, F., 2000, *Tanaman Obat Keluarga*, Penebar Swadaya, Jakarta.
- Peungvicha. P., 1998, Hypoglycemic Effect of The Water Extract of *Piper sarmentosum* in Rats, *J. of Ethnopharmacology*, Vol. 60, 27-32.
- Rahman, A.N., 1999, Antimalarial Activity of Extract of Malaysia Medical Plant, *J. of Ethnopharmacology*, Vol. 64, 249-259.
- Riditid, W., 1998, Neuromuscular Blocking Activity of Metanol Ekstrakt of *Piper sarmentosum* Leaves in Rat Phrenic Nerve-Hemidiaphragm Prepadation, *J. of Ethnopharmacology*, Vol. 61,135-14