

ISOLASI SENYAWA FLAVONOID BUNGA BELIMBING WULUH (*Averrhoa Bilimbi L.*) SERTA UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus Aureus* DAN *Klebsiella Pneumoniae*

Oleh :

Ayus Diningsih¹⁾, Adi Antoni²⁾

^{1,2}Fakultas Kesehatan, Universitas Aufo Royhan Di Kota Padangsidempuan

¹email: ayusdiningsih@gmail.com

²email: adiantoni100@gmail.com

Abstrak

Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki keanekaragaman tanaman obat di dunia, Salah satu tanaman yang sering digunakan sebagai obat tradisional adalah bunga belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) yang sering dimanfaatkan sebagai obat tradisional oleh masyarakat Kota Padangsidempuan, Provinsi Sumatera Utara untuk mengobati batuk dan sariawan pada anak-anak. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental berbasis laboratorium dengan metode isolasi senyawa flavonoid dan metode yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri adalah difusi sumuran. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi senyawa Flavonoid dari bunga belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) dan untuk mengetahui aktivitas antibakteri senyawa flavonoid bunga belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Klebsiella pneumoniae*. Dari hasil analisis data yang diperoleh bahwa dari hasil isolasi ekstrak metanol bunga belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) diperoleh senyawa flavonoid golongan flavonol. Uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak metanol bunga belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) memberikan daerah hambat yang efektif terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 50 mg/ml dengan diameter 10,81 mm dan bakteri *Klebsiella Pneumoniae* pada konsentrasi 50 mg/ml dengan diameter 10,77.

Kata Kunci: Bunga belimbing wuluh, Flavonoid, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*

1. PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki keanekaragaman obat di dunia. Wilayah hutan tropika Indonesia memiliki keanekaragaman hayati tertinggi ke-2 di dunia setelah Brazil. Sebanyak 40.000 jenis flora yang ada di dunia, terdapat 30.000 jenis dapat dijumpai di Indonesia dan 940 jenis diantaranya diketahui berkhasiat sebagai obat dan telah dipergunakan dalam pengobatan tradisional secara turun-temurun oleh berbagai etnis di Indonesia (Mashud, 2010).

Salah satu tanaman yang sering digunakan sebagai obat tradisional adalah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*). Hampir semua bagian dari tanaman belimbing wuluh dapat digunakan untuk pengobatan meliputi daun, bunga dan buah. Bunga belimbing wuluh sering dimanfaatkan sebagai obat tradisional oleh masyarakat Kota Padangsidempuan, Provinsi Sumatera Utara untuk mengobati batuk dan sariawan pada anak-anak (Mario, 2011).

Penelitian Artanti, et al (2006) menyatakan bahwa sejumlah tanaman obat yang mengandung flavonoid telah dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan, antibakteri, antivirus, antiradang, antialergi dan antikanker³. Menurut penelitian Sandoram ekstrak daun dan buah belimbing wuluh dapat menghambat pertumbuhan beberapa bakteri patogen (Sandoram, 2019).

Antibakteri adalah senyawa yang mengganggu pertumbuhan dan metabolisme bakteri, sehingga senyawa tersebut dapat menghambat pertumbuhan atau bahkan membunuh bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif yang berbentuk bulat dan merupakan patogen utama pada manusia. Kulit dan membran mukosa merupakan *barrier* yang sangat baik terhadap invasi lokal *Staphylococcus aureus*. Dapat menyebabkan infeksi lokal pada kulit, hidung, uretra, saluran pernafasan dan saluran pencernaan (Chen, 2019)

Klebsiella pneumoniae adalah bakteri gram negatif berbentuk batang yang dapat menyebabkan infeksi pada saluran pernafasan seperti pneumonia. *Klebsiella pneumoniae* merupakan penghuni normal traktus digestivus. Selain menginfeksi pernafasan juga dapat menyebabkan infeksi saluran kemih dan infeksi nosokomial (Susilo, 2004).

Menurut penelitian Maryam (2015) menyatakan bahwa ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) pada konsentrasi terendah 0,4% telah mampu memberikan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus*.

Tujuan dari penelitian ini adalah Untuk mengisolasi senyawa Flavonoid dari bunga

belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) dan untuk mengetahui aktivitas antibakteri senyawa flavonoid bunga belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Klebsiella pneumoniae*.

2. METODE PENELITIAN

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental, dengan metode isolasi flavonoid dan metode yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri adalah difusi sumuran. Subjek dalam penelitian ini berupa ekstrak metanol bunga belimbing wuluh dalam bentuk cair dan objek dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* dan bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektroskopi FT-IR, Spektroskopi ¹H-NMR, rotarievaporator, kolom kromatografi, Neraca analitis dan peralatan gelas. Bahan yang digunakan adalah bunga belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*), metanol, etil asetat, N-heksana, larutan FeCl₃ 5%, NaOH 10%, serbuk Mg, HCl_(p), H₂SO_{4(p)}, kloroform, bakteri *Staphylococcus aureus* dan bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

Ekstraksi Bunga Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*)

Serbuk bunga belimbing wuluh ditimbang sebanyak 100 g, kemudian dimaserasi dengan metanol sebanyak ± 3 L sampai semua sampel terendam dan dibiarkan selama 24 jam. Maserasi ditampung dan dipisahkan dengan menggunakan alat rotarievaporator sehingga diperoleh ekstrak pekat metanol dan diuji dengan FeCl₃ 5%. Kemudian diuapkan dengan penangas air hingga semua pelarut metanol menguap. Lalu dilakukan pemisahan tanin dengan cara melarutkan ekstrak pekat metanol dengan aquadest lalu dipartisi berulang-ulang dengan etil asetat, hingga negatif flavonoida diuji dengan FeCl₃ 5%. Filtrat kemudian dirotarievaporator lalu diuapkan dengan penangas air hingga semua pelarut etil asetat menguap. Lalu ekstrak pekat etil asetat diuji dengan FeCl₃ 5%. Ekstrak pekat etil asetat dilarutkan dengan metanol dan diekstraksi partisi berulang-ulang dengan n-heksan sampai lapisan n-heksan bening. Lapisan metanol dipisahkan dari lapisan n-heksan, lalu diuji dengan FeCl₃ 5% dan dipisahkan kembali dengan rotarievaporator dan diuapkan kembali sehingga diperoleh ekstrak pekat lapisan metanol.

Isolasi Senyawa Flavonoida dengan Kromatografi Kolom

Isolasi senyawa flavonoida dilakukan dengan kolom kromatografi terhadap ekstrak pekat metanol. Fasa diam yang digunakan adalah silika gel 40 (70-230 mesh) ASTM dan fase gerak yaitu kloroform 100%, campuran pelarut kloroform:metanol dengan perbandingan 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50 (v/v). Terlebih dahulu

dibuburkan silika gel 40 (70-230 mesh) ASTM dengan menggunakan kloroform, diaduk-aduk hingga homogen lalu dimasukkan ke dalam kolom kromatografi. Kemudian dielusi dengan menggunakan kloroform 100% hingga silika gel padat dan homogen. Dibuburkan 4 g ekstrak pekat metanol dengan silika gel dengan pelarut metanol, kemudian dimasukkan ke dalam kolom kromatografi yang telah berisi bubuk silika gel, lalu ditambahkan fasa gerak kloroform:metanol 90:10 (v/v) secara perlahan-lahan dan diatur sehingga aliran fasa yang keluar dari kolom sama banyaknya dengan penambahan fasa gerak dari atas. Ditingkatkan kepolaran dengan menambahkan fasa gerak kloroform:metanol dengan perbandingan 80:20 (v/v), 70:30 (v/v), 60:40 (v/v), dan 50:50 (v/v). Hasil yang diperoleh ditampung dalam botol vial setiap ± 10 mL, lalu di KLT dan digabung fraksi dengan harga R_f yang sama lalu diuji dengan FeCl₃ 5%. Kemudian diuapkan sampai terbentuk gum.

Pemurnian

Gum yang diperoleh dari isolasi dengan kromatografi kolom dilarutkan kembali dengan metanol lalu dianalisis KLT untuk mengetahui apakah senyawa yang diperoleh sudah murni atau belum sekaligus mencari fasa gerak yang sesuai untuk KLT preparatif. Kloroform:etil asetat 50:50 (v/v) adalah fasa gerak yang menunjukkan pemisahan yang paling baik untuk selanjutnya digunakan untuk menjenuhkan bejana KLT preparatif. Sedangkan gum yang telah dilarutkan tadi ditotolkan secara perlahan-lahan dan sama rata disepanjang tepi bawah plat KLT yang telah diaktifkan. Plat dimasukkan ke dalam bejana yang berisi campuran pelarut yang telah dijenuhkan, kemudian ditutup. Setelah dielusi, plat dikeluarkan dari bejana, dikeringkan, dan hasilnya diperiksa dibawah sinar UV. Tiap zona diberi tanda dan dikeruk lalu dielusi dengan kloroform:etil asetat (1:1). Hasil elusi diuapkan hingga diperoleh gum kuning.

Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi

Identifikasi senyawa hasil isolasi dianalisis menggunakan Spektroskopi Infra Red (FT-IR) dan ¹H-NMR.

Pengujian Sifat Antibakteri Ekstrak Metanol Bunga Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*)

Dimasukkan media Mueller Hilton Agar (MHA) ke dalam cawan petri steril dengan suhu 45-50°C kemudian didiamkan sampai memadat. Diambil suspensi bakteri *S. Aureus* yang sudah dilarutkan dalam aquades, kemudian digoreskan suspensi bakteri ke dalam media MHA yang telah memadat secara merata. Dimasukkan kertas cakram yang telah direndam dengan ekstrak metanol bunga belimbing wuluh dengan berbagai variasi konsentrasi ke dalam cawan petri yang telah berisi bakteri, kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu ± 35°C selama 18-24 jam.

Selanjutnya diukur diameter zona hambat disekitar kertas cakram dengan jangka sorong. Dilakukan dengancara yang sama terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

3. HASIL DANPEMBAHASAN

Hasil Ekstraksi dan Fraksinasi

Sebanyak 1500 gram sampel bunga belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) kering di ekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol, semua sampel terendam dan dibiarkan selama 24 jam. Hasil maserasi berwarna coklat di tampung dan dipekatkan menggunakan alat rotary evaporator sehingga diperoleh ekstrak pekat metanol berwarna kuning kecoklatan. Kemudian diuapkan dengan penangas air hingga semua pelarut metanol menguap. Lalu dilakukan pemisahan tanin dengan cara melarutkan ekstrak pekatmetanol dengan aquadest lalu dipartisi berulang-ulang dengan etil asetat. Filtrat kemudian dirotarievaporator lalu diuapkan dengan penangas air hingga semua pelarut etil asetat menguap. Lalu ekstrak pekat etil asetat diuji dengan $FeCl_3$ 5%. Ekstrak pekat etil asetat dilarutkan dengan metanol dan diekstraksi partisi berulang-ulang dengan n-heksan sampai lapisan n-heksan bening. Lapisan metanol dipisahkan dari lapisan n-heksan, lalu diuji dengan $FeCl_3$ 5% dan dipekatkan kembali dengan rotarievaporator dan diuapkan kembali sehingga diperoleh ekstrak pekat lapisan metanol berwarna kuning kecoklatan.

Hasil Skrining Fitokimia

Hasil skrining fitokimia terhadap bunga belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) dapat dilihat pada tabel 3.1 sebagai berikut :

Tabel 3.1 Hasil Skrining Fitokimia Bunga Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbiL.*)

No	Senyawa Metabolit Skunder	Pereaksi	Hasil Skrining
1	Flavonoid	$FeCl_3$ 5%	+
		Mg + $HCl(p)$	+
		H_2SO_4	+
2	Alkaloid	Bouchardart	-
		Maeyer	-
3	Terpenoid/Steroid	Salkowsky	+
		Liebermann-Burcard	+
		$FeCl_3$ 5%	+
4	Tanin	$FeCl_3$ 5%	+
5	Saponin	Aquades+alkohol 96% +HCl 2N	-

Ketetapan :

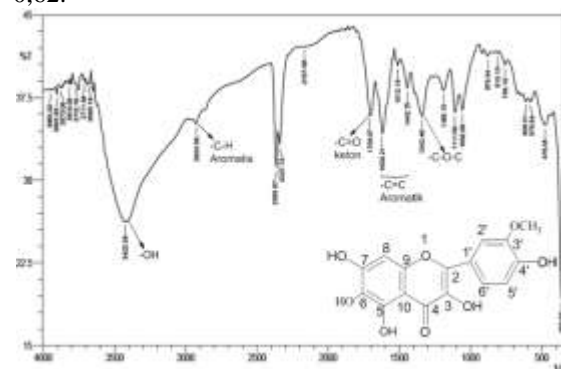
(+) positif : mengandung golongan senyawa

(-) positif : tidak mengandung golongan senyawa

Pada serbuk bunga belimbing wuluh yang ditambahkan serbuk Mg dan asam klorida pekat, kemudian dibiarkan beberapa menit akan menimbulkan warna merah lembayung, menunjukkan adanya senyawa flavonoid. Penambahan pereaksi Salkowskydan Liebermann-Burcard memberikan warna merah merah ungu, menunjukkan adanya senyawa Terpenoid dan di uji dengan $FeCl_3$ 5% memberikan warna hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin.

Pemurnian

Dari hasil analisis kromatografi lapis tipis sebelum kromatografi kolom didapat bahwa perbandingan pelarut yang baik untuk mengisolasi senyawa flavonoida dari bunga belimbing wuluh adalah kloroform : metanol (90:10) $\frac{v}{v}$ yang menunjukkan pemisahan yang lebih baik dari noda yang dihasilkan. Hal ini dibuktikan dengan analisis KLT yang menunjukkan adanya tiga noda dengan jarak pisah antar noda yang baik. Setelah pemisahan dengan kromatografi kolom kemudian dilakukan analisis KLT untuk penggabungan fraksi dengan menggunakan eluen kloroform : metanol (90:10) $\frac{v}{v}$ dan didapatkan 6 fraksi, dimana bahwa noda yang dihasilkan pada plat kromatografi lapis tipis pada fraksi 35-38 dengan pereaksi $FeCl_3$ 5% merupakan pemisahan noda yang paling baik yaitu fraksi empat dan lima sebanyak 230 mg lalu dianalisis KLT kembali dengan kloroform : etil asetat (50:50) $\frac{v}{v}$, yang selanjutnya dikromatografi Lapis Tipis Preparatifdengan sistem pelarut yang sesuai adalah kloroform : etil asetat (50:50) $\frac{v}{v}$, diamati dengan lampu UV, lalu diambil noda ke dua dari batas atas, kemudian silika gel dikerok dan dielusi dengan perbandingan pelarut metanol : etil asetat (1:1) $\frac{v}{v}$, didalam kolom kecil. Senyawa yang diperoleh dilakukan kembali pemurnian dengan rekristalisasi menggunakan pelarut metanol dan n-heksan, kemudian diuji kemurniannya dengan KLT menggunakan eluan kloroform : etil asetat (60:40) $\frac{v}{v}$ yang menunjukkan hanya satu noda pada senyawa yang dihasilkan dengan harga R_f sebesar 0,62.

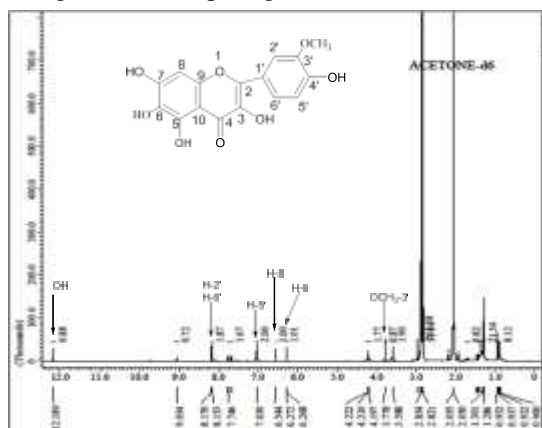


Gambar 3.1 Hasil Analisis Spektrofotometer FT-IR

Hasil analisis Spektrofotometer Infra Merah (FT-IR) dari pasta hasil isolasi menghasilkan pita serapan pada daerah bilangan gelombang (cm^{-1}) menunjukkan bahwa pada bilangan gelombang 3425,56 intensitas sedang menunjukkan vibrasi ulur OH, bilangan gelombang 2924,09 intensitas rendah menunjukkan vibrasi ulur CH, bilangan gelombang 1705,07intensitas sedang menunjukkan vibrasi ulur C=O, bilangan gelombang 1442,75-1620,21intensitas sedang menunjukkan vibrasi ulur C=C, dan bilangan gelombang 1342,46 intensitas sedang menunjukkan vibrasi ulur C-O-C.

Hasil analisis Spektrofotometer Resonansi Magnetik Inti Proton (^1H-NMR) terhadap senyawa

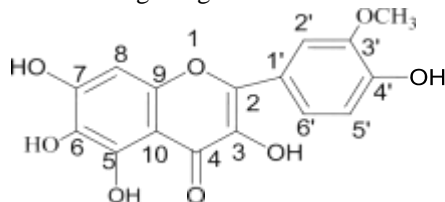
hasil isolasi dengan menggunakan pelarut aseton-d₆ dan TMS pergeseran kimia pada daerah (ppm) sebagai standart seperti gambar berikut:



Gambar 3.2 Spektrum ¹H-NMR Senyawa Hasil Isolasi pada δ_H = 0-12,0 ppm

Berdasarkan dataspektrum ¹H-NMR senyawa hasil isolasi dapat dilihat bahwa daerah pergeseran kimia (δ) 3,778 ppm menunjukkan H dari OCH₃-3 dengan puncak singlet, (δ) 6,268-6,272 ppm menunjukkan H-6 dengan puncak doublet, (δ) 6,544 ppm menunjukkan H-8 dengan puncak doublet, (δ) 7,030 ppm menunjukkan H-5 dengan puncak doublet, (δ) 12,189 ppm menunjukkan OH dengan puncak singlet.

Berdasarkan analisis data dan interpretasi yang dilakukan pada spektrum Inframerah (FT-IR), Spektrum ¹H-NMR disimpulkan bahwa besar kemungkinan pasta yang diisolasi dari bunga belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) adalah senyawa flavonoida golongan flavonol.



Gambar 3.3 Struktur Senyawa Hasil Isolasi (Flavonol)

Tabel 3.2 Hasil Uji Aktivitas Anti Bakteri Pada Bakteri *Staphylococcus aureus* dan Bakteri *Klebsiella Pneumoniae*

No	Konsentrasi (mg/ml)	Diameter Daerah Hambatan (mm)	
		Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	Bakteri <i>Klebsiella Pneumoniae</i>
1	50	10,81	10,77
2	40	10,71	10,29
3	30	10,46	9,84
4	20	10,17	9,72
5	10	-	-
6	Blanko	-	-

Blanko : DMSO

Dari data diatas memperlihatkan bahwa, ekstrak metanol memberikan daerah hambat yang efektif terhadap bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 50 mg/ml

dan memberikan daerah hambat yang efektif terhadap bakteri gram negatif *Klebsiella Pneumoniae* pada konsentrasi 50 mg/ml.

Senyawa flavonoid memiliki aktivitas antibakteri karena flavonoid merupakan golongan senyawa fenol. Senyawa steroid/triterpenoid menghambat pertumbuhan bakteri dengan mekanisme penghambatan terhadap sintesis protein karena terakumulasi dan menyebabkan perubahan komponen-komponen penyusun sel bakteri itu sendiri. Senyawa terpenoid mudah larut dalam lipid, sifat inilah yang yang mengakibatkan senyawa ini mudah menembus dinding sel bakteri gram positif dan sel bakteri gram negatif (Ferawaty, dkk., 2012)

4. KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah hasil isolasi ekstrak metanol bunga belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) menunjukkan bahwa golongan flavonoid yang terkandung adalah jenis Flavonol. Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak metanol bunga belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) memberikan daerah hambat yang efektif terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 50 mg/ml dengan diameter 10,81 mm dan bakteri *Klebsiella Pneumoniae* pada konsentrasi 50 mg/ml dengan diameter 10,77. Peneliti menyarankan agar dilakukan penelitian lebih lanjut untuk uji antioksidan dari ekstra bunga belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) .

5. REFERENSI

- Artanti, N.Y., Ma'arifa & M. Hanafi. 2006. *Isolation and Identification of Active Antioxidant Compound From Star Fruit (Averrhoa carambola) Mistletoe (Dendrophthoe Pentandra (L) Miq). Ethanol Extract.* Journal Of Applied Science.
- Ardananuridin, A. (2004). *Uji Efektifitas Dekok Bunga Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi) Sebagai Antimikroba Terhadap Bakteri Salmonella typhi Secara In Vitro.* Jurnal Kedokteran Brawijaya. 20(1): 30-34.
- Chen, Linhai, Laura J Keller, Edward Cordasco. 2019. *Single-cell Phenotypic Characterization of Staphylococcus aureus With Flourescent Triazole Urea Activity-Based Probes.* Journal of The Gesellschaft Deutscher Chemiker.
- Das, S.C., Sultana, S., Roy, S., dan Hasan, S.S. (2011). *Antibacterial and Cytotoxic Activities of Methanolic Extracts of Leaf and Fruit Parts of The Plant Averrhoa bilimbi (Oxalidaceae).* American Journal of Scientific and Industrial Research. 2(4): 531-536.
- Ferawaty, A.S., Agus, S., dan Delianis, P. (2012). *Potensi Antibakteri Ekstrak Rumpun Laut*

- Terhadap Bakteri Penyakit Kulit Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus epidermidis, dan Micrococcus luteus.* Jurnal of Marine Research. 1(2): 152-160.
- Jawetz, E., Menick, J.L., dan Adelberg, E.A. 2017. *Mikrobiologi Kedokteran Edisi 27.* Alih Bahasa: Eddy Mudihardi, Kuntaman, Eddy Bagus Wasito, Ni Made Mertaniasih, Setio Harsono, dan Lindawati Alimsardjono. Jakarta: Penerbit Salemba Medika. Hal. 317-318, 352, 360
- Mario, P. (2011). *Khasiat Dan Manfaat Belimbing Wuluh.* Surabaya: Stomata. Hal. 65-68, 102-103.
- Maryam, ST. 2015. *Uji Aktivitas Antibakteri Etanol Buah Belimbing Wuluh Asal Kota Watampone.* Jurnal As-Syifaa. Vol 07 (01) : 60-69.
- Masyhud. 2010. *Tanaman Obat Indonesia.* http://www.dephut.go.id/index.php?_id/node/54.
- Nugraha, Aditya Cahya, Agung Tri Prasetya dan Sri Mursiti. 2017. *Isolasi, Identifikasi, Uji Aktivitas Senyawa Flavonoid Sebagai Antibakteri Dari Daun Mangga.* Indonesian Journal Of Chemical Science.
- Sandoram, Rounita Seebaluck, Namrita Lall, Bianca Fibrich. 2019. *Antimicrobial, Antioxidant and cytotoxic Evaluation Of Two Underutilised Fod Plants : Averrhoa bilimbi L (Oxalidaceae) and Phyllanthus acidus L. Skeels (Phyllanthaceae).* Journal Of Biocatalysis And Agricultural Biotechnology Research.