



Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Kadar Total Fenol dan Total Flavonoid Ekstrak Etanol Daun Insulin (*Smallanthus sonchifolius*) serta Aktivitas Antibakteri Terhadap *Staphylococcus aureus*

Chintiana Nindya Putri^{1*}, Muhammad Ryan Radix Rahardhian² dan Dewi Ramonah²

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Sultan Agung, Jl.Kaligawe Raya Km.4, Semarang, Indonesia, 50112.

²Program Studi Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Yayasan Pharmasi, Jl.Letjen Sarwo Edie Wibowo Km.1 Plamongan Sari, Semarang, Indonesia, 50192.

*email korespondensi : cnindyaputri@gmail.com

Received 03 August 2020, Accepted 31 December 2021, Published 15 March 2022

Abstrak: Fenomena resistensi antibiotik menjadi permasalahan baru dalam terapi infeksi, sehingga mendorong dilakukannya penemuan produk baru berbasis bahan alam. Daun insulin merupakan bahan alam yang berpotensi sebagai antimikroba karena mengandung metabolit sekunder seperti fenolik dan flavonoid. Jumlah kandungan senyawa tersebut dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah metode ekstraksi. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh perbedaan metode ekstraksi maserasi dan digesti terhadap kadar total fenolik dan flavonoid, serta aktivitas penghambatan bakteri *Staphylococcus aureus* dari ekstrak etanol daun insulin 5%,10%,15%. Pada penelitian ini penentuan kadar fenolik dan flavonoid menggunakan spektrofotometri UV-Vis, sedangkan uji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 2018 menggunakan difusi agar. Hasil penelitian diperoleh data bahwa kadar flavonoid dan fenolik ekstrak daun insulin yang diekstraksi dengan maserasi lebih besar dibandingkan digesti yaitu sebesar 40,2 mg GAE/g, sedangkan pada metode digesti hanya 8,12 mg GAE/g untuk kadar fenolik. Kandungan total flavonoid ekstrak dari metode maserasi sebanyak 28,42 mg QE/g, sedangkan pada metode digesti sebanyak 11,52 mg QE/g. Pada pengujian antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 2018 diperoleh hasil bahwa ekstraksi dengan maserasi memiliki diameter daya hambat lebih besar dibandingkan digesti.

Kata kunci: daun insulin; *Staphylococcus aureus*; total fenolik; total flavonoid

Abstract. Effect of Extraction Methods for Total Phenolic Content, Total Flavonoid Content and Antibacterial Activity of Etanolic Extract Insulin Leave (*Smallanthus Sonchifolius*). The phenomenon of antibiotic resistance has become a new problem in infection therapy, thus encouraging the discovery of new products based on natural ingredients. Insulin leaves are natural ingredients that have potential as antimicrobials because contain phytochemicals such as phenolics and flavonoids. The amount of content is influenced by several factors including the extraction method. This study aimed to determine the effect of different maceration and digestion extraction methods on total phenolic and flavonoid levels, as well as the inhibitory activity of *Staphylococcus aureus* from ethanol extract of insulin leaves 5%, 10%, 15%. The result showed the number of phenolic compounds extracted by maceration (40,2 mg GAE/g) was significantly higher than those extracted by digestion (8,12 mg GAE/g). The total flavonoid compounds (28,42 mg QE/g)

were significantly double in maceration than those in digestion (28,42 mg QE/g). Besides, the antibacterial activity of *Staphylococcus aureus* ATCC 2018 showed the higher inhibition on maceration extraction.

Keywords: insulin leaf; *Staphylococcus aureus*; total phenolic content; total flavonoid content

1. Pendahuluan

Infeksi adalah penyakit yang diakibatkan oleh masuknya suatu mikroorganisme patogen pada jaringan tubuh. Salah satu mikroorganisme yang dapat menyebabkan infeksi yaitu bakteri *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus*, merupakan salah satu patogen infeksius yang menyebar luas dan telah menjadi ancaman kesehatan yang mengkhawatirkan di seluruh dunia, dan *Staphylococcus aureus* baru-baru ini dikelompokkan sebagai patogen II tingkat tinggi oleh World Health Organization (WHO) (Gatadi *et al.*, 2019).

Antibiotik mempunyai peranan penting yang diharapkan mampu mengeliminasi bakteri penyebab infeksi, namun munculnya resistensi terhadap antibiotik yang ada, menjadikannya sebagai permasalahan baru dalam terapi infeksi, sehingga perlu dilakukannya pengembangan obat baru berbasis bahan alam untuk mengatasi permasalahan tersebut. Sumber bahan alam seperti tanaman berpotensi dijadikan sebagai bahan baku untuk pengembangan obat baru karena adanya kandungan fitokimia yang terdapat dalam suatu tanaman memiliki berbagai aktivitas farmakologi seperti antibakteri, selain itu antibakteri dari bahan alam juga diharapkan mampu meminimalisir efek samping dari antibiotik kimia.

Metode ekstraksi merupakan salah satu faktor yang berpengaruh terhadap kandungan senyawa bioaktif dalam ekstrak karena secara langsung berpengaruh pada proses ekstraksi senyawa fitokimia dalam tanaman. Perbedaan metode ekstraksi juga dapat mengakibatkan adanya interaksi antara pelarut dan senyawa terlarut dengan sifat polaritas yang sama, dimana sifat polaritas senyawa fitokimia yang sama dengan pelarut akan terjadi interaksi tarik menarik (Yabalak *et al.*, 2020). Hal ini juga sama seperti yang diungkapkan oleh (Widyaningrum, 2020) yang melaporkan bahwa perbedaan metode ekstraksi akan menghasilkan kandungan senyawa yang berbeda karena terkait dengan sifat fisika kimia golongan senyawa fitokimia. Menurut Nurkhasanah & Rahardhian (2015) bahan alam yang memiliki kandungan fenolik dan flavonoid dapat dideterminasi *total phenolic content* menggunakan reagen *folin-ciocalteu* dan *Total Flavonoid Content* menggunakan reagen $AlCl_3$.

Daun insulin atau yakon bersifat antimikroba, antifungi, antioksidan dan antidiabetik (Joung *et al.*, 2010). Penelitian Hegde *et al.*, (2014) melaporkan bahwa hasil skrining fitokimia ekstrak metanol daun insulin menunjukkan adanya kandungan senyawa karbohidrat,

triterpenoid, protein, alkaloid, tanin, saponin, flavonoid dan steroid serta memiliki aktivitas antibakteri yang mampu menghambat bakteri gram positif (*Bacillus megaterium*, *Micrococcus leuteus*, *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus lactis*) dan bakteri gram negatif (*P.aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* dan *Salmonella typhi*). Pada penelitian Saputri (2018) membuktikan bahwa ekstrak etanol daun insulin konsentrasi 10% memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *P. aeruginosa*, sedangkan pada penelitian Ramonah *et al.*, (2020) menyebutkan bahwa daun insulin dengan metode ekstraksi perkolasi memiliki kandungan fenolik dan flavonoid yang memiliki potensi sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Dari penelitian sebelumnya sudah cukup banyak penelitian tentang daun insulin di bidang mikrobiologi khususnya antibakteri, namun belum ada penelitian tentang pengaruh metode ekstraksi terhadap kandungan fenolik total, flavonoid total dan aktivitas antibakteri pada *Staphylococcus aureus*. Berdasarkan alasan tersebut, maka tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh metode ekstraksi dingin (maserasi) dan metode ekstraksi panas (digesti) terhadap kandungan fenolik total, flavonoid total dan aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol daun insulin.

2. Bahan dan Metode

2.1. Bahan

Daun insulin diperoleh dari Kota Semarang, HCl, aquadest, FeCl₃, serbuk Mg, CH₃COONa anhidrat, reagen stiasny, reagen mayer, reagen dragendorff, H₂SO₄, plat silica gel 60 F₂₄₅, n-butanol, uap ammonia, etil asetat, AlCl₃, metanol, kloroform, anisaldehyd-asam sulfat, n-heksan, asam galat (Sigma Aldrich), Folin Ciocalteu (Sigma Aldrich), NaCO₃ (Merck), Quercetin ≥95% (Sigma Aldrich), dimetilsulfoksida (Sigma Aldrich), *Nutrient Broth* (Sigma Aldrich), *Mannitol Salt Agar* (Sigma Aldrich), Siprofloksasin, bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 2018. Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah rotary evaporator (Heidolph), pipet volume (pyrex), mikropipet (Socorex), *moisture analyzer* (Shimadzu), waterbath (Memmert), LAL, spektrofotometer UV-Vis (Thermo scientific), alat gelas (pyrex).

2.2. Metode

2.2.1. Preparasi sampel

Serbuk simplisia daun insulin sebanyak 100 gram diekstraksi dengan dua metode, yakni maserasi dan digesti. Maserasi dilakukan dengan merendam serbuk menggunakan etanol 96% 1000 mL dengan perbandingan 1:10 selama 3 x 24 jam. Maserat kemudian disaring. Digesti dilakukan dengan merebus serbuk simplisia diatas *hot plate* pada suhu 40-50°C selama 3 jam, disaring hingga diperoleh ekstrak cair. Ekstrak cair dari masing-masing metode ekstraksi lalu diuapkan diatas *rotary evaporator* (Heidolph®, Germany) hingga diperoleh ekstrak kental.

2.2.2. Skrining fitokimia

Skrining fitokimia dengan metode (Savitri *et al.*, 2020) dengan modifikasi. Sampel ekstrak etanol daun insulin 30 mg dilarutkan dalam etanol 3 ml hingga larut sempurna, yang selanjutnya digunakan sebagai sampel pengujian skrining fitokimia dengan prosedur sebagai berikut:

- Flavonoid

Sampel ditambahkan serbuk Mg dan 1 mL HCl, terbentuk warna merah, kuning/jingga menunjukkan positif flavonoid.

- Polifenol

Sampel ditambahkan FeCl₃, positif polifenol berwarna biru/hijau kehitaman.

- Tanin

Sampel dilarutkan dengan garam gelatin, terbentuknya endapan putih kekuningan menunjukkan sampel positif tanin.

- Alkaloid

Sampel ditambah HCl dan aquades, dipanaskan dan dibagi 2 filtrat, filtrat 1 direaksikan dengan reagen mayer membentuk endapan putih kekuningan, filtrat 2 ditambah reagen dragendorff terbentuk endapan merah bata menunjukan positif alkaloid.

- Saponin

Sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 10 ml aquadest. Dikocok kuat selama 10 detik. Reaksi positif jika terbentuk buih selama 10 menit setinggi 1-3 cm.

- Steroid / triterpenoid

Sampel ditambahkan kloroform, dan disaring, filtrat ditambahkan CH₃COOH anhidrat, dipanaskan. Dinginkan tambahkan H₂SO₄, terbentuk warna hijau mengandung steroid dan warna jingga/merah mengandung triterpenoid.

2.2.3. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sampel diteteskan langsung pada lempeng KLT, kemudian dilakukan identifikasi kandungan senyawa menggunakan fase gerak dengan prosedur sebagai berikut:

- Flavonoid

Fase gerak n-butanol: asam asetat: air (4:1:5), lalu lempeng KLT diletakkan diatas uap amoniak. Hasil menunjukkan adanya flavonoid apabila terbentuk noda berwarna kuning setelah perlakuan penambahan uap amoniak.

- Tanin

Etil asetat: metanol: air (100:13,5:10) dan penampak bercak FeCl₃, menunjukkan adanya tanin apabila terbentuk bercak hijau kehitaman.

- Alkaloid

Etil asetat: metanol: air (6:4:2) dan penampak bercak reagen dragendorff, menunjukkan adanya alkaloid apabila terbentuk warna coklat.

- Saponin

Kloroform: metanol: air (64:50:10) dan penampak bercak anisaldehyd-asam sulfat kemudian dipanaskan pada hot plate selama 5-10 menit pada suhu 100°C, menunjukkan adanya kandungan saponin apabila terbentuk warna kuning, hijau, merah, biru tua, ungu, kuning kecoklatan.

- Steroid / triterpenoid

N-heksan: etil asetat (17:3) dan penampak bercak anisaldehyd-asam sulfat. Lempeng KLT dipanaskan pada hot plate selama 5-10 menit pada suhu 100°C. Hasil positif steroid bila terbentuk warna ungu dan hasil positif triterpenoid bila terbentuk warna biru.

2.2.4. Penentuan kandungan *Total phenolic contents* (TPC)

Prosedur pada penentuan kandungan total fenolik dari ekstrak daun insulin mengacu pada prosedur (Vongsak *et al.*, 2013) yang telah dimodifikasi. Adapun tahapannya sebagai berikut:

- Pembuatan larutan standar asam galat

Asam galat sebanyak 50,0 mg dilarutkan dengan aquadest sampai volume 50,0 ml. Larutan induk 1000 µg/ml yang diperoleh, kemudian diencerkan untuk membuat seri konsentrasi 20-100 µg/ml, dengan interval 20 µg/ml.

- Penentuan kandungan fenolik total

Larutan standar atau sampel diambil 1,0 ml dimasukkan tabung reaksi ditambah 4,5 ml *Folin Ciocalteu* 10 % ditambah 4,5 ml Na₂CO₃ 7,5%, homogenkan. Diinkubasi 30 menit, dibaca pada λ 760 nm menggunakan Spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu®) tipe 1240.

2.2.5. Penentuan kandungan *Total Flavonoid Contents* (TFC)

Prosedur pada penentuan kandungan total flavonoid dari ekstrak daun insulin mengacu pada prosedur (Chang *et al.*, 2002) yang telah dimodifikasi dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

- Pembuatan larutan standar Kuersetin

Kuersetin sebanyak 50,0 mg dilarutkan dengan aquades sampai volume 50,0 ml. Larutan induk 1000 µg/ml yang diperoleh, kemudian diencerkan untuk membuat seri konsentrasi 20-100 µg/ml, dengan interval 20 µg/ml.

- Penentuan Kandungan Flavonoid Total

Larutan standar atau sampel diambil 1,0 ml dimasukkan tabung reaksi ditambah 3 ml etanol ditambah 0,2 ml AlCl_3 10%, ditambah 0,2 ml CH_3COONa anhidrat 20%, ditambah 5,6 ml aquadest, homogenkan. Diinkubasi 30 menit pada λ 420 nm menggunakan Spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu®) tipe 1240.

2.2.6. Aktivitas antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun insulin dilakukan menurut metode yang telah dilakukan oleh (Ngajow *et al.*, 2013) yaitu dengan metode *disc diffusion*, dengan tahapan sebagai berikut:

- Pembuatan media pengujian

Media MSA (Mannitol Salt Agar) sebanyak 11,1gram dilarutkan kedalam 100 ml akuades demineralisasi menggunakan erlenmeyer. Dihomogenkan diatas penangas air sampai mendidih. Media cair yang sudah homogen, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

- Pembuatan suspensi bakteri uji

Kultur bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 2018 diambil satu ose, dimasukkan dalam media cair Nutrient Broth (NB), campur homogen dan diinkubasi 1x24 jam pada suhu 37°C . Lalu diukur serapannya dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 625 nm yang disetarakan dengan larutan standar $\frac{1}{2}$ Mc. Farland (biakan cair yang memiliki kekeruhan setara dengan larutan $\frac{1}{2}$ Mc. Farland yang mempunyai populasi 1×10^8 CFU/mL).

- Pembuatan kontrol positif siprofloksasin

Serbuk siprofloksasin ditimbang sebanyak 50 mg dan dimasukkan ke labu takar 10 ml, lalu dilarutkan dalam 10 ml aquades steril. Larutan tersebut dipipet sebanyak 1,0 ml dan dimasukkan ke dalam labu takar 100 ml, kemudian dicukupkan dengan aquadest steril lagi sampai volume 100 ml lalu digojog sampai homogen (konsentrasi 0,005%).

- Uji aktivitas antibakteri

Media MSA (*Mannitol Salt Agar*) sebanyak 10 mL dimasukkan ke dalam cawan petri lalu biarkan memadat sebagai lapisan pertama. *Cylinder cup* kemudian diletakkan di atas lapisan pertama yang telah memadat, dan dimasukkan suspensi bakteri sebanyak 0,5 μL kedalam 15 mL media MSA cair, dihomogenkan dan dituangkan secara aseptis diatas lapisan pertama, ditunggu hingga memadat. Ekstrak daun insulin yang digunakan yaitu konsentrasi 5%, 10% dan 15%, kontrol negatif *Dimethyl sulfoxide* (DMSO), dan kontrol positif Siprofloksasin 0,005% sebanyak 50 μL kedalam lubang *cylinder cup*. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C , kemudian dilakukan pengukuran diameter zona hambat.

2.2.7. Analisis data

Pengukuran flavonoid total dan fenolik total dilakukan dengan analisis data terlebih dahulu menggunakan kurva standar, regresi linier $y = bx + a$, Dimana y adalah absorbansi dan x adalah konsentrasi dari larutan standar. Selanjutnya dihitung kandungan fenolik total (mg GAE/g ekstrak) dan flavonoid total (mg QE/g ekstrak) menggunakan Persamaan 1.

$$\text{fenolik total atau Flavonoid Total} = \frac{C \times V}{m} \times FP$$

Persamaan 1. Perhitungan kadar flavonoid total atau fenolik total. Keterangan: C = konsentrasi ekstrak (mg/L), V = volume sampel (L), FP = faktor pengenceran dan m = bobot sampel (g).

Pengukuran antibakteri, dilakukan dengan mengukur diameter zona bening menggunakan jangka sorong. Seluruh data dari kadar total fenolik, total flavonoid dan diameter hambat dilakukan analisis dengan SPSS menggunakan *software* IBM SPSS *Statistic* 23, USA. Langkah awal analisis SPSS adalah uji normalitas dengan Kolmogorov-Smirnov dan uji homogenitas untuk melihat data terdistribusi normal dan homogen, selanjutnya adanya perbedaan pada masing-masing konsentrasi ekstrak dilihat dari hasil uji *Post Hoc* dengan nilai signifikannya (Sig) kurang dari 0,05. Seluruh data pengujian juga dilakukan uji korelasi *pearson* ($p > 0,05$) untuk mengetahui hubungan kadar fenolik dan flavonoid terhadap aktivitas antibakteri.

Hasil analisis SPSS menggunakan uji *Post Hoc* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok yaitu metode maserasi dan digesti terhadap kandungan total fenolik, total flavonoid dan aktivitas antibakteri, begitu pula dengan hasil analisis korelasi *pearson* yang menunjukkan adanya korelasi antara kandungan fenolik dan flavonoid dalam ekstrak etanol daun insulin terhadap daya hambat bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 2018. Hal ini menunjukkan bahwa adanya senyawa fenolik dan flavonoid memberikan kontribusi yang tinggi terhadap aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun insulin.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Skrining fitokimia dan KLT

Penelitian ini, dilakukan ekstraksi daun insulin dengan dua metode yang berbeda yakni secara maserasi (cara dingin) dan digesti (cara panas) menggunakan pelarut etanol. Alasan pemilihan etanol sebagai pelarut karena pelarut etanol dapat menyari berbagai metabolit sekunder seperti senyawa flavonoid, tanin, alkaloid, saponin, steroid/triterpenoid pada daun insulin. Pada penelitian lain menyebutkan bahwa etanol dapat menyari komponen aktif dari tanaman diantaranya tanin, polifenol, polyacetylene, flavonol, terpenoid, steroid dan alkaloid (Tiwari *et al.*, 2011). Banyaknya gugus hidroksil pada senyawa fenol dan flavonoid yang cenderung lebih mudah berikatan dengan etanol yang juga memiliki gugus hidroksil (Hasim

et al., 2016), sehingga pelarut etanol tepat digunakan untuk menyari ekstrak daun insulin yang mengandung senyawa tersebut. Selanjutnya, ekstrak etanol daun insulin yang diperoleh dari masing-masing metode ekstraksi dilakukan skrining fitokimia dan KLT sebagai langkah awal untuk mengidentifikasi kandungan senyawa dalam ekstrak etanol daun insulin yang meliputi uji polifenol, uji flavonoid, uji alkaloid, uji saponin dan uji steroid atau triterpenoid. Hasil skrining fitokimia dan KLT ekstrak etanol daun insulin dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil yang disajikan pada Tabel 1, menunjukkan bahwa kedua metode ekstraksi baik maserasi maupun digesti mampu menarik metabolit sekunder dalam daun insulin, sehingga hasil skrining fitokimia ekstrak etanol daun insulin menunjukkan adanya senyawa fitokimia seperti flavonoid, tanin, alkaloid, saponin dan steroid/triterpenoid pada masing-masing ekstrak dari metode ekstraksi yang berbeda.

Tabel 1. Skrining fitokimia dan uji kromatografi lapis tipis ekstrak daun insulin. Keterangan: terbentuk warna/endapan sesuai literatur (+) dan tidak terbentuk warna/endapan sesuai literatur (-).

Golongan Senyawa	Maserasi			Digesti		
	Skrining Fitokimia	Nilai Rf	Ket.	Skrining Fitokimia	Nilai Rf	Ket.
Flavonoid	+	0,49	+	+	0,44	+
Tanin	+	0,83	+	+	0,89	+
Alkaloid		0,64	+		0,59	+
- Mayer	+			+		
- Dragendorff	+			+		
Saponin	+	0,43	+	+	0,45	+
Steroid	+	0	+	+	0	+

3.2. Total Phenolic Content (TPC)

Determinasi TPC dianalisis dengan metode kolorimetri menggunakan reagen *Folin Ciocalteu*. Reagen *Folin Ciocalteu* digunakan karena senyawa fenolik dapat bereaksi dengan *Folin Ciocalteu* membentuk larutan berwarna yang dapat diukur absorbansinya. Prinsipnya adalah terbentuknya senyawa kompleks berwarna biru yang dapat diukur pada panjang gelombang maksimal hasil penelitian adalah 765 nm. Semakin besar konsentrasi senyawa fenolik maka semakin banyak ion fenolat yang akan mereduksi asam heteropoli (fosfomolibdat-phosphotungstate) menjadi kompleks molibdenum-tungsten sehingga warna biru yang dihasilkan semakin pekat.

Penentuan kandungan total fenolik diperoleh hasil bahwa kandungan fenolik total terbesar terdapat pada ekstrak dengan metode maserasi ($40,25 \pm 2,13$ mg GAE/g ekstrak) dibanding digesti yaitu ($8,12 \pm 0,50$ mg GAE/g ekstrak), adapun kadar TPC dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil penelitian membuktikan bahwa dengan adanya panas pada metode ekstraksi secara digesti mengakibatkan kandungan fenolik total dari ekstrak daun insulin menurun.

Penurunan ini kemungkinan terjadi karena umumnya panas memberikan efek destruktif pada senyawa fenolik yang bersifat sangat tidak stabil (Safitri *et al.*, 2018). Hal ini juga sesuai dengan penelitian (Nuri *et al.*, 2020) yang menyebutkan bahwa kandungan total fenolik pada ekstrak yang diperoleh dengan maserasi lebih besar dibandingkan dengan metode panas seperti infusa ($67,61 \text{ mg GAE/g} \geq 38,400 \text{ mg GAE/g}$).

3.3. Total Flavonoid Content (TFC)

Pengukuran kadar flavonoid total dilakukan penambahan AlCl_3 . Prinsip dari metode ini adalah AlCl_3 membentuk kompleks asam yang stabil dengan C-4 gugus keto, lalu dengan C3 atau C5 gugus hidroksil dari flavon dan flavonol. Selain itu AlCl_3 juga akan membentuk kompleks asam yang labil dengan gugus ortodihidroksi pada cincin A atau B dari flavonoid (Chang *et al.*, 2002). Adapun penambahan Natrium asetat untuk mempertahankan panjang gelombang pada daerah visible (tampak).

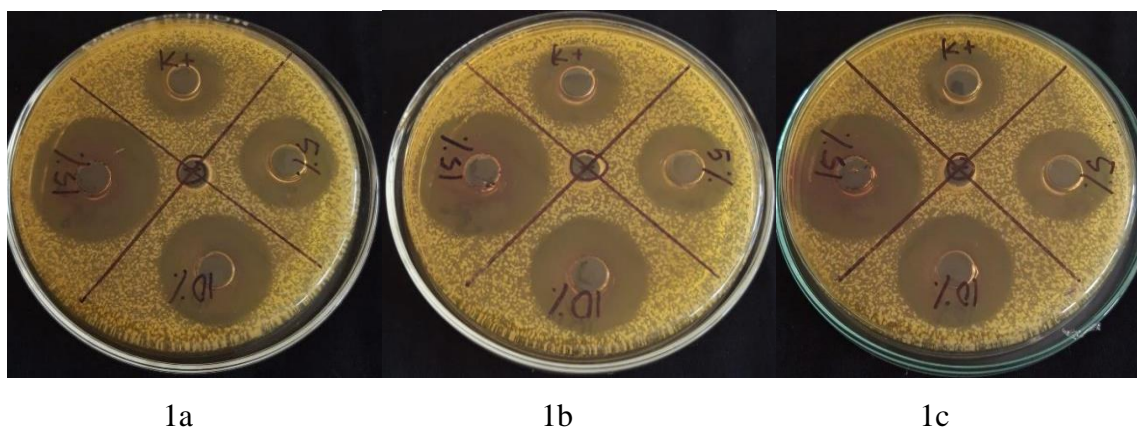
Data Tabel 2 menunjukkan bahwa kadar flavonoid total pada metode maserasi ($28,42 \pm 4,06 \text{ mg QE/g}$ ekstrak) lebih besar dibandingkan metode digesti ($11,52 \pm 0,24 \text{ mg QE/g}$ ekstrak). Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa ekstrak yang diperoleh dengan cara maserasi memiliki kandungan total flavonoid yang lebih besar dibandingkan ekstrak yang diperoleh dengan cara metode panas seperti infusa (Nuri *et al.*, 2020). Hal ini disebabkan karena proses ekstraksi secara digesti merupakan metode ekstraksi panas dengan memanaskan sampel secara langsung pada suhu tertentu, sehingga kemungkinan senyawa flavonoid dalam daun insulin rusak ketika pemanasan, atau bisa diakibatkan dari metode ekstraksi digesti yang kurang dapat menarik senyawa flavonoid secara maksimal pada daun insulin.

3.4. Uji aktivitas antibakteri

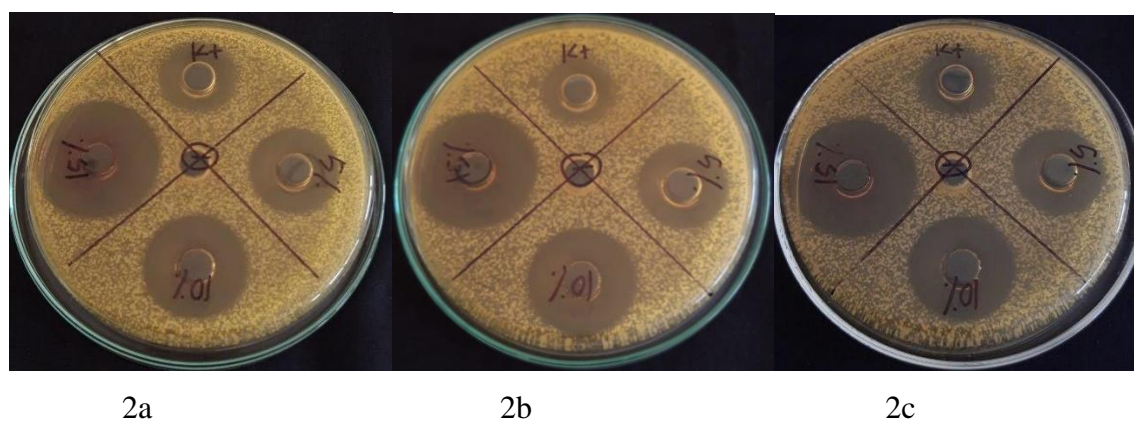
Pertumbuhan mikroorganisme terbagi menjadi 4 macam yaitu fase lag (adaptasi), log (exponential), stasioner, dan kematian. Selama fase lag bakteri mulai menyesuaikan diri pada lingkungan sehingga belum mengalami pertumbuhan. Pada fase log bakteri mulai mengalami peningkatan pertumbuhan cukup pesat dengan cara membelah diri. Fase stasioner merupakan fase dimana pertumbuhan konstan, dan terakhir merupakan fase kematian bakteri. Ekstrak Daun insulin memiliki aktivitas antibakteri pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 2018. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun insulin dengan metode maserasi disajikan pada Tabel 2 dan Gambar 1, sedangkan dengan metode digesti disajikan pada Table 2 dan Gambar 2.

Hasil penelitian menunjukkan perbedaan aktivitas antibakteri dengan varian konsentrasi dimana hal ini berbanding lurus dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak. Faktor-faktor yang mempengaruhi perbedaan diameter hambatan pertumbuhan bakteri antara lain perbedaan

konsentrasi yang menunjukkan besarnya kandungan zat aktif antibakteri yang dimiliki oleh ekstrak etanol daun insulin, perbedaan volume yang dimasukkan dalam sumuran, kecepatan difusi zat aktif dalam media agar (Januarti *et al.*, 2019).



Gambar 1. Hasil uji aktivitas antibakteri K⁺ (siprofloksasin), ekstrak etanol daun insulin 5%, 10%,15% dari metode maserasi.



Gambar 2. Hasil uji aktivitas antibakteri K⁺ (siprofloksasin), ekstrak etanol daun insulin 5%, 10%,15% dari metode digesti.

Aktivitas antibakteri ekstrak daun insulin tertinggi pada konsentrasi 15% dengan rerata daya hambat sebesar $26,50 \text{ mm} \pm 0,01 \text{ mm}$ untuk maserasi dan $24,51 \text{ mm} \pm 0,01$ untuk digesti, sedangkan pada kontrol yaitu siprofloksasin dimana daya hambat tersebut melebihi kontrol positifnya siprofloksasin sebesar $17,56 \pm 0,01 \text{ mm}$. Kekuatan antibakteri dibagi atas daerah hambatan 20 mm atau lebih berarti sangat kuat, daerah hambatan 10 – 20 mm berarti kuat, 5 – 10 mm berarti sedang, dan daerah hambatan < 5 mm lemah (Ngajow *et al.*, 2013). Hasil penelitian yang diperoleh, diketahui bahwa ekstrak etanol daun insulin memiliki aktivitas antibakteri yang kuat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, karena rata - rata diameter berada di kisaran 10 – 20 mm. Adanya aktivitas antibakteri pada ekstrak daun insulin, kemungkinan dikarenakan adanya kandungan senyawa alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin, saponin dan steroid didalamnya.

Fenol bekerja dengan cara mendenaturasi protein yang dapat menyebabkan aktivitas metabolisme ini akan mengakibatkan kematian sel bakteri (Sari *et al.*, 2017). Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Maulana *et al.*, 2020). Dalam penelitian lain menjelaskan bahwa gugus hidroksil yang terdapat pada struktur senyawa flavonoid menyebabkan perubahan komponen organik dan transport nutrisi yang akhirnya akan mengakibatkan timbulnya efek toksik terhadap bakteri (Fitriah *et al.*, 2017).

Tanin memiliki aktivitas antibakteri yang berhubungan dengan kemampuannya untuk menginaktifkan adhesin sel mikroba juga menginaktifkan enzim, dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel (Ngajow *et al.*, 2013). Saponin memiliki mekanisme kerja sebagai antibakteri dengan menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler keluar, sedangkan mekanisme kerja alkaloid sebagai antibakteri melalui penghambatan sintesis dinding sel yang akan menyebabkan lisis pada sel sehingga terjadi kematian sel (Trisia *et al.*, 2018). Antibakteri senyawa steroid berhubungan dengan membran lipid dan sensitivitas terhadap komponen steroid yang menyebabkan kebocoran pada liposom menyebabkan integritas membran menurun serta morfologi membran sel berubah yang menyebabkan sel rapuh dan lisis (Sari *et al.*, 2017). Hasil pengukuran kandungan total flavonoid, fenolik dan aktivitas antibakteri dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Data uji kadar total fenolik, total flavonoid dan diameter daya hambat antibakteri *S.aureus* ATCC 2018 dari ekstrak etanol daun insulin.

Ekstraksi	Rep.	Determinasi		Antibakteri (mm)				
		TFC (mgQE /g)	TPC (mgGAE /g)	5%	10%	15%	+ 0,05% (Sipro- flokasin)	- DMSO
Maserasi	1	26,20	39,75	15,25	21,35	26,51	17,55	0
	2	33,11	42,57	15,25	21,28	26,50	17,55	0
	3	25,96	38,41	15,24	21,35	26,50	17,57	0
	X±SD	28,42± 4,06	40,25± 2,13	15,25± 0,01	21,33 ± 0,04	26,50 ± 0,01	17,56± 0,01	0±0,00
Digesti	1	11,64	7,54	14,51	19,62	24,50	17,53	0
	2	11,67	8,42	14,53	19,61	24,51	17,54	0
	3	11,24	8,39	14,52	19,61	24,52	17,57	0
	X±SD	11,52± 0,24	8,12± 0,50	14,52 ± 0,01	19,61 ± 0,01	24,51± 0,01	17,55 ± 0,02	0±0,00

4. Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah adanya pengaruh metode ekstraksi tidak memberikan pengaruh terhadap hasil skrining fitokimia kedua ekstrak, namun kadar

fenolik, flavonoid serta aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* menunjukkan hasil yang lebih besar dan lebih baik pada metode maserasi dibandingkan digesti.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Wening Harsanti dan Junia Ayu Rahmatika yang telah membantu penelitian ini.

Deklarasi Konflik Kepentingan

Semua penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan terhadap naskah ini.

Daftar Pustaka

- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., dan Chern, J. C. (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10(3), 3.
- Fitriah, Mappiratu, dan Prismawiryanti. (2017). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Tanaman Johar (*Cassia Siamea Lamk.*) dari Beberapa Tingkat Kepolaran Pelarut. *Kovalen*, 3(3), 242–251.
- Gatadi, S., Gour, J., dan Nanduri, S. (2019). Natural product derived promising anti-MRSA drug leads: A review. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 27(17), 3760–3774. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.07.023>
- Hasim, Falah, S., dan Dewi, L. K. (2016). Effect of Boiled Cassava Leaves (*Manihot esculenta Crantz*) on Total Phenolic, Flavonoid and its Antioxidant Activity. *Current Biochemistry*, 3(3), 116–127. <https://doi.org/10.29244/1-12>
- Hegde, P. L., Rao, H. A., Rao, P. N., dan Liebm, C. (2014). PLANT REVIEW A review on Insulin plant (*Costus igneus Nak*). *Pharmacognosy reviews*. 8(15). <https://doi.org/10.4103/0973-7847.125536>
- Januarti, I. B., Wijayanti, R., Wahyuningsih, S., dan Nisa, Z. (2019). Potensi Ekstrak Terpurifikasi Daun Sirih Merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) Sebagai Antioksidan Dan Antibakteri. *JPSCR: Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*, 4(2), 60. <https://doi.org/10.20961/jpscr.v4i2.27206>
- Joung, H., yeul Kwon, D., gi Choi, J., Young Shin, D., Sil Chun, S., Beob Yu, Y., dan Dong, W. S. (2010). Antibacterial and synergistic effects of *Smilax sonchifolius* leaf extracts against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* under light intensity. *Journal of natural medicines*, 64(2). 212–215. <https://doi.org/10.1007/s11418-010-0388-7>
- Maulana, I. A., Triatmoko, B., dan Nugraha, A. S. (2020). Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak dan Fraksi Tanaman Senggugu (*Rotheca serrata* (L.) Steane & Mabb.) terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. *JPSCR: Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*, 5(1), 01.
- Ngajow, M., Abidjulu, J., dan Kamu, V. S. (2013). Antibacterial Effect of Matoa Stem (*Pometia pinnata*) peels Extract to *Staphylococcus aureus* Bacteria In Vitro. *Jurnal MIPA UNSRAT*, 2(November 2013), 128–132.
- Nurkhasanah, dan Rahardhian, M. R. R. (2015). Hepatoprotective Effect Of *Hibiscus sabdariffa* L Extract On 7, 12-dimethylbenz (α) antracene (dmba) Induced Rat. In *International Journal of Biological & Medical Research* 3(1), pp. 4705–4708.
- Nuri, N., Puspitasari, E., Hidayat, M. A., Ningsih, I. Y., Triatmoko, B., dan Dianasari, D. (2020). Pengaruh Metode Ekstraksi terhadap Kadar Fenol dan Flavonoid Total, Aktivitas Antioksidan serta Antilipase Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia*). *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 7(2), 143. <https://doi.org/10.25077/jsfk.7.2.143-150.2020>
- Ramonah, D., Rahardhian, M. R. R., dan Putri, C. N. (2020). Determinasi Total Flavonoid, Total Fenolik, dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Insulin (*Smilax*)

- sonchifolius*) Dengan Metode Perkolasi. *Media Farmasi Indonesia*, 15(1), 1585–1592.
- Saputri, A. D. S. (2018). Aktivitas Antibakteri, Antidiabetes Dan Penyembuhan Ulkus Diabetik Ekstrak Etanol Daun Insulin (*Smallanthus sonchifolius*). Tesis, Universitas Setia Budi.
- Sari, R., Muhani, M., dan Fajriaty, I. (2017). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Gaharu (*Aquilaria microcarpa Baill.*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Proteus mirabilis* Antibacterial Activity of Ethanolic Leaves Extract of Agarwood (*Aquilaria microcarpa Baill.*) Against *Staphyloco*. *Pharm Sci Res*, 4(3), 143–154.
- Savitri, G. R., Triatmoko, B., dan Nugraha, A. S. (2020). Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak dan Fraksi Tumbuhan Anyang-Anyang (*Elaeocarpus grandiflorus* J. E. Smith.) terhadap *Escherichia coli*. *JPSCR: Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*, 5(1), 22. <https://doi.org/10.20961/jpscr.v5i1.32206>
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., dan Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1), 98–106. <https://doi.org/10.1002/hep.29375>
- Trisia, A., Philyria, R., dan Toemon, A. N. (2018). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kalanduyung (*Guazuma ulmifolia* Lam.) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Dengan Metode Difusi Cakram (*Kirby-Bauer*). *Anterior Jurnal*, 17(2), 136–143. <https://doi.org/10.33084/anterior.v17i2.12>
- Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., dan Gritsanapan, W. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*, 44, 566–571.
- Widyaningrum, I. (2020). Effect of Extraction Method on Antimicrobial Activity Against *Staphylococcus aureus* of Tapak Liman (*Elephantopus scaber* L.) Leaves. *International Journal of Health & Medical Sciences*, 3(1), 105-110.
- Yabalak, E., Emire, Z., Adıgüzel, A. O., Könen Adıgüzel, S., dan Gizir, A. M. (2020). Wide-scale evaluation of *Origanum munzurense* Kit Tan & Sorger using different extraction techniques: Antioxidant capacity, chemical compounds, trace element content, total phenolic content, antibacterial activity and genotoxic effect. *Flavour and Fragrance Journal*, 35(4), 394–410. <https://doi.org/10.1002/ffj.3574>

