



REPUBLIK INDONESIA
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA

SERTIFIKAT PATEN

Menteri Hukum dan Hak Asasi Manusia atas nama Negara Republik Indonesia berdasarkan Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten, memberikan hak atas Paten kepada:

Nama dan Alamat Pemegang Paten

: UNIVERSITAS SRIWIJAYA
Jl. Palembang-Prabumulih Km 32,
Kabupaten Ogan Ilir 30662,
INDONESIA

Untuk Invensi dengan Judul

: PROSES ISOLASI SENYAWA ANTIBAKTERI DARI
TUMBUHAN DAUN DEWA (*Gynura pseudochina*)

Inventor

: Ferlinahayati
Herlina

Tanggal Penerimaan

: 25 November 2015

Nomor Paten

: IDP000053590

Tanggal Pemberian

: 21 September 2018

Perlindungan Paten untuk invensi tersebut diberikan untuk selama 20 tahun terhitung sejak Tanggal Penerimaan (Pasal 22 Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten).

Sertifikat Paten ini dilampiri dengan deskripsi, klaim, abstrak dan gambar (jika ada) dari invensi yang tidak terpisahkan dari sertifikat ini.



a.n. MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL

Dr. Freddy Harris, S.H., LL.M., ACCS.
NIP. 196611181994031001

Deskripsi**PROSES ISOLASI SENYAWA ANTIBAKTERI DARI TUMBUHAN DAUN DEWA
(*Gynura pseudochina*)**

5

Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berhubungan dengan proses isolasi senyawa yang bersifat antibakteri dari ekstrak metanol tumbuhan daun dewa (*Gynura pseudocina*), produk dan kemampuan antibakterinya.

10

Latar Belakang Invensi

Penggunaan tumbuhan sebagai pengobatan tradisional adalah hal umum di Indonesia yang terlihat dari banyaknya produk ramuan tradisional yang beredar di masyarakat. Penggunaan tumbuhan dalam pengobatan terkait dengan kandungan senyawa bioaktif (metabolit sekunder) yang terdapat dalam tumbuhan tersebut. Bukti-bukti ilmiah mengenai senyawa yang terkandung dalam suatu tumbuhan obat dan bioaktivitas dari senyawa tersebut harus terus dikaji untuk mengungkapkan kerasionalan penggunaannya dalam pengobatan maupun untuk pengembangannya sebagai salah satu senyawa obat.

15

20

Daun dewa merupakan salah satu tumbuhan dalam genus *Gynura* yang digunakan dalam pengobatan tradisional diantaranya untuk menyembuhkan demam dan kejang pada anak, bisul, kutil, membuang racun, menghentikan pendarahan, mengatasi peradangan seperti radang pankreas pada penderita diabetes militus dan infeksi herpes (Kardinan dan Taryono, 2003 ; Lemmens dan Bunyapraphtasara, 2003). Selain itu tumbuhan ini juga merupakan salah satu tumbuhan yang digunakan masyarakat untuk pengobatan kanker (Aristiani, 2006).

25

30

Beberapa kandungan metabolit sekunder telah dilaporkan dari tumbuhan famili *Gynura* ini adalah dari kelompok

35

flavonoid yaitu kuersetin 3-rutinosida, serta senyawa dari golongan asam klorogenat yaitu asam 4,5-dikafeolkuinat, dan asam 3,5- dikafeolkuinat (Siriwatanametanon dan Heinrich, 2011). Bioaktivitas dari tumbuhan famili Gynura ini yang telah dilaporkan diantaranya adalah sebagai antioksidan (Alisyahbana dkk., 2003), sitotoksik (Dondin, 2001), antikanker (Meiyanto dkk., 2007), antibakteri (Aryanti, 2007) dan mengurangi pertumbuhan *Candida albican* (Rahman, 2012).

10 Penelusuran terhadap paten-paten internasional seperti di Cina menunjukkan adanya penggunaan ekstrak *G. pseudochina* untuk pengobatan radioterapis (CN103495085 A), pengobatan endometriosis (CN103110847 A) dan sebagai ingredient dalam kosmetik (CN102395352 A). Selain itu juga telah ditemukan paten internasional penggunaan senyawa asam lemak dalam bentuk ester maupun asam lemak bebas sebagai antibakteri (US4997851 A, US5434182 A, US2015224072A1 dan US7973006 B2).

20 Ekstrak daun dewa diperoleh dari bagian daun secara maserasi menggunakan pelarut organik. Pemisahan dan identifikasi ekstrak daun dewa menghasilkan senyawa β -sitosterol, stigmasterol, campuran asam lemak metil ester, dan campuran asam lemak bebas.

25 Uji aktivitas antibakteri memperlihatkan bahwa ekstrak metanol bersifat antibakteri terhadap *Bacillus subtilis*, demikian juga dengan campuran asam lemak metil ester maupun campuran asam lemak bersifat aktif sebagai antibakteri secara bakteriostatik terhadap *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*.

30

Ringkasan Invensi

Invensi ini berhubungan dengan proses isolasi senyawa bersifat antibakteri dari daun dewa yang meliputi tahap berikut:

- 5 a. Mengeringkan dan menggiling tumbuhan daun dewa (*Gynura pseudochina*);
- b. Mengekstraksi tumbuhan tersebut dengan pelarut metanol dan menguapkan pelarutnya.
- 10 c. Memisahkan senyawa bersifat antibakteri menggunakan berbagai teknik kromatografi (kromatografi cair vakum, kromatografi radial dan kromatografi gravitasi kolom sephadex).

Selanjutnya juga diungkapkan senyawa bersifat antibakteri yang dihasilkan dari proses tersebut di atas.

15 **Uraian Lengkap Invensi**

1. Proses ekstraksi.

Sampel tumbuhan daun dewa kering (melalui pengeringan di udara terbuka) sebanyak 750 g digiling sampai halus. 20 Sampel perlu dikeringkan untuk mengurangi kadar air yang akan dapat mengganggu pada proses penguapan pelarut saat ekstraksi.

Daun dewa yang sudah halus diekstraksi dengan cara direndam (maserasi) menggunakan metanol sebanyak 3 L dengan 25 3 kali pengulangan masing-masingnya selama 24 jam. Penggunaan metanol karena mampu menarik senyawa-senyawa baik yang bersifat non polar maupun polar. Filtrat yang di dapat dipekatkan dengan cara menguapkan pelarutnya menggunakan *rotari evaporator* sehingga diperoleh ekstrak 30 pekat metanol sebanyak 65,2 g (8,69 %)

2. Proses isolasi dan identifikasi

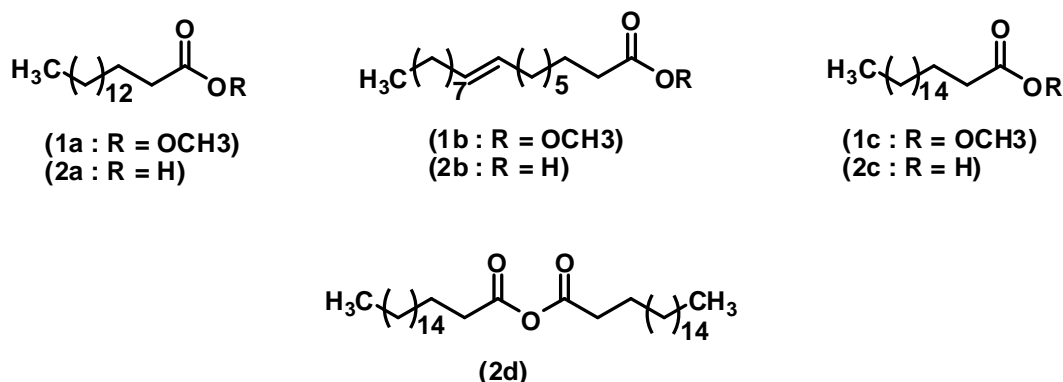
Selanjutnya pemisahan dilakukan terhadap 60 g ekstrak pekat metanol (dibagi 4 bagian, @ 15 g) dengan

dengan kromatografi cair vakum (KCV) (*n*-heksana, *n*-heksana:EtOAc = 9:1 sampai EtOAc dan EtOAc:MeOH = 9:1) menghasilkan 8 fraksi utama A-H (1,89; 1,15; 2,12; 0,64; 1,31; 0,90; 3,02 dan 2,19 g). Pemisahan awal dilakukan dengan KCV karena jumlah sampel cukup banyak. Pemisahan selanjutnya dilakukan terhadap fraksi G (3,02 g) (eluen CHCl₃, CHCl₃ : MeOH (98:2, 96:4, 93:7 dan 9:1) dan metanol sehingga dihasilkan 4 fraksi (G1-G4). Fraksi G2 (401,1 mg) dipisahkan dengan kromatografi radial (eluen CHCl₃ : MeOH = 99:1 sampai dengan 90:10) menghasilkan fraksi G₂₁- G₂₄. Pemisahan dengan dilakukan dengan kromatografi radial karena terdapat senyawa-senyawa yang berpendar di bawah lampu ultraviolet sehingga selama pemisahan pergerakan sampel dapat dimonitor dengan lampu ultraviolet. Selanjutnya fraksi G₂₃ (124,5 mg) dipisahkan dengan kromatografi kolom gravitasi sephadex menggunakan pelarut metanol sehingga diperoleh senyawa campuran asam lemak metil ester atau senyawa **1** (11,7 mg; 0,02% dari 6- g ekstrak pekat metanol). Penggunaan kromatografi kolom sephadex dilakukan karena noda yang overlap sehingga dipisahkan berdasarkan ukuran molekul.

Pemisahan selanjutnya dilakukan terhadap fraksi G3 (407,5 mg) dengan kromatografi radial (CHCl₃:MeOH = 99:1; 97:3; 95:5; 93:7 dan 90:1) menghasilkan fraksi G₃₁ - G₃₄. Fraksi G₃₄ (95,5 mg) dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi radial (CHCl₃:MeOH = 95:5 ; 93:7 ; 92:8 ; 91:9 dan 9:1) menghasilkan campuran asam lemak atau senyawa **2** (17,6 mg; 0,029% dari 60 g ekstrak pekat metanol)

Identifikasi kedua senyawa tersebut dilakukan secara spektroskopi yaitu IR, NMR dan GC-MS. Spektrum IR senyawa **1** menunjukkan adanya gugus fungsi C-H alifatik (2854 dan 2924 cm⁻¹), karbonil ester (1714 cm⁻¹) dan alkoksi (1093 cm⁻¹). Spektrum ¹H-NMR mengindikasikan bahwa senyawa **1** merupakan campuran dari asam lemak metil ester dengan

adanya sinyal yang khas dari proton-proton metilen asam lemak pada δ H 1,25 ppm dan sinyal dari gugus metoksil pada δ H 3,64 ppm. Analisa GC-MS menunjukkan terdapatnya 3 campuran asam lemak metil ester yaitu pada waktu retensi (rt.) 18,89; 20,99 dan 21,27 menit. Perbandingan dengan database dari NIST08.LIB dan WILEY7.LIB menunjukkan bahwa senyawa dengan rt. 18,89 menit mempunyai ion molekul 270 adalah metil palmitat, rt. 20,99 dengan ion molekul 296 adalah metil oleat dan rt. 21,27 dengan ion molekul 298 adalah metil stearat. Berdasarkan data spektroskopi tersebut maka senyawa **1** merupakan campuran asam lemak metil ester yang terdiri atas metil palmitat (**1a**), metil oleat (**1b**), dan metil stearat (**1c**).



15

Gambar 1. Struktur senyawa **1** dan senyawa **2**

Spektrum IR senyawa **2** menunjukkan adanya gugus fungsi C-H alifatik (2854 dan 2924 cm^{-1}), karbonil ester (1707 cm^{-1}) dan alkoksi (1076 cm^{-1}). Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa **2** mirip dengan senyawa **1** kecuali pada senyawa **2** tidak ditemukan adanya gugus metoksil yang menunjukkan bahwa senyawa **2** adalah campuran asam lemak. Analisa GC-MS menunjukkan terdapatnya 4 campuran asam lemak yaitu pada waktu retensi (rt.) 18,89; 20,99, 21,27 dan 24,76 menit. Perbandingan dengan database dari NIST08.LIB dan WILEY7.LIB menunjukkan bahwa senyawa dengan rt. 18,89 menit adalah asam palmitat, rt. 20,99 adalah asam oleat; rt. 21,27 adalah asam stearat

25

dan rt. 24,76 adalah anhidrida stearat. Berdasarkan data spektroskopi tersebut maka senyawa **2** merupakan campuran asam lemak metil ester yang terdiri atas asam palmitat (**2a**), asam oleat (**2b**), asam stearat (**2c**) dan anhidrida stearat (**2d**).

3. Uji aktivitas antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan secara *in vitro* menggunakan metode paper disc. Kultur cair dari masing-masing bakteri uji sebanyak 1 ml diinokulasikan ke dalam cawan petri yang sudah berisikan 12 ml media NA dan diratakan. Sampel uji dibuat dengan konsentrasi yaitu 10000, 7500, 5000, 2500 dan 1250 ppm. Sampel yang telah dibuat dalam berbagai konsentrasi diteteskan pada kertas cakram dengan diameter 6 mm dan diletakkan diatas biakan yang sudah diinokulasikan kedalam cawan petri. Setiap cawan petri diletakkan 6 buah *paper disc*, dengan control negatif dan positif. Biakan tersebut diinkubasikan selama 48 jam. Aktivitas antibakteri ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar *paper disc*. Diameter zona bening terbentuk karena adanya daya antibakteri, yang diukur dengan menggunakan jangka sorong dengan perhitungan luas zona keseluruhan dikurang dengan luas cakram kertas.

Pengujian antibakteri senyawa **1** dan **2** dilakukan terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* memperlihatkan adanya zona keruh, baik terhadap bakteri *E. coli* maupun *B. subtilis*. Hal ini menunjukkan bahwa kedua senyawa ini bersifat sebagai antibakteri bakteriostatik yang bekerja dengan cara menghambat perbanyakan bakteri dengan tidak mematakannya terlihat dengan adanya zona keruh disekitar kertas cakram (Schunack, 1990).

Hasil pengujian antibakteri (Tabel 1) memperlihatkan bahwa senyawa **1** mempunyai aktivitas antibakteri lebih baik terhadap *E. coli* (dengan zona keruh 1-2,83 mm) dibandingkan

B. subtilis (dengan zona keruh 1-2.33 mm). Namun aktivitas antibakteri senyawa **1** terhadap kedua bakteri tersebut tergolong lemah. Senyawa **2** mempunyai aktivitas antibakteri (tabel 2) lebih baik terhadap *B. subtilis* (dengan zona keruh 1.49-5,66 mm) dibandingkan *E. coli* (dengan zona keruh 1-2.83 mm). Zona keruh yang dihasilkan senyawa **2** pada konsentrasi 10000 ppm dikategorikan sedang terhadap *B. subtilis* karena memiliki daya hambat lebih dari 5 mm.

10 Tabel 1. Uji antibakteri senyawa **1** terhadap *E. coli* dan *B. subtilis*

Senyawa 1	Konsentrasi (ppm)	Zona Keruh (mm)		Rata-rata
		Pengulangan		
		I	II	
<i>E. coli</i>	1250 (5)	1	1	1
	2500 (4)	1	2	1.5
	5000 (3)	2	2	2
	7500 (2)	3	2.6	2.83
	10000 (1)	3	2.66	2.83
	(Amoxicillin 1250) (+)	8.33	8	8.165
<i>B. subtilis</i>	1250 (5)	1	1	1
	2500 (4)	1	1.33	1.16
	5000 (3)	2	1.66	1.83
	7500 (2)	2	2.33	2.16
	10000 (1)	2.33	2.33	2.33
	(Amoxicillin 1250) (+)	7.33	6	6.66

Secara umum senyawa **1** dan senyawa **2** memiliki aktivitas antibakteri yang sama terhadap bakteri *E. coli* akan tetapi senyawa **2** dengan kandungan utamanya asam heksadekanoat (asam palmitat) memiliki aktivitas antibakteri yang lebih baik terhadap bakteri *B. subtilis* dibandingkan dengan senyawa **1** dengan kandungan utamanya metil palmitat. Hal ini sejalan dengan yang dilaporkan oleh Agoramoorthy *et al.* (2007) yang melaporkan bahwa senyawa asam lemak dengan kandungan utamanya asam palmitat aktif terhadap bakteri *E. coli* dan *B. subtilis*.

Tabel 2. Uji antibakteri senyawa **2** terhadap *E. coli* dan *B. subtilis*

Senyawa 2	Konsentrasi (ppm)	Zona Keruh (mm)		
		Pengulangan		Rata-rata
		I	II	
<i>E. coli</i>	1250 (5)	1	1	1
	2500 (4)	1.66	2	1.83
	5000 (3)	2	2	2
	7500 (2)	2	1.66	1.83
	10000 (1)	2.33	3.33	2.83
	(Amoxicillin 1250) (+)	9.33	9.33	9.33
<i>B. subtilis</i>	1250 (5)	1.66	1.33	1.49
	2500 (4)	3	3.66	3.33
	5000 (3)	4	5.66	4.83
	7500 (2)	4.33	5.33	3.83
	10000 (1)	5.33	6	5.66
	(Amoxicillin 1250) (+)	9.33	8.66	8.99

Klaim

1. Proses isolasi senyawa bersifat antibakteri *E.coli* dan
B. subtilis dari tumbuhan daun dewa yang meliputi tahap
5 berikut:
 - a. Mengeringkan dan menggiling tumbuhan daun dewa
(*Gynura pseudochina*);
 - b. Mengekstraksi tumbuhan tersebut dengan pelarut metanol
dan menguapkan pelarutnya.
 - 10 c. Memisahkan senyawa bersifat antibakteri menggunakan
berbagai teknik kromatografi (kromatografi cair vakum,
kromatografi radial dan kromatografi gravitasi kolom
sephadex).
- 15 2. Senyawa antibakteri yang didapat melalui proses pada
klaim 1.

Abstrak**PROSES ISOLASI SENYAWA ANTIBAKTERI DARI DAUN DEWA (*Gynura pseudochina*)**

5

Invensi ini berhubungan dengan proses isolasi senyawa antibakteri dari daun dewa (*Gynura pseudocina*), yang dibuat dari bagian daun tumbuhan daun dewa yang dikeringkan di udara terbuka dan digiling. Ekstraksi dilakukan pada suhu kamar menggunakan pelarut organik yang dilanjutkan dengan pemekatan. Ekstrak selanjutnya dipisahkan menggunakan pelarut organik yang dipilih dari n-heksana, etil asetat, aseton kloroform dan metanol. Produk kandungan kimia aktifnya berupa campuran asam lemak metil ester (11,7 mg) dan campuran asam lemak bebas (17,6 mg) menunjukkan aktivitas sebagai antibakteri pada konsentrasi 1250-10000 ppm.