

Isolasi dan Identifikasi Zat Antibakteri dan Antikuorum Sensing dalam Ekstrak Kelopak Bunga Rosela (*Hibiscus sabdariffa L.*)

(Isolation and Identification of Antibacterial Substance in Rosela (*Hibiscus sabdariffa L.*) Calyx Extract)

LISA SOEGIANTO^{1,2*}, TRIANA HERTIANI^{2,3}, SUWIJIYO PRAMONO^{2,3}

¹Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Farmasi, Unika Widya Mandala, Raya Kalisari Selatan
no. 1, Pakuwon City - Surabaya, 60112,

²Program Studi Magister Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Sekip
Utara, Yogyakarta, 55281,

³Laboratorium Fitokimia, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada Sekip Utara,
Yogyakarta, 55281

Diterima 5 September, Disetujui 15 September 2015

Abstrak: Pada penelitian ini, kelopak rosela dikeringkan kemudian dimaserasi dengan etanol 70% - HCl (99:1) kemudian difraksinasi berturut-turut menggunakan n-heksana, etil asetat, n-butanol dan air. Semua fraksi diuji aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *E. coli* dengan menggunakan metode difusi, aktivitas antibiofilm dan aktivitas antikuorum sensing terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. Fraksi etil asetat adalah fraksi yang paling aktif terhadap *S. aureus* menghasilkan daerah hambatan pertumbuhan pada konsentrasi 10% dan 20% sebesar $15,89 \pm 0,37$ mm dan $15,93 \pm 0,72$ mm, sedangkan terhadap *E. coli* sebesar $17,25 \pm 0,86$ mm dan $17,35 \pm 0,48$ mm pada konsentrasi 10% dan 20%. Pada uji aktivitas antibiofilm didapat % penghambatan pada *S. aureus* sebesar $62,05\% \pm 17,83$ dan pada *E. coli* sebesar $11,11\% \pm 23,13$, uji aktivitas antikuorum sensing memberikan daerah hambatan sebesar $19,23 \pm 1,52$ mm dan $20,89 \pm 2,35$ mm pada konsentrasi 10% dan 20%. Fraksi etil asetat dilakukan isolasi terhadap satu senyawa aktif dengan menggunakan metode VLC dan KLT preparatif kemudian diidentifikasi strukturnya dengan menggunakan spektrofotometer ¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY-NMR, HMBC dan LCMS. Berdasarkan data yang diperoleh diperkirakan terdapat sebuah senyawa turunan benzofuran.

Kata kunci: Kelopak rosela, antibakteri, antikuorum sensing, antibiofilm.

Abstract: This research was dried powder of Rosela calyx macerated with ethanol 70%-HCl (99:1) and then fractionated using n-hexane, ethyl acetate, n-butanol and water. All fraction was tested for antibacterial and antibiofilm activities by using the diffusion methods against *S. aureus* and *E. coli*. Quorum sensing inhibition was tested against *Pseudomonas aeruginosa*. Further fractionation was performed on the most active fraction by using VLC, followed by preparative TLC. Bioautography was done to guide the isolation of the active compound. Structure identification of the active compound was performed by analysing ¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, HMBC and LCMS data. The ethyl acetate fraction was the most active fraction against *S. aureus* showed by growth inhibition zone 15.89 ± 0.37 mm (concentration of 10%) and 15.93 ± 0.72 mm (concentration of 20%), while against *E. coli*, 17.25 mm (concentration of 10%) and 17.35 mm (concentration of 20%). Formation inhibition of *S. aureus* biofilm observed at $62.05\% \pm 17.83$ and $11.11\% \pm 23.13$ in *E. coli*. Antiquorum sensing activity was observed as 19.23 ± 1.52 mm (concentration of 10%) and 20.89 ± 2.35 m at a concentration of 20%. Identification of the partial structure of the active compounds resulted a benzofuran derivative compounds.

Keywords: Rosela calyx, antibacterial, antiquorum sensing, antibiofilm.

* Penulis korespondensi, Hp. 08123208814
e-mail: lisa.soegianto@yahoo.com

PENDAHULUAN

SEIRING dengan semakin meluasnya penyakit infeksi, resistensi mikroba terhadap antibiotika menjadi salah satu masalah kesehatan yang perlu ditangani secara serius. Selama ini pengobatan terhadap resistensi antibiotika lebih ditujukan pada sel dalam bentuk planktonik atau bentuk sel bebas yang berperan penting dalam proliferasi sel dan penyebaran sel. Adanya lapisan biofilm yang merupakan matriks ekstraseluler pelindung dari pengaruh luar serta metabolisme sel mikroba yang lebih lambat merupakan faktor yang mendukung terjadinya resistensi mikroba yang terkait biofilm⁽¹⁾. Salah satu pemicu terbentuknya biofilm itu sendiri adalah adanya komunikasi antar sel untuk memastikan jumlah sel mencukupi sebelum suatu spesies melakukan respon biologi khusus, atau yang dikenal dengan sistem quorum sensing⁽²⁾. Senyawa antikuorum sensing dapat mencegah komunikasi antar sel bakteri melalui molekul signal tetapi tidak membunuh bakteri⁽³⁾. Dengan demikian, penghambatan komunikasi antar sel tersebut diharapkan dapat menjadi salah satu strategi eradikasi penyakit infeksi, dikarenakan dapat mencegah bakteri membentuk biofilm dan menjadi patogen.

Kelopak Rosela (*Hibiscus sabdariffa L.*) telah dilaporkan mengandung asam organik (asam sitrat, asam hidroksisitat lakton), senyawa fenol (*protocatechuic acid*), flavonoid (*gossypetin-3-glucoside*, *gossypetin-8-glucoside*) dan antosianin (*hibiscin*, *cyanidine-3-β-D-glucoside*, *hibiscetin*, *delphinidine*, *sabdaretin*)⁽⁴⁾. Beberapa literatur menyebutkan manfaat antimikroba dari kelopak rosela antara lain: bersifat letal terhadap *Mycobacterium tuberculosis*⁽⁵⁾ serta mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus pyogenes*⁽⁶⁾. Oleh karena itu dalam penelitian ini akan ditentukan fraksi yang aktif sebagai antibakteri dan antibiofilm terhadap *S. aureus* dan *E. coli*, dan antikuorum sensing pada strain reporter *Pseudomonas aeruginosa* serta mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa aktifnya.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Kelopak rosela, kultur murni *Escherichia coli* 24 jam, kultur murni *Staphylococcus aureus* 24 jam, kultur murni *Pseudomonas aeruginosa* 24 jam, aquadest, media *Mueller Hinton Agar*, media *Tryptic Soy Broth*, media *Cetrimide*, NaCl 0,9 %, *crystal violet*, alkohol 96%. Seperangkat alat untuk membuat ekstrak, alat untuk uji antibakteri dan antikuorum sensing : cawan petri, *beaker glass*, pinset,

perforator, jangka sorong, mikropipet, *microplate 96 well*, inkubator.

METODE. Pembuatan Ekstrak Kelopak Rosela. Kelopak rosela (*Hibiscus sabdariffa Linn*) yang digunakan dalam penelitian ini diambil segar dari Kebun Pendidikan, Penelitian dan Pengembangan Pertanian (KP4) Universitas Gadjah Mada pada bulan Maret 2011 dan dideterminasi di laboratorium Biologi Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Kelopak Rosela kemudian dikeringkan dan diserbuk, dilakukan maserasi selama 24 jam dengan etanol 70%-HCl (99:1), kemudian diambil filtratnya dan dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50 °C.

Fraksinasi Senyawa Kelopak Rosela. Ekstrak kental dilarutkan dalam metanol-air (9:1) sebanyak 100 mL, kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah. Pelarut heksan ditambahkan dalam labu pisah dan dikocok secara perlahan-lahan kemudian didiamkan sehingga terjadi pemisahan antara fraksi heksan dan fraksi metanol-air. Fraksi heksan dipisahkan sedangkan fraksi metanol-air dipanaskan sehingga metanol menguap sampai habis dan yang tertinggal adalah fraksi air. Pelarut etil asetat ditambahkan kedalam fraksi air kemudian dilanjutkan dengan n-butanol, fraksi n-butanol dipisahkan dari fraksi air sehingga didapat 4 fraksi yaitu: fraksi heksana, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol dan fraksi air. Fraksi heksana dan fraksi etil asetat diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50 °C dan fraksi air diuapkan dengan *waterbath* suhu 60-80 °C sampai kering.

Uji Aktivitas Antibakteri Metode Difusi Sumuran⁽⁷⁾. Media agar overlay dibuat dengan menginokulasikan bakteri uji *S. aureus/E. coli* yang kekeruhannya setara dengan larutan ½ Mc Farland I. Masing-masing fraksi yang didapat disuspensikan dalam air dengan bantuan DMSO dibuat konsentrasi 10% dan 20%. Media agar *overlay* yang memadat dibuat sumuran dengan bantuan *perforator* diameter 6 mm. Masing-masing sumuran diisi dengan suspensi fraksi sebanyak 20 µL kemudian media agar *overlay* diinkubasi pada suhu 37 °C. Pengamatan daerah hambatan pertumbuhannya (DHP) dilakukan setelah inkubasi 24 jam dan dianalisis fraksi dengan DHP yang terbesar.

Uji Aktivitas Antibiofilm⁽⁸⁾. *Microplate U-bottom 96 well* diisi dengan media TSB sebanyak 100 µL, fraksi kelopak rosela sebanyak 100 µL (konsentrasi 1 mg/ml), suspensi bakteri (setara dengan ½ Mc Farland I) sebanyak 10 µL pada masing-masing sumuran kemudian ditutup dengan parafilm dan diinkubasi pada suhu 37 °C, 48 jam. Kelembaban dijaga dengan cara sebelum dimasukkan inkubator,

microplate diletakkan pada kotak tertutup yang diberi kertas saring basah. Setelah inkubasi, isi sumuran dibuang dan dibilas tiga kali dengan air mengalir dan dikeringkan.

Masing-masing sumuran diberi 200 μ L kristal violet 1% selama 15 menit pada suhu ruang (untuk mewarnai biofilm yang terbentuk) kemudian dibilas dengan air mengalir sebanyak tiga kali. Masing-masing sumuran diberi alkohol 96% teknis (untuk melarutkan cincin biofilm yang terbentuk), dibiarkan selama 15 menit. Masing-masing isi sumuran dipindahkan sebanyak 150 μ L ke dalam *microplate 96 well* yang baru dan dibaca densitas optiknya dengan *microplate reader* pada $\lambda = 595$ nm. Perhitungan % Penghambatan berdasarkan rumus⁽⁸⁾:

$$\% \text{penghambatan} = \left[1 - \frac{OD_{\text{biofilm}}}{OD_{\text{vehicle}}} \right] \times 100$$

$$OD_{\text{biofilm}} = OD_{\text{test}} - OD_{\text{blanko}}$$

Dimana:

- OD_{biofilm} = absorbansi lapisan biofilm yang terbentuk
 OD_{test} = rata-rata absorbansi tiap konsentrasi ekstrak/fraksi
 OD_{blanko} = rata-rata absorbansi blanko
 OD_{vehicle} = rata-rata absorbansi kontrol pembawa

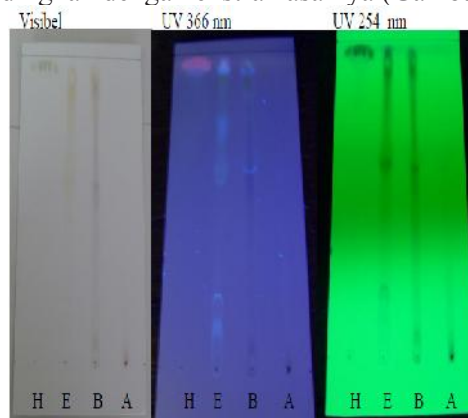
Uji Aktivitas Antikuorum Sensing⁽⁹⁾. Media agar *overlay* dibuat dengan menginokulasikan bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* yang kekeruhannya setara dengan larutan $\frac{1}{2}$ Mc Farland I. Masing-masing fraksi yang diperoleh disuspensikan dalam air dengan bantuan DMSO. Media agar *overlay* yang memadat dibuat sumuran dengan bantuan *perforator* diameter 6 mm. Masing-masing sumuran diisi dengan suspensi fraksi masing-masing 20 μ L (konsentrasi 8%, 4%, 2%) Media Agar *overlay* diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Adanya aktivitas antikuorum sensing dapat diamati berupa zona yang buram (*opaque*) sedangkan adanya aktivitas antibakteri dapat diamati berupa zona jernih (*transparan*).

Isolasi dan Identifikasi Senyawa Aktif. Senyawa aktif diisolasi menggunakan *Vacuum Liquid Chromatography (VLC)* dan kromatografi lapis tipis preparatif dengan penuntun uji bioautografi untuk mendapatkan senyawa yang mempunyai aktivitas antibakteri. Pemeriksaan kemurnian dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis dengan fase diam silika gel dan 3 macam fase gerak yang kepolarannya berbeda yaitu n-heksan-etil asetat (9:1), kloroform-karbon tetraklorida (7:1) dan kloroform 100% dan dengan *LC-MS (Chromatography-Mass*

Spectrometry). Identifikasi isolat yang sudah murni dilakukan dengan menggunakan spektroskopi IR dan NMR dengan data spektra $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, COSY dan HMBC. Bobot molekul dianalisis berdasarkan data *LC-MS*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak kental etanol-HCl yang diperoleh adalah sebanyak 314,3 g (32,07%), fraksi n-heksana 7,98 g (2,66%), fraksi etil asetat 118,92 g (39,64%), fraksi n-butanol 103,95 g (34,65%) dan fraksi air 51,81 g (17,27%). Fraksinasi yang dilakukan dapat memisahkan senyawa berdasarkan sifat kepolarannya sebagaimana ditunjukkan pada hasil KLT fraksi yang dibandingkan dengan ekstrak asalnya (Gambar 1).

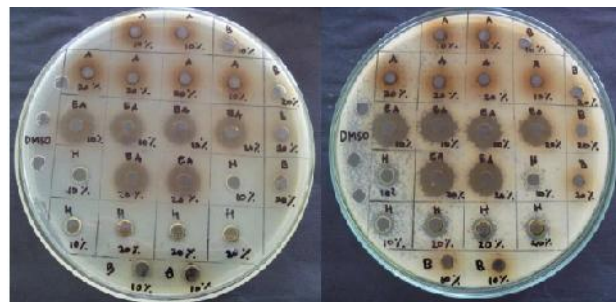


Gambar 1. Profil KLT hasil fraksinasi ekstrak kelopak rosela pada konsentrasi 5% sebanyak 5 μ L dengan fase diam silika gel dan fase gerak CHCl_3 -metanol-air(64:50:10).

Keterangan gambar :

H = fraksi n-heksana; E = fraksi etil asetat; B = fraksi n-butanol; A = fraksi air

Hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi terhadap bakteri Gram positif (*S. aureus*) dan bakteri Gram negatif (*E. coli*) (Gambar 2 dan Tabel 1) menunjukkan bahwa fraksi etil asetat mempunyai aktivitas antibakteri terbesar dibanding fraksi lain terhadap *S. aureus* dan *E. coli*.



Gambar 2. Hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi sumuran.

Keterangan gambar :

H 10% = fraksi n-heksana dengan konsentrasi 10% (2 mg/sumuran)
 H 20% = fraksi n-heksana dengan konsentrasi 20% (4 mg/sumuran)
 EA 10% = fraksi etil asetat dengan konsentrasi 10% (2 mg/sumuran)
 EA 20% = fraksi etil asetat dengan konsentrasi 20% (4 mg/sumuran)
 B 10% = fraksi n-butanol dengan konsentrasi 10% (2 mg/sumuran)
 B 20% = fraksi n-butanol dengan konsentrasi 20% (4 mg/sumuran)
 A 10% = fraksi air dengan konsentrasi 10% (2 mg/sumuran)
 A 20% = fraksi air dengan konsentrasi 20% (4 mg/sumuran)
 DMSO = kontrol pelarut (20 µl/sumuran)

Tabel 1. Hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi sumuran.

Fraksi	Konsentrasi (mg/sumuran)	DHP (mm)	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
n-heksana	2	ND	9,73 ± 1,12
	4	ND	11,83 ± 0,40
Etil asetat	2	15,89 ± 0,37	17,25 ± 0,86
	4	15,93 ± 0,72	17,35 ± 0,48
n-butanol	2	ND	ND
	4	ND	ND
Air	2	ND	ND
	4	ND	ND
Kontrol DMSO		ND	ND

Keterangan: DHP = diameter hambatan pertumbuhan; ND = *no detected activity*; diameter *paper disk*: 6 mm.

Tabel 2. menunjukkan bahwa ekstrak kasar kelopak rosela mempunyai persentase penghambatan pembentukan biofilm terbesar pada *S. aureus* dan *E. coli* dibandingkan fraksi-fraksinya, hal ini disebabkan karena ekstrak kasar mengandung lebih banyak senyawa yang berkontribusi terhadap aktivitas penghambatan pembentukan biofilm. Hal tersebut dapat melalui antara lain mekanisme penghambatan kuorum sensing dan penghambatan enzim yang menghasilkan biofilm.

Tabel 2. Hasil uji aktivitas penghambatan pembentukan biofilm ekstrak dan fraksi pada *S. aureus* dan *E. coli* dengan pembandingan Ampisilin pada kadar 1 mg/mL (n = 3).

Ekstrak/fraksi	% Penghambatan terhadap <i>S. aureus</i>	% Penghambatan terhadap <i>E. coli</i>
Etanol-HCl	84,34 ± 6,11	203,70 ± 151,32
n-Heksana	74,10 ± 16,52	14,82 ± 147,95
Etil asetat	62,05 ± 17,83	11,11 ± 23,13
n-Butanol	54,82 ± 17,40	192,59 ± 35,00
Air	75,30 ± 7,69	33,33 ± 37,04
Ampisilin	69,88 ± 25,76	140,74 ± 2,14

Aktivitas antikuorum sensing dapat diuji berdasarkan *Acylated Homoserine Lactone (AHL)-mediated density-dependent signaling* atau kuorum sensing yang terjadi ketika batas konsentrasi AHLs terakumulasi ke tingkat yang cukup untuk berinteraksi dengan reseptor protein. *P. aeruginosa* adalah salah satu bakteri patogen yang sangat poten karena menghasilkan sejumlah faktor virulensi (*elastase, pyocyanin, rhamnolipids, protease alkalin, dan eksotoksin A*). Faktor-faktor tersebut diatur oleh jalur AHL kuorum sensing sehingga *P. aeruginosa* dapat dijadikan model untuk regulasi gen yang diperantarai AHL⁽¹⁰⁾. Pembentukan biofilm diatur oleh tingkatan ekspresi gen yang densitasnya dikontrol oleh sinyal antar sel atau kuorum sensing. Dengan menghambat sinyal atau komunikasi antar sel maka pembentukan biofilm dapat dicegah.

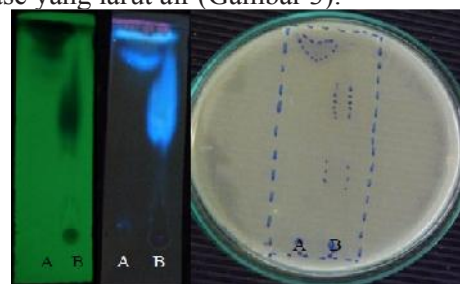
Tabel 3. menunjukkan hasil uji aktivitas antikuorum sensing bakteri *P. aeruginosa* dan diketahui bahwa fraksi etil asetat mempunyai aktivitas antikuorum sensing terbesar dibanding fraksi lain. Dengan adanya aktivitas antibakteri dan antikuorum sensing ini maka fraksi etil asetat kelopak rosela potensial untuk difraksinasi lebih lanjut untuk mengisolasi senyawa aktif.

Tabel 3. Hasil uji aktivitas anti kuorum sensing.

Fraksi	Konsentrasi (mg/sumuran)	DHP (jernih) mm	Antikuorum sensing (<i>opaque</i>) mm
Etil asetat	1,6	14,28 ± 0,74	18,49 ± 0,47
	0,8	11,57 ± 0,52	15,11 ± 0,80
	0,4	ND	12,35 ± 1,20

ND = *no detected activity*

Proses fraksinasi lebih lanjut dilakukan menggunakan *Vacuum Liquid Chromatography (VLC)* yang dilanjutkan dengan kromatografi lapis tipis preparatif. Hasil uji bioautografi digunakan sebagai penuntun dimana gabungan fraksi yang aktif dipisahkan menjadi 2 fase yaitu fase yang larut CHCl₃ dan fase yang larut air (Gambar 3).



Gambar 3. Profil KLT fase larut CHCl₃ (A) dan fase larut air (B) dengan fase diam silika gel dan fase gerak kloroform:metanol:air (64:50:10 v/v) serta hasil uji bioautografi dengan bakteri *S. aureus*.

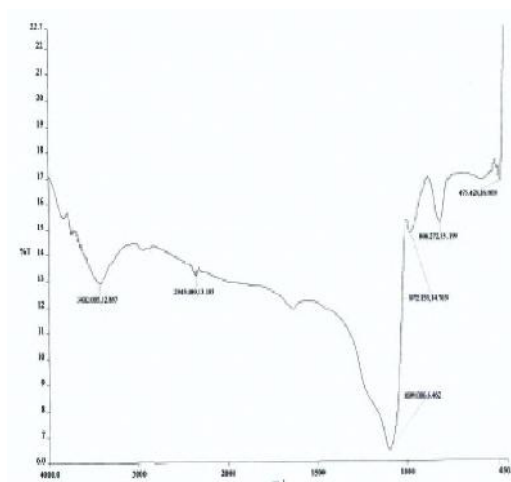
Keterangan : Konsentrasi bakteri = 1,5 x 10⁶ cfu/ml

Hasil pemurnian dengan kromatografi lapis tipis preparatif mendapatkan isolat yang mempunyai aktivitas antibakteri dan pemeriksaan kemurnian isolat dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis pada fase diam silika gel dan 3 macam fase gerak yang kepolarannya berbeda yaitu n-heksan-etil asetat (9:1), kloroform-karbon tetraklorida (7:1) dan kloroform 100%.

Isolat diuji kemurnian lebih lanjut dengan metode KLT dua dimensi (fase diam silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak I:n-heksan:Etil Asetat = 9:1 v/v, fase gerak II:Kloroform:Karbon Tetraklorida = 7:1 v/v). Hasil uji kemurnian menunjukkan satu bercak. Berdasarkan hasil *scanning* panjang gelombang bercak tersebut didapat profil spektra UV dengan puncak pada panjang gelombang 221 dan 278 nm. Puncak pada λ_{\max} 221 nm mengindikasikan adanya transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ dari sistem terkonjugasi (karakteristik pita konjugasi) dan merupakan ciri khas dari ester atau lakton tak jenuh sedangkan puncak pada λ_{\max} 278 nm mengindikasikan adanya transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ dari inti aromatik (karakteristik pita benzenoid) dan ciri khas untuk spektra molekul aromatik dan heteroaromatik⁽¹¹⁾. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi yang didapat mengandung gugus ester/lakton tak jenuh dan gugus aromatis tersubstitusi. Hasil identifikasi dengan lempeng klt menunjukkan informasi sebagai berikut:

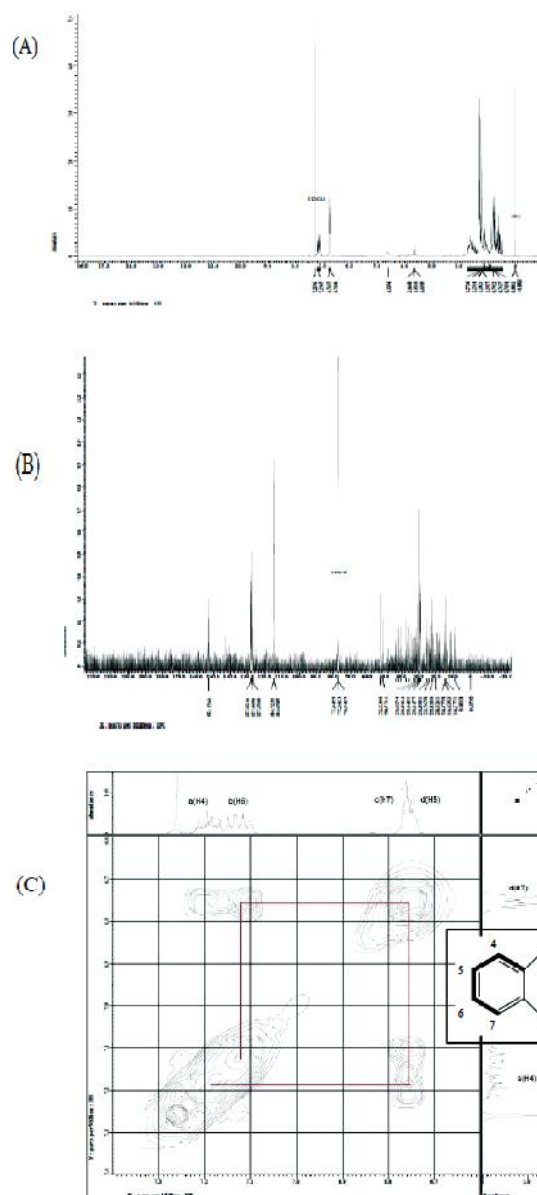
- Dengan eluen n-heksan : etil asetat = 9:1 ada noda pada hRf 44 dimana secara visibel noda isolat tidak menunjukkan adanya warna, UV 254 pada noda isolat mengalami peredaman fluoresensi, UV 366 noda isolat berwarna biru hitam hal ini mengindikasikan adanya ikatan rangkap terkonjugasi dalam isolat.
- Dengan anisaldehyda asam sulfat menghasilkan warna merah yang menunjukkan kemungkinan senyawa golongan terpenoid/steroid.
- Dengan AlCl₃ menghasilkan noda berwarna putih kekuningan pada sinar UV λ 366 nm, hal ini mengindikasikan tidak adanya senyawa golongan flavonoid.
- Dengan FeCl₃ menghasilkan noda yang berwarna putih dengan latar belakang kekuningan, ini mengindikasikan tidak adanya gugus fenol bebas;
- Dengan Dragendorff menghasilkan warna kuning pucat dengan latar belakang kuning tua yang mengindikasikan tidak adanya senyawa alkaloid.

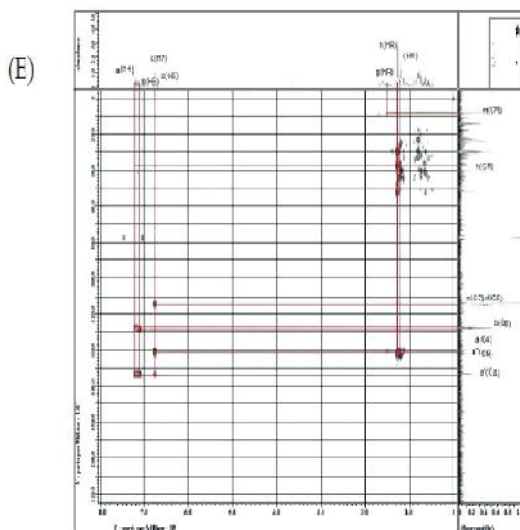
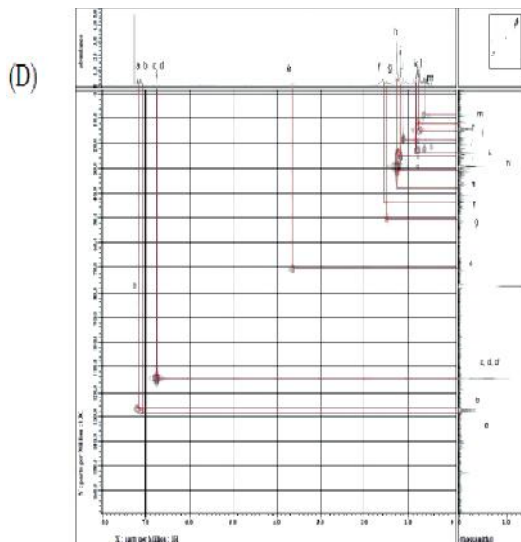
Spektra IR menunjukkan informasi adanya gugus hidroksil (-OH), C-H, C-O dan cincin aromatik (Gambar 4).



Gambar 4. Spektrum Infra Merah Isolat (dalam KBr).

Data ini didukung oleh hasil spektra ¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY- NMR, HMQC, HMBC yang ditunjukkan pada gambar 5 dan tabel 4.



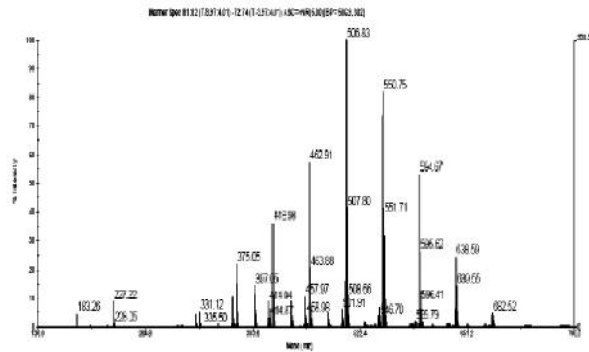


Gambar 5. Hasil spektra (A) ¹H-NMR, (B) ¹³C-NMR, (C) COSY-NMR, (D)HMQC, (E) HMBC.

Tabel 4. Data spektrum ¹H, ¹³C-NMR isolat, ¹H-¹H COSY, HMQC dan HMBC.

δH(ppm)	¹ H- ¹ H COSY	HMQC (δC ppm)	HMBC
		C4(144)	
		C9(153)	
7,18(H4)	H5	C5(127,2)	C9, C5, CR
7,10(H16)	H5	C7(128,2)	C9, C7
6,76(H5)		C8(114,6)	C4, C9, C8
6,74(H7)	H6	C6(114,6)	C6
3,65		(70,6)	
1,5		(51)	
1,7(HR)		CR(44)	CR
1,26(HR)		CR(37)	C4
1,26		(29)	
1,2(HR)		CR(20,4)	C4
1,13		(18)	
0,8		(0,8)	
0,7		(14,1)	
0,7		(12)	
0,6		CR(6)	

Penggabungan data yang diperoleh menunjukkan adanya gugus OH, C=O, C-O, dan cincin aromatis. Hasil LC-MS menunjukkan bahwa senyawa mempunyai ion pseudomolekular [M+H⁺] = 506 m/z dengan kemungkinan kehilangan fragmen [C₃H₇+H⁺]⁺ = 44 m/z (Gambar 6).



DAFTAR PUSTAKA

1. Wang R, Khan BA, Cheung GYC, Bach THL, Lee MJ, Kong KF, Queck SY, and Otto M. *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. The Journal of Clinical Investigation. <http://www.jci.org>. Volume 121 Number 1. 2011.
2. Pace, JL, Rupp ME, and Finch R. *Biofilms, infection and antimicrobial therapy*. Taylor and Francis Group. LLC. Boca Raton. 2006.
3. DeLeo FR, Otto M. *Bacterial pathogenesis, methods and protocols*. Humana Press; 2008. p.55-66
4. Odigie IP, Ettarh RR, Adigun SA. Chronic administration of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* attenuates hypertension and reserves cardiac hypertrophy in 2K-1C hypertensive rats. *J. Ethnopharmacol.* 2003. 86 (2-3) : 181-185.
5. Morton JF. *Roselle in: fruits of warm climate*. C.F. Dowling (ed). Media, Inc. Greensboro, NCP. 1987. pp. 281-86.
6. Limyati, DA dan Soegianto L. Aktivitas antibakteri ekstrak kelopak rosela (*Hibiscus sabdariffa* L.) terhadap *staphylococcus aureus* dan *streptococcus pyogenes*. PPOT Research Project, LPPM, Unika Widya Mandala Surabaya. Surabaya. 2008.
7. Benson. *Microbiological applications: laboratory manual in general microbiology*. Eighth Edition. The McGraw Hill companies. 2001.
8. Quave CL, Plano LRW, Pantuso C and Bennett BC. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*: 2008. 118. 418–28.
9. Nagy MM. Quorum sensing inhibitory activities of various folk-medicinal plants and the thymetetracycline effect. *Biology Dissertations, Paper 90*. Georgia State University Digital Archive @GSU. 2010.
10. Rice SA, McDougald D, Givskov M and Kjelleberg S. Detection and inhibition of bacterial cell–cell communication in DeLeo, F.R. dan Otto, M. *Methods in Molecular Biology, Bacterial Pathogenesis Methods and Protocols*, Humana Press., 2008, pp 55-68.
11. Supratman, U. *Elucidasi struktur senyawa organik*. Widya Padjadjaran, Bandung. Indonesia. 2010.