

1. a.

Moh. Adam Mustapa



Tumbuhan Senyawa Penghambat Bakteri

Moh. Adorn Mustopa Turnbuhdan Senyawa Penghambat Bakteri



TUMBUHAN SENYAWA PENGHAMBAT BAKTERI

Mohammad Adam Mustapa



IP.124.07.2014

Tumbuhan Senyawa Penghambat Bakteri

Moh. Adam Mustapa

Pertama kali diterbitkan dalam Bahasa Indonesia

Oleh Ideas Publishing, Juli 2014

Alamat:

Jl. Gelatik No. 24 Kota Gorontalo

Telp/Fax. 0435 830476

e-mail: infoideaspublishing@gmail.com

Anggota Ikapi, Februari 2014

Penata Letak, Ilustrasi dan Sampul

Tim Kreatif Ideas Publishing

ISBN : 978-602-1396-35-3

Hak cipta dilindungi oleh undang-undang
dilarang mengutip atau memperbanyak sebagian

Kata Pengantar

Indonesia merupakan negara tropis yang memiliki keanekaragaman tanaman hayati yang berpotensi sebagai sumber senyawa antimikroba. Salah satu tanaman yang berfungsi sebagai antimikroba adalah *Blumea mollis* (D.Don) Merr. Penggunaan antibiotik yang sembarangan telah menyebabkan bakteri patogen beradaptasi dengan lingkungan. Meningkatnya masalah resisten menyebabkan kebutuhan akan antibiotik baru juga meningkat. Namun sejauh ini belum pernah dilaporkan senyawa lain yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antibakteri pada herba *Blumea mollis* tersebut.

Mengingat pentingnya pencarian senyawa baru yang berpotensi terhadap mikroba, maka perlu dilakukan penelitian tentang isolasi dan identifikasi senyawa antimikroba yang terkandung dalam herba *Blumea mollis*.

Buku ini adalah implementasi penulis dari penelitiannya, yang mengidentifikasi senyawa dalam tumbuhan *Blumea mollis* (D.Don) apakah memiliki kandungan yang bermanfaat atau tidak.

Berdasarkan penelitian itu, ditemukan bahwa tumbuhan *Blume mollis* (D.Don) memiliki senyawa yang bermanfaat dalam penghambat bakteri.

Disadari buku ini masih perlu pembenahan, oleh karena itu diharapkan ada kritikan dan saran demi kesempurnaan buku ini selanjutnya. Akhir kata penulis ucapkan terima kasih yang mendalam kepada *Ideas Publishing* baik secara langsung maupun tidak langsung yang telah memberikan kontribusi demi penerbitan buku ini. Semoga amal bakti kita semua akan diridhai, diberkahi dan dirahmati Allah SWT. Diucapkan juga terima kasih kepada pihak-pihak yang ikut membantu dan bekerjasama sehingga memudahkan penulis mendapatkan data dan informasi guna penulisan buku ini.

Gorontalo Juli 2014

Penulis

Daftar Isi

Kata Pengantar.....	i
Daftar Isi	iii

Bagian 1

Mengenal Senyawa dalam Tumbuhan.....	1
--------------------------------------	---

Bagian 2

Tumbuhan <i>Blumea mollis</i> (D.Don) Merr.....	5
---	---

Bagian 3

Isolasi Senyawa Aktif.....	9
A. Ekstraksi.....	9
B. Kromatografi	10

Bagian 4

Uji Aktivitas Senyawa Aktif.....	15
A. Mikroba	15
B. Metode uji aktivitas <i>antimikroba</i>	18

Bagian 5

Penentuan Struktur Senyawa Aktif	25
--	----

Bagian 6

Pengujian Dan Hasil Senyawa Aktif Pada Tumbuhan <i>Blumea Mollis</i> (D.Don)	31
A. Pengujian senyawa Aktif pada Tumbuhan <i>Blumea Mollis</i> (D.Don)	31
B. Hasil Temuan dari Pengujian	33

Bagian 1

Mengenai Senyawa dalam Tumbuhan

Salah satu pencapaian paling besar dalam bidang ilmu Farmasi adalah pengendalian dan penatalaksanaan infeksi. Peran mikroba sebagai penyebab infeksi baru disadari dan dipahami saat Louis Pasteur merumuskan dan memformulasikan teori mikroba/germ theory 1853 - 1867. Dalam kurung waktu 1880 - 1910, banyak ditemukan bakteri patogen. Tetapi baru abad ke 20 dikembangkan terapi tertuju pada mikroba. Sejak dibuktikannya kemampuan penisilin dalam melawan infeksi pada manusia, dimulailah kemoterapi antibiotik. Dalam beberapa dasawarsa terakhir jumlah antibiotik yang dipasarkan bertambah banyak. Penggunaan antibiotik yang sembarangan telah menyebabkan bakteri patogen beradaptasi dengan lingkungan. Meningkatnya masalah resisten menyebabkan kebutuhan akan antibiotik baru juga meningkat. Oleh karena itu perlu dilakukan pencarian antibiotik baru (Martini dan Eloff, 1998; Ahmad dan Beg, 2001).

Sejak zaman dahulu masyarakat telah menggunakan tumbuhan untuk melawan berbagai penyakit, salah satunya penyakit infeksi. Hal ini dimungkinkan karena tumbuhan memiliki metabolit sekunder yang bertanggung jawab terhadap ketahanan alami. Samuelsson (1999) mengemukakan bahwa uji aktivitas fraksi-fraksi dari campuran senyawa produk alam akan menuntun dilakukan isolasi dan identifikasi senyawa struktur kimia yang bertanggung jawab terhadap aktivitas tersebut.

Penggunaan teknik mikrobiologi modern telah dapat mengungkap banyak senyawa dari tumbuhan yang mempunyai potensi antimikroba yang signifikan, yaitu terhadap bakteri maupun jamur patogen (Mitscher *et al.*, 1987).

Indonesia merupakan negara tropis yang memiliki keanekaragaman tanaman hayati yang berpotensi sebagai sumber senyawa antimikroba. Salah satu tanaman yang berfungsi sebagai antimikroba adalah *Blumea mollis* (D.Don) Merr. Senthikumar *et al.*, (2009) menunjukkan bahwa minyak atsiri dari *Blumea mollis* dapat digunakan sebagai bahan alam yang berpotensi terhadap antibakteri. Namun sejauh ini belum pernah

dilaporkan senyawa lain yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antibakteri pada herba *Blumea mollis* tersebut. Mengingat pentingnya pencarian senyawa baru yang berpotensi terhadap mikroba, maka perlu dilakukan penelitian tentang isolasi dan identifikasi senyawa antimikroba yang terkandung dalam herba *Blumea mollis*.

Bagian 2

Tumbuhan *Blumea mollis* (D.Don) Merr

Uraian Tumbuhan *Blumea mollis* (D.Don) Merr

1. Sistematika Tumbuhan *Blumea mollis*

Divisi : Spermatophyta

Sub Divisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledoneae

Bangsa : Asterales

Suku : Asteraceae

Marga : *Blumea*

Jenis : *Blumea mollis* (D.Don) Merr. (Becker,
1965 ; Steenis,1958)

2. Morfologi

Blumea mollis adalah tanaman, dengan batang tegak dan lembut rambut kelenjar. Daunnya petiolate dan tidak teratur bergigi. Bunganya berwarna ungu merah muda, dan diidentifikasi oleh Botanical Survey of India, Coimbatore. *B. mollis* adalah herba tahunan tumbuh tinggi 30-60 cm dan umumnya ditemukan di

dataran India, luar Himalaya, Sri Lanka dan Myanmar (Guha Bakshi *et al.*, 1999).



Gambar 1. Tanaman *Blumea mollis* (D.Don) Merr

3. Distribusi

Blumea mollis sebenarnya berasal dari daerah India, Sri langka dan Myanmar namun saat ini tanaman telah tersebar di berbagai daerah tropis termasuk Indonesia. Tanaman ini dapat tumbuh subur pada dataran rendah pada ketinggian 1400 meter di atas permukaan laut (Guha Bakshi *et al.*,1999).

4. Kegunaan

Daun *Blumea mollis* digunakan untuk penyakit kulit dan juga untuk mengobati diare (Guha Bakshi *et al.*, 1999).

5. Kandungan kimia

Komponen kimia minyak atsiri dari daun *Blumea mollis* adalah linalool (19,43%), γ - elemene (12,19%), copaene (10,93%), estragola (10,81%), allo-ocimene (10,03%), γ -terpenone (8,28%) dan alloaromadendrene (7,44%). (Guha Bakshi *et al.*, 1999).

Bagian 3

Isolasi Senyawa Aktif

A. Ekstraksi

Ekstraksi atau penyarian, merupakan perpindahan massa zat aktif yang semula berada didalam sel, ditarik oleh cairan penyari sehingga zat aktif tersebut larut dalam cairan penyari (Anonim, 1986). Penyarian berfungsi untuk memisahkan suatu zat yang diinginkan dari sistem campuran. Mekanisme penyarian melibatkan peristiwa difusi pelarut kedalam senyawa campuran (Sing *et al.*, 1980). Metode penyarian yang biasa digunakan antara lain adalah maserasi, perkolasi, infuse, sokletasi dan destilasi (Houghton dan Raman, 1998). Menurut Robinson (1995) bahan tumbuhan yang akan diisolasi kandungan kimia harus dipersiapkan sedemikian rupa dan perlu dihindari terbentuknya senyawa yang tidak diinginkan. Jika jaringan hidup diproses terlalu lambat, maka aktivitas enzim dapat menimbulkan perubahan yang besar pada kandungan kimia tertentu (Samuelson, 1999).

Maserasi merupakan penyarian yang paling baik digunakan untuk bahan yang berupa serbuk halus. Dalam proses maserasi, bahan yang berupa serbuk ditempatkan dalam wadah atau bejana yang bermulut lebar, tertutup rapat dan dikocok berulang-ulang, biasanya berkisar 1 - 4 hari. Pengocokan berulang ini memungkinkan pelarut masuk keseluruh permukaan serbuk. Melalui usaha ini dijamin suatu keseimbangan konsentrasi bahan ekstrak yang lebih cepat ke dalam penyari. Keadaan diam menyebabkan sebagian bahan aktif tidak mengalami perpindahan. Hasil ekstraksi yang diperoleh disimpan dingin beberapa hari, selanjutnya cairan dituang dan disaring (Voight, 1995).

B. Kromatografi

Pemisahan dan pemurnian kandungan tumbuhan dapat dilakukan dengan menggunakan salah satu dari empat teknik kromatografi atau gabungan dari teknik kromatografi. Keempat tehnik kromatografi itu adalah : Kromatografi Kertas (KKt), Kromatografi Lapis Tipis (KLT), Kromatografi Gas Cair (KGC), dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) (Harborne, 1987).

Pemisahan secara kromatografi dari berbagai senyawa dalam cuplikan berdasarkan pada perbedaan kecepatan migrasi dan peyebaran dari molekul-molekul senyawa yang merupakan hasil keseimbangan distribusi dari senyawa-senyawa dalam cuplikan antara fase diam dan fase gerak. Perbedaan kecepatan migrasi berhubungan dengan perbedaan kecepatan gerak dari senyawa-senyawa yang berbeda sepanjang kolom dan migrasi merupakan hasil distribusi keseimbangan dari senyawa-senyawa antara fase diam dan fase gerak (Sudjadi, 1985).

Dalam kromatografi, hidrokarbon jenuh akan terserap sedikit atau tidak sama sekali penyerapan hidrokarbon tidak jenuh akan meningkat seiring dengan meningkatnya ikatan rangkap. Oleh karena itu, dalam proses pemisahan harus menggunakan suatu penyerap yang aktif dan pelarut pengembang yang kurang polar (Stahl, 1985).

1. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis merupakan metode pilihan untuk pemisahan semua kandungan yang larut dalam lipid, yaitu : lipid, steroid, karotenoid, kuinon sederhana, dan klorofil (Robinson,1991). Kromatografi

Lapis Tipis memiliki kelebihan dibandingkan teknik kromatografi lainnya, yaitu : Kecerbangan, kecepatan, dan kepekaan. Kecerbangan KLT disebabkan oleh kenyataan bahwa sejumlah penyerap yang berbeda-beda dapat disaputkan pada pelat kaca atau penyangga lain dan digunakan untuk kromatografi. Walaupun silika gel paling banyak digunakan, lapisan dapat pula dibuat dari alumunium oksida, ceteli, kalsium hidroksida, damar penukar ion, magnesium fosfat, poliamida, sephadex, polivinil pirolidon, selulosa, dan campuran dua bahan diatas atau lebih. Kecepatan KLT yang lebih besar disebabkan oleh sifat penyerap yang lebih padat bila disaputkan pada pelat dan memberikan keuntungan dalam menelaah senyawa labil. Kepekaan KLT disebabkan karena dapat memisahkan bahan yang jumlahnya lebih sedikit dari ukuran ug (Harborne, 1987).

2. Kromatografi Lapis Tipis Preparatif

Hal yang harus diperhatikan pada Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) adalah penyaputan pelat kaca dengan penyerap. Pelat kaca harus dibersihkan hati-hati dengan aseton untuk menghilangkan lemak.

Kemudian bubur silica gel atau penyerap lainnya dalam air harus dikocok kuat-kuat selama jangka waktu tertentu (misalnya 90 detik) sebelum penyaputan. Apabila diperlukan, penambahan kalsium sulfat hemihidrat (15%) untuk membantu melekatkan penyerap pada plat kaca. Setelah penyaputan, plat harus dikeringkan pada suhu kamar dan kemudian diaktifkan dengan pemanasan dalam tanur pada suhu $100 - 110^{\circ} \text{C}$ selama 30 menit (Harborne, 1987)

Kromatografi Lapis Tipis Preparatif merupakan metode yang relatif sederhana, murah, cepat dan memiliki daya pisah yang cukup baik. Metode ini tidak dianjurkan untuk pemisahan awal, tetapi digunakan untuk pemurniaan akhir dalam prosedur isolasi senyawa (Harborne, 1987).

3. Kromatografi Cair Vakum

Pada Kromatografi Cair Vakum, kolom dikemas secara kering (biasanya dengan penyerap mutu KLT 10 - 40 μm) dalam keadaan vakum agar diperoleh kerapatan kemasan yang maksimum. Cuplikan dilarutkan dalam pelarut yang cocok, dimasukkan langsung pada bagian atas kolom atau pada lapisan prapenyempurnaan dan dihisap

perlahan-lahan ke dalam kemasan dengan memvakumkannya. Kolom dielusi dengan pelarut yang cocok, mulai dengan pelarut yang kepolarannya rendah kemudian ditingkatkan kepolarannya perlahan-lahan, kolom dihisap sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi (Hostettmann *et al.*, 1995).

4. Kromatografi Gas

Kromatografi Gas merupakan metode analisis yang didasarkan pada pemisahan fisik zat organik dan anorganik bersifat yang stabil pada pemanasan dan mudah diatsirikan (Grob, 1977).

Kromatografi Gas (KG) merupakan metode yang cepat dan tepat untuk memisahkan campuran yang sangat rumit. Kromatografi gas dapat dipakai untuk setiap campuran yang sebagian besar komponennya mempunyai tekanan uap yang berarti pada suhu yang dipakai untuk pemisahan. Tekanan uap atau keatsirian memungkinkan komponen menguap dan bergerak bersama-sama dengan fase gerak yang berupa gas. Komponen campuran dapat diidentifikasi dengan penggunaan waktu lambat (waktu retensi) yang khas pada kondisi yang tepat (Gritter *et al.*, 1991)

Bagian 4

Uji Aktivitas Senyawa Aktif

A. Mikroba

Mikroba yang seringkali berhubungan dengan aktifitas hidup manusia adalah bakteri Gram positif *Staphylococcus aureus*, bakteri Gram negatif *Escherichia coli*, dan jamur *Candida albicans*.

1. Bakteri Gram positif *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri yang berbentuk bulat dengan diameter 1 um, biasanya hidup bergerombol seperti buah anggur. Dalam media cair dapat berbentuk tunggal berpasang-pasangan, berempat atau membentuk rantai. Sejumlah besar *S. aureus* ditemukan pada udara, debu, baju, dan popok bayi. Jika terdapat pada popok bayi yang baru dilahirkan (Jawetz et al., 2001).

Salah satu *Staphylococcus* yang penting dan banyak berhubungan dengan manusia adalah *S. aureus*. Bakteri ini dapat memfermentasi laktosa, bersifat proteolitik,

memproduksi koagulase, memproduksi pigmen, lipase dan menghasilkan zone hemolisis aerobik pada piringan agar darah serta tumbuh pada media yang mengandung natrium klorida 0,9 %. Bakteri *S. aureus* biasanya ditemukan pada kulit membran serta menimbulkan suatu penyakit tertentu. Bakteri ini dapat menyebabkan bisul, borok dan nanah pada luka. Sumber infeksiya pada kulit dan saluran pencernaan (Jawetz et al., 2001).

Menurut Jawetz *et al.*, (2001) *Staphylococcus aureus* dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Divisi	: Schizomycota
Kelas	: Shizomycetes
Bangsa	: Eubacteriales
Suku	: Micrococcaceae
Marga	: Staphylococcus
Jenis	: <i>Staphylococcus aureus</i>

2. Bakteri Gram negatif *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan bakteri Gram negatif yang berbentuk batang, dapat berderet seperti rantai dan merupakan flora yag paling banyak diusus. Bebeapa galur *E. coli* dapat menghasilkan eksotoksin yang tidak tahan panas yang padat meningkatkan sekresi air dan

klorida ke dalam lumen usus dan menyebabkan hipermotilitas yang dapat menyebabkan diare ringan pada anak-anak (Jawetz et al., 2001).

E. coli dapat menyebabkan diare karena menghasilkan enterotoksin yang disebut *enterotoksokogenik E. coli* (ETEC) serta mempunyai kemampuan tertentu untuk memasuki epitel usus yang disebut enteroinvasif *E. coli* (EIEC). Bakteri ini tidak menimbulkan penyakit bila di dalam usus, tetapi akan menimbulkan penyakit apabila telah mencapai jaringan seperti saluran kencing, paru, saluran empedu, peritoneum, dan selaput otak. *E. coli* diekresikan dalam jumlah yang besar dalam feses, menyebabkan kontaminasi lingkungan termasuk tanah (Jawetz et al., 2001).

Menurut Jawetz et al., (2001) *Escherichia coli* dapat diklasifikasikan sebagai berikut

Divisi	: Prokaryotae
Kelas	: Eubakteriales
Bangsa	: Schizomycetes
Suku	: Enterobacteriaceae
Marga	: Escherichia
Jenis	: Escherichia coli

3. Jamur *Candida albicans*

Candida albicans adalah jamur berbentuk lonjong yang menghasilkan pseudomiselium dan merupakan flora normal pada selaput lender saluran pernafasan, saluran pencernaan, maupun saluran genitalia wanita. *C. albicans* dapat menimbulkan infeksi dalam aliran darah, endokardiasis, atau infeksi pada mata dan organ lainnya bila disuntikan intravena (Jawetz *et al.*, 2001).

Menurut Jawetz *et al.*, (2001) jamur *C. albicans* dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Divisi	: Thallophyta
Anak divisi	: Fungi
Kelas	: Eumycetes
Anak kelas	: Deuteromycetes
Bangsa	: Moniliaceae
Marga	: Candida
Jenis	: <i>Candida albicans</i>

B. Metode uji aktivitas antimikroba

Antibakteri adalah obat pembasmi mikroba terutama mikroba yang merugikan manusia. Berdasarkan mekanisme kerjanya, antimikroba ada yang

bersifat menghambat pertumbuhan mikroba dikenal sebagai aktivitas bakteriostatik dan ada yang bersifat membunuh mikroba dikenal sebagai aktivitas bakterisida. Antimikroba memiliki aktivitas tertentu yang dapat meningkatkan dari aktivitas bakteriostatik menjadi aktivitas bakterisida, bila kadar antimikroba ditingkatkan melebihi KHM (konsentrasi hambat minimal).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antimikroba dibagi dalam 5 kelompok yaitu : 1) Mengganggu metabolisme sel mikroba, 2) Menghambat sintesis dinding sel mikroba, 3) Mengganggu permeabilitas membrane sel mikroba, 4) Menghambat sintesis protein sel mikroba, 5) Menghambat atau sintesis atau merusak sintesis asam nukleat sel mikroba (Setiabudi dan Gan, 1995).

Antifungi adalah obat yang dipakai sebagai pelindung terhadap fungi. Istilah antifungi mempunyai dua pengertian yaitu fungisidal dan fungistatik. Fungisidal diartikan sebagai senyawa yang dapat membunuh fungi, sedangkan fungistatik dapat menghambat pertumbuhan fungi tanpa mematikan

(marsh., 1997). Mekanisme antifungi dapat dikelompokkan menjadi :

1. Gangguan pada membran sel. Akibat mekanisme ini dapat mempengaruhi permeabilitas sel, sehingga sel akan kehilangan isi sel contoh senyawa adalah ion kalium. Antibiotik polien juga dapat membentuk kompleks dengan sterol dan merusak fungsi membran. Mekanisme ini menimbulkan efek fungisidal.
2. Penghambatan sintesis kitin. Penghambatan sintesis kitin merupakan mekanisme yang paling ideal dan selektif tampak memberikan efek samping pada manusia atau tumbuhan. Contohnya senyawa polyxin.
3. Penghambatan sintesis asam nukleat dan protein. Contohnya sikloheksemia, blastidin, gliseofulvin, 5-fluorositosin. Penghambatan pada sintesis asam nukleat dan protein ini hanya menimbulkan efek fungiostatik.
4. Penghambatan produksi energi oleh ATP. Hal ini dapat terjadi dengan cara penghambatan respirasi atau menghalangi terjadinya fosforilasi oksidatif yang terjadi di sitoplasma atau mitokondria.

Mekanisme ini mempunyai efek fungisidal (Marsh, 1997).

Uji aktivitas antimikroba secara umum dapat dikelompokkan menjadi 3 yaitu metode difusi, metode dilusi dan metode bioautografi.

a. Metode Difusi

Metode ini tidak membutuhkan dispersi yang homogen dari zat uji didalam media berair. Zat uji diserapkan pada cakram kertas saring atau ditempatkan pada media dan zat uji dibiarkan melakukan kontak dengan kultur mikroba uji (Rios *et al.*, 1988). Kelemahan metode ini karena tidak bisa digunakan untuk semua jenis mikroba misalnya mikroba dengan pertumbuhan lambat ataupun anaerob obligat. Uji ini distandarisasi pada suhu inkubasi 37°C, sehingga resistensi antimikroba tertentu yang seharusnya terdeteksi pada suhu 37°C menjadi tidak terdeteksi (Barry dan Thornsberry, 1991).

b. Metode Dilusi

Metode Dilusi memerlukan dispersi yang homogen dari zat uji dalam media berair (Rios *et al.*, 1988). Keunggulan metode ini adalah dapat mendeteksi pola resistensi tertentu yang tidak dapat terdeteksi dengan metode difusi. Menurut Sham dan Washington II (1991), metode ini dapat digunakan untuk menetapkan Konsentrasi Hambatan Minimum (KHM) dari suatu senyawa aktif. Wahyuono (1991) menggunakan metode dilusi agar dengan media trypticase Soy Agar (TSA) untuk mendeteksi aktivitas antiinfeksi senyawa aktif dari *Artemisia pacifica* Nutt, dan untuk membantu disperse zat uji digunakan dimetilsulfoksida (DMSO) 2 %.

c. Metode Bioautografi

Metode ini dapat dikatakan sebagai metode yang paling efisien untuk mendeteksi adanya senyawa yang mempunyai aktivitas antimikroba karena letak bercak senyawa yang mempunyai aktivitas dapat ditentukan, meskipun berada dalam campuran yang kompleks, dengan demikian

dimungkinkan untuk melakukan isolasi senyawa aktif tersebut dalam bioautografi lapis tipis dari ekstrak yang dikehendaki, diletakkan menempel pada permukaan agar mikrobiologi yang telah disemai dengan mikroba yang dikehendaki. Lempeng tetap dalam keadaan kontak dengan media uji selama periode inkubasi yang dikehendaki untuk pertumbuhan mikroorganisme uji. Dalam kasus ini sampel dipisahkan dengan metode KLT, kemudian lempeng KLT dikeringkan dari sisa-sisa larutan pengembang dan kemudian uji biologi dilakukan di atas permukaan lempeng KLT. Setelah waktu inkubasi tertentu, suatu zone hambatan akan teramati pada nilai R_f (*retardation factor*) senyawa aktif (Wright, 1998).

Bagian 5

Penentuan Struktur Senyawa Aktif

Penetapan struktur senyawa lebih banyak dilakukan dengan metode spektroskopi karena sangat cepat dan hanya memerlukan sampel dalam jumlah milligram bahkan mikrogram. Di samping itu data tentang asal senyawa, metode isolasi, tahapan sintesis dan informasi-informasi senyawa analog sangat membantu pada penetapan struktur senyawa organik. Seringkali senyawa-senyawa yang strukturnya kompleks dapat dielusidasi dengan cepat karena sebagian dari struktur senyawa tersebut telah diketahui (Silverstein *et al.*, 1981).

Sejauh ini terdapat empat metode spektroskopi yang banyak dan umum digunakan untuk penetapan struktur suatu senyawa yaitu Spektrofotometri Ultra violet, Spektrofotometri inframerah, Spektrometri masa dan Spektrometri resonansi magnetic inti.

1. Spektrofotometri Ultra Violet (UV)

Molekul suatu senyawa dapat mengabsorpsi energi pada panjang gelombang ultraviolet dan sinar tampak. Absorpsi molekuler pada daerah tersebut tergantung pada struktur elektronik molekul. Besarnya energi yang diabsorpsi bersifat terkuantisasi dan tergantung pada struktur elektroniknya. Spektrogram ultraviolet merupakan penggambaran antara panjang gelombang dari energi yang diserap oleh suatu molekul tergantung pada keberadaan gugus kromofor dan gugus auksokrom. (Silvestein *et al.*, 1981). Meskipun sangat terbatas pada kromofor, namun spektrofotometri ini sangat bermamfaat untuk diagnosis karena dapat menetapkan adanya sistem elektron π dan ikatan rangkap terkonjugasi (Markham, 1988). Dengan metode spektrofotometri ultra violet akan didapat spektrogram yang menggambarkan keberadaan kromofor dalam molekul senyawa yang dianalisis.

2. Spektrofotometri Inframerah (IR)

Daerah inframerah mencakup daerah spektrum elektronik yang lebar yakni antara visibel dan mikrowav, sehingga molekul yang sangat sederhana

pun dapat memberikan spektrum yang kompleks. Frekuensi serapan molekul tergantung pada masa relatif atom-atom, konstanta kekuatan ikatan dan bentuk geometri dari atom-atom. Daerah inframerah dapat dikelompokkan menjadi pita-pita serapan antara 4000 - 1300 cm^{-1} yang disebut wilayah serapan gugus fungsional, antara 1600 - 1300 cm^{-1} yang disebut wilayah sidik jari (khas untuk tiap-tiap molekul), serta antara 900 - 650 yang disebut serapan aromatik (Silverstein *et al.*, 1981). Karena setiap tipe ikatan yang berbeda akan memiliki frekuensi vibrasi yang berbeda maka dua molekul yang berbeda tidak akan mempunyai pola absorpsi infra merah yang sama (Pavia *et al.*, 1979). Gugus-gugus tertentu dalam molekul memberikan pita serapan pada frekuensi yang tetap atau hampir tetap walaupun keberadaan gugus dalam struktur molekul yang bersangkutan berlainan. Hal ini memberikan informasi yang sangat berguna untuk menentukan struktur molekul (Silverstein *et al.*, 1981).

3. Spektrometri Massa (SM)

Spektrometri massa merupakan metode analitik yang paling banyak digunakan untuk analisis kuantitatif maupun kualitatif komposisi atom maupun molekuler senyawa organik dan anorganik. Karena sensitifitas dan spesifitasnya cukup tinggi maka metode ini dapat digunakan untuk identifikasi senyawa yang belum diketahui atau untuk mengkonfirmasikan adanya komponen yang dicurigai (Willard *et al.*, 1988). Pada analisis dengan metode spektrometri massa, senyawa yang dianalisis dalam wujud gas dibombardir dengan berkas elektron berenergi tinggi sehingga molekul senyawa tersebut membentuk ion positif yang selanjutnya terfragmentasi menjadi sejumlah radikal-radikal dan ion positif yang bermassa lebih kecil. Ion-ion positif ini kemudian direkam sehingga dapat diketahui massa molekul dan pola fragmentasi dari senyawa yang dianalisis (Silverstein *et al.*, 1981).

4. Spektrometri Resonansi Magnet Inti (RMI)

Atom-atom tertentu seperti ^1H dan ^{13}C jika ditempatkan dalam medan magnet yang kuat akan dapat beresonansi dengan radiasi elektromagnetik pada

wilayah frekuensi radio. Atom-atom yang demikian disebut sebagai spin aktif yang resonansi dapat direkam. Jadi spektrum resonansi magnet inti merupakan rekaman dari frekuensi atom-atom yang intensitas dan letaknya tergantung pada posisi atau lingkungan atom ^1H atau ^{13}C di dalam molekul senyawa yang dianalisis (Silverstein *et al.*, 1981). Frekuensi yang diabsorpsi oleh atom-atom ^1H dan ^{13}C dinyatakan dengan bilangan relatif yang merupakan pergeseran (δ) dari frekuensi absorpsi zat standar internal yang diberi nilai 0 umumnya digunakan tetrametilsilan (TMS) (Harborne, 1987; Silverstein *et al.*, 1981). Besarnya pergeseran tergantung dari keadaan lingkungan disekitar atom-atom ^1H dan ^{13}C tersebut didalam molekul. Besarnya geseran kimia dalam spektrum RMI dapat diketahui lingkungan atau gugus tempat keberadaan atom atom ^1H dan ^{13}C dalam molekul. Selain itu intensitas atau luas area dari puncak-puncak sinyal-sinyal berbanding lurus dengan jumlah atom atom spin aktif dalam molekul yang dianalisis. Hasil integrasi dari luas area pada spektrum RMI memberikan informasi tentang perbandingan jumlah atom-atom spin aktif dalam molekul tersebut

(Silverstein *et al.*, 1981). Adanya sistem kopling antara atom-atom H serta antar atom H dengan atom C juga memberikan informasi tentang gugus-gugus yang saling berdekatan (Sanders dan Hunter, 1988).

Bagian 6

Pengujian Dan Hasil Senyawa Aktif Pada Tumbuhan *Blumea Mollis* (D.Don)

A. Pengujian senyawa Aktif pada Tumbuhan *Blumea Mollis* (D.Don)

1. Bahan

a. Bahan Herba

Herba *Blumea mollis* (D.Don) Merr, diambil dari Taman Nasional Gunung Merapi Kaliurang Yogyakarta pada bulan Desember 2009. Herba yang diambil adalah tumbuhan liar dan dipilih yang mempunyai warna bunga yang sama. Herba ini diidentifikasi di laboratorium Farmakognosi, bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

b. Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan untuk penyarian dan fraksinasi adalah bahan kimia dengan derajat kemurnian teknik yang telah didestilasi ulang. Bahan kimia yang digunakan untuk fraksinasi sari dan untuk fase gerak kromatografi serta uji aktivitas

antimikroba serta spektroskopi semuanya berderajat pro analisa.

c. Mikroba uji

Mikroba uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* dan *Candida albicans*. Mikroba uji diperoleh dari koleksi Laboratorium mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

d. Media Uji

Media untuk pertumbuhan bakteri digunakan : Brain Heart Infusion (BHI), Muller Hinton Agar (MHA), Nutriean Agar (NA) dan NaCl 0,9 %, sedangkan untuk jamur digunakan, CYG, Sabouroud Dextrose Agar (SDA), dan NaCl 0,9 %.

2. Alat

a. Alat-alat untuk Ekstraksi dan Pemurniaan

Labu erlemeyer gelas piala, corong pisah, pipet dan alat-alat gelas lainnya, corong buchner, pengaduk vortek, pengaduk magnetic,

evaporator (MRK-Heydolph vacuum evaporator typ. VVI), lempeng kromatografi.

b. Alat-alat untuk uji Aktivitas Antimikroba

Gelas petri, tabung ose, pipet mikro, neraca analitik (Ohaus Analytical Plus), otoklaf (Sakura model ac - 300 ae), kotak aseptis, incubator (napco model 320).

c. Alat-alat untuk Identifikasi Senyawa

Spektrofotometer Ultra Violet (Shimadzu uv-366), Spektrofotometer Infra merah (perkin elmer spektrum 1000), Spektrometer Massa (Varian Mat 311 A dengan Pengion semprot Elektron /Electrospray Ionization (ESI), Spektrometer Resonansi Magnetic Inti (Bruker 400 MHz).

B. Hasil Temuan dari Pengujian

1. Determinasi Tanaman

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini, diambil pada bulan september 2009 dan dideterminasi dengan berpedoman pada buku Flora of Java

(Becker, 1965; Steenis, 1958) di Laboratorium bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta.

Hasil determinasi tanaman *Blumea mollis* (D. Don) Merr adalah sebagai berikut :

1b - 2b - 3b - 4b - 12b - 13b - 14b - 17b - 18b
- 19b - 20b - 21b - 22b - 23b (*Asteraceae*).

1b - 3b - 33b - 41b - 82b - 85b - 96b - 100b -
102 - 114b - 115b - 116a (*Blumea*).

1b - 2b - 4b - 9b - 11b - 13b - 14a (*Blumea mollis* (D. Don) Merr).

Berdasarkan hasil determinasi di atas didapat kepastian bahwa tanaman yang dideterminasi dan akan dipakai dalam penelitian ini adalah spesies *Blumea mollis* (D. Don) Merr. Surat keterangan mengenai determinasi yang telah dilakukan.

2. Hasil Penyarian

Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi. Tidak menggunakan metode lain seperti sokletasi karena dalam metode tersebut *Blumea mollis* mengalami pemanasan yang terus menerus sehingga dikhawatirkan zat aktifnya mengalami kerusakan, sementara dengan

metode maserasi cukup dilakukan perendaman dan pengadukan. Hal lain yang dipertimbangkan adalah kandungan air dalam blumea yang cukup banyak, sehingga metode maserasi merupakan pilihan yang cukup tepat.

mollis seberat 360 g dimaserasi selama 3 kali 24 jam dengan pelarut washbenzen sebanyak 4 liter. Pemilihan washbenzen sebagai pelarut karena sifatnya yang nonpolar. Sebelum dilakukan perendaman, *B. mollis* dibersihkan dari kotoran yang menempel, kemudian dipotong-potong, dengan tujuan memperkecil permukaan sehingga luas permukaan jadi lebih besar. Dengan demikian, bagian yang bersentuhan dengan pelarut menjadi lebih luas.

Penggojokan dan pengadukan dalam perendaman dimaksudkan agar terjadi perputaran pelarut sehingga ekstraksi lebih efektif karena pelarut dapat masuk keseluruh permukaan *B. mollis*. Diamkan selama 24 jam dilakukan agar zat-zat yang larut dalam pelarut washbenzen cenderung turun ke dasar wadah akibat meningkatnya gaya berat dari penambahan berat *B. mollis*. Pelarut yang masih segar akan naik ke permukaan dan proses ini akan berjalan terus hingga

pelarut sudah tidak dapat mengakomodir ekstrak lagi. Untuk metanol perlakuannya sama dengan perlakuan maserasi pada washbenzen. Hasil keseluruhan ekstrak washbenzen dan ekstrak metanol yang diperoleh diuapkan pada suhu kamar dengan bantuan kipas angin lalu dimasukkan kedalam eksikator hingga kering dan tidak berbau washbenzen dan metanol.

Ekstrak washbenzen dan ekstrak metanol yang telah kering kemudian dikumpulkan dan ditimbang, dengan berat ekstrak, warna ekstrak dan rendemen seperti terlihat pada tabel 1. Hasil ekstrak serbuk kering herba *B. mollis* dengan menggunakan 2 jenis pelarut dapat dilihat tabel 1.

Tabel 1. Hasil ekstraksi serbuk *Blumea mollis*

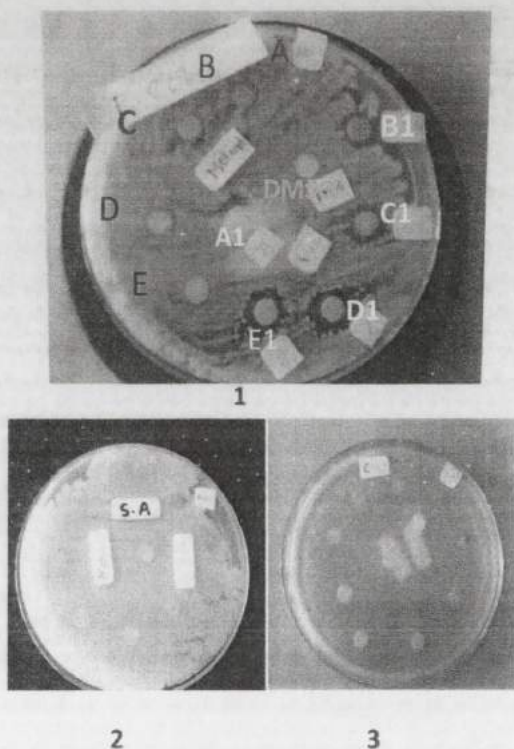
No	Pelarut penyari	Berat ekstrak(g)	Warna ekstrak	Rendemen (%)
1	Washbenzen	7,6	Hitam coklat	2
2	Metanol	20,5	Hitam	5

3. Hasil Skrining Uji Aktifitas Ekstrak

Uji aktivitas antimikroba dilakukan terhadap 3 macam mikroba, yaitu *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans*. Jawetz *et al.* (2001) menyatakan bahwa mikroba yang seringkali berhubungan dengan

aktivitas hidup manusia adalah bakteri *S. aureus*, *E. coli* dan jamur *C. albicans*.

Uji aktivitas antimikroba dari kedua ekstrak terhadap ketiga jenis mikroba seperti pada gambar 3.



Gambar 3. Uji aktifitas ekstrak washbenzen dan ekstrak metanol *Blumea mollis* terhadap mikroba 1) *Escherichia coli*, 2) *Staphylococcus aureus* dan 3) *Candida albicans*

Keterangan Gambar

- A = Metanol konsentrasi 1000 ug
- B = Metanol konsentrasi 2000 ug
- C = Metanol konsentrasi 3000 ug
- D = Metanol konsentrasi 4000 ug
- E = Metanol konsentrasi 5000 ug
- A1 = Washbenzen konsentrasi 1000 ug
- B1 = Washbenzen konsentrasi 2000 ug
- C1 = Washbenzen konsentrasi 3000 ug
- D1 = Washbenzen konsentrasi 4000 ug
- E1 = Washbenzen konsentrasi 5000 ug

Hasil uji aktivitas ekstrak washbenzen dan metanol tersebut selengkapnya seperti tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji aktivitas ekstrak washbenzen dan metanol terhadap mikroba *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans*

No	Ekstrak uji (ug)		Organism uji	Diameter hambatan pada pengujian ke			
				1	2	3	Rata-rata
1	1000	Washbenzen	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-
			<i>E.coli</i>	15 mm	15 mm	15 mm	15 mm
			<i>C. albicans</i>	-	-	-	-
		Metanol	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-
			<i>E.coli</i>	-	-	-	-
			<i>C. albicans</i>	-	-	-	-
2	2000	Washbenzen	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-
			<i>E.coli</i>	17 mm	17 mm	17 mm	17 mm
			<i>C. albicans</i>	-	-	-	-
		Metanol	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-
			<i>E.coli</i>	-	-	-	-
			<i>C. albicans</i>	-	-	-	-
3	3000	Washbenzen	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-
			<i>E.coli</i>	18 mm	18,3 mm	18,3 mm	18,3 mm
			<i>C. albicans</i>	-	-	-	-
		Metanol	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-
			<i>E.coli</i>	-	-	-	-
			<i>C. albicans</i>	-	-	-	-
4	4000	Washbenzen	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-
			<i>E.coli</i>	20,4 mm	20,2 mm	20,3 mm	20,3 mm
			<i>C. albicans</i>	-	-	-	-
		Metanol	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-
			<i>E.coli</i>	-	-	-	-
			<i>C. albicans</i>	-	-	-	-
5	5000	Washbenzen	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-
			<i>E.coli</i>	20,2 mm	20,3 mm	20,3 mm	20,3 mm
			<i>C. albicans</i>	-	-	-	-
		Metanol	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-
			<i>E.coli</i>	-	-	-	-
			<i>C. albicans</i>	-	-	-	-
6		Kontrol	DMSO	-	-	-	-

Keterangan : diameter paperdisk = 6 mm

4. Hasil Uji Terhadap Bakteri

Hasil uji aktivitas terhadap bakteri yang masing-masing diulang dilakukan sebanyak tiga kali. Data pada tabel 2 menunjukkan bahwa hanya ekstrak washbenzen yang aktif yaitu mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*. Ekstrak metanol pada konsentrasi yang sama dengan konsentrasi ekstrak washbenzen tidak menunjukkan aktivitas pada *S. aureus* maupun *E. coli* serta pada jamur *C. albicans*.

Adanya kemampuan ekstrak washbenzen dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* menunjukkan bahwa senyawa aktif yang terdapat pada herba *B. mollis* berada dalam ekstrak nonpolar.

Mekanisme penghambatan antibakteri suatu senyawa terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif erat kaitannya dengan struktur dinding sel. Sifat polaritas senyawa akan mempengaruhi afinitas dan reaktivitas senyawa terhadap komponen dinding sel sehingga dapat mengacaukan integritas dinding dan membrane sel (Shahidi dan Naczki, 1995)

Kemampuan senyawa non polar seperti trigliserida, minyak atsiri dan senyawa terpenoid dalam menghambat bakteri diduga karena senyawa non polar

dapat menyebabkan perubahan komposisi membran sel dan terjadinya pelarutan membran sel, sehingga membran sel mengalami kerusakan. Selain itu, komponen nonpolar juga dapat berinteraksi dengan protein membran yang menyebabkan kebocoran isi sel (Sikkema *et al.*, 1995)

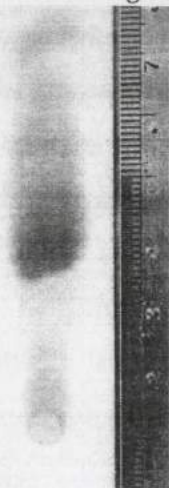
5. Hasil Uji Terhadap Jamur

Hasil skrining uji aktivitas terhadap jamur menunjukkan bahwa kedua larutan uji yaitu ekstrak washbenzen dan ekstrak metanol tidak mampu menghambat pertumbuhan *C. albicans* pada konsentrasi yang sama dengan konsentrasi pada uji terhadap bakteri (1000, 2000, 3000, 4000, 5000 ug). Dari hasil ini terdapat dua kemungkinan, pertama bahwa kemampuan menghambat dari kedua ekstrak ini terhadap *C. albicans* berada pada konsentrasi yang lebih tinggi, kemungkinan kedua bahwa kedua ekstrak ini memang tidak mempunyai kemampuan dalam menghambat pertumbuhan *C. albicans*.

6. Hasil Fraksinasi dan Uji Aktivitas Fraksi

a. Hasil kromatografi lapis tipis pendahuluan

Hasil skrining uji aktivitas pada ekstrak (washbenzen dan metanol) menunjukkan bahwa hanya ekstrak washbenzen yang aktif terhadap bakteri *E. coli*. Sehingga untuk penelitian selanjutnya hanya dilakukan terhadap ekstrak washbenzen dengan uji aktivitas antimikroba terhadap bakteri *E. coli*. Ekstrak washbenzen dilakukan pemeriksaan dengan pereaksi Ce (IV) sulfat untuk identifikasi umum keberadaan senyawa organik. Hasil KLT menunjukkan adanya senyawa lain, yang ditunjukkan dengan bercak warna merah seperti tampak dalam hasil KLT kromatogram pada gambar 4.



Gambar 4. Hasil KLT ekstrak washbenzen *Blumea mollis*

Fase diam : silika gel 60 F254, Fase

gerak : washbenzen :

etilasetat (4 : 1 v/v) Deteksi : Ce (IV)
sulfat

Ekstrak washbenzen yang ditotolkan pada lempeng KLT dengan fase diam silika gel 60 F254 tidak menampilkan bercak di bawah sinar UV254 dan UV366 dan setelah disemprot dengan serium (IV) sulfat dan serta dipanaskan warna bercak berubah menjadi coklat. Hasil negatif pada UV254 dan UV366 tersebut menunjukkan bahwa senyawa dalam ekstrak washbenzen diatas tidak memiliki ikatan rangkap terkonjugasi.

Selanjutnya ekstrak washbenzen difraksinasi untuk memisahkan senyawa- senyawa yang ada berdasarkan atas tingkat kepolarannya.

b. Hasil Fraksinasi dengan Kromatografi Cair Vakum (KCV)

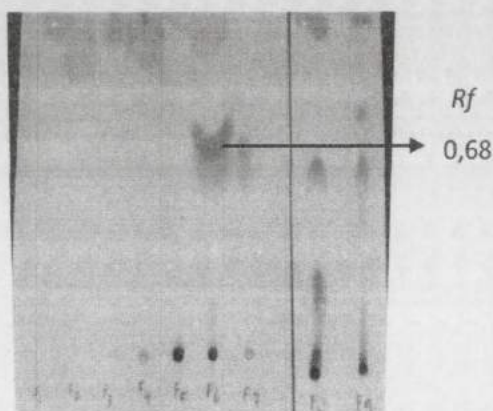
Fraksinasi dilakukan terhadap ekstrak washbenzen menggunakan KCV dengan pertimbangan bahwa metode ini tergolong cepat dalam memisahkan suatu ekstrak kasar menjadi fraksi-fraksinya. Pemilihan fase gerak yang digunakan dalam KCV didasarkan pada hasil orientasi pemisahan senyawa dalam ekstrak washbenzen dengan KLT tersebut. Sistem gradient fase gerak yang digunakan adalah

washbenzen dan etilasetat dengan komposisi perbandingan seperti pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil fraksinasi ekstrak washbenzen *Blumea mollis* dengan Kromatografi Cair Vacum

No	Fraksi	Fase gerak	Perbandingan Pelarut (ml)	Volume (ml)	Berat fraksi (mg)
1	F1	Washbenzen : Etilasetat	50 : 0	50	150
2	F2	Washbenzen : Etilasetat	49,5 : 0,5	50	87
3	F3	Washbenzen : Etilasetat	49 : 1	50	55
4	F4	Washbenzen : Etilasetat	48 : 2	50	63
5	F5	Washbenzen : Etilasetat	47 : 3	50	60
6	F6	Washbenzen : Etilasetat	46 : 4	50	53
7	F7	Washbenzen : Etilasetat	45 : 5	50	125
8	F8	Washbenzen : Etilasetat	42 : 8	50	110
9	F9	Washbenzen : Etilasetat	0 : 50	50	100

Masing- masing fraksi yang diperoleh diperiksa profilnya menggunakan KLT dengan fase diam silika gel 60 F254 dan fase gerak kloroform : etilasetat (14 : 1 v/v). Sistem fase gerak diatas menjadi lebih polar sehingga diharapkan senyawa-senyawa yang bersifat relatif lebih polar dalam ekstrak washbenzen dapat terelusi. Setelah itu disemprot dengan pereaksi Ce (IV) sulfat yang hasilnya dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Kromatogram fraksi-fraksi 1 - 9 ekstrak washbenzen *B. mollis*. Fase diam : silika gel 60 F254 dan Fase gerak : kloroform : etilasetat (14 - 1 v/v). Deteksi Ce (IV) sulfat

Bercak warna ungu pada fraksi fraksi 1 - 9 (Gambar 5) merupakan ciri khas senyawa organik yang bereaksi dengan pereaksi Ce (IV) sulfat. Kromatogram pada gambar 5 memperlihatkan bahwa fraksi 7 memiliki

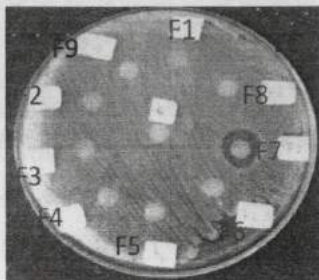
bercak dengan nilai R_f 0,68 yang mungkin bertanggung jawab atas sifat antibakteri.

c. Hasil Uji Aktivitas Fraksi

Sembilan fraksi yang didapat dari fraksinasi KCV diuji aktivitas terhadap bakteri *Escherichia coli*. Metode uji aktivitas yang digunakan dalam uji ini adalah difusi agar Kirby Bauer.

1) Metode difusi agar

Uji aktivitas fraksi-fraksi hasil fraksinasi ekstrak washbenzen terhadap bakteri *Escherichia coli* seperti pada gambar 6.



Gambar 6. Zona hambatan pada uji aktivitas fraksi-fraksi ekstrak washbenzen *Blumea mollis* terhadap *E. coli*

Keterangan gambar

F1 = fraksi 1

F5 = fraksi 5

F9 = fraksi 9

F2 = fraksi 2

F6 = fraksi 6

C = kloroform

F3 = fraksi 3

F7 = fraksi 7

EC = *Escherichia coli*

F4 = fraksi 4

F8 = fraksi 8

Hasil uji aktivitas antibakteri selengkapnya terlihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji aktivitas fraksi-fraksi hasil fraksinasi ekstrak washbenzen *Blumea mollis* terhadap *Escherichia coli*.

No	Fraksi	Kadar ug	Bakteri uji	Diameter hambatan (max)		
				1	2	Rata-rata
1	F1	1000	<i>E. coli</i>	-	-	-
2	F2	1000	<i>E. coli</i>	-	-	-
3	F3	1000	<i>E. coli</i>	-	-	-
4	F4	1000	<i>E. coli</i>	-	-	-
5	F5	1000	<i>E. coli</i>	-	-	-
6	F6	1000	<i>E. coli</i>	-	-	-
7	F7	1000	<i>E. coli</i>	20,9 mm	20,9 mm	20,9 mm
8	F8	1000	<i>E. coli</i>	-	-	-
9	F9	1000	<i>E. coli</i>	-	-	-

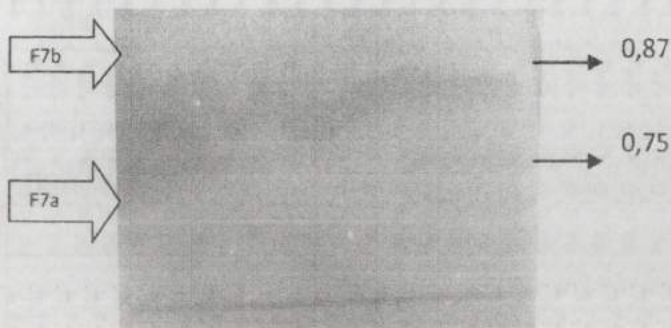
Keterangan : diameter paperdisk = 6 mm

Hasil uji aktivitas seperti pada tabel 4 mengindikasikan bahwa senyawa antibakteri paling aktif terdapat pada fraksi 7 (F7) (diameter hambatan rata-rata 20,9 mm) dan pada fraksi lainya tidak memberikan hambatan

2) Hasil Isolasi Kromatografi Lapis Tipis (KLTP)

Dari kromatogram KLT preparatif (gambar 7) terlihat bahwa fraksi tujuh (F7) masih mengandung dua komponen senyawa, yang terbagi menjadi 2 bagian berdasarkan letak bercaknya, yaitu F7a dan F7b (Tabel 5). Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF254 dengan ketebalan lapisan 0,5 mm dan fase geraknya adalah wahsbenzen-etilasetat (14 : 1 v/v). Deteksi dilakukan dengan menyemprot salah satu bagian tepi pelat dengan Ce (IV) sulfat. Isolat senyawa F7b menghasilkan bercak berwarna ungu yang tidak stabil dan dalam beberapa menit menjadi hijau pudar (gambar 7). Pita senyawa F7b yang telah diperkirakan letaknya dikerok, demikian pula pita senyawa F7a di bawah pita F7b tersebut. Masing-masing kerokan pita tersebut kemudian diekstraksi dengan kloroform disaring dan diuapkan.

Rf



Gambar 7. Pita-pita bercak hasil KLT preparatif fraksi tujuh Fase diam : silika gel GF254 Fase gerak : washbenzen : etilasetat (14 : 1 v/v)

Deteksi : (a) UV254 nm,
 (b) UV 366 nm
 (c) Ce (IV) sulfat

Keterangan : panah = isolat F7b

Dari sekitar 125 mg fraksi tujuh (F7) (table 3) setelah dilakukan KLT preparatif diperoleh hasil seperti pada tabel 5 berikut.

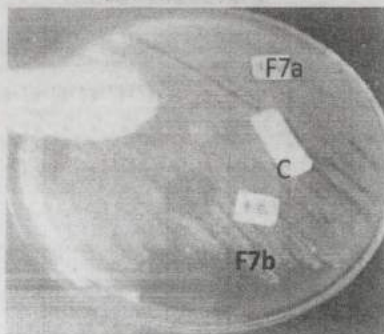
Tabel 5. Hasil KLT Preparatif (KLTP) Fraksi 7 (F7)

No	Fraksi	R _f	Deteksi		Warna senyawa pada Deteksi Ce(IV) sulfat
			UV254	UV366	
1	F7a	0,75	Kuning	Kuning memendar	Kecoklatan
2	F7b	0,87	-	-	Ungu (violet)

- (1) Senyawa (F7a) terlihat dibawah sinar UV254 nm nampak berwarna kuning dan UV366 nm berwarna kuning memendar dengan R_f 0,75. Kemudian dikerok dan disari dengan kloroform menghasilkan padatan semi cair sebanyak 100 mg berwarna kuning.
- (2) Senyawa (F7b) dengan R_f 0,87 bercak pita berwarna ungu. Positif dengan Ce (IV) sulfat. Tidak berwarna dibawah sinar UV366 nm dan tidak padam pada sinar UV254 nm. Kristal putih dengan bobot 20 mg. Senyawa F7a terjadi perubahan warna kuning menjadi kecoklatan setelah disemprot dengan Ce (IV) sulfat.

d. Hasil Uji aktivitas fraksi 7 (F7) kromatografi lapis tipis preparative

Uji aktivitas fraksi F7a dan F7b terhadap *Escherichia coli* seperti pada gambar 8.



Gambar 8. Hasil Uji Aktivitas fraksi 7 (F7) terhadap *Escherichia coli*

Keterangan gambar

F7a = fraksi F7a

C = kloroform

F7b = fraksi F7b

EC = *Escherichia coli*

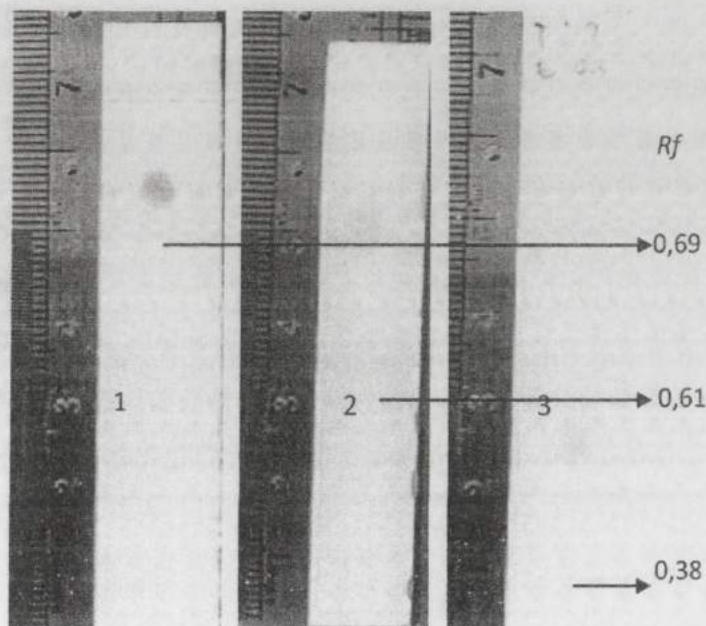
Tabel 6. Hasil uji aktivitas KLT preparatif Fraksi 7 (F7)

No	Fraksi	Kadar ug	Bakteri uji	Diameter hambatan		
				1	2	Rata- rata
1	F7a	1000	<i>E. coli</i>	-	-	-
2	F7b	400	<i>E. coli</i>	20,8 mm	20,7 mm	20,8 mm
3	Kontrol (CHCl ₃)			-	-	-

Hasil uji aktivitas menunjukkan bahwa hanya fraksi F7b yang memiliki aktivitas antibakteri dibandingkan dengan Fraksi F7a terhadap fraksi F7b yang menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*. Uji kemurniannya menggunakan KLT dengan berbagai fase gerak yaitu : kloroform : etilasetat (14 : 1 v/v), toluena : etilasetat (14 : 1 v/v), *n*-heksan : etilasetat (14 : 1 v/v), *n*-heksan : kloroform (14 : 1 v/v).

7. Uji kemurniaan senyawa aktif

Hasil uji kemurnian terlihat pada gambar 9.

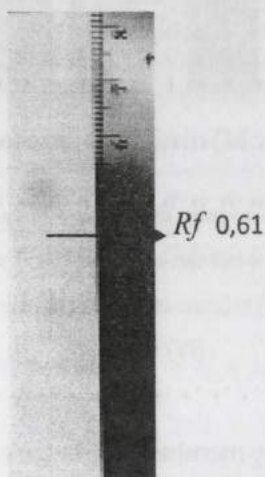


Gambar 9. Profil kromatogram KLT isolat F7b Fase diam : silica gel 60 F254 Fase gerak : 1) *n*-heksan-etilasetat (14 : 1 v/v), 2) kloroform-etilasetat (14 : 1 v/v), 3) toluena-etilasetat (14 : 1 v/v). Deteksi : Ce (IV) sulfat.

Masing-masing memberikan bercak tunggal dan R_f yang berbeda, sehingga isolat tersebut dinyatakan murni secara KLT.

Untuk mengidentifikasi golongan senyawa isolat F7b tersebut dilakukan dengan menyemprotkan pereaksi pada kromatogram KLT, yaitu pereaksi Liebermann- Burchard (sterol dan triterpen).

Dari pereaksi-pereaksi diatas ternyata Liebermann-Burchard memberikan hasil positif dengan R_f 0,61 (Gambar 10) sehingga isolat senyawa F7b diketahui masuk dalam golongan steroid atau triterpen. Senyawa F7b dengan pereaksi Liebermann- Burchard menghasilkan bercak berwarna merah ungu yang tidak stabil dan berubah menjadi hitam bila pemanasan terlalu lama.



Gambar 10. Identifikasi isolat F7b Fase diam : silika gel 60 F254,
Fase gerak : *n*-heksan : kloroform (14 : 1 v/v) Deteksi : Lieberman-
Burchard

a. Identifikasi senyawa aktif

Senyawa antibakteri *Escherichia coli* pada isolat (F7b) diidentifikasi lebih lanjut menggunakan metode spektroskopi.

1. Spektrum Ultra violet-Visibel

Hasil analisis isolat (F7b) dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis memberikan satu puncak serapan. Spektrum spektrofotometri UV-Vis dari isolat F7b ditunjukkan pada gambar 11. Munculnya serapan maksimum pada panjang gelombang 242 nm diduga diakibatkan oleh adanya transisi elektron dari $\pi - \pi^*$ yang disebabkan oleh adanya suatu ikatan rangkap C=C. Hal ini didukung dari hasil analisis spektrofotometri inframerah yang menunjukkan isolat mempunyai gugus fungsi C=C pada daerah bilangan gelombang 1643.9 cm^{-1} (Silverstein *et al.*, 1991). Dari spektra ultra violet ini, tidak begitu banyak memberikan informasi gambaran struktur senyawa hasil isolasi, sehingga diperlukan data-data spektra yang lain.

2. Spektrum Inframerah

Untuk mengidentifikasi gugus fungsional yang ada pada senyawa hasil isolasi, senyawa dianalisis menggunakan spektrometer inframerah. Spektrum yang dihasilkan dapat dilihat pada gambar 12.



Gambar 12. Spektrum inframerah senyawa antibakteri F7b dalam kloroform

Data spektrum inframerah isolat F7b menunjukkan adanya pita serapan melebar dengan intensitas kuat pada daerah bilangan gelombang $3436,6 \text{ cm}^{-1}$ yang diduga serapan dari gugus -OH terikat. Adanya gugus -OH ini didukung dengan munculnya serapan kuat pada bilangan gelombang $1062,5 \text{ cm}^{-1}$ dari C-O alkohol. Pita

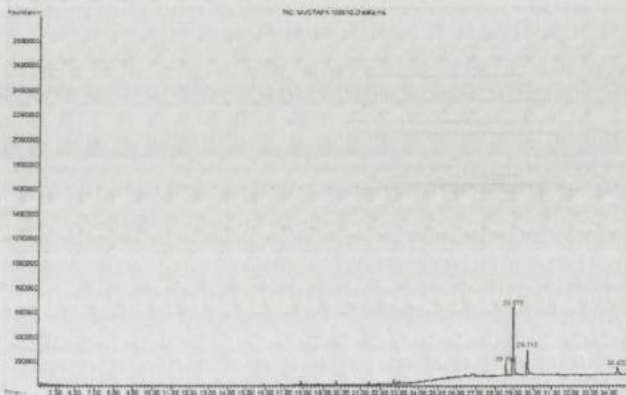
serapan yang tajam dengan intensitas kuat pada bilangan gelombang 2934 cm^{-1} dan $2865,1\text{ cm}^{-1}$ diduga mengandung gugus -CH alifatik (*stretching*). Dugaan ini diperkuat oleh adanya serapan pada daerah bilangan gelombang $1464,7\text{ cm}^{-1}$ dan $1381,9\text{ cm}^{-1}$ yang merupakan serapan dari -CH_2 dan -CH_3 (*bending*). Sedangkan munculnya pita serapan yang lemah pada daerah bilangan gelombang $1643,9\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus fungsi -C=C . (Silverstein, dkk, 1981; Sastrohamidjojo, 1991; Sastrohamidjojo, 1992). Tidak adanya serapan yang kuat pada daerah $3100 - 3000\text{ cm}^{-1}$ dan pada $1600 - 1500\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi bukan merupakan senyawa aromatis (Silverstein *et al.*, 1991).

b. Kromatografi Gas- Spektrometri Massa (KG-SM)

Untuk mengetahui lebih lanjut kemurnian isolat (F7b) tersebut dilakukan analisis kromatografi Gas-Spektrometri Massa. Dengan teknik ini akan diketahui jumlah senyawa yang ada dalam isolat beserta bobot molekulnya.

Kromatogram KG-SM isolat F7b memberikan 4 puncak yang berdekatan dan menyatu pada bagian garis dasar (gambar 13). Ini menandakan bahwa keempat senyawa mempunyai polaritas yang hampir sama. Dan empat puncak ini berarti isolat yang mengandung F7b tersebut memang belum murni. Kromatogram gas (gambar 13) menunjukkan bahwa isolat tersebut terdiri dari satu senyawa utama (puncak 2) dan satu senyawa dengan kadar lebih rendah (puncak 1, 3 dan 4).

File : D:\Data_MTD 35.0\MTD35A 100x10.0
 Operator : VIGOROSO
 Acquired : 16 Jun 2010 14:58 using Acquisition MTD 35.0
 Institution : Institut Teknologi Sepuluh Nopember
 Sample Name : C:\MSDCHEM\1
 Method : GC/MS
 Method Name :
 File Number : 1



Gambar 13. Propil kromatogram gas senyawa senyawa pada F7b.
 Jenis kolom : HPS, gas pembawa :Helium, tekanan gas 12 kPa dan
 aliran gas 30 ml / menit, suhu injector 280°C suhu awal kolom 240°C
 waktu mula 2 menit, kenaikan waktu terprogram yaitu 10°C
 permenit sampai 300°C, panjang kolom 30 cm, diameter kolom 0,25
 mm

Puncak dengan waktu retensi 28,590 menit menghasilkan spektrum massa pada gambar 14 (a) berikut : ion molekuler (M^+) muncul pada m/z 400.4 selanjutnya menunjukkan fragmen-fragmen pada m/z 382,0, 340,0, 315,0, 289,1, 255,0, 255,0, 231,0, 213,0, 187,0, 163,0, 145,0, 125,0, 107,0, 81,0, dan m/z 43,0.

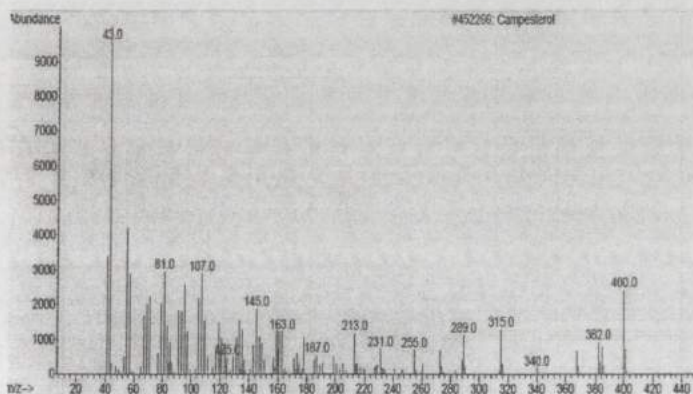
Puncak dengan waktu retensi 28.975 menit dalam kromatogram menghasilkan spektrum massa pada gambar 14 (b) berikut : M^+ pada m/z 412 dengan fragmen-fragmen m/z 397.0, 383.0, 369, 351, 328, 314, 300, 285, 271, 255, 229, 213, 199, 173, 159, 133, 119, 95, 81, 55, dan m/z 41.

Puncak dengan waktu retensi 29.715 menit menghasilkan spektrum massa pada gambar 14 (c) berikut : M^+ muncul pada m/z 414 selanjutnya menunjukkan fragmen-fragmen pada m/z 396, 381, 354, 329, 303, 273, 255, 231, dan m/z 213.

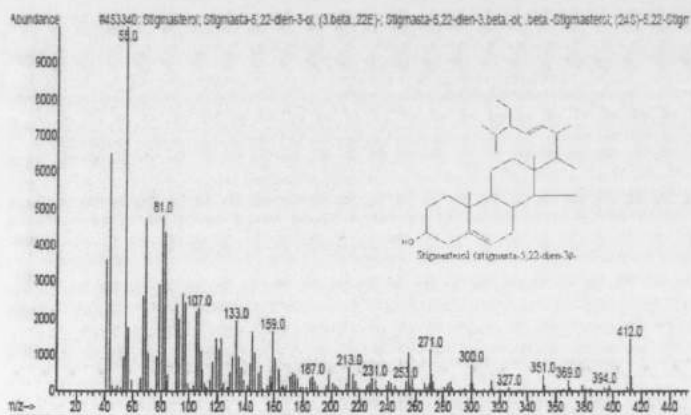
Puncak dengan waktu retensi 34,424 menit menghasilkan spektrum massa gambar 14 (d) berikut M^+ pada m/z 647, selanjutnya menunjukan fragmen m/z 616.

Hasil perbandingan spektrum massa isolat. Spektra massa referensi yang tersimpan dalam database computer WILEY7NIST05.L didapat bahwa spektrum dengan waktu retensi 28,975 dan 29,715 mirip dengan spektra massa stigmasa -5,22-dien 3-ol dan ethylholest-5-en-3-ol dengan indeks kemiripan (Similarity Index) sebesar 98 - 99 %. Untuk spektrum dengan waktu

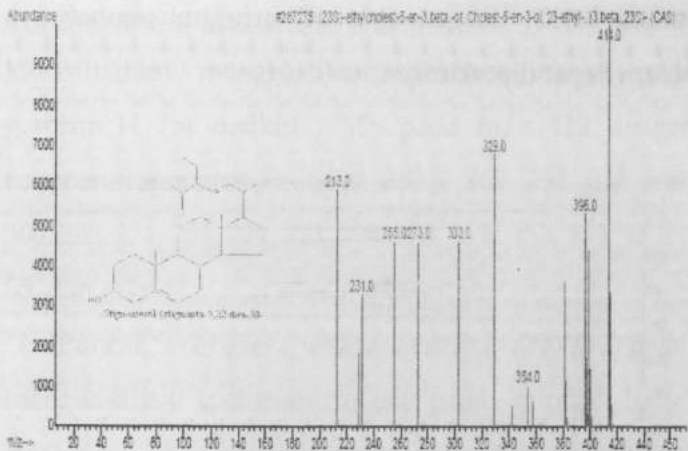
retensi 34,424 dengan m/z 647 struktur senyawanya belum dapat diperkirakan.



(a)



(b)



(c)



Gambar 14. Spektra massa senyawa-senyawa pada F7b

- Campesterol dengan indeks kemiripan 50 %
- Stigmasterol dengan indeks kemiripan 98 %
- (23S)-Ethylcholest-5-en-3β-ol dengan indeks kemiripan 99 %

cl. 7, 8, 17, 18-Tetrahydro-35-methoxy-1,3,21,23-tetramethyl-
16H,31H-5,9,15,19-dimethanol-10,14-metheno-26,30-nitrilo-
6H,25H-dibenzo(b,s)(1,21,4,8,14,18) dioxatetraazacyclooctacosine
indeks kemiripan 49 %

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1984, *Peristilahan Kimia dan Farmasi*, Penerbit ITB, Bandung
- Barry, J.T., dan Thornsberry, C., 1991, *Succeptibility Test ; Diffusion Test Procedurs, in Balows, A Manual of Clinical Microbiology*, Washington Inc.p. 1117 - 1124
- Backer, Sc., C.,A.D. and Bring, R.C,B,V,D, 1992, *FLORA OF JAVA (Spermatophytes Only)*, p. 540, Wolters-Noordhoff N.V-Gronigen-Netherland
- Blackburn, C. W. dan McClure, P. J. 2002. *Foodborne Pathogens Hazard, Risk Analysis and Control*. CRC Press, New York.
- Bombardelli, E. 1991. *Technologies for The Processing of Medicinal Plants*. In : R. O. B. Wijesekera (ed). 1991. *The Medicinal Plant Industry*. CRC Press, Boca Raton.
- Briger. 1969. *A Laboratory Manual for Modern Organik Chemistry*. Harver and Row Publiser, New York. Coll, J.C dan Bowden,B.F., 1986, *The Application OF Vacuum liquid chromatography to*

the separation of Terpene Mixture, journal OF Natural Product, No. 5 p ; 934 - 936

Creswell, C.J., Olaf A.R., dan Malcom M.C., 1982, *Analisi Spectrum Senyawa Organik* edisi kedua, hal : 59 - 99, 100 - 182, diterjemahkan oleh kosasi Padmawinata dan Iwang Soediro, ITB, Bandung

Dellar, J.E., Cole, M.D. dan Waterman, P.G., 1996, *Antimicrobial Abietane Diterpenoids from Plectranthus Elegant*, *Phytochemistry*, Vol. 41, No.3, p. 735 - 738

Dewick, P.M., 1999, *Medicinal Natural Product, a Biosynthetic Approach*, p. 53 - 63,, John Wiley and Sons, Ltd, New York.

Davidson, P.M. and A.L. Branen, 1993, *Antimicrobials in food*. Edisi ke dua, Revisid and Expanded. Marsel Dekker, Inc., New York. 293 - 295

Fardiaz, S. 1989. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. Petunjuk Laboratorium. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.

- Fessenden, R.J. dan Fessenden J.S., 1999, *Kimia Organic* jilid hal ; 315 - 375, 455 - 458, diterjemahkan oleh Aloysius Hadyana Pudjaatmaka, Erlangga, Jakarta
- Gritter, R.J., Bobbit, J.M. dan Scwaarting, A.E., 1991, *Pengantar Kromatografi* diterjemahkan oleh kosasih padmawinata, penerbit ITB Bandung.
- Garriga, M., M. Hugas, T. Aymerich dan J. M. Monfort. 1993. *Bacteriocinogenic Activity of Lactobacili from Fermentation Sausage*. *Journal of Applied Microbiology*, 7 142-148.
- Goldberg, G. 2003. *Plants : Diet and Health*. I Owa State Press, Blackwell Publishing Company, 2121 State Avenue, USA.
- Gubitz, G.M., M. Mittelbach, dan M. Trabi. 1999. *Exploitation of the tropical oil seed plant Jatropha curcas L. Bioresourc Technology* 67: 73-82.
- Gunstone, F. A. Dan F. A. Norris. 1983. *Lipid in Foods Chemistry*. Longman Group Ltd., London.
- Hamburger, M.O dan Cordell, G.A., 1987, *A Direct Bioautographic TLC Assay For Compounds Possessing Antibakterial Aktivitas*, *Journal of Natural Product* Vol. 50, No. 1, p.19 - 20.

- Harborne, J.B., 1987, *Metode Fitokimia, Penuntun cara modern Menganalisis Tumbuhan* diterjemahkan oleh kosasih Padmawinata, terbitan kedua, penerbit ITB Bandung.
- Halliwell, B. dan J. M. C. Gutteridge. 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford.
- Ketaren, S. 1985. *Pengantar Teknologi Minyak Atsiri*. Balai Pustaka, Jakarta.
- Jay, J. M. 1992. *Modern Food Microbiology*. 4th Ed. Wayne State University, USA.
- Madigan, M.T., J. M. Martinko, dan j. Parker, 1997, *Biologi of Microorganism* edisi ke delapan. Prentice-Hall Internasional, Inc. New Jersey 405 - 413
- Mann, J., et al., 1994, *Natural Products: Their Chemistry and Biological Significance*, Longman, UK
- Marcus, Y. 1992. *Principles of Solubility and Sollution*. Marcel Dekker. Inc., New York.
- Meskin, M. S., W. R. Bidlack, A. J. Davies, S. T. Omaye. 2002. *Phytochemicals in Nutrition and Health*. CRC Press, London- New York.

Miller, H. E., F. Rigelhof, L. Marquart, A. Prakash, M. Kanter. 2000. *Antioxidant Content of Whole Grain Breakfast Cereal, Fruits and Vegetables*. Journal of The American Collage of Nutrition. Vol. 19. No. 3. 3125-3195.

Mitscher, L. A., Drake, S., Gollapudi, S.R., and Okwute, K., 1987, A Modern Look at Folkloric Use of Anti-infective Agents, *Journal of Natural Products*, 50, 6, 1025 - 1040.

Mukhopadhyay, M. 2000. *Natural Extract Using Supercritical Carbon Dioxide*. CRC Press, London-New York

Paul M. Dewick, 2002, *Medicinal Natural Product A Biosynthetic Approach*, 2nd Ed., John Wiley and Sons, Ltd.

Pratiwi, S.T., 2008, *Mikrobiologi Farmasi*, Penerbit Erlangga, Jakarta

Pelczar, M. J, Jr., and Chan E. C. S, 1986, *Mikrobiologi Dasar*, Edisi Kelima, Jilid I, a.b. Sri, R. H., dkk, Universitas Indonesia-Press, Jakarta.

Pelczar, M.J, Jr., and Chan E.C.S, 1998, *Dasar- Dasar Mikrobiologi II*, a.b. : Ratna Sri Hadioetomo, dkk, Universitas Indonesia- Press, Jakarta

- Robinson, T., 1995, *Kandungan Organik Tanaman Tingkat Tinggi*, Penerbit ITB, Bandung
- Sastrohamidjojo. H, 1996, *Sintesis Bahan alam*, Cetakan ke-1, Liberty, Yogyakarta
- Senthikumar, A., Kannathasan. K and Venkatesalu, V.,2009, *Antibacterial Activity of The Leaf Essential Oil Of Blumea Mollis (D. Don) Merr.*Department of botany,Annamalai University, Annamalainagar, Tamil Nadu, India
- Senthikumar, A., Kannathasan. K and Venkatesalu, V.,2009, *Chemical Constituents and Larvicidal Property of The Essential Oil of Blumea Mollis (D.Don) Merr. Against Culex Quinquefasciatus* .Department of botany,Annamalai University, Annamalainagar, Tamil Nadu, India
- Shahidi, F.dan M. Naczki, 1995, *food phenolics ; sources, chemistry, effects, and applications*. Tehcnomic Publisher, Co. Inc., 14 - 18, 59 - 64 dan 76 - 98.
- Sudjadi, 1985, *Metode Pemisahan*, Penerbit kanisus, Yogyakarta

Indonesia merupakan negara tropis yang memiliki keanekaragaman tanaman hayati yang berpotensi sebagai sumber senyawa antimikroba. Salah satu tanaman yang berfungsi sebagai antimikroba adalah *Blumea mollis* (D.Don) Merr.

Penggunaan antibiotik yang sembarangan telah menyebabkan bakteri patogen beradaptasi dengan lingkungan. Meningkatnya masalah resisten menyebabkan kebutuhan akan antibiotik baru juga meningkat. Namun, sejauh ini belum pernah dilaporkan senyawa lain yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antibakteri pada herba *Blumea mollis* tersebut.

Buku ini merupakan hasil sebuah penelitian yang telah dilakukan oleh penulis sendiri. Berdasarkan penelitian tersebut, ditemukan bahwa tumbuhan *Blumea mollis* (D.Don) memiliki senyawa yang bermanfaat dalam penghambat bakteri.