

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA ANTIBAKTERI DARI DAUN *Eupatorium odoratum* L. TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 DAN *Escherichia coli* ATCC 25922

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ANTIBACTERIAL COMPOUND FROM *Eupatorium odoratum* L. LEAVES AND ITS ACTIVITY AGAINST *Staphylococcus* *aureus* ATCC 25923 AND *Escherichia coli* ATCC 25922

Hasnawati^{1*)} dan Erna Prawita²

1. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Haluoleo, Kendari

2. Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

ABSTRAK

Daun *E. odoratum* secara tradisional digunakan untuk terapi penyakit infeksi kulit seperti bisul, kurap, dan kadas. Berdasarkan hal tersebut, maka daun *E. odoratum* memungkinkan memiliki aktivitas antibakteri. Serbuk kering *E. odoratum* diekstraksi dengan menggunakan Soxhlet menggunakan pelarut washbenzen dan metanol. Kedua ekstrak kental (washbenzen dan metanol) yang diperoleh diuji aktivitas antibakterinya menggunakan metode difusi agar dan. Ekstrak aktif difraksinasi menggunakan kromatografi vakum cair. Senyawa aktif pada fraksi aktif dimurnikan dengan kromatografi lapis tipis preparatif. Spektrum UV-Vis isolat (2.3) dalam kloroform menampakkan serapan λ_{max} pada 291 nm. Spektrum inframerah isolat (2.3) (KBr) menunjukkan serapan pada (-OH), ($CH_{alifatik}$), ($CH_{alifatik}$), ($C=O$), ($C=C$), (CH_2), (CH_3), (epoksi), dan ($C-O$). Spektra 1H -NMR ($CDCl_3$) menunjukkan resonansi pada δ 1,26 (3H); 3,65 (3H); 3,82 (3H); 3,93 (3H); 4,53 (1H,d); 5,0 (1H,d); 5,7 (1H,d); 6,06 (1H,d); 6,14 (1H,d); 6,93 (1H,d); 7,05 (1H,dd); dan 7,16 (1H,d) ppm. Spektra ini diperkirakan sebuah kalkon yang mengandung epoksi. Senyawa aktif antibakteri (2.3) pada loading terkecil 250 μ g menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap *S. aureus* dan *E. coli* dengan diameter 9,5 dan 7,2 mm.

Kata kunci: *Eupatorium odoratum* L., kalkon, senyawa antibakteri, *E. coli*

ABSTRACT

The leaves of *Eupatorium odoratum* L. have been used traditionally to cure abscess due to infectious diseases, leech bite and wound healing. It was suspected that the leaves contain antibacterial compounds. The dried powder of *E. odoratum* leaves is extracted by Soxhlet using washbenzene and followed by methanol. Both extracts are tested to determine their antibacterial activity by using diffusion test. The active extract is fractionated by vacuum liquid chromatography. The active compound (2.3) obtained from the active fraction is purified by using preparative thin layer chromatography. The UV-Vis spectrum of (2.3) (chloroform) showed λ_{max} at 291nm. The IR spectrum of the active compound (2.3) (KBr) .0displayed signals (-OH), (- $CH_{alifatik}$), (- $CH_{alifatik}$), (- $C=O$), ($C=C$), (CH_2), (CH_3), (epoksi), and ($C-O$). 1H -NMR spectrum ($CDCl_3$) showed signals at δ 1.26 (3H,s); 3.65 (3H,s); 3.82 (3H,s); 3.93 (3H,s); 4.53 (1H,d); 5.0 (1H,d); 5.7 (1H,d); 6.06 (1H,d); 6.14 (1H,d); 6.93 (1H,d); 7.05 (1H,dd); dan 7.16 (1H,d) ppm. This spectrum is suspected to be an epoxide chalcone type of compound. The active compound (2.3) at minimum loading of 250 μ g showed bacterial growth inhibition on *S. aureus* and *E. coli* at diameter 9.5 and 7.2 mm respectively.

Key words: *Eupatorium odoratum* L., chalcone, antibacterial compound, *E. coli*

* Korespondensi : Hasnawati
Fakultas MIPA Universitas Haluoleo Kendari
email: hasna_cheno@yahoo.co.id

PENDAHULUAN

Tanaman obat tradisional telah lama menjadi sasaran pencarian obat baru. Perkembangan penggunaan obat tradisional khususnya dari tumbuh-tumbuhan untuk membantu meningkatkan derajat kesehatan masyarakat sudah cukup meluas. Salah satu manfaat penggunaan obat dari tanaman-tanaman tersebut pada manusia adalah sebagai antibiotik.

Antibiotik merupakan substansi atau zat yang bisa membunuh atau melemahkan mikroorganisme, jasad renik (bakteri, fungi, dan parasit). Antibiotik yang diperuntukkan dalam penanganan penyakit karena infeksi bakteri patogen disebut antibakteri, sedangkan oleh fungi patogen disebut sebagai antifungi. Banyak penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri patogen dapat disembuhkan oleh beberapa obat antibakteri. Namun dalam perkembangannya penanganan terhadap beberapa penyakit ini menemui kesulitan (Awoyinka *et al.*, 2007).

Indonesia merupakan negara tropis sehingga prevalensi penyakit infeksi yang disebabkan oleh mikroba sampai saat ini masih tetap tinggi. Di sisi lain penggunaan antibiotik secara intens di Indonesia dapat menyebabkan kecenderungan terjadinya resistensi mikrobial terhadap antibiotik yang ada. Oleh karena itu penemuan dan pengembangan antibiotik baru di Indonesia tetap merupakan salah satu sasaran penting dalam penemuan obat baru. Meskipun riset atau upaya penemuan obat-obatan antibiotik pada abad modern ini banyak difokuskan dalam bidang bioteknologi, namun riset obat-obatan yang bersifat eksploratif menjadi alternatif yang patut dilakukan. Selain pertimbangan ekonomis dan faktor keamanan yang relatif baik, pemanfaatan obat-obatan yang berasal dari alam juga telah banyak terbukti dan teruji (Saiful, 2005).

Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan untuk terapi penyakit infeksi adalah daun tanaman *Eupatorium odoratum* L. Tanaman ini di Thailand digunakan sebagai obat luka, koagulan, dan sebagai antiseptik (Irobi, 1997), di Nigeria digunakan sebagai terapi penyakit malaria (Rungnapa, 2003), sedangkan di Indonesia digunakan sebagai obat luka baru, demam, batuk, dan menghentikan pendarahan (Purwati, 2003). Meskipun demikian, tanaman ini masih sangat jarang dimanfaatkan oleh masyarakat Indonesia karena dianggap sebagai tanaman pengganggu yang sulit diberantas.

Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya terhadap daun *E. odoratum* antara lain Inya-agha *et al* (1987) melaporkan bahwa ekstrak air dari daun *E. odoratum* mengandung tannin, fenol, saponin, dan minyak atsirinya mengandung α -pinene, cadinene, camphore, limonene, β -caryophyllene, isomer cadinol. Owolabi *et al* (2010) melaporkan adanya β -pinene, germacrene, β -copaen-4 α -ol, geijerene. Jane *et al* (2004) melaporkan adanya α -humulene, γ -muurolene, bicyclogermacrene, vinylchroman-4-one, dan 2-senecioyl-4-vinylphenol dalam daun *E. odoratum*. Rungnapa (2003) juga menginformasikan bahwa

daun *E. odoratum* kaya akan flavonoid, quersetin, sinensetin, sakuranetin, padmatin, kaempferol, dan salvagenin, isosakuranetin, ramnetin, tamariksetin, kaempferid, dan ombuin. Sedangkan β -kardin, sesquiterpen, β -sitosterol dan senyawa triterpen merupakan tambahan yang diisolasi pada bagian aerial dari tanaman ini.

Aktivitas biologi dari *E. odoratum* sebelumnya telah dilaporkan sebagai *anodyne, hemostatic, nervine, spasmolytic, vermifuge* (James *et al.*, 1989) dan *antigonorrhreal* (Armando *et al.*, 1995). Thakong (1999) melaporkan bahwa ekstrak kloroform dari daun *E. odoratum* menunjukkan aktivitas yang tinggi terhadap *Plasmodium falciparum* yang resisten terhadap kloroquin (K1). Senyawa yang di isolasi dari fraksi ekstrak kloroform daun *E. odoratum* adalah isosakuranetin, yang tidak aktif terhadap protozoa *P. falciparum* pada konsentrasi maksimum 5 μ g/ml. Ekstrak etanol dari daun *E. odoratum* menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas sp.*, *Escherichia coli*, *B. thuringensis*, *Klebsiella sp.* dan *Stereptococcus faecalis* (Irobi, 1997).

Berdasarkan laporan penelitian di atas, aktivitas antibakteri yang dilaporkan masih dalam tingkatan ekstrak. Belum ada yang melaporkan sampai pada tingkatan senyawa, sehingga bertitik tolak pada hal tersebut, perlu dilakukan penelitian isolasi dan identifikasi serta uji aktivitas antibakteri senyawa aktif dari daun *E. odoratum*.

METODOLOGI

Alat

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah : spektrofotometer UV-Vis (GENESYS 10s), IR (PERKIN ELMER FTIR 100), 1 H-NMR dan 13 C-NMR (DELTA2 dengan frekuensi 500 MHz), spektrometer massa (LC: Hitachi L 6200, LC-MS : Mariner Biospectrometry), GC-MS (AGILENT GC 6890N 5975B MSD) , alat destilasi, peralatan gelas, neraca, blender, alat Soxhlet, inkubator otoklaf, rotary evaporator, mikropipet, penangas air, cawan petri, cawan porselin, lampu Bunsen, Erlenmeyer, flakon, batang pegeduk, ose, autoklaf, lampu ultraviolet panjang gelombang 336, lampu ultraviolet panjang gelombang 254, pipa kapiler, mikropipet, sentrifuse, kompor listrik, oven, pensil, penggaris, seperangkat alat Vacum Liquid Chromatography, dan bejana pengembang KLT preparatif.

Bahan

Bahan-bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah daun *Eupatorium odoratum* L., washbenzen, etil asetat dan metanol yang berderajat tehnis, kloroform, etil asetat dan

amoniak berderajat p.a, serum sulfat, lempeng kromatografi lapis tipis menggunakan silika gel F₂₅₄ (E. Merck), kromatografi preparatif menggunakan silika gel 60PF₂₅₄, kertas Wathman no. 1, aquades, kertas saring, *Nutrien Agar (NA)*, *Nutrien Broth (NB)*, alkohol 70%, bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherechia coli* ATCC 25922.

Jalannya Penelitian

Pengeringan dan pembuatan serbuk

Daun muda *E. odoratum* yang telah dipanen dibersihkan dari bahan-bahan pengotor dengan menggunakan air. Sebanyak 42 kg sampel daun yang telah dibersihkan tersebut lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 60 °C selama 24 jam. Simplisia *E. odoratum* yang telah kering sebanyak 3650 gram kemudian diserbuk.

Ekstraksi

Daun kering *E. odoratum* (300 gram) yang sudah diserbuk di ekstraksi dengan menggunakan Soxhlet secara bertingkat menggunakan pelarut washbenzen dan metanol. Ekstrak cair yang diperoleh diuapkan sampai diperoleh ekstrak washbenzen dan metanol kental. Selanjutnya kedua ekstrak yang diperoleh diuji profil KLT-nya dan aktivitas antibakterinya menggunakan metode difusi agar.

Uji aktivitas antibakteri

Penyiapan sampel uji

Sebanyak 100, 50, dan 25 mg sampel yang akan diuji (ekstrak washbenzen, dan ekstrak metanol) dilarutkan dalam 1 mL kloroform kemudian masing-masing sampel uji dipipet 10 µL sehingga diperoleh loading 1000, 500, dan 250 µg

Pengujian antibakteri

Pengujian antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar, yaitu dengan cara sebagai berikut : *Nutrient Agar (NA)* yang telah mencair di masukkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan memadat. Suspensi bakteri yang kosentrasiya 10⁸ CFU dioleskan di atas permukaan agar yang

telah memadat secara merata. Di atas permukaan agar tersebut diletakkan paper disk (diameternya = 6 mm) yang telah ditetes senyawa uji sebanyak 10 µL, lalu diinkubasi selama 18 – 24 jam pada suhu 37 °C.

Interpretasi

Zona jernih disekitar paper disk (zona radikal) mengindikasikan adanya penghambatan dari senyawa uji.

Fraksinasi ekstrak washbenzen

Ekstrak yang menunjukkan aktivitas antibakteri selanjutnya difraksinasi menggunakan kromatografi cair vakum. Hasil fraksinasi selanjutnya diuji secara KLT dengan menggunakan eluen washbenzen : etil asetat (4 : 1 v/v). Hasil fraksinasi yang menunjukkan pola bercak yang sama disatukan menjadi satu fraksi, dimana dihasilkan 7 fraksi yaitu F1, F2, F3, F4, F5, F6 (F6+F7), dan F7 (F8+F9+F10+F11).

Uji aktivitas antibakteri fraksi

Fraksi-fraksi yang dihasilkan dari kromatografi cair vakum selanjutnya dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *E. coli* dengan menggunakan metode difusi agar seperti pada pengujian aktivitas antibakteri ekstrak.

Isolasi senyawa aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP).

Fraksi yang menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *E. coli* yang paling besar, kemudian diuji secara KLT menggunakan eluen kloroform : etilasetat (15 : 1 v/v), selanjutnya di KLTP.

Uji aktivitas antibakteri senyawa aktif

Pita-pita yang diperoleh dari KLTP diuji aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *E. coli* dengan menggunakan metode difusi agar, seperti pada uji-uji aktivitas sebelumnya

Pemeriksaan kemurnian dengan KLT.

Tabel I. Hasil ekstraksi serbuk daun *E. odoratum*

No.	Pelarut Penyari	Berat Ekstrak (gram)	Warna Ekstrak	Rendemen (%)
1.	Washbenzen	23,28	Coklat kekuning-kuningan	7,76
2.	Metanol	55,89	Hitam kecoklatan	18,63

Tabel II. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak washbenzen dan metanol daun *E. odoratum* masing-masing *loading* 1000 μ g, 500 μ g, 250 μ g terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922

No.	Ekstrak Uji	Organisme Uji	Diameter Hambatan pada Pengujian (mm)		
			(1000 μ g)	(500 μ g)	(250 μ g)
1	Washbenzen	<i>S. aureus</i>	9,3	7,7	6,3
			9,4	8,6	6,3
			9,1	7,6	6,3
	Rata-rata	<i>S. aureus</i>	9,3	7,9	6,3
		<i>E. coli</i>	9,7	7,7	6,8
			9,9	8,8	7,1
2	Washbenzen		9,6	7,1	7,4
			9,7	7,9	7,1
			-	-	-
	Metanol	<i>S. aureus</i>	-	-	-
			-	-	-
			-	-	-
4	Rata-rata	<i>E. coli</i>	7,2	-	-
			7,2	-	-
			7,2	-	-
	Metanol		7,2	-	-
			7,2	-	-
			7,2	-	-
5	Rata-rata		7,2	-	-
	Kontrol pelarut : kloroform (CHCl ₃)		-	-	-
5 Diameter paper disk : 6 mm			-	-	-

Ket : - artinya tidak menghambat bakteri

Pita yang menunjukkan aktivitas antibakteri *S. aureus* dan *E. coli* yang paling besar selanjutnya di KLT dengan menggunakan fase gerak kloroform : etilasetat (15 : 1 v/v), kemudian dilakukan pemeriksaan kemurnian secara kromatografi lapis tipis menggunakan 3 macam fase gerak yang berbeda, yakni n-heksan : etilasetat (3 : 1 v/v), toluena : etilasetat (4 : 1 v/v), dan etilasetat : metanol (1 : 1 v/v). Selanjutnya Isolat murni yang telah diperoleh, dilakukan elusidasi struktur dengan menggunakan UV, IR, GC-MS, LC/MS, NMR.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penyarian serbuk uji pendahuluan terhadap ekstrak gubal washbenzen dan metanol

Hasil uji pendahuluan terhadap ekstrak gubal washbenzen dan metanol menggunakan metode difusi agar menunjukkan zona hambatan (Tabel II).

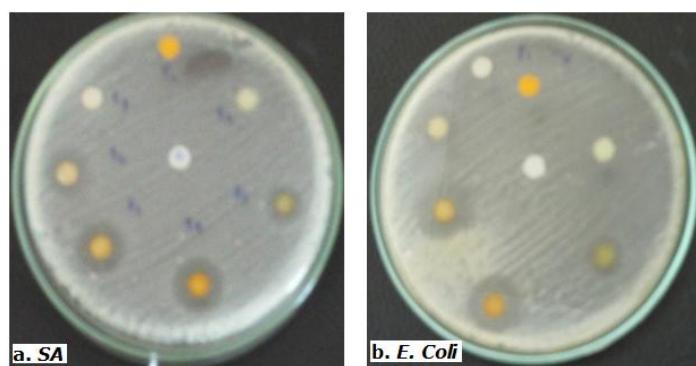
Hasil uji aktivitas antibakteri dari kedua ekstrak menunjukkan bahwa ekstrak washbenzen dan *S. aureus* dan *E. coli* pada *loading* 1000, 500 dan 250 μ g, sedangkan ekstrak metanol hanya aktif pada *loading* 1000 μ g terhadap *E. coli* sedangkan pada *S. aureus* inaktif.

Hasil fraksinasi ekstrak gubal dan uji aktivitas antibakteri fraksi

Selanjutnya ekstrak washbenzen aktif antibakteri difrasinasi secara kromatografi kolom vakum (KCV) dengan menggunakan eluen bergradien Fraksi yang diperoleh kemudian ditotolkan pada plat kromatografi lapis tipis

menggunakan eluen washbenzen : etilasetat (4 : 1 v/v). Fraksi dengan profil KLT yang sama digabung, sehingga didapatkan 7 fraksi (Tabel III).

Fraksi-fraksi yang diperoleh selanjutnya diuji aktivitas antibakterinya terhadap *S. aureus* dan *E. coli* dengan metode difusi agar (Gambar 1 dan Tabel IV).



Gambar 1. Aktivitas antibakteri fraksi 1, 2, 3, 4, 5, 6, dan 7 dari ekstrak washbenzen daun *Eupatorium odoratum* L. dengan loading 1000 μ g pada bakteri (a) *S. aureus* ATCC 25923, (b) *E. coli* ATCC 25922

Ket : C (kontrol -) = kloroform diameter paperdisk = 6 mm

Tabel III. Hasil fraksinasi ekstrak washbenzen dari daun *Eupatorium odoratum* L.

No.	Washbenzen (mL)	Etil asetat (mL)	Perbandingan washbenzen : etilasetat	Fraksi
1.	100	-	10 : 0	F1
2.	90	10	9 : 1	F2
3.	80	20	8 : 2	F3
4.	75	35	7 : 3	F4
5.	60	40	6 : 4	F5
6.	50	50	5 : 5	
7.	40	60	4 : 6	F6
8.	30	70	3 : 7	
9.	20	80	2 : 8	
10.	10	90	1 : 9	F7
11.	-	100	0 : 10	

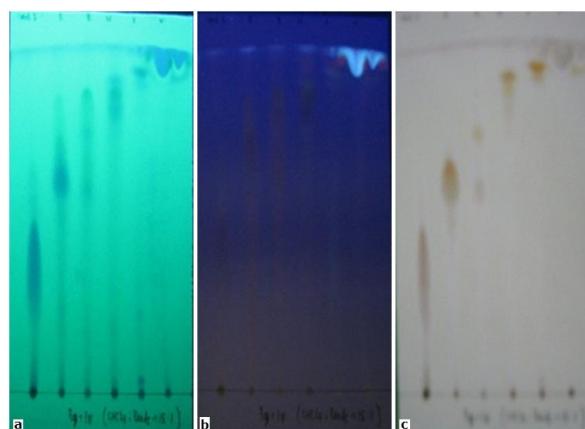
Tabel IV. Hasil uji aktivitas antibakteri *S.aureus* ATCC 25923 dan *E. coli* ATCC 25922 pada fraksi-fraksi (F4 – F6) ekstrak washbenzen dengan loading 1000 μ g

Konsentrasi	Organisme Uji	Diameter Hambatan Pada Pengujian Dari (mm)				
		F3	F4	F5	F6	
(1000 μ g)	<i>S. aureus</i>	8,3	13,6	13,0	8	
		8,6	13,3	13,0	8	
		7,5	14,6	13,0	8	
Rata-rata		8,1	13,8	13,0	8	
		11,0	15,8	14,2	10	
(1000 μ g)	<i>E. coli</i>	11,7	14,4	12,7	10	
		11,8	15,7	13,1	10	
		11,5	15,3	13,3	10	
Rata-rata						
Kontrol pelarut : kloroform (CHCl_3)						
Diameter paperdisk : 6 mm						



Gambar 2. Aktivitas antibakteri pita-pita (1, 2, 3, 4, 5, 6) pada loading 1000 µg terhadap bakteri *E.coli* ATCC 25923

Ket : C (kontrol -) = kloroform paperdisk = 6 mm

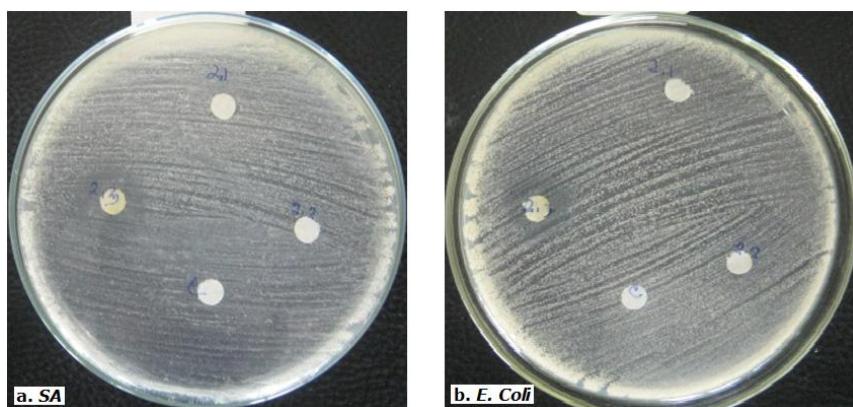


Gambar 3. Profil KLT pita-pita (1, 2, 3, 4, 5, dan 6) dari fraksi 4 setelah di KLTP menggunakan fase diam silika gel 60 F₂₅₄ dengan eluen kloroform : etilasetat (15 : 1 v/v) yang diamati di bawah sinar (a) UV₂₅₄ (b) UV₃₆₆ dan (c) Pereaksi Cerium Sulfat.

Tabel V. Diameter zona hambatan pita (1 dan 2) dari fraksi 4 dengan loading 1000 µg pada bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dan *E.coli* 25923

Konsentrasi (F4)	Organisme Uji	Diameter Hambatan pada Pengujian (mm)					
		Pita 1	Pita 2	Pita 3	Pita 4	Pita 5	Pita 6
(1000µg)	<i>S. aureus</i>	21,2	20,4	-	-	-	-
		20,9	19,6	-	-	-	-
		20,0	20,1	-	-	-	-
		20,7	20,03	-	-	-	-
(1000µg)	<i>E. coli</i>	20,6	19,3	-	-	-	-
		19,4	20,1	-	-	-	-
		21,3	20,2	-	-	-	-
		20,4	19,8	-	-	-	-

Keterangan : - artinya tidak menghambat bakteri paperdisk = 6 mm



Gambar 4. Aktivitas antibakteri isolat 2.1, 2.2, dan 2.3 dari hasil KLTP isolat 2 dengan *loading* 1000 μ g terhadap (a) *S. aureus* ATCC 25923 dan (b) *E. coli* ATCC 25923.

Ket : C (kontrol -) = kloroform diameter paperdisk = 6 mm

Tabel VI. Diameter zona hambatan masing-masing isolat dari hasil KLTP isolat 2 dengan *loading* 1000 μ g pada bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dan *E. coli* ATCC 25923 dengan kontrol pelarut adalah kloroform

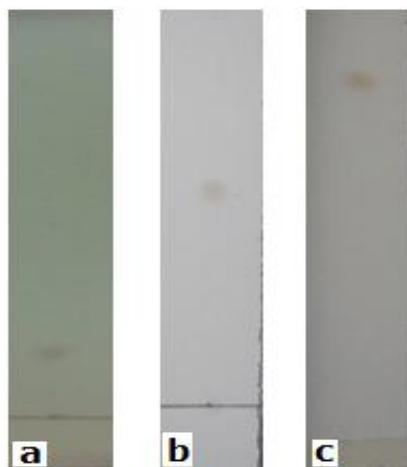
Konsentrasi	Organisme Uji	Diameter Hambatan pada Pengujian (mm)		
		Isolat 2.1	Isolat 2.2	Isolat 2.3
(1000 μ g)	<i>S. aureus</i>	-	-	17,6
		-	-	19,4
		-	-	19,0
		-	-	18,7
(1000 μ g)	<i>E. coli</i>	-	-	15,7
		-	-	16,2
		-	-	17,0
		-	-	16,3
Rata-rata				

Keterangan : - artinya tidak menghambat bakteri Diameter paperdisk = 6 mm

Hasil uji yang diperoleh bahwa fraksi 4 menunjukkan aktivitas antibakteri yang paling baik, karena menunjukkan zona hambatan yang paling baik dibandingkan dengan fraksi-fraksi yang lain. Fraksi yang aktif tersebut selanjutnya dilarutkan dalam kloroform dan dimurnikan menggunakan KLTP dengan eluen terbaik (hasil dari optimasi) yaitu kloroform : etilasetat (15 : 1 v/v) Dari hasil KLTP diperoleh sebanyak enam pita, termasuk pita ditempat penotolan (pita 1). Pita-pita yang terbentuk kemudian diuji aktivitas antibakterinya terhadap *S. aureus* dan *E. coli*. Dari hasil uji menunjukkan bahwa pita 1 dan 2 menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli* dengan diameter hambatan rata-rata sebesar 20,7 dan 20,03 mm serta 20,4 dan 19,8 mm (Gambar 2 dan Tabel V).

Kemudian hasil 6 pita tersebut di KLT dengan menggunakan fase gerak kloroform : etilasetat (15 : 1 v/v)(Gambar 3).

Karena pita 2 (Gambar 3) memiliki resolusi yang baik meskipun aktivitas antibakterinya lebih kecil (19,8 mm) dibanding pita 1 (20,4 mm), maka isolat tersebut dipilih untuk dimurnikan lebih lanjut yaitu dengan KLTP menggunakan fase gerak kloroform : etilasetat (15 : 1 v/v). Dari hasil KLTP pita 2, di peroleh 3 pita. Pita-pita yang diperoleh kemudian di isolasi dan diuji aktivitas antibakterinya terhadap *S. aureus* dan *E. coli*. Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *E. coli* menunjukkan bahwa hanya isolat 2.3 yang aktif (Gambar 4 dan Tabel VI).



Gambar 5. Profil KLT isolat 2.3 *Eupatorium odoratum* L. menggunakan fase diam silika gel 60 F₂₅₄ dan eluen (a) n-heksan : etilasetat (3 : 1 v/v) (b) toluen : etilasetat (4 : 1 v/v) dan (c) etil asetat : metanol (1 : 1 v / v) menggunakan pereaksi Cerium Sulfat.

Berdasarkan hal tersebut maka kemudian isolat 2.3 dilakukan KLT menggunakan plat kromatografi lapis tipis silika gel 60 F₂₅₄ dan dielusi dengan kloroform : etil asetat (15 : 1 v/v). Dari hasil KLT diperoleh bahwa isolat 2.3 mempunyai satu bercak dengan $R_f = 0,39$. Isolat 2.3 ini kemudian diuji kemurniannya secara KLT dengan menggunakan fase gerak yang berbeda polaritasnya (Gambar 5).

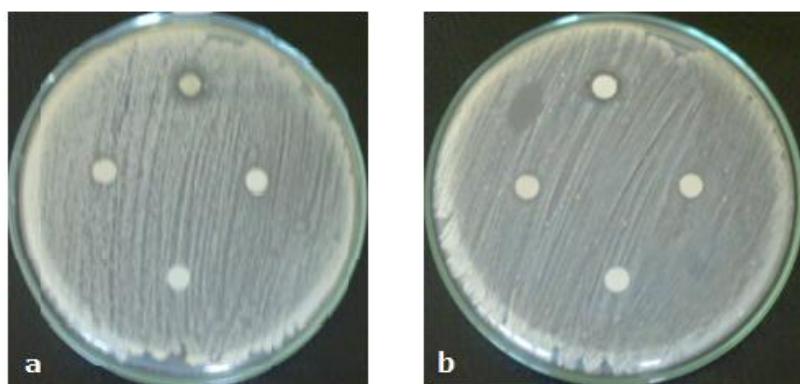
Dengan demikian dapat dikatakan bahwa isolat 2.3 dari daun *E. odoratum* telah murni secara KLT. Selanjutnya isolat 2.3 ini diuji aktivitas antibakterinya pada kosentrasi terkecil yaitu 250, 200 dan 150 μg (Gambar 6 dan Tabel VII).

Dari hasil uji diatas terlihat bahwa isolat 2.3 hanya mampu menghambat bakteri *S. aureus* dan *E. coli* pada kosentrasi terkecil 250 μg dengan diameter hambatan 9,5 dan 7,2 mm.

Identifikasi senyawa aktif antibakteri daun *Eupatorium odoratum* L.

Spektra ultra violet senyawa aktif hasil isolasi menunjukkan adanya absorbansi maksimum pada panjang gelombang (λ) 291 nm. (Silverstein *et al.*, 1991) menyatakan bahwa data serapan untuk aldehid dan keton jenuh memiliki λ_{max} antara 279 – 299 nm, dan pita serapan pada λ_{max} 291 nm merupakan transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ dari inti aromatic dan menunjukkan adanya gugus kromofor yang panjang. Untuk mengidentifikasi gugus fungsional yang ada pada senyawa hasil isolasi, senyawa dianalisis menggunakan spektrofotometer infra merah. Dari spektra menunjukkan serapan kuat (*strong*) dan tajam

pada 3410,3 cm^{-1} yang merupakan pita uluran OH, hal ini menunjukkan adanya gugus (-OH) pada senyawa isolasi, dan diperkuat dengan adanya pita serapan pada 1158 dan 1132,1 cm^{-1} yang merupakan ikatan C-O, pita ini muncul dikarenakan oleh adanya interaksi antara tekukan O-H dan uluran C-O gugus C-O-H. Serapan yang lemah (*weak*) pada 1250,8 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus C-O-C epoksi, yang diperkuat dengan adanya pita serapan pada daerah 812,2 cm^{-1} dan 764,0 cm^{-1} . Hal ini diperkuat lagi menurut Silverstein *et al.*, (1991) bahwa uluran simetrik atau kerapan nafas cincin, pada cincin epoksi yakni gerakan memanjang dan memendek secara sefasa pada seluruh ikatan cincin, terjadi didekat 1250 cm^{-1} dengan pita lainnya muncul di daerah 950 – 810 cm^{-1} yang merupakan hasil uluran cincin taksimetrik, ketika ikatan C-C memanjang sementara ikatan C-O memendek. Serapan 1733,7 cm^{-1} merupakan serapan khas untuk gugus karbonil (C=O), dan serapan pada daerah 2925,4 cm^{-1} dan 2853,3 cm^{-1} menunjukkan adanya -CH bending yang merupakan hidrokarbon alifatik dan siklik (lingkar) yang tak-teregang hal ini dipertegas adanya serapan pada daerah 1458,2 cm^{-1} untuk metilen dan 1384,4 cm^{-1} untuk metil. Adanya serapan lemah (*weak*) pada daerah 1515,0 cm^{-1} dan 1536,2 cm^{-1} menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi merupakan senyawa aromatis (Silverstein *et al.*, 1991). Serapan pada daerah 1638,9 cm^{-1} yang berintensitas kuat dan



Gambar 6. Aktivitas antibakteri isolat 2.3 pada loading 250, 200, dan 150 µg pada bakteri (a) *S. aureus* ATCC 25923 (b) *E. coli* ATCC 25922.

Ket : C (kontrol -) = kloroform diameter paperdisk = 6 mm

Tabel VII. Diameter daerah hambatan isolat 2.3 pada loading 250, 200, dan 150 µg terhadap bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dan *E. coli* ATCC 25922

Organisme Uji	Diameter Hambatan pada Pengujian (mm)		
	250 µg	200 µg	150 µg
<i>S. aureus</i>	9,5	-	-
Rata-rata	9,5	-	-
<i>E. coli</i>	7,2	-	-
Rata-rata	7,2	-	-

Keterangan : - artinya tidak menghambat bakteri Diameter paperdisk = 6 mm

tajam diindikasikan merupakan daerah serapan yang khas untuk ikatan C=C. Hal ini memperkuat dugaan terdapatnya gugus kromofor pada daerah spektra UV₂₅₄ dan UV₃₆₆. Karena posisi serapannya yang kurang dari nilai 1700 cm⁻¹, maka gugus C=C tersebut dalam keadaan terkonjugasi (Silverstein *et al.*, 1991).

Spektra ¹H-NMR

Data spektra ¹H-NMR isolat 2.3 dari daun *E. odoratum* menunjukkan *chemical shift* (δ) antara 3,5-4,3 ppm, hal ini menginformasikan bahwa proton yang muncul pada δ 3,93 ppm (singlet, 3H), δ 3,82 ppm (singlet, 3H), dan δ 3,65 ppm (singlet, 3H) kemungkinan adalah proton dalam bentuk metoksi (OCH₃). Proton pada δ 4,5-6,1 ppm, menginformasikan bahwa proton pada δ 5,0 dan 4,53 ppm dengan masing-masing integrasi 1H yang sama-sama displit menjadi doublet yang tajam dengan konstanta kopling yang sama sebesar (J) 12 Hz diperkirakan proton dalam

bentuk alfa dan beta yang membentuk epoksi, munculnya epoksi ini diperkuat dengan adanya data IR dimana pada spektra IR, epoksi muncul pada daerah 1251 cm⁻¹ dan diperkuat dengan adanya pita serapan pada daerah 812 cm⁻¹ dan 764 cm⁻¹ (gambar 13). Puncak yang muncul pada δ 6,06 dan 6,14 ppm, masing-masing tampak sebagai doublet dengan tinggi integrasi 1H dan (J) 1,75 dan 2,3 Hz, diperkirakan ada dua proton aromatis dalam cincin benzen yang saling berdekatan dan proton ini terpisah meta satu sama lain. Signal proton pada δ 5,7 ppm tampak sebagai singlet dengan tinggi integrasi 1H diperkirakan proton dalam bentuk OH. Proton yang muncul pada δ 7,16 ppm ($d; J = 1,75$ Hz; 1H), δ 6,93 ppm ($d; J = 8$ Hz; 1H) dan δ 7,05 ppm ($dd; J = 8,55$ & $1,75$ Hz; 1H) diperkirakan tiga proton dari cincin benzen yang saling berdekatan. Proton dengan δ 6,93 ppm muncul sebagai doublet yang tajam dengan konstanta kopling sebesar 8 Hz, proton ini diperkirakan hasil kopling dengan

proton tetangganya dalam satu cincin aromatik yang terpisah *ortho*. Signal proton dengan δ 7,16 ppm muncul sebagai doublet dengan konstanta kopling yang kecil yaitu 1,75 Hz, diperkirakan proton yang berkedudukan *meta* dengan proton tetangganya. Proton pada δ 7,05 ppm muncul sebagai *doublet of doublet* dengan konstanta kopling 8,55 & 1,75 Hz, diperkirakan proton ini berkedudukan *ortho* dengan proton tetangganya dan berposisi *meta* dengan proton tetangganya pula. Dengan demikian diperkirakan terdapat tiga proton aromatis (dalam cincin benzen).

Berdasarkan semua data-data spektrum pendukung yang tersebut diatas, maka isolat 2.3 dari daun *Eupatorium odoratum* Linn tidak dapat diidentifikasi. Namun diperkirakan senyawanya adalah kalkon yang mengandung epoksi.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

- Isolat aktif dari daun *E. odoratum* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *E. coli* pada loading terkecil 250 μg dengan diameter masing-masing 9,5 dan 7,2 mm.
- Golongan senyawa yang terkandung pada isolat aktif antibakteri dari daun *E. odoratum* diperkirakan adalah kalkon yang mengandung epoksi.
- Struktur isolat aktif antibakteri dari daun *E. odoratum* belum dapat diperkirakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Armando Cáceres., Herlinda Menéndez., Emilia Méndez., Ericka Cohobón., Blanca E. Samayo., Elsa Jauregui et al., 1995. Antigonorrhoeal Activity of Plants Used in Guatemala for The Treatment of Sexually Transmitted Diseases. *J. Ethnopharmacol.*, 48 (2) : 85-88.
- Awoyinka, O.A., Balogun, I. O., Ogunnowo, A.A., 2007, Phytochemical Screening and In Vitro Bioactivity *Cnidoscolus aconitifolius* (Euphorbiaceae), *J. of Medicinal Plants Res.*, 1(3):063-065.
- Inya-agha, S.I., B.O. Oguntiemein, A. Sofowora and T.V. Benjamin, 1987, Phytochemical and Antibacterial Studies on the Essential Oil of *Eupatorium odoratum* L., *Pharmaceutical biology*, (1) vol. 25, pages 49-52, Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, University of Lagos, Nigeria.
- Irobi, O.N., 1997, Antibiotic Properties of Ethanol Extract of *Chromolaena odorata* (Astraceae). *International Journal of Pharmacognosy*, 35(2):111-115.
- James A, Duke SA, Edward SA, 1989, *Medicinal Plants of China*, 4th ed. Michigan, In The United States of America.
- Jane R.M.R., Albuquerque, Edilberto R. Silveira, Daniel Esdras De A. Uchoa, et al and Otilia Deusdenia L. Pessoa, 2004, Chemical Composition and Larvicidal Activity of The Essential Oils From *Eupatorium betonicaefforme* (D.C) Baker (Asteraceae), *J. Agric. Food Chem.*, 52(22), pp 6708-7611
- Owolabi, M.S., Akintayo Ogundajo., Kamil O. Yusuf, Labunmi Lajide., Heather E.Villanueva., Jessika A. Tuten., and William N.Setzer., 2010, Chemical Composition and Bioactivity of the Essential Oil of *Chromolaena odorata* from Nigeria, ACG Publication, *Records Natural Products*, 4:1 72-78.
- Purwati, 2003, *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Organik Dalam daun Eupatorium odoratum L.*, Tesis, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Rungnapa,O., 2003, *Phytochemistry and Antimalarial Activity of Eupatorium odoratum L.*, Thesis, Pharmaceutical Chemistry And Phytochemistry, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University, Bangkok
- Saiful, 2005, *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Antimikroba Dari Daun Galenggang (Cassia alata Linn)*. Tesis, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C. and Morril, T.C., 1981, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, Fourth Edition, John Wiley and Sons Inc., USA.
- Thakong, K., 1999, *A Study on The Antimalarial Constituents and Chemical Composition of Eupatorium odoratum L.*, Thesis M.Sc (Pharmaceutical Chemistry and Phytochemistry) Faculty of Graduate Studies, Mahidol University, Bangkok.