

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil

4.1.1. Ekstraksi sampel daun tumbuhan pacar jawa (*Lawsonia inermis* Lin)

Sebanyak 250 g serbuk daun Pacar jawa, pertama-tama di ekstrak dengan n-heksan, diperoleh ekstrak heksan sebanyak 6 g yang berwarna hitam kehijauan. Setelah diekstrak dengan heksan dilanjutkan dengan menggunakan metanol dan diperoleh ekstrak metanol sebanyak 35,7 g.

4.1.2. Fraksinasi ekstrak dengan kromatografi kolom

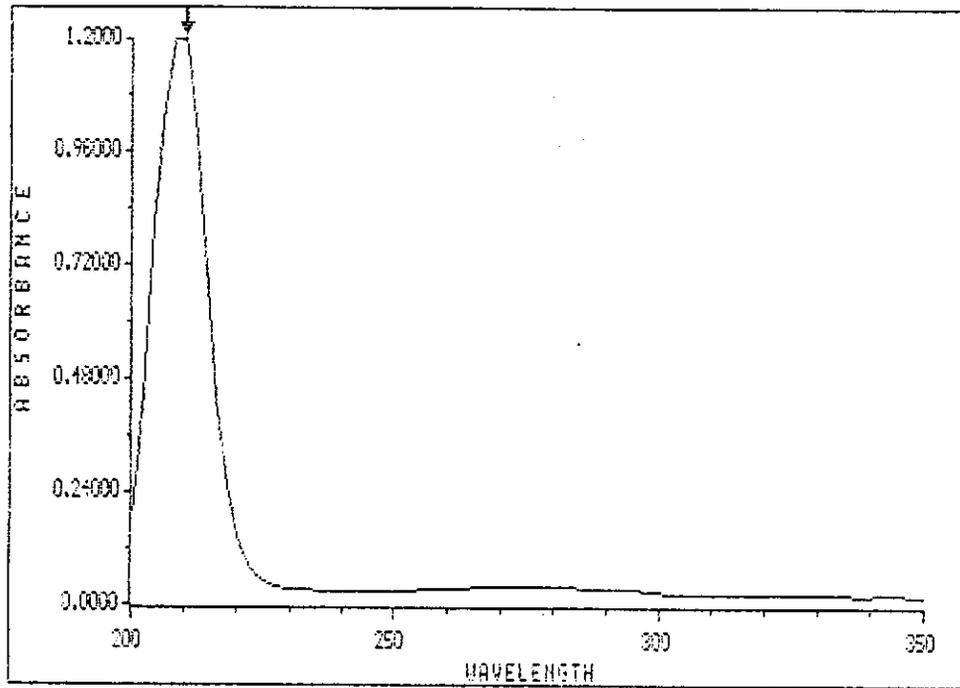
Ekstrak heksan setelah dilakukan fraksinasi dengan kromatografi kolom diperoleh sebanyak 8 fraksi. Masing-masing fraksi ini dilakukan uji aktivitas antimikrobia.

Dari 8 fraksi hasil kromatografi kolom, fraksi 6 (F_6) yang berupa padatan dilakukan rekristalisasi. Hasil rekristalisasi diperoleh kristal putih (diberi kode LiH) dengan titik leleh 130-131°C. Uji kemurnian dengan kromatografi lapis tipis (KLT) memberikan satu noda dengan Rf: 0,30 (heksan : etilasetat = 8 : 2); 0,34 (kloroform); 0,62 (kloroform : etilasetat = 6 : 4) dan 0,80 (heksan : etilasetat = 1 : 1). Kristal ini memberikan warna biru dengan pereaksi penampak noda Libermann-Burchard.

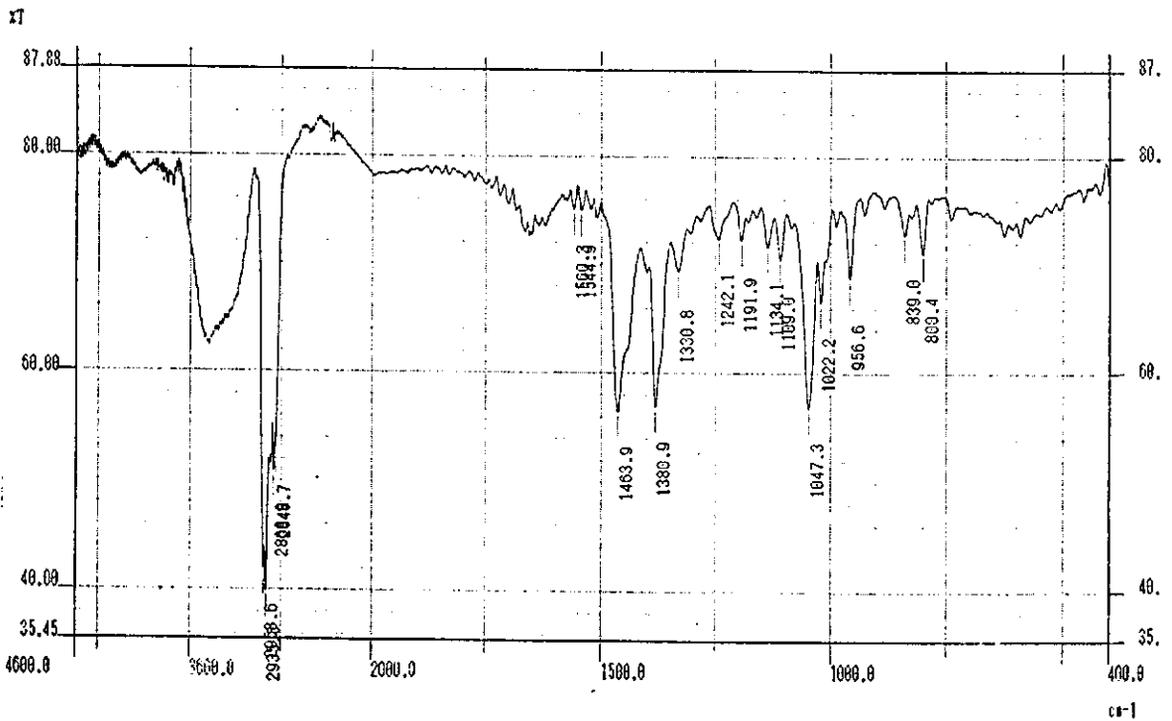
Spektrum ultraviolet (UV) senyawa LiH menunjukkan serapan maksimum (λ maks) (EtOH): 210 nm. Penambahan dengan basa tidak terjadi perubahan panjang gelombang (efek batokromik) (Gambar 1).

Spektrum inframerah (IR) memberikan pita serapan pada bilangan gelombang: 3430 cm^{-1} , 2968 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} , 1464 cm^{-1} , 1381 cm^{-1} , 1047 cm^{-1} , 956 cm^{-1} , 800 cm^{-1} (Gambar 2).





Gambar 1. Spektrum ultraviolet senyawa LiH

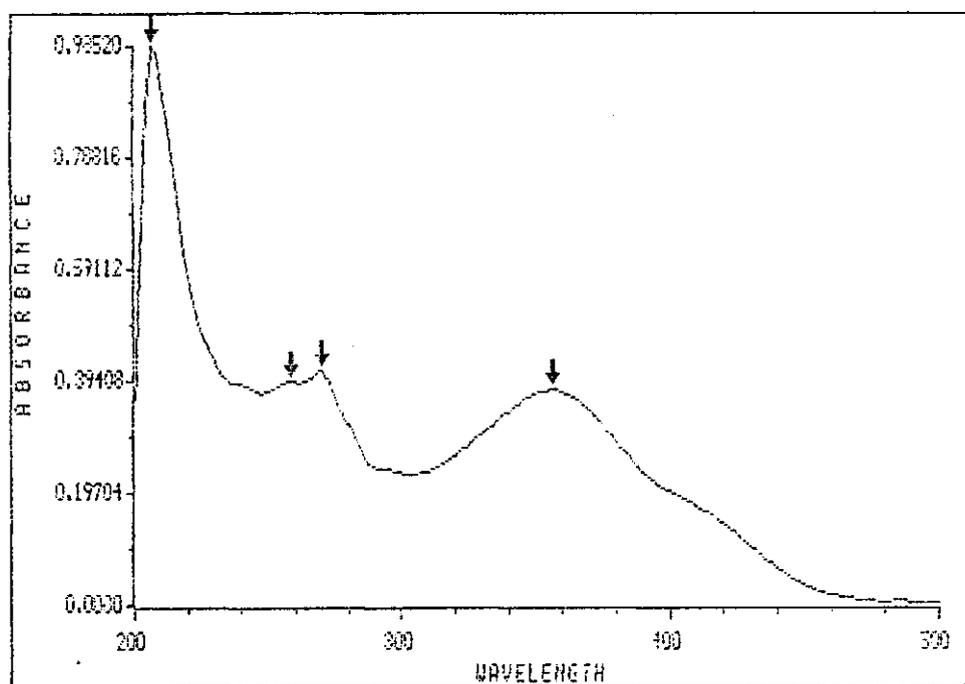


Gambar 2. Spektrum inframerah senyawa LiH

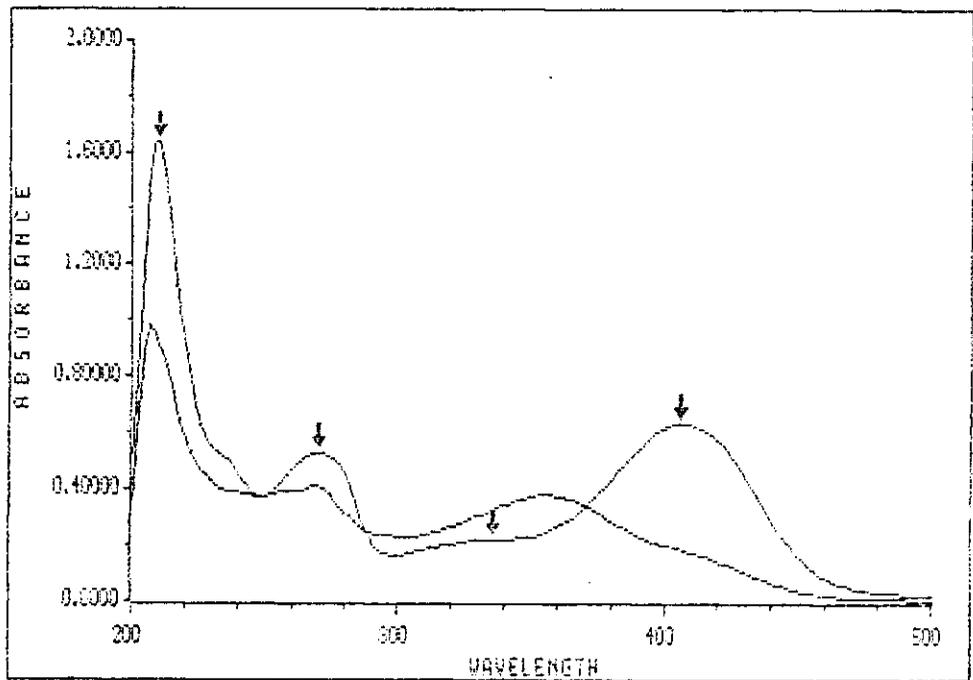
Ekstrak metanol setelah dilakukan fraksinasi dengan kromatografi kolom, dilanjutkan dengan KLT (Lampiran 2) diperoleh 6 fraksi. Fraksi 3 (F₃) berbentuk padat dilakukan rekristalisasi diperoleh kristal sebanyak 103 mg yang diberi kode LiM. Uji shinoda kristal LiM memberikan warna merah lembayung.

Kristal LiM mengalami terdekomposisi pada suhu 260°C. Hasil uji KLT memberikan satu noda dengan berbagai sistem eluen dengan Rf: 0,73 (etilasetat); 0,75 (kloroform : metanol = 8 : 2); dan 0,69 (etilasetat : metanol = 9 : 1).

Spektrum UV kristal LiM memberikan serapan maksimum (λ maks) (EtOH): 206 nm (A= 0,985), 258 nm (A= 0,394), 270 nm (A= 0,411) dan 356 nm (A= 0,378) (Gambar 3). Penambahan basa (NaOH) menghasilkan serapan maksimum (λ maks) (EtOH + NaOH): 210 nm (A=1,63), 270 nm (A= 0,53), 336 nm (A= 0,221) dan 406 nm (A= 0,639) (Gambar 4).

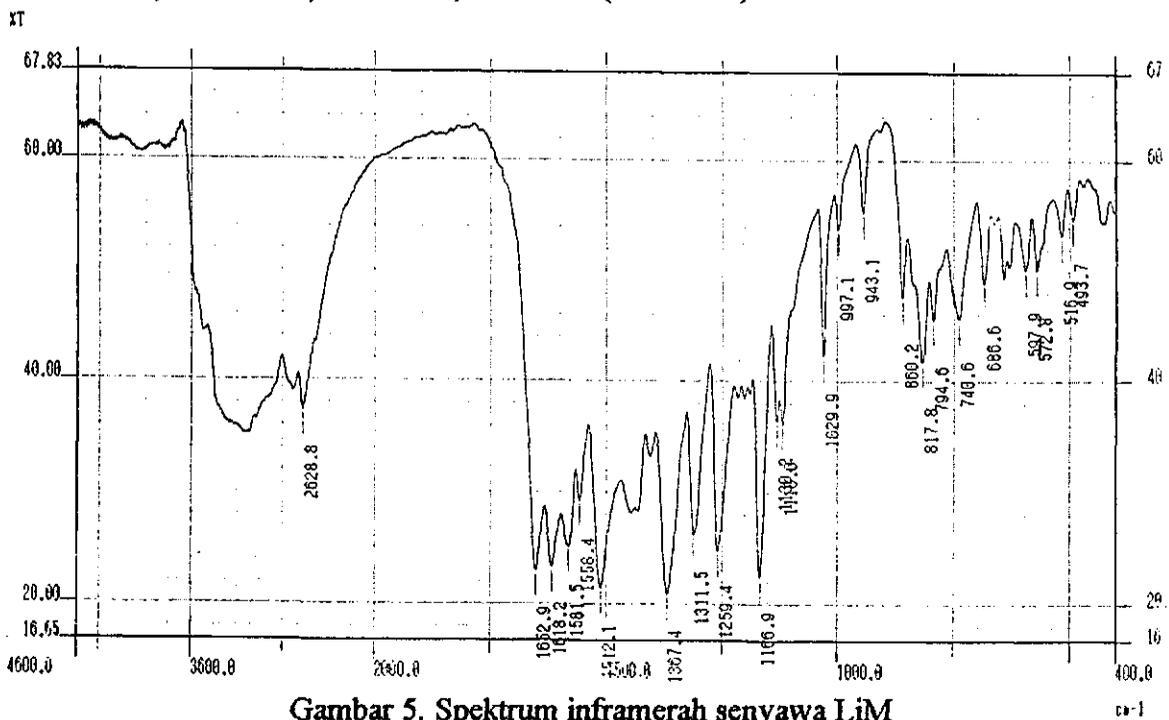


Gambar 3. Spektrum UV senyawa LiM dalam etanol



Gambar 4. Spektrum UV senyawa LiM dalam etanol + NaOH

Spektrum inframerah terjadi pita serapan pada bilangan gelombang: 3100 cm^{-1} , 2700 cm^{-1} , 2629 cm^{-1} , 1663 cm^{-1} , 1618 cm^{-1} , 1581 cm^{-1} , 1558 cm^{-1} , 1512 cm^{-1} , 1367 cm^{-1} , 1259 cm^{-1} , 1167 cm^{-1} , 1030 cm^{-1} , 817 cm^{-1} (Gambar 5).



Gambar 5. Spektrum inframerah senyawa LiM

4.1.3. Uji aktivitas antibakteri

Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap ekstrak heksan dan hasil fraksinasinya ternyata tidak aktif sebagai antibakteri yang diuji.

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak total metanol dan hasil fraksinasinya dapat dilihat pada Tabel 1. Bentuk daerah hambatan terhadap bakteri yang diuji dapat dilihat pada Lampiran 3.

Tabel 1. Diameter daerah hambatan (mm) pertumbuhan bakteri oleh ekstrak metanol dan hasil fraksinasinya

| Jenis Bakteri | Diameter daerah hambatan (mm) | | | | | | |
|------------------------------|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | Ekstrak total | F ₁ | F ₂ | F ₃ | F ₄ | F ₅ | F ₆ |
| <i>Escherichia coli</i> | 11 | 12 | 13 | 15 | 12 | 12 | 10 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 12 | 14 | 15 | 16 | 13 | 13 | 11 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 11 | 9 | 13 | 16 | 13 | 11 | 12 |

Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap senyawa LiM dan senyawa pembanding (tetrasiklin 30 µg) dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Diameter daerah hambatan (mm) pertumbuhan bakteri oleh senyawa LiM dan antibiotika tetrasiklin

| Jenis bakteri | Tetrasiklin 30 µg | Senyawa LiM (5%) | Senyawa LiM (10%) |
|------------------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 21 | 8 | 12 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 16 | 9 | 13 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 22 | 8 | 12 |

4.1.4. Uji aktivitas antijamur

Ekstrak heksan dan hasil fraksinasinya tidak dapat menghambat pertumbuhan jamur yang diuji. Ekstrak metanol dan hasil fraksinasinya juga tidak aktif terhadap jamur yang diuji.

4.2. Pembahasan

4.2.1. Ekstrak n-heksan

Hasil ekstraksi 250 g serbuk daun Pacar jawa (*Lawsonia inermis* Linn) dengan pelarut n-heksan diperoleh 6 g ekstrak kental yang berwarna hitam kehijauan. Ekstrak ini difraksinasi dengan kromatografi kolom diperoleh 8 fraksi. Fraksi 6 (F₆) yang berbentuk padat dilakukan rekristalisasi dengan pelarut heksan diperoleh kristal putih LiH yang mempunyai titik leleh 130-131°C.

Uji kromatografi lapis tipis (KLT) kristal LiH memberikan satu noda dengan berbagai eluen dengan harga R_f = 0,30 (heksan : etilasetat = 8 : 2); 0,34 (kloroform); 0,62 (kloroform : etilasetat = 6 : 4) dan 0,80 (heksan : etilasetat = 1 : 1), ini menunjukkan bahwa kristal LiH sudah murni. Kristal ini memberikan warna biru dengan pereaksi Liebermann-Burchard yang berarti senyawa LiH termasuk golongan senyawa steroid.

Hasil pengukuran spektrum UV senyawa LiH memberikan serapan maksimum pada $\lambda = 210$ nm, dengan penambahan basa tidak terjadi pertambahan panjang gelombang (efek batokromik) yang berarti, ini menunjukkan bahwa senyawa LiH tidak mempunyai gugus ausokrom yang berkonjugasi dengan ikatan rangkap.

Hasil analisa dengan spektrum IR senyawa LiH menunjukkan adanya vibrasi ulur OH pada bilangan gelombang 3430 cm⁻¹, ini diperkuat dengan adanya vibrasi ulur C-O pada 1381 cm⁻¹ dan 1047 cm⁻¹. Adanya serapan pada bilangan gelombang pada 2968 cm⁻¹ merupakan ulur C-H dan 1650 cm⁻¹ merupakan ulur C=C dari senyawa alipatik.

Dari data di atas, kristal LiH diduga merupakan senyawa golongan steroid, karena dengan pereaksi Liebermann-Burchard memberikan warna biru. Senyawa LiH mempunyai ikatan rangkap C=C yang tidak berkonjugasi, selain itu juga terdapat gugus OH tetapi tidak berkonjugasi dengan ikatan rangkapnya, hal ini didukung oleh data UV yang hanya menyerap pada panjang gelombang 210 nm dan tidak terjadi efek batokromik setelah dilakukan penambahan dengan basa.

Ekstrak heksan dan hasil fraksinasinya tidak aktif terhadap spesies bakteri dan jamur yang diuji, ini berarti ekstrak heksan dan fraksi-fraksinya yang bersifat kurang polar tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan jamur yang diuji.



4.2.2. Ekstrak metanol

Dari 250 g serbuk daun Pacar jawa/Inai diperoleh sebanyak 35,7 g ekstrak metanol. Pemisahan ekstrak metanol dengan kromatografi kolom diperoleh 6 fraksi. Dari 6 fraksi ini, fraksi 3 (F₃) berbentuk padat dan dilakukan rekristalisasi dengan pelarut etilasetat diperoleh kristal putih kekuningan LiM dengan titik leleh 260°C (terdekomposisi).

Kristal LiM yang diperoleh telah murni karena memberikan satu noda pada plat KLT dengan berbagai eluen dan mempunyai harga R_f sebagai berikut: 0,73 (etilasetat), 0,75 (kloroform : metanol = 8 : 2) dan 0,69 (etilasetat : metanol = 9 : 1).

Pengukuran dengan spektrum UV senyawa LiM memberikan serapan maksimum pada $\lambda = 206 \text{ nm}$, 258 nm , 270 nm dan 356 nm . Perlakuan dengan penambahan pereaksi geser basa (NaOH) terjadi efek batokromik kearah panjang gelombang yang lebih besar dengan serapan maksimum menjadi 210 nm , 270 nm , 336 nm dan 406 nm . Dari data ini dapat disimpulkan bahwa senyawa LiM merupakan senyawa yang mempunyai ikatan rangkap yang berkonjugasi, dimana terjadi eksitasi dari orbital $\pi \rightarrow \pi^*$ dengan $\lambda_{\text{maks}} = 206 \text{ nm} - 270 \text{ nm}$. Terdapatnya $\lambda_{\text{maks}} 270 \text{ nm} - 356 \text{ nm}$ diakibatkan terjadinya eksitasi elektron dari orbital $\pi \rightarrow \pi^*$ yang berkonjugasi dan $n \rightarrow \pi^*$ dari gugus ausokrom dengan elektron yang tidak berpasangan, gugus ini berkonjugasi dengan ikatan rangkapnya. Dugaan ini didukung oleh data UV, dimana dengan penambahan basa terjadi pergeseran serapan maksimum kearah panjang gelombang yang lebih panjang (efek batokromik).

Hasil pengukuran spektrum IR menunjukkan adanya ulur OH pada bilangan gelombang 3100 cm^{-1} melebar, yang kemungkinan disebabkan terjadinya ikatan hidrogen gugus-gugus OH. Serapan pada daerah 2700 cm^{-1} dan 2629 cm^{-1} merupakan ulur C-H dan serapan 1663 cm^{-1} , 1618 cm^{-1} merupakan ulur karbonil C=O yang berkonjugasi dengan ikatan rangkap. Serapan pada bilangan gelombang 1581 cm^{-1} dan 1558 cm^{-1} merupakan ulur C=C sistem terkonjugasi. Terdapatnya gugus fungsi OH didukung dengan terdapatnya serapan ulur C-O pada daerah serapan 1259 cm^{-1} , 1167 cm^{-1} dan 1030 cm^{-1} .

Dari data spektrum UV dan IR, dapat disimpulkan bahwa senyawa LiM merupakan senyawa flavonoid yang mempunyai gugus fungsi OH dan C=O, dimana ikatan rangkap C=C berkonjugasi dengan ausokrom OH. Data ini didukung oleh uji



shinoda yang memberikan warna merah lembayung, ini merupakan sifat senyawa golongan flavonoid.

Aktivitas antimikrobal ekstrak metanol dan hasil fraksinasinya cukup besar, terutama fraksi F_3 , dimana dengan konsentrasi 10% b/v telah mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis* dengan diameter daerah hambatan (DDH) masing-masing sebesar 15 mm, 16 mm dan 16 mm. Fraksi yang kurang aktif dari ekstrak metanol adalah fraksi F_6 . Hasil uji aktivitas antimikrobal selengkapnya terdapat pada Tabel 1. Aktifnya fraksi-fraksi ekstrak metanol ini disebabkan oleh banyaknya gugus-gugus aktif yang terdapat pada masing-masing fraksi tersebut seperti gugus OH, C=O dan lain-lain. Ekstrak metanol merupakan ekstrak polar yang mengandung senyawa-senyawa fenolat dan golongan senyawa flavonoid yang kaya akan gugus aktif terhadap mikroorganisme. Kenyataan ini didukung oleh hasil pengukuran spektrum UV dan IR terhadap senyawa LiM dari fraksi F_3 .

Dari data Tabel 1, dapat diurut kekuatan aktivitas masing masing ekstrak terhadap jenis bakteri yang diuji seperti, *Escherichia coli* aktivitas terbesar adalah $F_3 > F_2 > F_1 = F_4 = F_5 > F_6$. Untuk bakteri *Staphylococcus aureus* aktivitas terbesar adalah $F_3 > F_2 > F_1 > F_4 = F_5 > F_6$, sedangkan terhadap bakteri *Bacillus subtilis* adalah $F_3 > F_2 = F_4 > F_6 > F_5 > F_1$.

Aktivitas antimikrobal senyawa LiM dengan konsentrasi 10% sedikit menurun dibandingkan dengan F_3 (Tabel 2) , ini disebabkan senyawa yang mempunyai aktivitas besar pada F_3 diduga bukan kristal LiM semata-mata, tetapi berasal dari bagian yang belum berhasil didapatkan.

