

IDENTIFIKASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI TERAKTIF DAUN PACAR KUKU (*Lawsonia inermis* Linn.) TERHADAP *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli*

Nesti Handayani¹, Aprilia Fitriana², Desi Suci Handayani²

1. Jurusan Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Sebelas Maret

2. Jurusan Kimia, Fakultas MIPA Universitas Sebelas Maret

ABSTRAK

Telah dilakukan uji aktivitas antibakteri fraksi teraktif daun pacar kuku (*Lawsonia inermis* Linn.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Fraksi teraktif diperoleh dari hasil pemisahan kromatografi vacum cair (KVC) ekstrak etanol daun pacar kuku (*Lawsonia inermis* Linn.) yang telah melalui tahap maserasi dengan pelarut etanol 70%. Proses KVC dilakukan dengan menggunakan tiga eluen yaitu n-heksan, etil asetat, dan etanol. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar. Komponen kimia dalam fraksi teraktif diidentifikasi melalui skrining fitokimia dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi gas-spektrometer massa (GC-MS). Uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak etanol dan fraksi-fraksi daun pacar kuku (*Lawsonia inermis* Linn.) mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Fraksi etil asetat adalah fraksi teraktif anti bakteri. Identifikasi senyawa dalam fraksi teraktif melalui kromatografi lapis tipis (KLT) menunjukkan adanya golongan senyawa flavonoid, terpenoid, antrakuinon, saponin, dan asam lemak. Analisis GC-MS menunjukkan adanya senyawa dominan *2-pentanone, 4-hydroxy-4-methy, coumarin, hexadecanoic acid, methyl ester, dan 10-octadecanoic acid*.

Kata kunci : *Lawsonia inermis* Linn., antibakteri, fraksi teraktif, identifikasi

IDENTIFICATION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST OF THE MOST ACTIVE FRACTION OF PACAR KUKU (*Lawsonia inermis* Linn.) AGAINST *Staphylococcus aureus* AND *Escherichia coli*

ABSTRACT

The test of antibacterial activity of the most active fraction of pacar kuku (*Lawsonia inermis* Linn.) leaf against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* has been conducted. The most active fraction was obtained by liquid vacuum chromatography crude extract of ethanol. The crude extract of ethanol was extracted through a maceration using ethanol 70%. Liquid vacuum chromatography was carried out using three eluents such as n-hexane, ethyl acetate, and ethanol. The test of antibacterial activity was evaluated by agar diffusion method. The most

active fraction's compounds were identified by screening phytochemical using thin layer chromatography and gass chromatography-mass spectrometry. The test of antibacterial activity indicated crude extract of ethanol and pacar kuku (*Lawsonia inermis* Linn.) leaf's fractions have antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Ethyl acetate fraction was the most active fraction for all bacterial tested. Identification of the most active fraction's compounds identified by thin layer chromatography showed ethyl acetate fraction contains flavonoids, terpenoids, anthraquinones, saponin, and fatty acid. The analysis of GC-MS showed ethyl acetate fraction contains 2-pentanone, 4-hydroxy-4-methyl, coumarin, hexadecanoic acid, methyl ester, and 10-octadecanoic acid.

Key word : *Lawsonia inermis* Linn., antibacterial, most active fraction, identification

PENDAHULUAN

Pacar kuku atau Henna (*Lawsonia inermis* Linn.) merupakan salah satu tanaman berkhasiat obat. Pacar kuku bagian daun, bunga, biji, kulit batang dan akar berpotensi menyembuhkan sakit kepala, arthritis, diare, leprosy, dan demam (Chaudhary, 2010). Selain itu daun pacar kuku juga mampu menyembuhkan radang ruas jari (panaritium) dan luka pada kulit (Elya, 2007), serta menurunkan kadar gula darah (Inawati, 2006).

Penelitian yang telah dilakukan oleh Arun (2010) menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun pacar kuku mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Proteus mirabilis*. Pandey dan Kumar (2011), juga melaporkan bahwa ekstrak daun, ekstrak kulit batang, dan ekstrak buah pacar kuku (*Lawsonia inermis* Linn.) sangat efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Escherichia coli* dengan pelarut etanol, etil asetat, metanol, dan air. Namun penelitian ini masih menggunakan ekstrak yang belum melalui suatu tahap fraksinasi yang bertujuan untuk memisahkan senyawa campuran yang terkandung di dalamnya.

METODE PENELITIAN

Alat yang digunakan

Alat-alat yang digunakan adalah bejana maserasi dari bahan gelas, rotary evaporator (Buchi), kolom Kromatografi vacum cair (KVC), neraca analitik (Denver INST.TL603D), pendeteksi UV, hotplate-stirrer (RCT Basic Labortechnik), autoclave (Presoclave 75 P-Selecta), Laminar Air Flow (Minihelik II, dwyer), inkubator (Hotcold M P-Selecta), GC-MS (QP2010S SHIMADZHU), penyemprot KLT, pipa kapiler, perforator (6 mm), mikropipet 10-100 μ L, vortex mixer, alat-alat gelas.

Bahan yang digunakan

Bahan-bahan yang digunakan adalah simplisia daun pacar kuku (*Lawsonia inermis* Linn.), etanol 70% dan etanol 96 %, n-heksan, etil asetat, aseton, asam asetat glasial, metanol, toluen, dietil amin, dietil eter, H₂SO₄ pekat, asam formiat, AlCl₃, HCl, NaCl, bismuth nitrat, KI, SbCl₃, FeCl₃, KOH, benzene, kloroform, Plat Silika gel GF₂₅₄, larutan dimetil sulfoksida (DMSO), akuades, isolat *Staphylococcus aureus*, isolat *Escherichia coli*, MSA (Manitol Salt Agar), MCA (Mac Conkey Agar), tetrasiklin HCl.

Cara Kerja

Determinasi tanaman dan proses ekstraksi

Identifikasi dan determinasi tanaman sebagai bahan awal dilakukan pada bagian daun, batang, bunga, biji, dan buah untuk memastikan tanaman yang digunakan benar-benar *Lawsonia inermis* Linn.

Ekstraksi daun pacar kuku

Daun pacar kuku diangin-anginkan hingga kering, tanpa menerima cahaya matahari secara langsung. Setelah kering kemudian dihaluskan hingga berupa serbuk halus. Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dengan pelarut etanol 70%. Maserasi dilakukan di dalam bejana kaca, terhindar dari cahaya langsung, dan dilakukan selama 3 hari dengan pengadukan, disaring dan diuapkan hingga menjadi ekstrak kental.

Fraksinasi Ekstrak Etanol

Senyawa campuran dalam ekstrak kental etanol dipisahkan dengan kromatografi vacum cair untuk memudahkan mengetahui senyawa aktif yang berpotensi sebagai antibakteri. Pemisahan melalui KVC menggunakan silika GF₂₅₄ sebagai fase diam dan silika adsorb G₆₀ untuk mengimpregnasi sampel. Perbandingan yang dipilih antara sampel dengan fase diam adalah 1:7 sedangkan perbandingan antara sampel dengan silika adsorb adalah 1:1. Sebanyak 5 gram ekstrak kental daun pacar kuku dilarutkan dalam aseton lalu diimpregnasi dengan 5 gram silika G₆₀. Proses impregnasi dilakukan hingga sampel berupa serbuk kering. Sampel yang kering tersebut kemudian diletakkan di atas fase diam, silika GF₂₅₄ yang telah dipadatkan dalam sistem vacum KVC. Silika GF₂₅₄ yang digunakan sebanyak 35 gram. Proses pemisahan dilakukan 5 kali, dengan proses elusi dimulai dari pelarut non polar hingga polar, yaitu secara berturut-turut

heksana, etil asetat, lalu etanol. Dengan volume masing-masing sebanyak 200 mL. Hasil elusi (fraksi) kemudian ditampung, dan diperoleh fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi etanol.

Uji Antibakteri Ekstrak Etanol dan Fraksi Daun Pacar Kuku

Untuk uji antibakteri ekstrak etanol fraksi daun pacar kuku, sebanyak 2,575 gr Mac Concey (untuk *E.coli*) dan 5,4 gram MSA (untuk *S. aureus*) dilarutkan ke dalam 50 mL akuades, distirer sampai homogen, disterilkan dalam autoclave pada suhu 121 °C selama 20 menit. Sebanyak 1 ose masing-masing bakteri diambil untuk membuat suspensi bakteri, dimasukkan dalam akuades steril, diaduk sampai keruh. Sebanyak 100 mikro liter suspensi bakteri diambil dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril. Media bakteri steril dimasukkan pula kedalamnya, cawan petri digoyang, sehingga larutan tercampur rata. Larutan didiamkan sampai memadat, lalu dibuat sumuran dengan ukuran 6 mm. Sumuran diisi dengan 20 mikro liter sampel atau bahan yang diujikan, yaitu ekstrak etanol yang dilarutkan dalam DMSO dengan konsentrasi 100%, 75%, 50%, dan 25 % serta fraksi-fraksi hasil KVC, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hambatan pertumbuhan bakteri dapat diketahui dengan mengukur diameter daerah hambatan.

Uji kandungan senyawa kimia secara KLT pada fraksi teraktif

Pengujian golongan senyawa atau skrining fitokimia dapat dilakukan dengan Uji KLT menggunakan plat silika gel F₂₅₄. Sampel ditotolkan pada plat kemudian dielusi dengan larutan pengembang, lalu disemprot dengan reagen spesifik. Bercak diamati pada cahaya tampak, UV₂₅₄ nm, dan UV₃₆₅ nm. Uji KLT dilakukan terhadap

fraksi teraktif antibakteri. Metode pengujian KLT berdasarkan metode Wagner (1983) dan Harborne (1996). Uji KLT dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa meliputi flavonoid, alkaloid, tannin, saponin, antrakuinon dan asam lemak

Kromatografi Gas-Spektrometer Massa (GC-MS)

Uji GC-MS dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa antibakteri dalam fraksi teraktif antibakteri daun pacar kuku (*Lawsonia inermis* Linn.), jenis kolom AGILENTJ%W DB-panjang kolom 30 meter, diameter kolom 0,25 mm, Helium sebagai gas pembawa, jenis pengionan EI (Electron Impact), suhu kolom 70 °C, suhu injector 310 °C.

Hasil dan Pembahasan

Pengujian awal aktivitas antibakteri

Pengujian awal terhadap potensi antibakteri ekstrak etanol perlu dilakukan sebelum dilakukan pengujian aktivitas

antibakteri fraksi-fraksi yang dihasilkan dari proses KVC. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar terhadap dua bakteri, yaitu *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Pemisahan Ekstrak Etanol

Pemisahan dilakukan dengan kromatografi vacum cair (KVC). Suatu teknik kromatografi yang dilengkapi pompa vacum untuk mempercepat elusi. Elusi dimulai dari pelarut non polar sampai polar. Fraksi yang diperoleh kemudian ditampung. Hasil Pemisahan dengan kromatografi vacum cair ekstrak etanol daun pacar kuku ditampilkan pada Tabel 2.

Hasil KVC menunjukkan bahwa fraksi n-heksan memiliki rendemen terkecil (dengan banyaknya elusi yang sama) bila dibandingkan dengan kedua fraksi lainnya, yaitu sebesar 1,43% sehingga tidak mencukupi jumlahnya untuk proses pengujian aktivitas antibakteri.

Tabel 1. Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pacar Kuku

Konsentrasi Ekstrak (%)	Diameter Daerah Hambat Rata-Rata (mm)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
100	19,47±1,00	9,60±0,59
75	18,32±0,89	8,63±0,37
50	17,71±0,85	8,01±0,79
25	15,58±0,14	7,68±0,25

Keterangan : diameter lubang = 6 mm

Tabel 2. Hasil Pemisahan dengan Kromatografi Vacum Cair Ekstrak Etanol Daun Pacar Kuku

Pelarut	massa fraksi (gram)	warna	Rendemen Fraksi (%)
n-heksan	0,081	putih bening	1,43
etil asetat	0,580	cokelat jernih	5,80
etanol	5,275	cokelat pekat	52,75

Pengujian Aktivitas Antibakteri Fraksi – Fraksi Hasil Kromatografi Vacum Cair (KVC) Daun Pacar Kuku

Fraksi-fraksi hasil pemisahan KVC kemudian diuji aktivitas antibakteri dengan metode yang sama dengan pengujian awal aktivitas antibakteri ekstrak etanol. Tahap ini dilakukan untuk mengetahui fraksi teraktif antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang akan digunakan untuk penelitian lebih lanjut.

Hasil pengujian aktivitas antibakteri fraksi-fraksi hasil KVC daun pacar kuku menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki potensi yang paling tinggi untuk menghambat pertumbuhan kedua bakteri bila dibandingkan dengan fraksi etanol. Pada konsentrasi terendah, yaitu 25%, fraksi etil asetat mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan diameter daerah hambat rata-rata sebesar 19,49±1,42 mm dan bakteri *Escherichia coli* dengan diameter daerah hambat rata-rata sebesar 13,35±4,16 mm. Sedangkan pada fraksi etanol,

diameter daerah hambat rata-rata untuk bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar 13,45±1,74 mm dan bakteri *Escherichia coli* sebesar 7,67±0,32 mm.

Hasil pengujian aktivitas antibakteri fraksi-fraksi hasil KVC daun pacar kuku ditampilkan pada Tabel 3. Fraksi etil asetat merupakan fraksi yang paling aktif dilihat dari Diameter Daerah Hambatnya (DDH). Chaudhary (2010) melaporkan bahwa dalam kulit batang pacar kuku terkandung senyawa *lupeol*; *betulin*; *betulinic acid*; β -sitosterol; 3β , 30-dihydroxylupine-20(29)ene (*hennadiol*); *isopumblagin*; *3-Metilnonacosan-1-ol*; *isoscutellarin*; dan *methyl ester Lupeol*; *betulin*; *betulinic acid*; *hennadiol*; *3-Metilnonacosan-1-ol*; dan *methyl ester*; merupakan senyawa yang cenderung non polar, sedangkan *isopumblagin* bersifat semi polar, dan *isoscutellarin* bersifat polar, sehingga fraksi etil asetat kulit batang pacar kuku didominasi oleh senyawa non polar.

Tabel 3. Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri Fraksi–Fraksi Hasil KVC Daun Pacar Kuku

Bakteri	Konsentrasi Fraksi	Diameter Daerah Hambat Rata-Rata (mm)	
		Fraksi 1	Fraksi 2
<i>S. aureus</i>	100	24,14 ± 1,30	16,99 ± 1,20
	75	23,16 ± 1,33	16,05 ± 0,73
	50	20,93 ± 1,12	14,58 ± 1,52
	25	19,49 ± 1,42	13,45 ± 1,74
<i>E. coli</i>	100	16,17 ± 4,42	10,26 ± 2,08
	75	15,69 ± 4,35	9,63 ± 2,33
	50	14,85 ± 4,19	8,94 ± 2,09
	25	13,35 ± 4,16	7,67 ± 0,32

Keterangan : Diameter lubang = 6 mm
 Fraksi 1 = etil asetat
 Fraksi 2 = etanol

Skrining Fitokimia Senyawa Aktif Antibakteri

Skrining fitokimia dengan KLT (kromatografi lapis tipis) dilakukan terhadap fraksi etil asetat sebagai fraksi teraktif antibakteri untuk mengetahui golongan senyawa aktif yang terkandung dalam fraksi etil asetat daun pacar kuku, yaitu dengan melakukan pengujian golongan senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, terpenoid, steroid, antrakuinon, tanin (polifenolik), asam lemak, dan saponin. Proses skrining fitokimia dengan

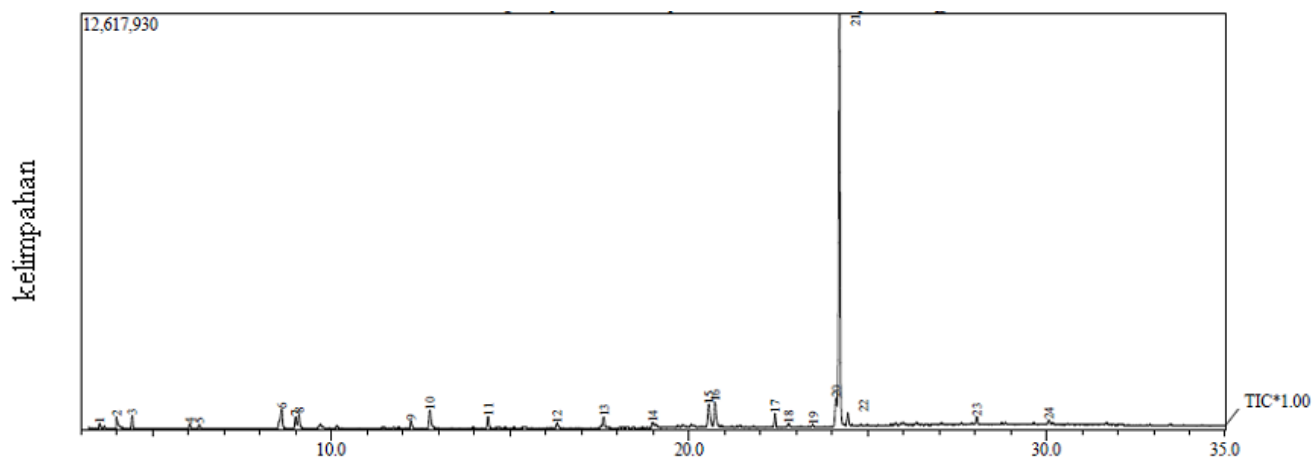
metode KLT disertai dengan penyemprotan plat menggunakan reagen-reagen yang spesifik dan sensitif terhadap senyawa target.

Hasil skrining fitokimia dengan metode KLT terhadap fraksi etil asetat daun pacar kuku, sebagai fraksi teraktif antibakteri ditunjukkan pada Tabel 4. Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa dalam fraksi etil asetat daun pacar kuku, yang merupakan fraksi teraktif antibakteri terkandung senyawa flavonoid, terpenoid, saponin, antrakuinon, dan asam lemak.

Tabel 4. Hasil Skrining Fitokimia Fraksi Etil Asetat Daun Pacar Kuku dengan KLT

No.	Golongan	Rf	Reagen Spesifik	Sinar Tampak		UV ₂₅₄		Kesimpulan
				Hasil	Teori	Hasil	Teori	
1.	Flavonoid	0,4 0,67	Amonia atau AlCl ₃ 1% dalam etanol 95%	kuning	kuning	biru tua	biru tua	+
2.	Alkaloid	-	Dragendorf	tidak teramati	cokelat	Cokelat	Ungu	-
3.	Terpenoid	0,21 0,33 0,42	Lieberman Burchad	ungu	ungu	Ungu	Ungu	+
4.	Steroid	-	SbCl ₃ dalam CHCl ₃	tidak terlihat	ungu	Cokelat	Ungu	-
5.	Antrakuinon	0,37	KOH etanolik 10% (Brontrage)	kuning	kuning	Flouresens	Flouresens	+
6.	Tanin (polifenolik)	-	FeCl ₃ 1%	tidak terlihat	hijau, biru, dan hitam	Cokelat	Flouresens	-
7.	Asam lemak	0,3 0,47	Rhodamin B dalam etanol	Cokelat	-	Ungu	Ungu	+
8	Saponin	0,11 0,22 0,32	SbCl ₃ dalam CHCl ₃	Oranye	cokelat, oranye	Cokelat	-	+

Keterangan : (+) : ada golongan senyawa kimia
 (-) : tidak ada golongan senyawa kimia



Gambar 1. Kromatogram GC-MS fraksi etil asetat daun pacar kuku (*Lawsonia inermis* Linn.)

Kromatografi Gas- Spektrometer Massa (GC-MS)

Analisis GC-MS dilakukan terhadap fraksi etil asetat, sebagai fraksi yang menunjukkan aktivitas paling aktif menghambat pertumbuhan bakteri. Melalui analisis GC-MS diharapkan senyawa-senyawa aktif dalam fraksi etil asetat yang berpotensi sebagai antibakteri tersebut dapat diketahui. GC-MS menampilkan data. kromatogram dari analisis GC dan spektra massa dari analisis MS. Spektra massa dari masing-masing puncak diperoleh dari analisis MS. Analisis spektra massa didasarkan pada trend pecahan spektra massa terutama kesamaan ion molekul, base peak (puncak

dasar), dan nilai *Similarity Index* (SI), kemudian dibandingkan dengan standar yang ada pada *library* yaitu Willey 229.LIB dan NIST62.LIB. Jika kemiripan senyawa kurang dari 85% maka spektra massa standar library tidak dapat digunakan, sehingga dibutuhkan data pembanding spektra massa dari penelitian lain yang sudah ada. Kromatogram fraksi etil asetat daun pacar kuku dari analisis GC menunjukkan 24 puncak, dan ditunjukkan pada Gambar 1. Hasil analisis GC-MS fraksi etil asetat daun pacar kuku pada puncak-puncak yang dominan ditunjukkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Analisis GC-MS Fraksi Etil Asetat Daun Pacar Kuku (*Lawsonia inermis* Linn.)

Puncak	Kelimpahan (%)	Waktu Retensi (menit)	Berat Molekul (gr/mol)	Rumus Molekul	Nama Senyawa
3	1,72	4,430	116	C ₆ H ₁₂ O ₂	2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl
10	3,41	12,756	119	C ₈ H ₈ O	2,3-dihydrobenzofuran Coumarin

17	1,75	22,411	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	<i>Hexadecanoic acid, methyl ester</i>
21	57,43	24,217	296	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	<i>10-Octadecanoic acid</i>

KESIMPULAN

1. Fraksi- fraksi daun pacar kuku (*Lawsonia inermis* Linn.) hasil pemisahan KVC memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, dan fraksi yang teraktif antibakteri adalah fraksi etil asetat
2. Analisis GC-MS menunjukkan adanya senyawa dominan *2-pentanone, 4-hydroxy-4-methyl, 2,3-dihydrobenzofuran coumarin, hexadecanoic acid, methyl ester, dan 10-Octadecanoic*

DAFTAR PUSTAKA

- Arun, K., K.G. Purushotham., Johnsy Jayarani J., dan Vasantha Kumari., 2010, In Vitro Antibacterial Activity and Flavonoid Content of *Lawsonia inermis* Linn. (Henna), *International Journal of PharmTech Research*, Vol. 2 Issue 2, p1178.
- Chaudhary, G., Goyal, S. and Poonia, P., 2010, *Lawsonia inermis* Linnaeus: A Phytopharmacological Review, *International Jurnal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 2, hlm. 91-98.

Harborne, J.B., 1996, *Metode Fitokimia*, Terbitan Ke dua, ITB, Bandung.

Inawati, Syamsudin, dan Hendiq Winarno., 2006, Pengaruh Ekstrak Daun Inai (*Lawsonia inermis* Linn.) Terhadap Penurunan Kadar Glukosa, Kolesterol Total dan Trigliserida Darah Mencit yang Diinduksi Aloksan, *Jurnal Kimia Indonesia*, Vol. 1 (2), 2006, hlm.71-77.

Pandey, Amit dan Rajesh Kumar., 2011, A Study of Extract Optimization and Antibacterial Properties of *Lawsonia inermis* Linn, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, India. Vol .11 (07), 2011

Wagner, H., 1983, *Plant and Drugs Analysis a Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer-Verlag, Berlin, Germany.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas Sebelas Maret karena penelitian ini merupakan penelitian yang didanai oleh dana BOPTN Universitas Sebelas Maret