

Isolasi dan Karakterisasi Golongan Senyawa Antibakteri *Streptococcus mutans* dari Ekstrak Etanol Daun Sosor Bebek (*Kalanchoe pinnata* (Lamk.) Pers.)

(Isolation and Characterization of Antibacterial Compound Against *Streptococcus mutans* from Ethanol Extract of *Kalanchoe pinnata* (Lamk.) Pers. Leaves)

NOVI YANTIH*, LISIA MARGARET, KARTININGSIH

Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta 12640

Diterima 8 Desember 2011, Disetujui 9 Maret 2012

Abstrak: *Streptococcus mutans* adalah salah mikroba yang bertanggung jawab terhadap bau mulut. Aktivitas ekstrak etanol dari daun Sosor Bebek (*Kalanchoe pinnata* (Lamk.) Pers.) memiliki kekuatan empat kali dari ekstrak airnya dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi suatu senyawa antibakteri dari ekstrak etanol daun *Kalanchoe pinnata* (Lamk.) Pers. Ekstrak difraksinasi menggunakan kromatografi kolom. Fraksi dipurifikasi dengan KLT dan diuji kemurnian isolat secara KCKT. Isolat dikarakterisasi menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan FTIR. Fraksinasi dengan kolom kromatografi menghasilkan 9 fraksi. Fraksi VII memiliki DDH terhadap *Streptococcus mutans* paling besar. Rendemen isolat sebesar 9,18% terhadap fraksi VII atau 0,84% terhadap ekstrak etanol dengan kemurnian 95%. Isolat diduga adalah golongan senyawa saponin.

Kata kunci: Sosor Bebek (*Kalanchoe pinnata* (Lamk.) Pers.), ekstrak etanol, antibakteri, *Streptococcus mutans*.

Abstract: *Streptococcus mutans* is one of the microbes which is responsible for the cause of bad breath. The activity of *Kalanchoe pinnata* (Lamk.) Pers. leaves ethanol extract is four times stronger than the water extract in inhibiting the growth of *Streptococcus mutans*. The aim of research is to isolate and characterize an antibacterial compound of ethanol extract of *Kalanchoe pinnata* (Lamk.) Pers. leaves. The extract was fractionated using column chromatography. The fractions were purified by TLC and the isolate were tested for its purity using HPLC. Isolate was characterized using UV-Vis spectrophotometry and FTIR. Fractionation by column chromatography generated 9 fractions. The fraction VII have the highest diameter of inhibitory against *Streptococcus mutans*. The yield of isolate was 9.18% of the fraction VII or 0.84% of the ethanol extract with purity of 95%. Isolate was suspected as a group of saponin compound.

Keywords: *Kalanchoe pinnata* (Lamk.) Pers., ethanol extract, antibacterial, *Streptococcus mutans*.

PENDAHULUAN

DI Indonesia, sebanyak 60% penduduknya menderita penyakit gigi dan mulut⁽¹⁾. Pada umumnya kasus kesehatan gigi dan mulut disebabkan oleh karies gigi, yang menjadi tempat berkembangbiak bakteri. Bakteri tersebut dapat memecah protein yang mengandung

sulfur yang akan menimbulkan bau pada rongga mulut. *Streptococcus mutans* merupakan salah satu bakteri yang bertanggung jawab terhadap timbulnya masalah kesehatan mulut, seperti bau mulut. Ekstrak etanol daun sosor bebek (*Kalanchoe pinnata* (Lamk.) Pers.) diketahui memiliki daya hambat 4 kali lebih tinggi dari ekstrak airnya terhadap *Streptococcus mutans*⁽²⁾.

Pemanfaatan sosor bebek sebagai antiseptik mulut sangat potensial karena selain memiliki daya hambat pertumbuhan bakteri, juga sangat mudah

* Penulis korespondensi, Hp. 08129624502
e-mail: novi_yantih@yahoo.com

dibudidayakan^(2,3,4). Ekstrak etanol daun sosor bebek yang dibuat secara maserasi dilaporkan telah memenuhi kriteria parameter standar umum ekstrak sesuai dengan standar Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan, Departemen Kesehatan RI⁵⁾.

Penelitian ini merupakan studi awal untuk mendapatkan senyawa pemandu dalam rangka pengembangan daun sosor bebek sebagai antiseptik mulut. Hasil penelitian diharapkan dapat bermanfaat dalam pengembangan sosor bebek sebagai produk antiseptik rongga mulut yang dalam uji mutunya membutuhkan senyawa bioaktif sebagai senyawa pemandu.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Daun sosor bebek yang diperoleh dari Kecamatan Tanasera, Bogor Utara telah dideterminasi di Herbarium Bogoriense, LBN, LIPI Bogor. Etanol 96% (Merck) sebagai pelarut pengestraksi. Bahan yang digunakan dalam uji diameter daerah hambat (DDH) adalah agar darah lempeng, agar darah tabung, kaldu pepton, kertas cakram, etanol 70% sebagai antiseptik, dan bakteri uji *Streptococcus mutans*. Untuk isolasi dan karakterisasi digunakan air suling, metanol, kloroform, silika gel GF 254, metanol grade HPLC, dan KBr untuk FTIR.

Alat. Lampu UV CAMAG, Digistor, timbangan analitik AND GR-200, Spektro-fotometer UV 1700 Shimadzu, FTIR 8400 Shimadzu, *Laminar Air Flow*, inkubator, rotavapor vakum, dan *homogenizer*

METODE. Pembuatan ekstrak etanol daun sosor bebek. Sejumlah 1 kg daun sosor bebek segar dihaluskan menggunakan blender, kemudian dimaserasi dengan 500 mL etanol pada suhu 40°C selama 24jam, kemudian disaring. Filtrat dipekatkan dengan rotavapor vakum sehingga didapatkan ekstrak kental etanol⁽⁵⁾.

Fraksinasi ekstrak etanol. Ekstrak etanol daun sosor bebek dimurnikan menggunakan kromatografi kolom dengan eluen sistem landaian dengan kloroform-metanol-air [(13:3:1), (10:3:1), (7:3:1), (5:3:1), dan (3:3:1)]. Tiap fraksi yang diperoleh ditotolkan pada lempeng KLT dan fraksi dengan profil kromatogram yang sama disatukan. Fraksi eluat yang diperoleh selanjutnya diuji aktivitas antimikroba terhadap *Streptococcus mutans*.

Uji diameter daerah hambat (DDH). Fraksi yang telah terkumpul kemudian dikeringkan. Sebanyak lebih kurang 10 mg fraksi dilarutkan dalam 100 µL kaldu pepton. Kertas cakram yang telah disterilkan kemudian dicelupkan ke dalam larutan fraksi. Lempeng agar darah dibagi menjadi beberapa bagian sesuai dengan jumlah fraksi yang diperoleh. Sebanyak 1mL suspensi bakteri 10% dimasukkan ke dalam lempeng

agar darah kemudian diratakan. Kertas cakram yang telah dicelupkan diletakkan pada lempeng agar darah, selanjutnya diinkubasi secara anaerob pada suhu kamar selama 5-7 hari.

Penapisan Fitokimia. Fraksi eluat dengan nilai DDH terbesar digunakan dalam penapisan fitokimia untuk menguji adanya alkaloid, saponin, flavonoid, tannin, steroid, dan triterpenoid dengan cara⁽⁷⁾: *Dragendorff and Meyer Test* untuk menguji adanya alkaloid; *Frothing Test* untuk menguji adanya saponin; *Wilstatter Test* untuk menguji adanya flavonoid; *Ferri klorida* untuk menguji adanya tannin; dan *Liebermann-Burchard* untuk menguji adanya steroid dan triterpenoid. Isolasi fraksi eluat. Fraksi dengan nilai DDH terbesar dianalisis secara KLT menggunakan eluen kloroform-metanol dengan sistem landaian mulai dari (10:0) sampai (0:10). Eluen dengan hasil pemisahan terbaik digunakan pada KLT preparatif untuk mengisolasi senyawa bioaktifnya. Pita dikerok, selanjutnya dilarutkan dalam kloroform. Isolat diperoleh setelah pelarut dikeringkan.

Uji kemurnian isolat. Uji kemurnian dilakukan secara KCKT menggunakan kolom C18 dan metanol grade HPLC sebagai fase gerak dengan laju alir 1 mL/menit dan detektor spektrofotometer UV-342 nm. Isolat dianggap murni apabila hanya terdapat satu puncak pada kromatogram.

Karakterisasi senyawa dengan spektrofotometri UV-Vis. Isolat dilarutkan dan diencerkan dengan etanol 95%, kemudian dibuat spektrum serapannya pada panjang gelombang 200 nm sampai 800 nm.

Karakterisasi senyawa dengan FTIR. Isolat digerus dengan serbuk KBr, kemudian dibuat spektrum FTIR pada bilangan gelombang 4000 cm⁻¹ sampai 650 cm⁻¹. Data karakterisasi menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dan FTIR selanjutnya digabungkan dengan data penapisan fitokimia untuk kemudian digunakan dalam analisis jenis golongan senyawa yang berkhasiat sebagai antibakteri dari ekstrak etanol daun sosor bebek.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fraksinasi ekstrak etanol daun sosor bebek secara kromatografi kolom menghasilkan 50 fraksi yang kemudian setelah analisis secara KLT dikumpulkan menjadi 9 fraksi dengan rendemen antara 0,31% -10,30% (Tabel 1).

Uji diameter daerah hambat (DDH) dilakukan untuk mengetahui fraksi isolat yang paling aktif menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*. Hasil menunjukkan bahwa fraksi VII memiliki potensi paling besar sebagai antibakteri karena memiliki DDH paling besar, yaitu 18 mm (Tabel 2).

Hasil penapisan fitokimia menunjukkan bahwa

Tabel 1. Hasil fraksinasi dan rendemen terhadap ekstrak etanol.

Fraksinasi Gabungan	No. Fraksi	Bobot (mg)	Rendemen (%)
1-3	I	11.2	0.31
4	II	12.8	0.35
5-10	III	24.1	0.66
11-24	IV	47.4	1.31
25-27	V	24.3	0.67
28-30	VI	48.2	1.33
31-37	VII	333.9	9.20
38-39	VIII	150.8	4.15
40-50	IX	374.0	10.30

Tabel 2. Hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode DDH.

No. Fraksi	DDH (mm)
I	15
II	9
III	12
IV	7
V	-
VI	9
VII	18
VIII	11
IX	16

fraksi VII mengandung flavonoid, tanin, dan saponin (Tabel 3). Fraksi VII kemudian dimurnikan menggunakan metode KLT-preparatif dengan eluen kloroform-metanol (8:2). Jumlah fraksi VII yang ditotolkan dengan konsentrasi 5.75 %. Hasil pemurnian dapat dilihat pada Gambar 2. Pita dengan intensitas terkuat dikerok dengan asumsi sebagai komponen yang paling berkontribusi memberi hambatan pada uji DDH.

Analisis secara KLT dilakukan terhadap fraksi VII dengan tujuan untuk mencari eluen yang sesuai guna

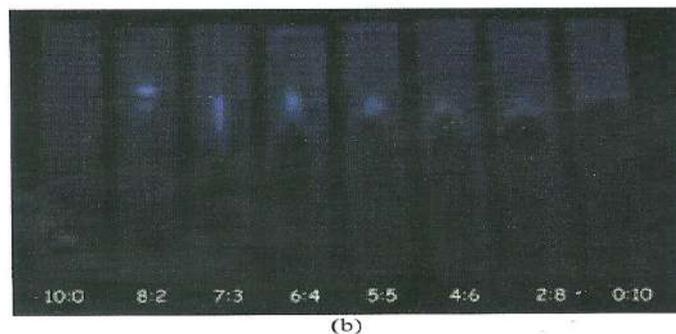
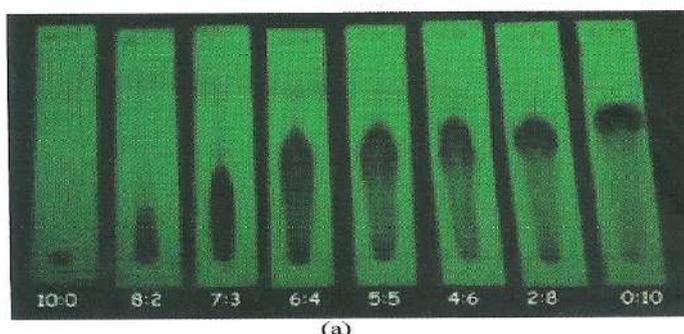
Tabel 3. Hasil Penapisan Fitokimia Fraksi VII.

No.	Penapisan Fitokimia	Pengamatan
1.	Alkaloid	-
2.	Flavonoid	+
3.	Saponin	+
4.	Tannin	+
5.	Steroid/triterpenoid	-

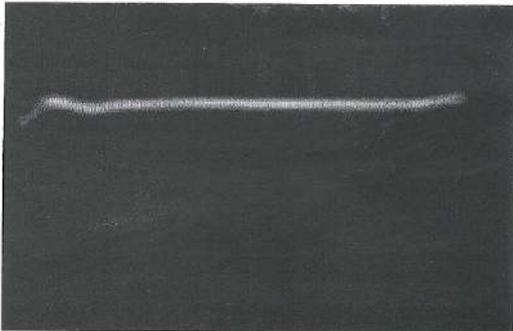
pemurnian selanjutnya. Eluen yang dicoba adalah kloroform-metanol dengan sistem landaian mulai dari (10:0) sampai (0:10). Dari semua eluen yang dicoba, ternyata yang memberikan hasil pemisahan komponen yang paling baik adalah kloroform-metanol (8:2), karena bercak yang berpendar sudah terpisah dengan baik dan tidak berekor (Gambar 1).

Senyawa flavonoid pada umumnya mempunyai gugus kromofor yang berkonyugasi dan berpendar di bawah cahaya UV. Bercak dengan $R_f = 0,69$ yang diduga golongan flavonoid selanjutnya diisolasi menggunakan KLT-preparatif. Isolat yang didapat berupa serbuk berwarna putih pucat dan berbau khas. Rendemen isolat setelah dikeringkan terhadap berat fraksi adalah 9,18% sedangkan terhadap berat ekstrak adalah 0,84%. Isolat yang sudah terkumpul kemudian dilakukan uji kemurnian. Uji kemurnian secara KCKT fase balik (C18) dengan detektor UV-342 nm menunjukkan bahwa isolat belum murni dan berdasarkan perbandingan area puncak utama terhadap total area puncak lainnya diketahui pengotornya sekitar 5% (Gambar 3).

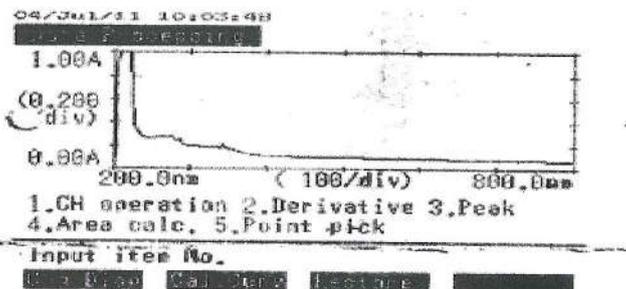
Pengukuran isolat dengan spektro fotometer UV-Vis menggunakan pelarut etanol menunjukkan bahwa senyawa dalam isolat mempunyai panjang gelombang serapan maksimum pada 260 dan 342 nm. Spektrum UV-Vis senyawa dalam isolat dapat dilihat pada Gambar 4. Hasil tersebut menunjukkan bahwa terkandung senyawa yang memiliki gugus kromofor terkonyugasi dalam struktur kimianya.



Gambar 1. Kromatogram fraksi VII dengan berbagai komposisi fase gerak kloroform-metanol. Visualisasi di bawah sinar UV 254nm (a) dan 366nm (b)



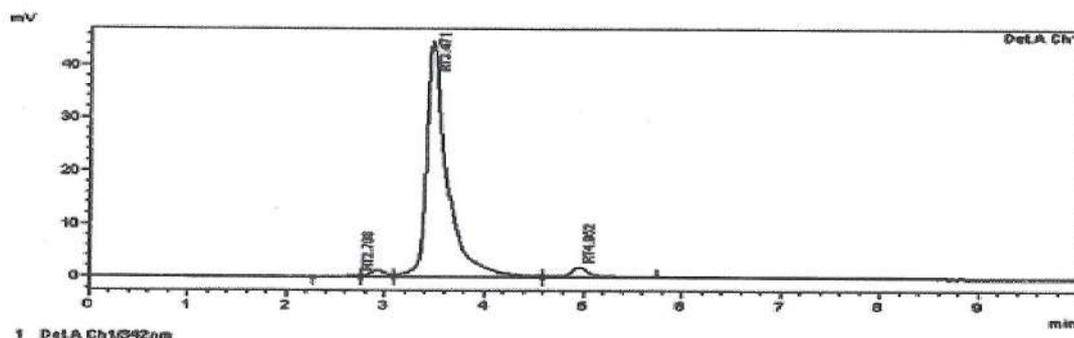
Gambar 2. Kromatogram KLT-preparatif fraksi VII dengan fase gerak kloroform-metanol (8:2) dengan jarak rambat 17 cm.



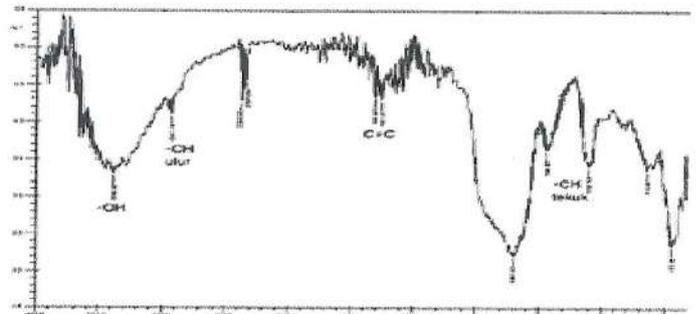
Gambar 4. Spektrum serapan ultraviolet-cahaya tampak dari larutan isolat dalam etanol.

Tabel 4. Hasil Spektrum Inframerah *Fourier Transform* isolat.

Bilangan gelombang (cm^{-1})	Gugus fungsional ⁽⁸⁾
3390,63	-OH
2927,74	C-H (ulur, alkena)
1653,85; 1631,67	C=C
1097,42	-OH bebas
802,33; 968,20	C-H (tekuk, alkena)



Gambar 3. Kromatogram isolat yang telah dimurnikan dengan KCKT fase balik menggunakan kolom C18 ukuran 250 x 4.6 mm I.D., eluen metanol dengan laju alir 1mL/menit, detektor UV-342 nm, dan volume injeksi 20 µL.



Gambar 5. Spektrum Inframerah *Fourier Transform* senyawa dalam isolat menggunakan metode cakram KBr.

Pengamatan dengan menggunakan spektrofotometer FTIR dilakukan untuk mengetahui gugus-gugus fungsional yang terdapat dalam senyawa pada isolat. Hasil spektrum transmitans dari senyawa dalam isolat dapat dilihat pada Gambar 5 dan Tabel 4.

Hasil spektrofotometri inframerah *Fourier Transform* senyawa dalam isolat menggunakan metode cakram KBr, menunjukkan bahwa senyawa dalam isolat mempunyai gugus -OH, ikatan C-H alkena ulur, ikatan C-H alkena tekuk, dan ikatan C=C.

Hasil penapisan fitokimia menunjukkan bahwa dalam fraksi VII terkandung tiga golongan senyawa yaitu flavonoid, saponin dan tanin. Ketiga golongan senyawa tersebut memiliki gugus -OH di struktur parsialnya. Spektrum transmitans khas gugus -OH adalah pola spektrum yang lebar dan intensitasnya kuat di daerah 3550-3200 cm^{-1} , biasanya overlap dengan gugus -CH di 3100-3000 cm^{-1} ⁽⁸⁾. Dari Gambar 5 terlihat adanya gugus -OH yang ditunjukkan oleh spektrum transmitans berbentuk lebar dan intensitasnya kuat di bilangan gelombang 3390,63 cm^{-1} .

Pada Gambar 5 juga dapat dilihat adanya gugus -CH ulur (*stretching*) maupun tekuk (*bending*).

Spektrum transmitans –CH ulur biasanya berada di bilangan gelombang 3000-2840 cm^{-1} dan spektrum transmitans –CH tekuk memiliki vibrasi paling spesifik di bilangan gelombang 1000-650 cm^{-1} (8). Pada Gambar 5, gugus –CH ulur terlihat di bilangan gelombang 2927,74 cm^{-1} dan gugus –CH tekuk terlihat di bilangan gelombang 802,33 cm^{-1} dan 968,20 cm^{-1} . Dari Gambar 5 juga dapat dipostulasikan bahwa isolat tidak memiliki gugus C=O karena tidak terlihat adanya transmitans pada daerah bilangan gelombang 1700 cm^{-1} . Bilangan gelombang 1667–1640 cm^{-1} menunjukkan gugus C=C yang tidak terkonjugasi pada rantai alkena linear. Gugus C=C terkonjugasi biasanya memiliki pola yang khas pada spektrum transmitans yaitu memiliki dua puncak berdekatan, satu puncak dengan intensitas lemah dan puncak lainnya dengan intensitas kuat(8). Pada Gambar 5 terlihat adanya dua puncak berdekatan yaitu pada bilangan gelombang 1653,85 cm^{-1} dan 1631,67 cm^{-1} . Meskipun berdekatan, spektrum ini memiliki intensitas yang sama dan bukan merupakan puncak yang intensitasnya lemah dan kuat, maka diduga senyawa dalam isolat tidak memiliki ikatan C=C terkonjugasi.

Berdasarkan hasil analisis gugus –OH dan gugus –CH, belum dapat ditarik kesimpulan mengenai golongan senyawa yang terkandung dalam isolat karena ketiga senyawa (flavonoid, saponin dan tanin) sama-sama memiliki gugus –OH dan –CH. Analisis gugus karbonil (C=O) tidak dapat menunjukkan bahwa isolat merupakan senyawa dari golongan flavonoid karena flavonoid memiliki gugus karbonil pada struktur bangun parsialnya. Hasil analisis gugus C=C menunjukkan bahwa isolat memiliki ikatan C=C tidak terkonjugasi, maka diduga bahwa isolat bukan merupakan senyawa dari golongan flavonoid dan tanin karena flavonoid dan tanin memiliki ikatan C=C terkonjugasi pada struktur bangun parsialnya. Bilangan gelombang 1667-1640 cm^{-1} menunjukkan gugus C=C yang tidak terkonjugasi pada rantai

alkena linear, maka dapat diduga kuat bahwa isolat mengandung senyawa golongan saponin.

SIMPULAN

Isolat yang didapat dari fraksi VII ekstrak etanol daun sosor bebek, diidentifikasi adalah senyawa golongan saponin dengan kemurnian 95% dan rendemen sebesar 9.18% dari fraksi VII atau 0,84 % dari ekstrak.

DAFTAR PUSTAKA

1. Zalnika I. 89% anak derita penyakit gigi dan mulut. Media Indonesia on line. [6 Mei 2008]; 2008.
2. Firdaus, Kartiningsih, Yantih N. Minimum inhibitory concentration (MIC) of powder ethanol extracts of *Kalanchoe pinnata* against *Streptococcus mutans*. Proceeding of the third international conference on mathematics and natural science. 2010. 520-3.
3. Akinsulire OR, Aibinu IE, Adenipekun T, Adelowotan T, Odugbemi T. In vitro antimicrobial activity of crude extracts from plants *Bryophyllum pinnatum* and *Kalanchoe crenata*. African Journal of Traditional, Complementary and Alternatif Medicines. 2007. 4(3): 338-44.
4. Akinpelu D.A. Antimicrobial activity of *Bryophyllum pinnatum* leaves. Fitoterapia. 2000. 71(2):193-4.
5. Yantih N, Diah W, Anggelina O, Firdaus, and Kartiningsih. General standard parameters of aqueous and ethanol extracts of *Kalanchoe pinnata*. Proceeding the third International Conference on Mathematics and Natural Science. 2010. 558-63.
6. Okwu DE, Nnamdi FU. Two novel flavonoids from *Bryophyllum pinnatum* and their antimicrobial activity. J Chem Pharm Res ISSN No:0975-7384 CODEN(USA): JCPRC5. 2011. 3(2):1-10
7. Farnsworth NR. Biology and phytochemical screening of plants. Pharm Sci. 1966. 55: 225-76.
8. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. Spectrometric identification of organic compounds. New York: John Wiley & Sons Inc; 2005. 72-108, 119-123.