

# ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA ANTIMIKROBA DARI *LANTANA CAMARA* L.

## *Isolation and Identification Antimicrobial Compound from Lantana Camara L.*

Yustina Sri Hartini<sup>1</sup>, Subagus Wahyuono<sup>2</sup>, dan Susi Irvati<sup>3</sup>

Program Studi Ilmu Farmasi  
Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada

### ABSTRACT

The isolation and identification of antimicrobial compound from the aerial parts of *Lantana camara* L. plant has been carried out. The isolation was started by maceration of the the aerial parts of *Lantana camara* L. plants with chloroform (CHCl<sub>3</sub>), then remacerated with methanol (MeOH). Both extracts were tested for their antimicrobial activity using agar dilution method. The active extract was then extracted with acetone, followed by microbial activity and the active fraction was then refractinated with 80% MeOH, followed by microbial activity test. The active fractions were then defractinated using vacuum liquid chromatography (VLC). The fractions were tested for their antimicrobial activity using agar dilution method, followed by bioautography method. Active spot was then isolated using preparatif TLC. The minimal bactericidal concentration (MBC) value of isolate (LC<sub>01</sub>), was determined using agar dilution method. Structure elucidation of active compound was established based on the spectra of ultra violet (UV), infra red (IR), mass spectra (MS), nuclear magnetic resonance (NMR)<sup>13</sup>C, NMR<sup>1</sup>H, correlation spectroscopy (COSY) and heteronuclear correlation (HETCOR).

The UV spectra of isolate (LC<sub>01</sub>), showed the maximum absorbance (I) at 241 nm. The IR spectra showed the wavenumber (n) at 3448 cm<sup>-1</sup> (OH), 2918 cm<sup>-1</sup>, 2850 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>, alifatik), 1718 cm<sup>-1</sup> (CO dari COOH) dan 1637 cm<sup>-1</sup> (C=C). High resolution electrospray ionization showed molecular ion m/z 470 (C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>4</sub>). The NMR<sup>13</sup>C spectra at 100 MHz showed 35 absorbance (35 C), 178 ppm (COOH), 165,5 ppm (C=O ester), 122,5 ppm, 143 ppm (the oleanilic families, b-amirin skeleton). Based on UV, IR, MS, and NMR<sup>13</sup>C, identification of isolate LC<sub>01</sub> seems to be a compound that have olean type, b-amirin skeleton, with ester of carboxylic acid. The NMR<sup>1</sup>H spectra at 400 MHz showed 8 sharp singlet absorbances (8 methyl singlets), and absorbance at 5,56 ppm (atom H at C<sub>32</sub>). Based on the spectrum and comparison with literature study, and ensure with COSY and HETCOR spectrum, it can be concluded that the aktif compound is lantanilic acid. Based on the antimicrobial activity test of isolate (LC<sub>01</sub>), *Lantana camara* L. plant contains lantanilic acid, that be able to kill the growth of *Staphylococcus aureus* at the concentration of 375 mg/ml.

**Keywords :** Antimicrobial -- *Lantana camara* L. -- and Lantanilic acid.

1. Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta
2. Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
3. Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

## PENGANTAR

Saat ini penyakit infeksi dan resistensi mikroba terhadap antibiotika merupakan masalah kesehatan masyarakat, oleh karena itu pencarian antibiotika baru termasuk yang berasal dari tanaman terus dilakukan. Tumbuhan *Lantana camara* L. atau dalam bahasa Jawa disebut Tembelekan (suku Verbenaceae) secara tradisional tanaman ini digunakan untuk mengobati berbagai penyakit infeksi batuk, desentri, eksim; sedangkan laporan penelitian menyebutkan adanya bermacam-macam aksi farmakologis. Mengingat kebutuhan akan antibiotika yang potensial maka dilakukan isolasi dan identifikasi senyawa antimikroba yang terdapat dalam tumbuhan *Lantana camara* L. (Martini dan Eloff, 1998; Ghisalberti, 2000; Watcher, et al., 2001).

## CARA PENELITIAN

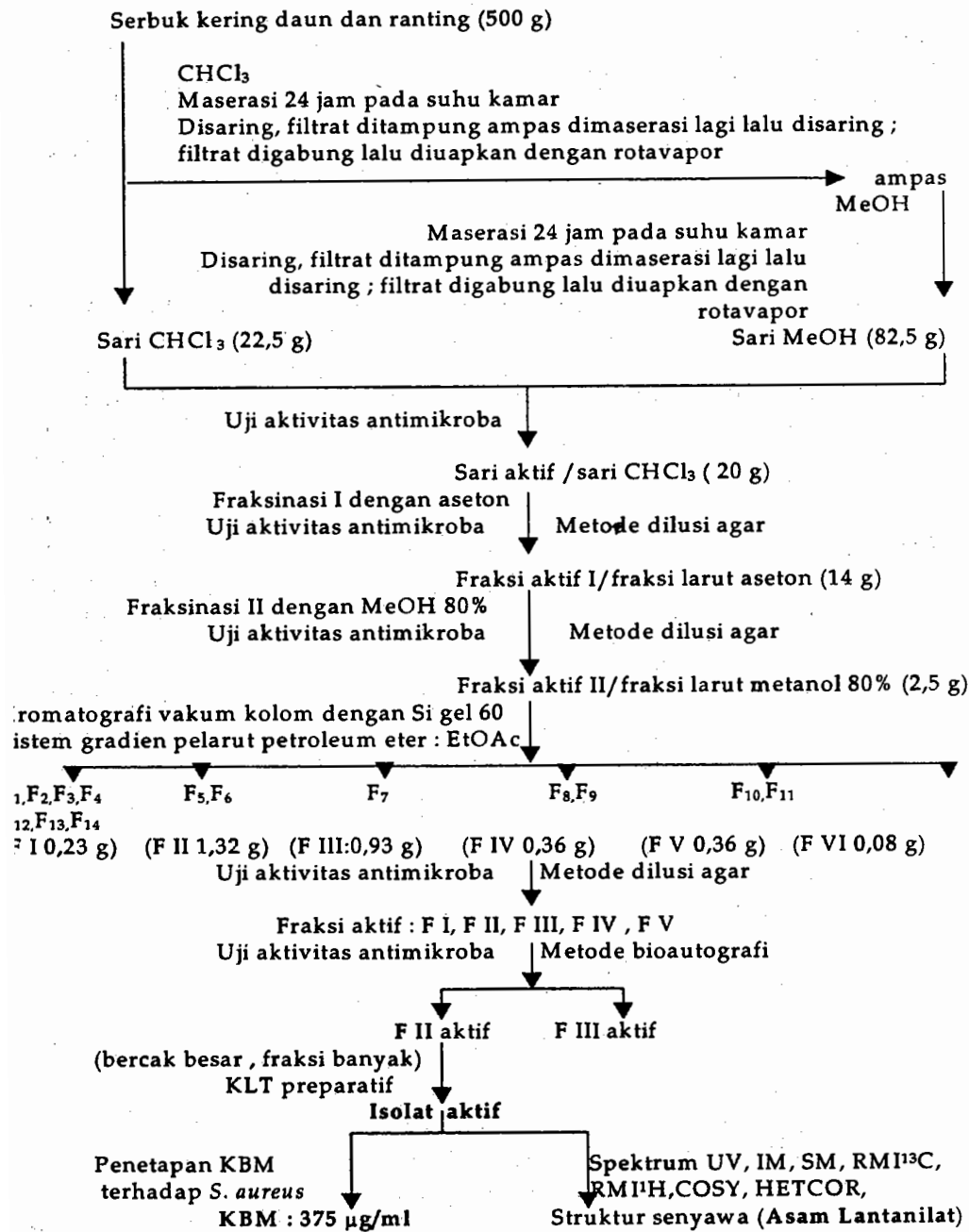
Tumbuhan *Lantana camara* L. yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari daerah Sekip Yogyakarta pada bulan Juli 1999. Bahan kimia yang digunakan berderajat pro analisa dan teknik yang telah didistilasi ulang. Mikroba uji yang digunakan adalah bakteri Gram positif *Staphylococcus aureus*, bakteri Gram negatif *Eschericia coli* dengan media uji *Tripticase Soy Agar* serta jamur *Candida albicans* dengan media uji *Sabouroud*. Penyarian dilakukan dengan kloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) dengan cara maserasi 3 kali 24 jam pada suhu kamar, filtrat digabung dan diuapkan dengan rotavapor sehingga diperoleh sari  $\text{CHCl}_3$ . Setelah semua  $\text{CHCl}_3$  menguap, bahan dimaserasi lagi menggunakan metanol (MeOH) sehingga diperoleh sari MeOH. Kedua sari tersebut diuji aktivitasnya dengan metode dilusi agar, selanjutnya sari yang menunjukkan aktivitas dipisahkan dengan menggunakan aseton, fraksi yang didapat diuji aktivitasnya, fraksi yang menunjukkan aktivitas selanjutnya dipisahkan dengan metanol 80%. Fraksi yang didapat diuji aktivitas antimikrobanya, dan fraksi yang aktif difraksinasi lebih lanjut dengan metode kromatografi vakum kolom dengan pelarut campuran petroleum eter dan etil asetat. Eluat yang didapat ditampung dan dikelompokkan berdasarkan perbedaan warna eluat, kemudian diuapkan. Fraksi-fraksi kental yang didapat dikelompokkan lagi berdasar kemiripan profil kromatogram dari kromatografi lapis tipis (KLT) masing-masing fraksi, selanjutnya diuji aktivitas antimikrobanya dengan metode dilusi agar. Fraksi yang aktif diuji aktivitasnya dengan metode bioautografi. Isolasi dilakukan dengan cara kromatografi lapis tipis (KLT) preparatif dengan 2 kali eluasi dengan pelarut campuran petroleum eter dan eter. Kemurnian isolat diperiksa dengan metode KLT dengan 4 macam campuran fase gerak. Penetapan harga konsentrasi bunuh minimal (KBM) isolat aktif dilakukan dengan

metode dilusi agar. Penentuan struktur isolat aktif berdasarkan atas spektra ultra violet (UV), infra merah (IM), spektra massa (SM), resonansi magnet inti (RMI) $^{13}\text{C}$ , RMI $^1\text{H}$ , heteronuclear correlation (HETCOR). dan correlation spectroscopy (COSY) (Hamburger dan Cordell, 1987; Houghton dan Raman, 1998; Pelletier, et al., 1986; Sham dan Washington, 1991). Langkah kerja pada penelitian ini dapat dilihat pada gambar 1.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil determinasi menunjukkan bahwa berdasarkan buku Flora (Steenis, 1975) tumbuhan yang digunakan adalah *Lantana camara* L. Pengujian aktivitas sari menunjukkan bahwa sari  $\text{CHCl}_3$  aktif menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif *Staphylococcus aureus* pada kadar 250 mg/ml. Senyawa dalam *Lantana camara* L lebih aktif terhadap bakteri Gram positif karena struktur dinding sel bakteri ini lebih mudah ditembus oleh kebanyakan senyawa antimikroba dibanding kan dengan bakteri Gram negatif (William et al., 1996). Fraksinasi dengan kromatografi vakum kolom menghasilkan 14 fraksi dan pengelompokan menghasilkan 6 fraksi ( $F_{\text{I}}$ ,  $F_{\text{II}}$ ,  $F_{\text{III}}$ ,  $F_{\text{IV}}$ ,  $F_{\text{V}}$ , dan  $F_{\text{VI}}$ ). Dengan metode dilusi agar didapatkan bahwa  $F_{\text{I}}$ ,  $F_{\text{II}}$ ,  $F_{\text{III}}$ ,  $F_{\text{IV}}$ , dan  $F_{\text{V}}$  aktif menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Uji aktivitas dengan metode bioautografi terhadap kelima fraksi aktif tersebut menunjukkan bahwa pada kromatogram  $F_{\text{II}}$  dan  $F_{\text{III}}$  terdapat bercak aktif. Bercak tersebut mempunyai harga Rf 0,27, meredam pada UV $_{254}$  dan berwarna ungu-biru-hijau bila disemprot dengan reagen serum sulfat. Karena bercak tersebut lebih besar/lebar pada  $F_{\text{II}}$  dari pada bercak yang sama pada  $F_{\text{III}}$  (berdasarkan KLT) dan jumlah bobot  $F_{\text{II}}$  lebih besar dibandingkan dengan  $F_{\text{III}}$  maka isolasi senyawa aktif dilakukan terhadap  $F_{\text{II}}$ . Dari hasil uji aktivitas isolat didapatkan harga konsentrasi bunuh minimal senyawa antimikroba dari tumbuhan *Lantana camara* L terhadap *Staphylococcus aureus* adalah 375 mg/ml.

Spektra UV isolat LC $_{01}$  menunjukkan serapan pada 1 241 nm, panjang gelombang tersebut karakteristik untuk kromofor dari suatu keton tersubstitusi a,b tidak jenuh. Spektra IM isolat LC $_{01}$  menunjukkan serapan pada 3448  $\text{cm}^{-1}$  (OH), 2918 dan 2850  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_3$  dan  $\text{CH}_2$  alifatik), 1718  $\text{cm}^{-1}$  (CO dari COOH), 1637  $\text{cm}^{-1}$  (C=C), dan 1384  $\text{cm}^{-1}$  (gem-dimetil) (Lambert, et al., 1987). Dari pengionan semprot elektron resolusi tinggi isolat LC $_{01}$  menunjukkan berat molekul 470 dan struktur senyawa  $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$ . Spektra RMI $^{13}\text{C}$  isolat LC $_{01}$  menunjukkan adanya 35 puncak serapan yang menandakan adanya 35 atom C dari isolat aktif. Puncak-puncak serapan tersebut antara lain adalah d 178 ppm (COOH), 165,5 ppm (C=O ester), 157,2 dan 122,7 ppm (CH=), 116,2 ppm (C=), 99 ppm (O-C-O), 75,5 ppm (CH-O), 67,9 ppm ( $\text{CH}_2$ -O) (Barre et al., 1997). Menurut Barre



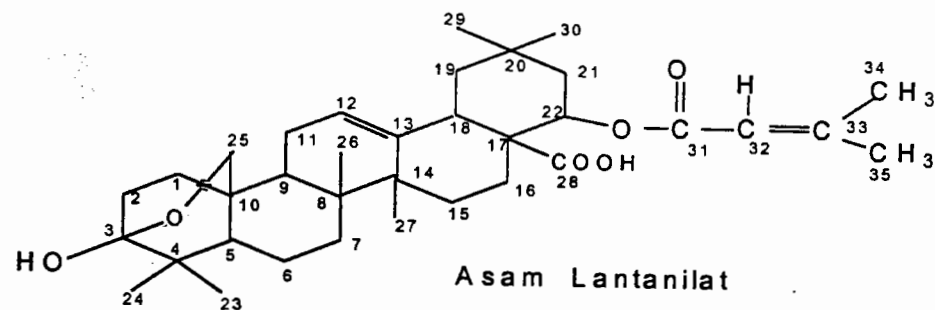
Gambar 1. Skema hasil penyarian, fraksinasi, isolasi dan uji aktivitas senyawa aktif

et al. (1997), semua triterpena yang dilaporkan terkandung dalam *Lantana camara* L. termasuk dalam grup asam ursolat (grup ursan) atau asam oleanolat (grup olean). Serapan pada 143 ppm menunjukkan bahwa isolat termasuk dalam grup olean (Kojima dan Ogura, 1986). Spektra tersebut juga menunjukkan adanya kerangka β-amirin (122,5 dan 143 ppm) (Siddiqui et al., 1995). Menurut Misra dan Laatsch (2000) oksigenasi senyawa oleanan dari *Lantana camara* biasanya terdapat pada atom C<sub>22</sub>. Serapan pada 165,5 (C=O) dan 67,9 ppm (CH<sub>2</sub>-O) kemungkinan karena bentuk epoksi dari senyawa, keduanya biasanya terdapat pada C<sub>3</sub> dan C<sub>25</sub>. Serapan pada 116,2 dan 143 ppm menunjukkan posisi ikatan rangkap pada posisi tipikal C<sub>12</sub> dan C<sub>13</sub>. Berdasarkan atas data UV, IM, MS, dan RMI<sup>13</sup>C di atas, identifikasi isolat LC<sub>01</sub> mengarah pada senyawa triterpena tipe olean, kerangka β-amirin dengan rantai samping ester dan karboksilat.

Spektra RMI<sup>1</sup>H atau Nuclear Magnetic Resonance (NMR)<sup>1</sup>H pada 400 MHz menunjukkan adanya 8 puncak resonansi singlet yang tajam pada daerah high field yakni δ 0,76 (3H), 0,87 (3H), 0,95 (3H), 0,99 (3H), 1,02 (3H) 1,14 (3H), 1,84 (3H) dan 2,12 (3H). Hal ini terjadi karena adanya 8 group gugus metil tersier, 6 dari kerangka β-amirin dan 2 dari rantai samping (masing-masing 3H dari C<sub>34</sub> dan C<sub>35</sub>). Puncak spektra pada 5,56 ppm (1H, s) disebabkan oleh proton pada atom C<sub>32</sub>. Berdasarkan atas jumlah serapan yang menunjukkan jumlah metil singlet dan data pustaka tentang kandungan senyawa yang telah dilaporkan terdapat dalam tumbuhan *Lantana camara* L. maka identifikasi mengarah pada senyawa asam kamarat ataupun asam lantanilat (Barre et al., 1997, Siddiqui et al., 1995). Puncak spektra pada 4,21(br) dan 3,88 (d) menunjukkan proton metilen dari sistem hemiketal, hal ini juga diperkuat oleh spektra dua dimensi heteronuclear correlation (HETCOR) yang menunjukkan hubungan antara 67,9 ppm (C<sub>25</sub>) dengan 3,88 dan 4,21 ppm. Puncak spektra pada 5,37 ppm (1H,br) mungkin disebabkan adanya ikatan rangkap, hal ini memperkuat dugaan adanya ikatan rangkap pada posisi tipikal C<sub>12</sub> dan C<sub>13</sub> (116,2 dan 143 ppm). Puncak spektra pada 3,03 ppm (1H,br) disebabkan oleh atom H<sub>18</sub>, hal ini diperkuat dengan spektra correlation spectroscopy (COSY) yang menghubungkan puncak 3,03 dengan puncak 1,27 ppm (H<sub>19</sub>).

Berdasarkan atas data pustaka tentang spektra RMI asam kamarat dan asam lantanilat, serapan pada 116,2 dan 157 ppm dari isolat mengarahkan pada senyawa asam lantanilat. Spektra dua dimensi HETCOR dan COSY lebih menguatkan identifikasi pada senyawa asam lantanilat. Spektra HETCOR menunjukkan hubungan antara serapan 116,2 ppm (C<sub>32</sub>) dengan serapan 5,56 ppm (H<sub>32</sub>). Dari spektra COSY

dapat dilihat bahwa atom  $H_{25a}$  dan  $H_{25b}$  tidak berhubungan dengan atom H yang lain, hal ini memperkuat dugaan posisi epoksi pada atom  $C_{25}$  yang berhubungan dengan atom  $C_3$ . Spektra COSY juga menunjukkan adanya atom H pada atom  $C_{32}$  yang berhubungan dengan atom H pada atom  $C_{35}$ . Keberadaan atom  $H_{32}$  ini yang membedakan asam lantanilat dari asam kamarat. Senyawa asam kamarat tidak memiliki atom H pada atom  $C_{32}$ . Berdasarkan data-data di atas, maka dapat ditetapkan bahwa isolat  $LC_{01}$  adalah asam lantanilat.



Gambar 2. Struktur senyawa-asam lantanilat

Senyawa asam lantanilat ( $C_{35}H_{52}O_6$ , BM: 568) pertama kali dilaporkan oleh Barua *et al* (1976) sebagai  $\beta,\beta$ -dimetilakrilolil dari asam lantaninilat. Senyawa ini diisolasi dari ekstrak petroleum daun *Lantana camara*. Isolasi asam lantanilat juga dilaporkan oleh Watcher *et al.*, (2001) yang menyatakan bahwa asam lantanilat memiliki aktivitas antituberkular terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub> Rv dengan KHM: 128mM. Asam lantanilat ada dalam tanaman tersebut bersama-sama dengan asam kamarat dan asam lantanolat. Kedua senyawa yang memiliki struktur hampir sama dengan asam lantanilat ini juga memiliki aktivitas antituberkular dengan potensi yang lebih tinggi. Inada *et al.* (1995) melaporkan adanya aktivitas penghambatan aktivasi virus Epstein Barr dari senyawa asam lantanilat. Senyawa asam kamarat juga memiliki aktivitas tersebut akan tetapi potensinya jauh lebih rendah dibanding asam lantanilat.

Menurut Inada *et al.*, (1995) perbedaan rantai samping terutama jenis substituen pada atom  $C_{22}$  dari senyawa triterpena yang terkandung dalam *Lantana camara* L. akan menyebabkan perbedaan aktivitas senyawa. Mengingat aktivitas yang beragam dari senyawa asam lantanilat dan senyawa sejenisnya maka dapat diharapkan bahwa isolat  $LC_{01}$  yang diidentifikasi sebagai senyawa asam lantanilat potensial sebagai senyawa

model ataupun prekursor pada penemuan obat baru khususnya senyawa antimikroba yang potensial terhadap mikroba yang resisten.

## KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa tumbuhan *Lantana camara* L. mengandung senyawa (isolat  $LC_{01}$ ) yang memiliki aktivitas antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi bunuh minimum 375 mg/ml dan senyawa yang terkandung dalam isolat  $LC_{01}$  tersebut adalah asam lantanilat.

## DAFTAR PUSTAKA

- Barre, J.T., Bowden, B.F., Coll, J.C., Jesus, D.J., Fuente, V.E.D.L., Jamairo, G.C., and Ragasa, C.Y., 1997, A Bioactive Triterpene from *Lantana camara*, *Phytochemistry*, vol. 45 No. 2. P.321-324
- Barry, A.L. dan Thornsberry, C., 1991, Susceptibility Test : Diffusion Test Procedures, in Balows, *A Manual of Clinical Microbiology*, Washington Inc. p.1117-1124
- Barua, A.K., Chakrabarti, Chowdhury, M.K., Basak, K. dan Basu, K., 1976, The Structure and Stereochemistry of Lantanilic Acid, The  $\beta,\beta$ -dimethylacryloyl Ester of Lantaninilic Acid Isolated from *Lantana camara*, *Phytochemistry*, Vo.15 p.987-989
- Ghisalberti, E.L., 2000, Review *Lantana camara*, L. (Verbenaceae), *Fitoterapia*, 71, p.476-486
- Hamburger, M.O. dan Cordell, G.A., 1987, A Direct Bioautographic TLC Assay for Compounds Possessing Antibacterial Activity, *Journal of Natural Product*, Vo.50, No.1, p.19-22
- Houghtone, J. dan Raman, A., 1998, *Laboratory Handbook for The Fractinatio of Natural Extracts*, 1<sup>st</sup> Ed., St. Edmundsbury Press, London
- Inada, A., Nakanishi, T., Tokudo, H., Nishino, H., Iwashima, A., dan Sarma, O.P., 1995, Inhibitor Effects of Lantadenes and Related Triterpenoids on Epstein-Bar Virus Activation, *Planta Medica*, 61 p.558-559
- Kojima, H. dan Ogura, H., 1986, Triterpenoids from *Prunella vulgaris*, *Phytochemistry*, Vol.25, No.3, p. 729-730
- Lambert, J.B., Shurvell, H.F., Lightner, D. dan Cooks, R.G., 1987, *Introduction to Organic Spectroscopy*, Macmillan Publishing Company, New York, p.276-279
- Martini, N. dan Ellof, J.N., 1998, The Preliminary Isolation of Several Antibacterial Compounds from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae), *Journal of Ethnopharmacology*, 62 p. 255-263
- Misra, L., dan Laatsch, H., 2000, Triterpenoids, Essential Oil and Photo-oxidatives 28 à 13-lactonation of Oleanic Acid from *Lantana camara* Roots, *Phytochemistry*, 54 p.969-974

- Pelletier, S.W., Chorschi, H.P., dan Desai, H.K., 1986, Separation of Diterpenoid Alkaloid Mixtures Using Vacuum Liquid Chromatography, *Journal of Natural Product*, Vol 49, N0.5, p.892-900
- Sahm, D.F., dan Washington II, J.A., 1991, Antibacterial Susceptibility Test : Dilution Methods, in : Balows, A., *Manual of Clinical Microbiology*, Washington D.C. p.1105-1112
- Siddiqui, B.S., Raza, S.M., Siddiqui, S. dan Firdous, S., 1995, Pentacyclic Triterpenoids from *Lantana camara*, *Phytochemistry*, 45 p.681-685
- Steenis, C.G.G.J., 1975, *Flora untuk Sekolah di Indonesia*, Pradnya Paramita, Jakarta, 45, 46, 53, 350, 351
- Watcher, G.A., Valcic, S., Franzblau, S.G., Soares, E. dan Timmermann, B.N., 2001, Antitubercular Activity of Triterpenoids from *Lippia turbinata*, *Journal of Natural Product*, 64, p.37-41
- Williams, R.A.D., Lambert, P.A. dan Singleton, P., 1996, *Antimicrobial Drug Action*, BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, p.33-35