

2.6 Senyawa Fenol

Fenol adalah senyawa yang mempunyai gugus OH yang terikat langsung pada cincin benzena. Derivat fenol mempunyai sistem nama umum dalam IUPAC yang disebut dengan kresol, seperti o-, m-, dan p-metilfenol. Fenol dan kresol mempunyai sifat antiseptik dan digunakan dalam melemahkan larutan encer sebagai disinfektan (Atkins and Carey, 2002).

2.6.1 Sifat-sifat senyawa fenol

Sifat kimia:

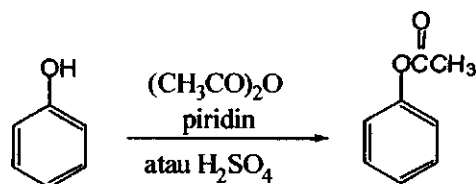
- Mempunyai sifat asam, atom H dapat diganti tidak hanya dengan logam (seperti alkohol) tetapi juga dengan basa, terjadi fenolat. Sifat asam dari fenol-fenol lemah dan fenolat ini diuraikan dengan asam karbonat.
- Mudah dioksidasi, juga oleh O₂ udara dan memberi zat-zat warna, mereduksi larutan Fehling dan Ag-beramoniak.
- Memberi reaksi-reaksi berwarna dengan FeCl₃.
- Mempunyai sifat antiseptik, $K_a = 1 \times 10^{-10}$ (Atkins and Carey, 2002).

Sifat fisika:

- Zat padat, berhablur dengan 1 air kristal (C₆H₅OH.1 H₂O).
- t.b. 42,3°C dan t.d. 182°C.
- Jika dibiarkan pada udara dan cahaya, fenol menjadi merah atau coklat. Jika dicampur dengan air terjadi dua lapisan yaitu lapisan bawah larutan air dalam fenol dan lapisan atas larutan fenol dalam air. Kelarutan air dalam fenol dan fenol dalam air bertambah dengan naiknya suhu, pada ±68°C kedua zat dapat dicampur dalam segala perbandingan (Atkins and Carey, 2002).

2.6.2 Reaksi asetilasi

Derivat alkohol yang umum disiapkan adalah asetil (asetat) dan benzoil (benzoat). Alkohol primer dan sekunder diasetilasi dengan baik menggunakan asetat anhidrat dan katalis selama semalam pada temperatur 25°C atau dengan pemanasan pada penangas air selama 10-15 menit. Katalis terdiri dari basa (sodium asetat, piridin, trietilamin), asam Lewis (H₂SO₄, BF₃) dan asam mineral. Urutan kenaikan efektivitas katalis yang sering digunakan dalam asetilasi adalah (Hart, *et al.*, 2003):



2.7 Kromatografi Cepat (*flash chromatography*)

Kromatografi cepat (*flash chromatography*) merupakan salah satu jenis kromatografi yang sangat sederhana dan murah. Teknik ini berfungsi dalam kimia sintesis dan kimia bahan alam. Pemisahan dilakukan dengan memberikan tekanan pada kolom berupa udara atau gas nitrogen yang berfungsi untuk mempercepat proses pemisahan. Ukuran silika gel yang banyak digunakan yaitu 40-60 μm (230-400 mesh). Ukuran kolomnya berdiameter antara 3-10 cm dan panjangnya 7-15 cm (Cannel, 1998). Kinerja kromatografi kilat lebih rendah daripada kromatografi cair tekanan menengah, tetapi dengan pertimbangan kesederhanaan dan ekonomi metode ini lebih sering digunakan (Hostettmann *et al.*, 1995).

2.8 Analisa Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan metode pemisahan yang mempunyai fase diam berupa lapisan tipis dan zat cair sebagai fase gerak yang mengalir karena gaya kapiler. Pada KLT, fase diam berupa lapisan yang terdiri atas bahan padat yang dilapiskan kepada permukaan penyangga datar yang biasanya terbuat dari kaca, tetapi dapat pula terbuat dari plat polimer atau logam (Gritter *et al.*, 1991). Lapis tipis yang berfungsi sebagai bahan pengikat ini biasanya adalah kalsium sulfat atau alumina.

Untuk senyawa yang tidak berwarna harus dideteksi dengan cara penyinaran lampu UV, dengan memasukkan ke dalam uap iodin atau dengan pereaksi penampak noda seperti Dragendorff, anisaldehyd, serium sulfat dan lain sebagainya. Noda yang didapat ditandai dengan pensil untuk menentukan harga R_f (*retardation factor*) yang berkisar 0-1. Harga R_f dapat dihitung dengan membandingkan jarak yang ditempuh komponen dengan jarak yang ditempuh eluen (Sastroamidjojo, 1985).

2.9 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif

Kromatografi lapis tipis merupakan salah satu pemisahan yang memerlukan biaya paling murah dan memakai peralatan yang sederhana. Jumlah sampel yang dapat dipisahkan sebanyak 10-100 mg pada lapisan silika gel atau alumunium oksida 20 x 20 cm yang tebalnya 1 mm (Hostettmann *et al.*, 1995).

Sampel yang akan dipisahkan ditotolkan berupa garis pada salah satu sisi plat lapisan besar dan dikembangkan secara tegak lurus pada garis sampel sehingga campuran akan terpisah menjadi beberapa pita. Pita ditampakkan dengan cara yang tidak dapat merusak jika senyawa tersebut tidak berwarna. Adsorben yang mengandung pita dikerok dari plat kaca. Kemudian cuplikan dielusi dari adsorben dengan pelarut polar (Gritter *et al.*, 1991)

2.10 Rekristalisasi

Pengkristalan kembali (rekristalisasi) yaitu pemurnian suatu zat padat dengan jalan melarutkan zat padat tersebut, mengurangi volume larutannya dengan pemanasan dan kemudian mendinginkan larutan. Dengan memanaskan larutan, pelarut akan menguap hingga larutan mencapai titik lewat jenuh. Saat larutan mendingin, kelarutan akan berkurang secara cepat dan senyawa mulai mengendap. Agar rekristalisasi berjalan baik, kotoran harus dapat larut dalam pelarut untuk rekristalisasi atau mempunyai kelarutan lebih besar daripada senyawa yang diinginkan (Bresnick, 2004).

2.11 Penentuan Titik Leleh

Salah satu teknik yang umum dan berguna untuk karakterisasi senyawa organik adalah menentukan titik lelehnya. Titik leleh adalah temperatur di mana padatan mulai meleleh hingga meleleh seluruhnya, temperatur padatan dan cairan berada pada kesetimbangan yang sama (Wilcox and Wilcox, 1995).

Penentuan titik leleh diperlukan untuk dua hal yaitu:

a. Penentuan kemurnian

Pada penentuan titik leleh suatu senyawa, bila harga yang diperoleh memiliki selisih angka kecil dari 2°C, maka senyawa itu dikatakan sudah murni. Bila selisihnya besar dari 2°C maka senyawa itu dikatakan belum murni.

b. Identifikasi senyawa yang tak dikenal

Dalam hal ini, data titik leleh yang diperoleh dicocokkan dengan data standar (hand book). Jika titik leleh senyawa tak dikenal tersebut sesuai dengan data dari hand book, maka senyawa tersebut dapat diketahui.

2.12 Metode Karakterisasi

Secara umum, ada empat teknik spektroskopi utama yang telah digunakan sejak tahun 1960-an yaitu Ultraviolet-visible (UV-Vis), Infrared (IR), Mass Spectroscopy (MS) dan Nuclear Magnetic Resonance (NMR). Penggunaan gabungan data UV-Vis, IR, MS dan NMR sangat berguna dalam menetapkan struktur senyawa-senyawa organik.

2.12.1 Spektroskopi UV

Semua senyawa organik menyerap cahaya ultraviolet (UV). Spektrum ultraviolet dan tampak dari senyawa-senyawa organik merupakan transisi antara tingkat-tingkat energi elektronik yang meliputi eksitasi elektron dari orbital ikatan bukan ikatan ke orbital anti-ikatan (Sastrohamidjojo, 1991).

Spektrum ultraviolet merupakan hasil pengukuran dari absorpsi energi foton sebagai absorbansi (A) atau kerapatan optik (OD , *optical density*) versus panjang gelombang dalam nm. Intensitas suatu puncak pada panjang gelombang maksimum (λ_{max}) dapat dinyatakan sebagai koefisien absorptivitas molar (ϵ). Nilai ϵ dihitung menggunakan hukum Lambert-Beer yaitu:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon l c$$

Keterangan: I_0 = intensitas cahaya yang diberikan

I = intensitas cahaya yang diteruskan

ϵ = absorptivitas molar

l = panjang jalur serapan melalui sel (cm)

c = konsentrasi (mol/liter)

2.12.2 Spektroskopi IR

Kegunaan utama dari IR dalam analisis struktur organik adalah untuk mengidentifikasi gugus fungsi. Bila suatu senyawa ditempatkan pada suatu

pancaran IR, energi yang diserap menyebabkan perubahan-perubahan vibrasi ikatan. Setiap gugus fungsi memiliki karakteristik frekuensi vibrasi tersendiri, sehingga spektroskopi IR menjadi cara yang sederhana dan cepat untuk menentukan kelas struktur untuk kebanyakan senyawa organik. Informasi dari IR sendiri jarang digunakan untuk karakterisasi suatu senyawa, tetapi dalam bentuk kombinasi dengan data dari metode lain, terutama NMR dan MS (Crews, 1998).

Frekuensi vibrasi suatu ikatan dapat dihitung dengan menggunakan persamaan-persamaan fisika klasik untuk model diatomik pada atom-atom yang diperkirakan sebagai bola-bola dan ikatannya sebagai pegas. Dalam hal ini digunakan persamaan Hukum Hooke, sehingga frekuensi ulur untuk suatu ikatan antara dua atom dengan massa m_1 dan m_2 dapat dihitung sebagai berikut:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{K}{\mu}}$$

Keterangan: $\bar{\nu}$ = frekuensi (cm^{-1})

c = kecepatan cahaya = 3×10^{10} cm/det

K = konstanta (dyne/cm)

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad \text{atau} \quad \frac{m_1 m_2}{(m_1 + m_2)(6,02 \times 10^{23})}$$

2.12.3 Spektroskopi NMR

Metode spektroskopi magnet inti (NMR) memberikan gambaran mengenai perbedaan dari berbagai inti yang ada dan untuk menduga letak inti tersebut dalam suatu molekul. Disamping itu, NMR ini juga dapat memberikan keterangan tentang jumlah setiap jenis lingkungan hidrogen yang ada dalam molekul dan juga jumlah atom hidrogen yang ada pada karbon tetangga (Sudjadi, 1983).

Geseran-geseran kimia dalam ^{13}C -NMR jauh lebih besar daripada geseran yang dijumpai dalam ^1H -NMR. Kebanyakan proton dalam spektrum ^1H -NMR menunjukkan absorpsi antara 0-10 ppm (nilai δ) di bawah medan dari TMS. Absorpsi pada ^{13}C -NMR dijumpai antara angka 0-200 ppm di bawah medan dari TMS. Pada kedua NMR tersebut digunakan tetrametilsilan (TMS) sebagai bahan pembandingan dalam (Sudjadi, 1983).

Fenomena resonansi magnet inti ini terjadi bila inti yang menyearahkan terhadap medan yang digunakan direduksi untuk menyerap tenaga dan orientasi spinnya berubah. Makin besar medan magnet yang digunakan, makin besar pula perbedaan tenaga antara kedudukan-kedudukan spin yang ada:

$$\nu = \left(\frac{\gamma}{2\pi} \right) B_0$$

Keterangan: ν = frekuensi elektromagnetik

B_0 = kuat medan magnet

γ = perbandingan giro magnet dan merupakan tetapan

2.12.4 Spektroskopi massa

Spektroskopi massa adalah suatu metode identifikasi struktur molekul senyawa berdasarkan massa. Spektrum massa merupakan rangkaian puncak-puncak yang berbeda-beda tingginya (Khopkar, 2003).

Dalam spektrometri massa, molekul-molekul organik ditembak dengan berkas elektron dan diubah menjadi ion-ion bermuatan positif yang bertenaga tinggi (ion-ion molekuler atau ion-ion induk) yang dapat pecah menjadi ion-ion yang lebih kecil (fragmen). Lepasnya elektron dari molekul menghasilkan radikal kation yang dinyatakan sebagai $M \rightarrow M^+$ (Sastrohamidjojo, 1991). Penentuan kemungkinan rumus molekul dari intensitas puncak ion molekul terbatas hanya jika puncak tersebut cukup tinggi.

2.13 Antimikroba

Sebagai antimikroba, beberapa senyawa fito-kimia dilaporkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri penyebab penyakit. Senyawa bahan alam yang bersifat antimikroba dapat dibagi kedalam beberapa kelompok yang meliputi fenolik, terpenoid, alkaloid, dan polipeptida dan senyawa lain. Pemakaian metabolit sekunder (diantaranya antibakteri dan antifungi) di berbagai bidang menunjukkan kecenderungan untuk meningkat setiap tahunnya (Naim, 2004).

Telah dikenal beberapa senyawa antimikroba kimiawi (sintesis) diantaranya senyawa antimikroba yang penggunaannya berkaitan erat dengan

produk-produk makanan dan senyawa antimikroba yang digunakan sebagai obat-obatan termasuk dalam kelompok ini adalah antibiotik dan senyawa antimikroba lain dalam mencegah atau menahan pertumbuhan mikroorganisme penyebab infeksi pada manusia dan hewan. Mekanisme penghambatan mikroorganisme oleh senyawa antimikroba dapat disebabkan oleh beberapa faktor, diantaranya:

- a. Mengganggu pembentukan dinding sel.
- b. Bereaksi dengan membran sel
- c. Menginaktivasi enzim
- d. Destruksi atau kerusakan fungsi material genetik.

Kemampuan senyawa antimikroba untuk menghambat aktivitas pertumbuhan mikroba dalam sistem pangan dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya:

- a. Temperatur
- b. Keasaman (pH)
- c. Pengaruh khusus dari mikroorganisme

Banyak senyawa yang ditemukan alami pada makanan memperlihatkan aktivitas antimikroba termasuk senyawa flavonoid dan fenol. Aktivitas antimikroba senyawa flavonoid disebabkan oleh adanya gugus OH. Salah satu mekanisme kerja antimikroba dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme adalah merusak lapisan fosfolipid membran sel mikroorganisme tersebut yang menyebabkan peningkatan permeabilitas dan kerusakan membran sel diikuti dengan pecahnya (lisis) sel sehingga sejumlah konstituen sel hilang. Hal ini disebabkan kepolaran gugus OH yang terdapat pada flavonoid tersebut (Pelczar and Chan, 2005).

Uji aktivitas antimikroba dari ekstrak dapat dilakukan dengan 3 metoda yaitu (Lenny, 2006):

- a. Metode Difusi Agar (Kirby Bauer Test)

Dengan metode difusi ini, ekstrak uji yang diserap dengan kertas saring dimasukkan ke dalam silinder atau dimasukkan ke dalam lubang, dikontakkan dengan media yang telah diinokulasi. Kemudian setelah diinkubasi, diameter daerah bening (clear zone) diukur. Diameter daerah bening ini merupakan daerah inhibisi dari ekstrak sampel terhadap mikroba uji. Untuk menurunkan limit

deteksi, sistem yang telah diinokulasi dibiarkan pada suhu rendah selama beberapa jam sebelum sistem diinokulasi pada suhu optimum pertumbuhan mikroba untuk memberikan kesempatan kepada antibiotik untuk berdifusi sebelum mikroba tumbuh.

b. Metode Pengenceran.

Pada metode ini, sampel yang akan diuji dicampur dengan medium yang cocok yang sebelumnya telah diinokulasi dengan mikoba uji. Setelah inkubasi, pertumbuhan mikroba dapat ditentukan secara visual atau dengan perbandingan turbidimetri di kultur uji dengan di kultur kontrol. Kultur kontrol adalah kultur yang tidak diberi sampel yang akan diuji aktivitasnya.

c. Metode Bioautografi

Metode ini digunakan untuk menentukan tempat atau posisi senyawa yang mempunyai aktivitas mikroba pada kromatogram. Caranya adalah dengan memindahkan senyawa uji dari kromatogram lapis tipis atau kertas ke medium agar yang sudah diinokulasi dengan mikroba uji. Daerah inhibisi kemudian dilihat dengan cara yang sesuai.

Mikroorganisme adalah makhluk hidup berukuran sangat kecil, bersel satu dengan bentuk dan struktur sederhana yang hanya dapat dilihat menggunakan mikroskop. Mikroorganisme ini memegang peranan yang sangat penting, bahkan eksistensinya merupakan persyaratan yang mutlak bagi terbinanya semua kehidupan yang lain.

2.14 Bakteri

Bakteri adalah makhluk hidup yang sangat kecil dan hanya dapat dilihat dengan mikroskop. Berdasarkan morfologinya bakteri termasuk mikroorganisme bersel tunggal dengan panjang 0,1-1,0 μm dan lebar 0,5-2,5 μm . Bakteri tersusun dari suatu sel dan isi sel. Di sebelah luar dinding sel terdapat selubung atau kapsul. Di dalam sel bakteri tidak terdapat membran dalam (endomembran) dan organel bermembran seperti kloroplas dan mitokondria (Irianto, 2006). Karakteristik bentuk sel yang ditemukan adalah:

- Bakteri berbentuk bulat (kokus)
- Bakteri berbetuk batang

- Bakteri berbentuk spiral

Berdasarkan teknik pewarnaan, bakteri dikelompokkan menjadi dua bagian, yaitu:

- Bakteri Gram positif

Bakteri yang dapat menyerap zat warna utama pada pewarnaan Gram dan dapat menahan zat warna tersebut dengan kuat setelah proses pencucian, sehingga tidak dapat diwarnai lagi dengan zat warna berikutnya. Dinding sel bakteri Gram positif cukup tebal sekitar 20-80 nm, terdiri atas 60-100% peptidoglikan.

- Bakteri Gram negatif

Bakteri yang tidak dapat menyerap zat warna utama pada pewarnaan Gram sehingga pada proses pencucian akan luntur dan mudah diwarnai lagi dengan zat warna berikutnya. Dinding selnya terdiri atas 10-20% peptidoglikan. Di luar lapisan ada struktur membran kedua yang tersusun dari protein, fosfolipid, dan lipopolisakarida.

Beberapa jenis bakteri yang sering digunakan uji antimikrobial antara lain:

1. *Escherichia coli*

Escherichia coli adalah bakteri Gram negatif berbentuk batang, bersifat anaerob fakultatif dan mempunyai flagel peritrik. Bakteri ini biasanya ditemukan pada usus besar manusia sehingga sering disebut dengan bakteri kolon. *Escherichia coli* dapat menyebabkan keracunan pada makanan. Bakteri ini merupakan bakteri patogen penyebab diare (keracunan makanan) dan dapat menjadi indikator pencemaran air (Frobisher, 1968). *Escherichia coli* tumbuh baik pada suhu 8-46°C, beda antara temperatur minimum dan maksimum sangat besar sehingga bakteri ini termasuk golongan bakteri *euritermik* (Dwidjoseputro, 2005).

2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah bakteri Gram positif, bersifat aerob dan anaerob, tidak bergerak, berdiameter 0,5-1,0 mm dengan koloni berwarna kuning. Bakteri ini sering terdapat pada pori-pori dan permukaan kulit, kelenjar keringat selaput lendir, bisul dan luka-luka. *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan bermacam-macam infeksi seperti jerawat, bisul, dan meningitis pada manusia, mereka hidup saprofit di dalam saluran pengeluaran lendir dari hidung, mulut dan tenggorokan, dan dapat dikeluarkan pada waktu batuk atau bersin. *S. aureus*

memiliki suhu optimum 35-37⁰C dan pH 4,0-9,8 dengan pH optimum 7,0-7,5 (Volk dan Wheeler, 1993).

3. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis merupakan bakteri Gram positif, bersifat aerob dan berbentuk basil panjang yang disebut streptobasil. *Bacillus subtilis* banyak ditemukan dalam tanah, air dan berbagai jenis makanan. Sporangya banyak berbentuk oval atau silinder dan lebarnya tidak melebihi dari sel induknya (Hans dan Schmidt, 1994).