

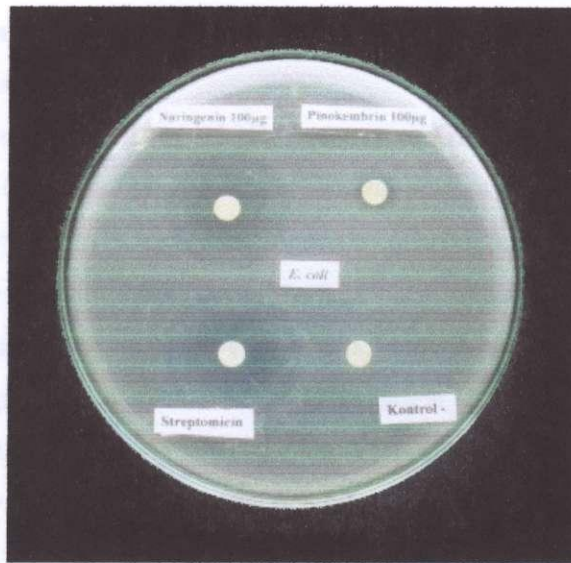
KLT yang dilakukan maka diduga bahwa campuran senyawa tersebut merupakan senyawa pinokembrin dan asetil pinokembrin. Campuran antara senyawa pinokembrin dan asetil pinokembrin ini tidak dipisahkan lebih lanjut karena hasil yang diperoleh sangat sedikit sehingga tidak memungkinkan untuk dilakukan pemisahan.

4.1.3 Uji aktivitas antibakteri

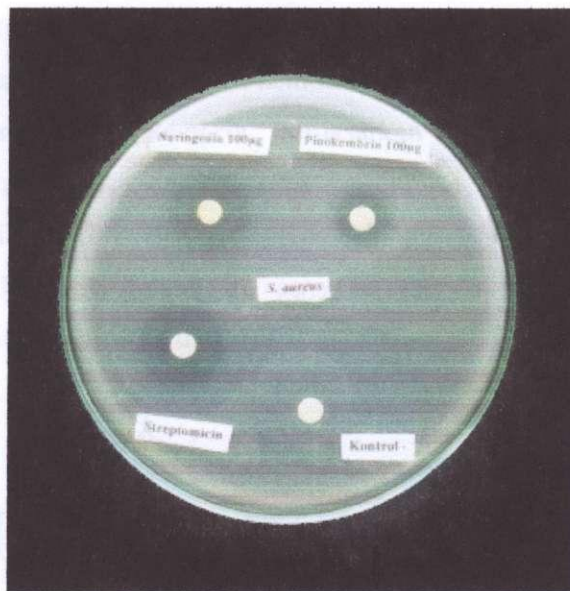
Uji aktivitas antimikroba yang dilakukan pada konsentrasi 60, 80 dan 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Senyawa pinokembrin dan naringenin memiliki aktivitas antibakteri yang cukup baik terhadap kedua bakteri tersebut. Hal ini dibuktikan dengan adanya zona bening disekitar kertas cakram dengan diameter hambatan seperti yang terlihat pada Tabel 4 dan Gambar 5.

Tabel 4. Daya hambat sampel pada berbagai konsentrasi

Bahan uji	Konsentrasi $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Daya hambat terhadap bakteri (mm)	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Streptomisin	60	16	14
Naringenin (GR-20)	60	16,5	9
Pinokembrin (GR-8)	60	9,5	8
Streptomisin	80	32	20
Naringenin (GR-20)	80	22	16
Pinokembrin (GR-8)	80	18	12,5
Streptomisin	100	33	30
Naringenin (GR-20)	100	32	29
Pinokembrin (GR-8)	100	20	14



(a)



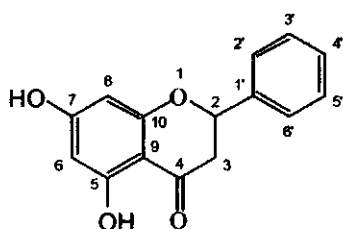
(b)

Gambar 5. Pembentukan daerah hambatan pada konsentrasi 100 µg/µL terhadap bakteri *E. coli* (a) dan *S. aureus* (b)

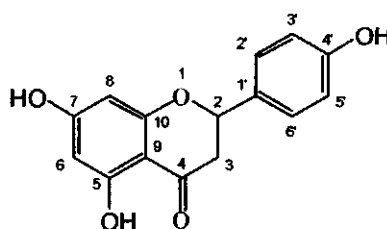
4.2 Pembahasan

4.2.1 Hasil isolasi

Hasil analisis spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa GR-8 dalam CD_3OD dengan frekuensi 500 MHz (Gambar 3) memperlihatkan adanya puncak pada pergeseran kimia δ_{H} 2,75 ppm dan 3,1 ppm menunjukkan adanya proton yang berasal dari metilen (CH_2), pada pergeseran kimia δ_{H} 7,38 ppm sampai 7,5 ppm menunjukkan adanya proton yang berasal dari $\text{C}=\text{C}$ aromatis. Namun pergeseran kimia senyawa GR-8 memiliki perbedaan pada posisi 5-OH dengan senyawa pinokembrin yang telah berhasil ditemukan sebelumnya oleh Teruna (2006). Hal ini disebabkan karena pelarut yang digunakan pada penentuan spektrum $^1\text{H-NMR}$ dari kedua senyawa berbeda. Spektrum suatu senyawa dapat berbeda-beda berdasarkan kepada lingkungan kimia disekitarnya. Disamping itu untuk memastikan senyawa hasil isolasi tersebut juga dilakukan uji KLT yang dapat dilihat pada Lampiran 7. Berdasarkan hasil KLT, senyawa GR-8 mempunyai harga R_f yang sama dengan senyawa pinokembrin standar (yang diperoleh Teruna, 2006) yaitu sebesar 0,42 (heksana : etil asetat = 3 : 2). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa senyawa GR-8 adalah senyawa pinokembrin. Berdasarkan riset yang dilakukan Teruna (2006), daun tumbuhan *Goniothalamus ridleyi* ini dominan mengandung 2 senyawa yaitu pinokembrin dan naringenin sehingga senyawa GR-20 tidak perlu dilakukan uji $^1\text{H-NMR}$. Selain itu senyawa GR-20 yang diperoleh sedikit sehingga tidak memungkinkan untuk dilakukan asetilasi.



Pinokembrin (GR-8)



Naringenin (GR-20)

Pada penelitian ini juga perlu dilakukan uji kemurnian dari senyawa pinokembrin (GR-8) sebagai bahan awal, yang dapat dilihat dari pengukuran jarak titik leleh dan profil KLT. Senyawa yang digunakan sebagai bahan awal pada penelitian ini adalah senyawa pinokembrin (GR-8) karena senyawa ini yang

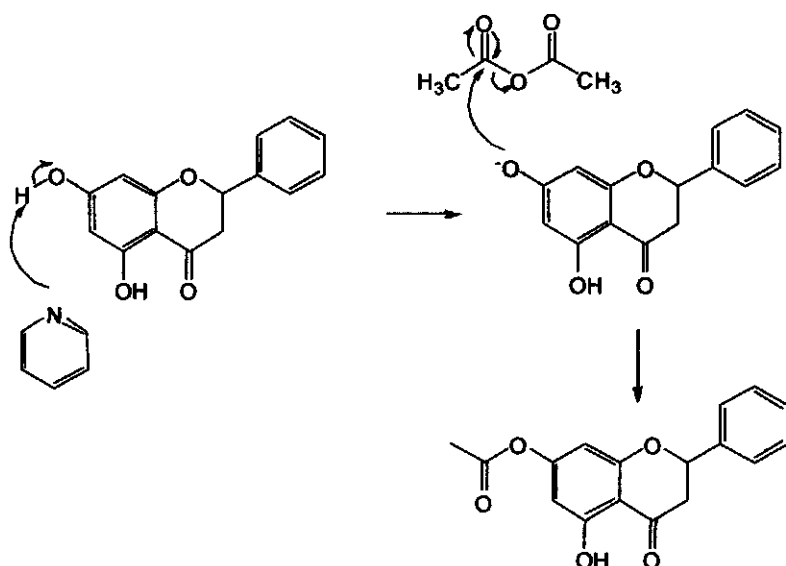
paling dominan diperoleh dari hasil isolasi. Senyawa pinokembrin (GR-8) didapat dalam bentuk bubuk berwarna kekuningan dengan titik leleh 198-200°C. Uji KLT dengan tiga sistem pelarut dapat dilihat pada Tabel 2. Berdasarkan hasil uji kemurnian yang tersebut, dapat disimpulkan bahwa senyawa pinokembrin (GR-8) yang digunakan cukup murni.

Tabel 5. Perbandingan $^1\text{H-NMR}$ senyawa GR-8 (CD_3OD) terhadap senyawa pinokembrin dan naringenin ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Teruna, 2006)

C/H	GR 8	Pinokembrin	Naringenin
	^1H	^1H	^1H
2	5,45	5,54 (dd; 12,9;3,0)	5,52 (dd; 12,9; 2,9)
3	3,1	3,21 (dd; 17,1; 12,9)	3,31 (dd; 17,0; 12,9)
	2,75	2,29 (dd; 17,1; 3,0)	2,29 (dd; 17,0; 2,9)
4	-	-	-
5	-	-	-
6	5,93	6,49 (d; 2,1)	6,49 (d; 2,1)
7	-	-	-
8	5,89	6,41 (d; 2,1)	6,40 (d; 2,1)
9	-	-	-
10	-	-	-
1'	-	-	-
2'	7,5	7,59 (d; 7,2)	7,56 (d; 8,5)
3'	7,43	7,43 (dd; 7,2; 7,2)	7,24 (d; 8,5)
4'	7,38	7,38 (d; 7,2)	-
5'	7,43	7,43 (dd; 7,2; 7,2)	7,24 (d; 8,5)
6'	7,5	7,59 (7,2)	7,56 (d; 8,5)
5-OH	-	12,8	12,82

4.2.2 Sintesis senyawa asetil pinokembrin

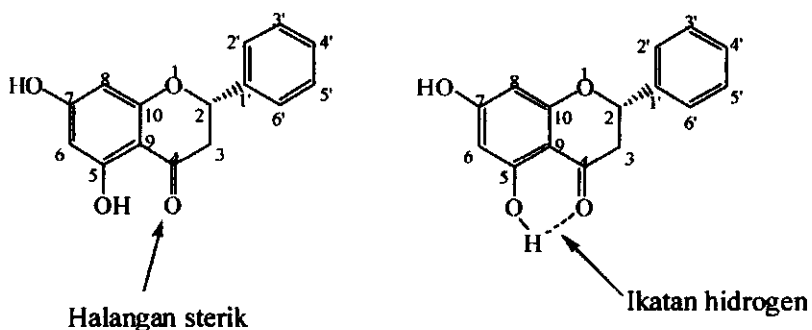
Sintesis senyawa asetil pinokembrin dilakukan dengan mereaksikan pinokembrin (GR-8) dan asetat anhidrat dengan pelarut piridin. Dugaan mekanisme reaksinya digambarkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Dugaan mekanisme reaksi sintesis senyawa asetil pinokembrin

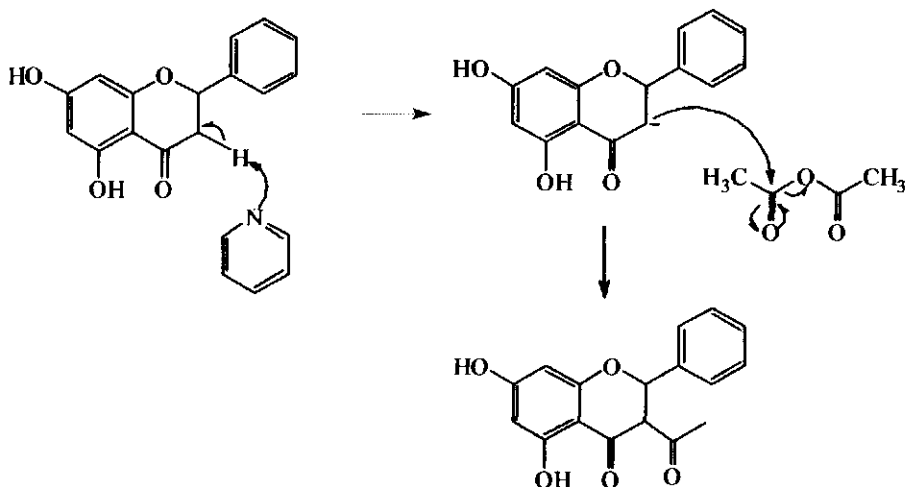
Reaksi esterifikasi ini menggunakan asetat anhidrat yang lebih reaktif daripada asam karboksilat karena ion karboksilat pada asetat anhidrat merupakan gugus lepas yang lebih baik dibanding $-OH$ pada asam karboksilat (Atkins and Carey, 2002). Secara teoritis diperlukan dua ekivalen asetat anhidrat, karena senyawa pinokembrin mempunyai dua gugus $-OH$ fenolik yang dapat diasetilasi.

Senyawa asetil pinokembrin yang diperoleh diduga mengalami asetilasi pada posisi 7 karena pada posisi 5 tidak memungkinkan terjadinya asetilasi disebabkan adanya halangan sterik yang besar dan terjadinya ikatan hidrogen antara H pada posisi 5 dan O pada posisi 4 sehingga gugus $-OH$ pada posisi 5 ini cenderung lebih stabil (Gambar 7).



Gambar 7. Halangan sterik dan ikatan hidrogen yang ditunjukkan oleh senyawa pinokembrin

Senyawa turunan pinokembrin yang tidak dapat diidentifikasi tersebut diduga mengalami reaksi dengan asetat anhidrat pada posisi 3. Hidrogen pada posisi 3 tersebut cukup asam, artinya cukup mudah untuk diambil oleh basa (piridin) sehingga menjadi bermuatan negatif. Selanjutnya menyerang gugus karbonil pada asetat anhidrat dan melepaskan asam asetat. Dugaan mekanisme reaksinya digambarkan pada Gambar 8.



Gambar 8. Dugaan mekanisme reaksi senyawa turunan pinokembrin yang tidak dapat diidentifikasi

4.2.3 Uji aktivitas antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif yang bersifat patogen pada manusia. Bakteri uji yang digunakan yaitu *Escherichia coli* (Gram negatif) dan *Staphylococcus aureus* (Gram positif). *Escherichia coli* dipakai sebagai indikator cemaran yang berbahaya bagi manusia (Buckle, *et al.* 1985). Hal ini disebabkan beberapa strain dari *Escherichia coli* dapat memproduksi toksin yang dapat menyebabkan timbulnya *gastro enteritis* pada manusia yang ditandai dengan gejala diare, demam kadang disertai muntah bahkan kematian. Terhadap bakteri Gram positif digunakan *Staphylococcus aureus* karena bakteri ini dapat menghasilkan enterotoksin yang dapat menyebabkan keracunan makanan, meningitis dan pneumonia. Selain enterotoksin, bakteri ini juga memproduksi hemolisin yaitu toksin yang dapat merusak dan memecah sel-sel darah merah (Aljizah, *et al.* 2007).

Uji aktivitas antibakteri terhadap senyawa pinokembrin (GR-8) dan naringenin (GR-20) dilakukan dengan metode kertas cakram pada konsentrasi 60, 80 dan 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Kedua senyawa tersebut dilarutkan dalam etanol absolut, sehingga larutan etanol absolut berfungsi sebagai kontrol negatif, sedangkan sebagai kontrol positif digunakan antibiotik streptomisin sulfat.

Untuk mendapatkan sampel sebanyak 60, 80 dan 100 μg , sebanyak 1 mg sampel dilarutkan dalam 1 mL larutan etanol absolut. Dari volume 1 mL larutan tersebut, dipipet sebanyak 60 μL larutan sampel dengan pipet mikro. Jadi, dalam volume 60 μL sampel tersebut terkandung 60 μg sampel. Pada prosedur ini, kertas cakram tidak dicelupkan dalam larutan sampel, tetapi diteteskan sedikit demi sedikit lalu ditunggu hingga kering. Kemudian kertas cakram diletakkan pada media agar yang telah memadat. Tujuan pengeringan larutan ini adalah agar pelarut menguap dan sampel akan tinggal di kertas cakram, sehingga sampel tersebut yang diharapkan memiliki aktivitas sebagai antibakteri bukan pelarut tersebut yang dapat menghambat aktivitas antibakteri.

Uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dari kedua senyawa tersebut menunjukkan hasil positif. Hal ini ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar cakram yang mengandung senyawa tersebut seperti yang terlihat pada Lampiran 9. Daya hambat senyawa naringenin (GR-20) terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* lebih besar dibandingkan dengan senyawa pinokembrin (GR-8). Hal ini disebabkan karena senyawa naringenin memiliki gugus fenol yang lebih banyak dibandingkan dengan senyawa pinokembrin. Cara kerja fenol dalam membunuh mikroorganisme yaitu dengan cara mendenaturasi protein sel. Dengan denaturasinya protein sel, maka semua aktivitas metabolisme sel dikatalisis oleh enzim yang merupakan suatu protein (Pelczar and Chan, 2005).

Perbedaan diameter daya hambat yang ditunjukkan oleh senyawa naringenin (GR-20) dan pinokembrin (GR-8) terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* karena perbedaan struktur dinding sel yang dimiliki oleh masing-masing bakteri. Diameter daya hambat senyawa naringenin (GR-20) dan pinokembrin (GR-8) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* lebih besar dibandingkan dengan bakteri *Escherichia coli* karena dinding sel *Staphylococcus*

aureus hanya terdiri dari beberapa lapis peptidoglikan tanpa adanya tiga polimer pembungkus yang terletak diluar lapisan peptidoglikan yaitu lipoprotein, selaput luar dan lipopolisakarida seperti yang dimiliki oleh *Escherichia coli*. Oleh karena *Staphylococcus aureus* hanya memiliki lapisan peptidoglikan maka selnya akan mudah terdenaturasi oleh fenol yang terkandung dalam senyawa naringenin (GR-20) dan pinokembrin (GR-8) sehingga diameter daya hambatnya lebih besar (Irianto, 2006).

Berdasarkan hasil uji aktivitas diperoleh bahwa semakin besar konsentrasi bahan uji maka daya hambatnya terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* semakin besar pula. Hal ini disebabkan karena semakin besar konsentrasi bahan uji maka senyawa yang terkandung didalamnya juga semakin banyak sehingga menghasilkan daya hambat yang besar pula. Untuk meningkatkan aktivitas antibakteri dari senyawa pinokembrin (GR-8) maka dilakukan asetilasi. Namun senyawa hasil asetilasi tidak dapat dilakukan uji aktivitas antibakterinya karena senyawa yang diperoleh berupa campuran dan tidak memungkinkan untuk dipisahkan karena jumlahnya sangat sedikit.