54

Makalah Seminar Nasional

Isolasi senyawa anti-bakteri dari fraksi n-heksan *Enicosanthum membranifolium* Sinclair

Oleh

Dr. Mai Efdi

Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Andalas
2010

Isolasi senyawa anti-bakteri dari fraksi n-heksan *Enicosanthum membranifolium* Sinclair

Mai Efdi[a], Mamoru Koketsu[b]

[a] *Department of Chemistry, Faculty of Engineering,* [b] *Division of Instrumental Analysis, Life Science Research Center, Gifu University, Gifu 501-1193, Japan*

Email korespondensi: maiefdi@yahoo.com

Abstract

Plants of the Annonaceae family are very important sources of edible fruits and material for perfumery, and are used in folk medicine in various capacities, such as antitumorial, antimicrobial and antidiarhoeal agents. *Enicosanthum membranifolium* Sinclair is one of the species from *Annonaceae*. Based on preliminary screening results, this plant showed activity as anti-microbial agent. The bioassay-guided separation of the n-hexane fraction led to the isolation of anti-bacterial compound. The structure of the compound was confirmed by spectroscopic data and X-ray analysis. The structure of compound having anti-bacterial activity was decided as *R*-(-) mellein.

Keywords: *R*-(-) mellein, *Enicosanthum membranifolium* Sinclair

1. PENDAHULUAN

Annonaceae merupakan salah satu famili terbesar dari tumbuhan, memiliki sekitar 130 genus dan 2300 genus (leboeuf et al., 1982). Famili tumbuhan ini tersebar luas di hutan-hutan tropis Asia dan Australia. Keanekaragaman struktur senyawa-senyawa metabolit sekunder dengan aktivitas biologi yang menarik seperti cytotoxic, anti tumoral and pestisida telah menstimulasi penelitian-penelitian yang berkaitan dengan senyawa metabolite sekunder dari beberapa genus pada famili annonaceae ini. Seperti contoh, penelitian terhadap beberapa sepesies dari genus

Goniothalamus telah diisolasi senyawa-senyawa kelompok asetogenin (Zafra-Polo et. al., 1998), styryl-lactones (Bermejo et. al., 1998) dan derivate senyawa alkaloid isoquinoline (Omar et al., 1992) yang memiliki aktifitas cytotoxic, insektisida dan antimikroba yang signifikan. Suatu senyawa triterpene baru, suberosol, yang memiliki aktifitas sebagai anti-HIV telah diisolasi dari *Polyalthia suberosa* (Li *et al.*, 1993) dan beberapa senyawa antimikroba seperti 16-oxocleroda-3, 13E-dien-15-oic acid, kolavenic acid dan 16β-hydroxycleroda-3,13-dien-15,16-olide diperoleh dari *Polyalthia longifolia* (Rashid, M. A *et al.* 1996). Salah satu spesies tumbuhan yang termasuk pada famili annonacea ini adalah *Enicosanthum membranifolium*. Spesies ini dilaporkan mengandung senyawa clerodermic acid yang memiliki aktifitas sitotoksik terhadap sel kanker leukemia cell line HL60 (Efdi, M. *et al* 2007).

Sebagai bagian dari penelitian tentang senyawa metabolt sekunder dari tumbuhan annonacecae, maka dalam makalah ini akan disampaikan tentang isolasi senyawa anti-bakteri dari fraksi n-heksan *Enicosanthum membranifolium*.

2. METODA DAN BAHAN

2.1. Prosedur umum

Peralatan yang digunakan adalah peralatan gelas yang umum dipakai pada

penelitian kimia organic bahan alam, rotary evaporator, micromelting point apparatus (Yanaginomoto), Spektrometer JEOL JNM-ECA500 (^{1}H, ^{13}C-NMR, DEPT). Alat HPLC (High performance liquid chromatography) yang digunakan adalah Shimadzu dengan menggunakan kolom Wakosil-II 5C18HG (untuk HPLC analitik, 250 x 4.6 mm i.d. dan untuk HPLC preparative, 250 x 20 mm i.d, Wako Co. Ltd., Tokyo).

2.2. Bahan tumbuhan

Tumbuhan *Enicosanthum membranifolium* Sinclair diambil di hutan Rimbo Panti, Pasaman, Sumatra Barat, Indonesia. Bagian yang diambil merupakan cabang dan ranting dari tanaman ini. Identifikasi dari tumbuhan ini dilakukan di Herbarium Jurusan Biologi. Voucher specimen disimpan di herbarium biologi universitas Andalas (ANDA), Padang, Indonesia.

2.3. Screening Anti-bakteri

2.3.1. Mikroba Uji

Pada penelitian ini, untuk uji bioaktifitas terhadap anti-bakteri digunakan bakteri uji sebagai berikut: *Bacillus subtilis* MB-32, *Staphylococcus aureus* ATCC25923.

2.3.2. Uji pendahuluan terhadap aktifitas antibakteri

Metoda agar difusi degunakan untuk menguji aktifitas anti-bakteri dari ekstrak

tumbuhan *Enicosanthum membranifolium* Sinclair yang diperoleh (ekstrak metanol, farksi *n*-hexane, fraksi EtOAc, fraksi *n*-butanol dan fraksi air). Metoda uji anti-bakteri dilakukan berdasarkan metoda yang dikembangkan oleh NCCLS global consensus standard (NCCLS, 2003).

2.4. Prosedur Isolasi

Isolasi dilakukan dengan menggunakan metoda maserasi, serbuk kering (369 g) dari cabang dan ranting tumbuhan *Eniconsanthum membranifolium* Sinclair (14 Kg) direndam dengan methanol pada suhu kamar. Selanjutnya disaring dan dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator. Proses pengekstraksian dilakukan berulangkali sebanyak 4 kali. Dari hasil pemekatan semua ekastrak methanol yang diperoleh diperoleh ekstrak pekat sebanyak 369 g. Selanjutnya ekstrak pekat ini difraksinasi berturut-turut dengan menggunakan *n*-heksan, etil asetat and *n*-butanol. Ekstrak *n*-heksan (64 g) dipisahkan dengan teknik kromatografi kolom menggunakan silika-gel 60 sebagai fasa diam (Cica Reagents, 40–50 mm) column (6 x 50 cm, 700 g), yang dielusi dengan menggunakan teknik *n*-hexane-ethyl acetate dan aseton. Proses pemisahan ini menghasilkan 10 fraksi (fraksi A - J). Fraksi C (6 g) dilanjutkan pemisahan dengan kromatografi kolom silaka gel (Merck,240 g) yang dielusi dengan menggunakan eluen $CHCl_3$–aseton secara SGP. Fraksi yang memiliki nilai Rf yang sama digabung sehingga

diperoleh tujuh fraksi (Fraksi C1-C7). Fraksi C1 (270 mg) direkromatografi dengan menggunakan silica gel (Cica Reagents, 20 g) sebagai fasa diam dan dielusi dengan menggunakan $CHCl_3$–aseton (5:2:1) sehingga menghasilkan empat fraksi (Fraksi C1a–C1d). Permurnian lebih lanjut terhadap farksi C1a (80 mg) by high-performance liquid chromatography (250 x 20 mm internal diameter, Wako Co. Ltd., Tokyo) and KLT preparative [1 mm layer thickness, n-hexane–$CHCl_3$–acetone (5:2:1)] sehingga menghasilkan senyawa 1 (12.0 mg). Analysis: [α]D = -85.2 (c 0.0027, MeOH, 295 K) (Dimitriadis et al., 1997; Mori & Gupta, 1985); m.p. 328–329 K.

(*R*)-(-)-Mellein (1)

Mp: 55-56°C. $[\alpha]_D$= -85.2 (c. 0.0027, MeOH, 295 K). ^{1}H NMR (500 MHz, CD_3Cl): δ 11.0 (1H, s), 7.41 (1H, *J* = 8.0 Hz), 6.89 □1H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.69 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 4.73 (1H, m), 2.93 (2H, d, *J* = 7.4 Hz), 1.53 (3H, d, *J* = 6.3 Hz). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3Cl): δ 170.0, 162.3, 139.5, 136.3, 118.0, 116.4, 108.4, 76.9, 34.8, 20.9.

3. HASIL DAN DISKUSI

Fraksinasi dari ekstrak methanol (369 g) dari ranting *Enicosanthum membranifolium* Sinclair, berturut-turut, dengan *n*-heksan, etil asetat, *n*-butanol, sehingga diperoleh empat

fraksi yakni fraksi n-heksana, etil asetat, *n*-butanol dan air.

Setiap fraksi dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator dan diuji aktifitas antimikrobanya dengan mikroba uji *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtillis* secara *in vitro* dengan menggunakan *agar diffusion assay* (metoda cakram). Hasilnya menunnjukan fraksi n-heksan memiliki aktifitas yang paling kuat terhadap *S. aureus* and *Bacillus subtillis* (Table 1).

Table 1
Aktifitas anti-mikroba dari farksi *n*-heksana, ethyl acetate, *n*-butanol and air dari *Enicosanthum membranifolium* Sinclair

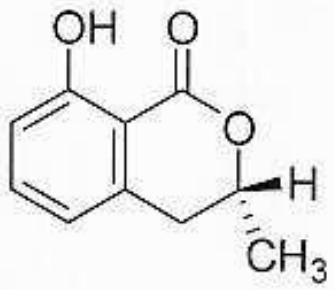
No.	*Tumbuhan*	*Fraksi*	Daerah hambat (mm)	
			Bacillus subtilis	*Staphylococcus aureus*
1.	*Enicosanthum membranifolium* Sinclair	*n*-Heksana	20.5	15.3
		Etil asetat	15.11	15.3
		n-Butanol	-	1
		Air	-	-

Selanjutnya fraksi yang paling aktif (n-heksana) di pisahkan dengan metoda kromatografi kolom (menggunakan silika gel sebagai fasa diam), KLT preparative, HPLC dan rekristalisasi. Setiap fraksi di monitor aktifitasnya terhadap bakteri (*S. aureus* and *B. subtilis*). Fraksi yang yang paling aktif dilanjutkan pemisahan dan pemurniannya dengan teknik kromatografi menghasilkan senyawa aktif anti-bakteri, *R*-(-)-Mellein (1).

Senyawa 1 diisolasi berupa kristal yang tidak berwana dengan titik leleh 55-56 °C dan putaran optik $[\alpha]_D$= -85.2 (c. 0.0027, MeOH, 295° K). Spektrum ^{1}H NMR

senyawa hasil isolasi menunjukan ada 10 proton pada struktur senyawa isolasi. Satu sinyal metil muncul sebagai doublet dengan pergeseran kimia (δ) 1.53 (3H, d, J = 6.3 Hz). Munculnya sinyal singlet untuk satu proton pada δ11.03 memberikan informasi tentang adanya suatu ikatan hidrogen intramoleculer dengan oksigen dari gugus karbonil. Senyawa isolasi memiliki tiga proton aromatik yang saling terkopling satu sama lain, dimana sinyal proton pada δ 7.41 (1H, dd, J = 7.3 dan 8.4 Hz) berjodohan dengan sinyal proton pada δ 6.90 (1H, d, J = 8.4 Hz) dan sinyal proton pada δ 6.70 (1H, d, J = 7.3 Hz). Satu proton metin proton pada δ 4.73 (1 H, m) yang terhubung oleh suatu atom oksigen dan dikopling oleh proton-proton methyl pada δ 1.53 (3H, d, J = 6.3 Hz) dan δ 2.93 (2H, d, J = 7.4 Hz). Spektrum ^{13}C NMR senyawa 1 memperlihatkan adanya 10 atom karbon. Data spectrum DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) menunjukan bahwa senyawa tersebut memiliki empat atom kabon quaternary yang muncul pada δ 108.4, 139.5, 162.4, 170.1 ppm. Empat karbon metin pada δ 76.9, 116.4, 118.0, 136.3, satu karbon metilen pada δ 34.8 and satu metil pada δ 20.9.

Berdasarkan data spektroskopi dari senyawa isolasi dan dibandingkan dengan data spektroskopi yang sudah dilaporkan, Senyawa I identifikasi sebagai *R*-(-)-mellein. (Höller, U., *et al.* 1999; Sun, C. M. *et al.* 1993; Tan, R. X., *et al* 2001)



R-(-)-Mellein (**1**)

Struktur senyawa hasil isolasi ini telah dipelajari lanjut dengan menggunakan analisis X-ray. Berdasarkan analisa x-ray, terdapat enam *independent molecules* dalam *unit cell*. Molekul-molekul dari (*R*)-(-)-mellein hampir paralel satu sama lainnya, dimana lapisan-lapisan tersebut dihubungkan oleh suatu interaksi yang lemah dari C—H O (Efdi et al., 2006).

4. KESIMPULAN

(*R*)-(-)-Mellein merupakan salah satu metabolit sekunder dari n-heksan *Enicosanthum membranifolium* Sinclair yang memiliki aktifitas sebagai anti-bakteri terhadap mikroba uji *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtillis*. Aktifitas anti-bakteri dari senyawa ini merupakan salah bukti bahwa sepesies-spesies dari famili annonaceae memiliki kandungan metabolite sekunder dengan aktifitas yang menarik, salah satunya adalah sebagai anti-mikroba.

5. UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Nurainas M.Si dan Pitra Akhriadi S.Si atas bantuannya dalam mengkoleksi dan mengidentifikasi tumbuhan *Eniconsanthum membranifolium* Sinclair.

DAFTAR PUSTAKA

An NCCLS global consensus standard, (2003) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: Approved standard. Eight edition, 6-11.

Bermejo, A., Blazquez, M.A., Rao, K.S, Cortes, D., (1998) Phytochemistry **47**, 1375-1380.

Dimitriadis, C., Gill, M. & Harte, M. F. (1997) Tetrahedron Asymmetry **13**, 2153–2158.

Efdi, M., Koketsu, M., Ebihara, M., Ishihara, H. (2006) Acta Crystallographica, Section E: Structure Reports Online **E62**, o2135-o2137.

Efdi, M., Itoh, T., Akao, Y., Nozawa, Y., Koketsu, M, Ishihara, I. (2007) *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 3667-3671.

Hoeller, U., Koenig, G. M. & Wright, A. D. (1999) J. Nat. Prod. **62**, 114–118.

Hussain, S.F., Gozler, B., Samma, M., Gozler, T. (1982) Phythochemistry **21**, 2979-2980.

Lebeoeuf, M., Cave, A., Bhaumik, P.K., Mukherjee, B., Mukherjee, R. (1982) Phythochemistry **21**, 2783-2813.

Li, H.Y., Sun, N.J., Kashiwada, Y., Sun, L., Snider, J.V., Cosentino, L.M., & Lee K.H. (1993) J. Nat. Prod. **56**, 1130-1133.

Mori, K. & Gupta, A. K. (1985) Tetrahedron **41**, 5295–5299.

Omar, S., Chee, C.L., Ahmad, F., Ni, J.X., Jaber, H., Huang, J., Nakatsu, T. (1992) Phytochemistry **31**, 4395-4397.

Rashid, M.A., Hossain, M.A., Hasan, C.M., Reza, M.S., (1996) Phytother. Res. **10**, 79-81.

Sun, C. M. & Toia, R. F. (1993) J. Nat. Prod. **56**, 953–956.

Tan, R. X. & Zou, W. X. (2001) Nat. Prod. Rep. **18**, 448–459.

Zafra-Polo, M.C., Figadere B., Gallardo, T., Tormo, J.R., Cortes, D. (1998) Phytochemistry **48**, 1087-1117.