

TRANSFORMASI ETIL-*P*-METOKSISINAMAT MENJADI ASAM *P*-METOKSISINAMAT DARI KENCUR (*Kaempheria galanga L.*) BESERTA UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERINYA

TRANSFORMATION OF ETHYL-*P*-METHOXYCINNAMATE TO *P*-METHOXYCINNAMIC ACID FROM KENCUR (*Kaempheria galanga L.*) AND THEIR ANTIBACTERIAL ACTIVITY

Muhamad Salman Fareza^{a*}, Rehana Rehana^a, Nuryanti Nuryanti^b, Didin Mujahidin^c

^aLaboratorium Kimia Farmasi, Program Studi Farmasi, Universitas Jenderal Soedirman

^bLaboratorium Farmasetika, Program Studi Farmasi, Universitas Jenderal Soedirman

^cLaboratorium Sintesis KOBA, Program Studi Kimia, Institut Teknologi Bandung

* email: muhamad.fareza@unsoed.ac.id

DOI : 10.20961/alchemy.v13i2.8472

Received 24 March 2017, Accepted 26 April 2017, Published online 1 September 2017

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi sifat antibakteri senyawa turunan asam sinamat dari rimpang kencur (*Kaempheria galanga L.*) yaitu etil-*p*-metoksisinamat dan asam-*p*-metoksisinamat. Etil-*p*-metoksisinamat merupakan senyawa hasil isolasi yang diperoleh dari ekstrak *n*-heksan rimpang kencur. Pemisahan dan pemurnian senyawa tersebut dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi cair vakum dan kromatografi kolom. Hidrolisis etil-*p*-metoksi sinamat dalam suasana basa menghasilkan asam-*p*-metoksi sinamat dengan rendemen 85 %. Karakterisasi senyawa dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer IR, NMR (¹H-NMR dan ¹³C-NMR) dan spektrofotometer massa. Evaluasi sifat antibakteri kedua senyawa dilakukan dengan menggunakan metode mikrodilusi terhadap bakteri *B. cereus* ATCC 11778, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *E. coli* ATCC 25922, *S. enterica* sv *Typhimurium* ATCC 14028 dan *E. aerogenes* ATCC 13048. Senyawa yang didapatkan memperlihatkan sifat antibakteri yang lemah. Hanya etil-*p*-metoksisinamat yang menunjukkan aktivitas antibakteri yang paling kuat khususnya terhadap bakteri *B. cereus* ATCC 11778 dengan nilai KHM 62,5 µg/mL. Adanya perubahan gugus fungsi tidak terlalu memberikan pengaruh signifikan terhadap peningkatan aktivitas antibakterinya.

Kata Kunci: antibakteri, asam *p*-metoksisinamat, etil *p*-metoksisinamat, *Kaempheria galanga L.*

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the antibacterial properties of ethyl-*p*-methoxycinnamate and *p*-methoxycinnamate acid from *Kaempheria galanga L.* Ethyl-*p*-methoxycinnamate was isolated from the *n*-hexane rhizome extract of *Kaempheria galanga L.* Separation and purification of this compound was carried out with vacuum liquid chromatography and column chromatography. Hydrolysis of ethyl-*p*-

methoxycinnamic under alkaline conditions obtained *p*-methoxycinnamic acid with a good yield of 85 %. The structure of the compounds were characterized with IR, NMR spectrophotometer (¹H-NMR and ¹³C-NMR) and mass spectrophotometer. The antibacterial properties of the compounds were evaluated using microdilution methods against *B. cereus* ATCC 11778, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *E. coli* ATCC 25922, *S. enterica* sv *Typhimurium* ATCC 14028, and *E. aerogenes* ATCC 13048. The compounds showed weak antibacterial properties. Only ethyl *p*-methoxycinnamate showed the strongest antibacterial activity, especially against *B. cereus* ATCC 11778 bacteria with MIC values of 62.5 µg /mL. The change of the functional groups provided no significant impact on the antibacterial activity.

Keywords: antibacterial, ethyl *p*-methoxycinnamate, *kaempheria galanga* L., *p*-methoxycinnamic acid.

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi yang disebabkan oleh mikroba hingga saat ini masih merupakan salah satu permasalahan global, termasuk di negara-negara tropis (Elder *et al.*, 2016; Mahady, 2005; Taylor *et al.*, 2002). Permasalahan tersebut, salah satunya, adalah disebabkan oleh berkembangnya resistensi mikroba terhadap obat-obat antibiotik yang tersedia (Arias and Murray, 2015; Alanis, 2005; Guillemot, 1999). Sumber senyawa-senyawa yang bersifat antimikroba lazimnya berasal dari produk biosintesis suatu mikroorganisme (Hardman and Limbird, 2012; Nussbaum *et al.*, 2006). Namun demikian, akhir-akhir ini pencarian senyawa-senyawa antimikroba tersebut dari sumber yang lain, seperti dari tanaman dan sintesis, juga secara intensif dilakukan. Beberapa senyawa-senyawa alam seperti teioksbaktin (Piddock, 2015), mangostin (Abdallah, 2011), kantonin-6-on, 7-amino-4-metilkumarin, heineanol A, dan asam kantik (Saleem *et al.*, 2010), merupakan contoh-contoh baru senyawa alam yang potensial sebagai antibakteri.

Tanaman kencur (*Kaempheria galanga* L.) merupakan salah satu tanaman obat tradisional yang termasuk ke dalam famili Zingiberaceae. Tanaman ini tersebar luas di daerah India dan Asia Tenggara (Lim, 2016). Rimpang dari tanaman ini telah dikenal dan digunakan oleh masyarakat dalam mengobati berbagai macam penyakit yang salah satunya adalah penyakit yang disebabkan infeksi bakteri (Sirisangtragul and Sripanidkulchai, 2011; Arambewela, 1999). Selain itu, di Indonesia secara tradisional bagian rimpang dari tanaman ini telah digunakan sebagai obat herbal dalam ramuan untuk meredakan gejala batuk (BPOM, 2013). Kajian secara *in vitro* ekstrak rimpang tanaman ini secara ilmiah telah terbukti pula memiliki sifat antibakteri yang kuat terhadap beberapa bakteri patogen seperti *Bacillus* sp., *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Shigella* sp., *E.*

aerogenes, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, dan *E. coli* (Dash *et al.*, 2014; Kochuthressia *et al.*, 2012; Pervez *et al.*, 2005). Adanya kandungan fitokimia pada rimpang tanaman kencur tersebut tentunya yang berperan terhadap sifat antibakteri yang dihasilkan.

Rimpang dari tanaman kencur mengandung beberapa senyawa seperti minyak asiri (2,5 - 4 %), etilsinamat, sinamaldehyd, eukaliptol, kaemferol, asam metil-*p*-kumarat etil ester dan etil-*p*-metoksisinamat. Etil-*p*-metoksisinamat merupakan salah satu kandungan fitokimia utama dari rimpang tanaman kencur yang biasa digunakan untuk kosmetik, makanan, insektisidal dan obat (He *et al.*, 2012). Berdasarkan penelitian sebelumnya, rimpang kencur memiliki kadar etil-*p*-metoksisinamat sebesar 38,6 % (Liu *et al.*, 2014). Hasil penelitian Huang *et al.* (2008) menunjukkan bahwa hasil analisa SPME-GC-MS pada ekstrak *n*-heksan rimpang tanaman kencur memiliki kadar etil *p*-metoksisinamat sebesar 46 %. Etil-*p*-metoksisinamat memiliki berbagai aktivitas farmakologis diantaranya sebagai antijamur (Omar *et al.*, 2014), antibakteri (Lakshmanan *et al.*, 2011), dan antikanker (Ekowati *et al.*, 2010). Sebagai komponen mayor, etil-*p*-metoksisinamat dapat digunakan sebagai prekursor awal dalam mensintesis senyawa turunan asam sinamat lainnya seperti asam *p*-metoksisinamat.

Kajian pengaruh perubahan struktur terhadap aktivitas antibakteri dari etil-*p*-metoksisinamat menjadi asam *p*-metoksisinamat dari rimpang kencur (*Kampheria galanga* L.) hingga kini belum ada yang melaporkan. Selain itu, sifat antibakteri kedua senyawa ini terhadap bakteri *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. enterica* sv *Typhimurium* ATCC 14028, dan *E. aerogenes* ATCC 13048 juga belum ada yang melaporkan. Berdasarkan latar belakang tersebut maka penelitian ini dilakukan.

METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan adalah serbuk rimpang kencur sebanyak 1 kg, silica gel 60 G 1.07731 untuk kromatografi cair vakum, silica gel 60 G 1.07734 untuk kromatografi kolom, plat silica gel (KLT) 60 F254 0,25 mm, etanol p.a., KOH p.a., pelarut *n*-heksan dan etilasetat (EtOAc) teknis yang telah didestilasi, antibiotik tetrasiklin, media *Mueller Hinton Broth* (MHB), NaCl, bakteri *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* sv *Typhimurium* ATCC 14028, dan *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048.

Alat yang digunakan adalah seperangkat alat gelas laboratorium, pemanas listrik, lampu UV, neraca analitik, *vortex*, Stuart Melting Point SMP 3, spektrofotometer FTIR Perkin Elmer spectrum 100, spektrofotometer NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*)

Agilent DD2 dengan sistem operasi 500 MHz (^1H) dan 125 MHz (^{13}C) dan HRMS (*High Resolution Mass Spectra*) Spektrofotometer VG Autospec Micromass (EI mode, 70 eV) atau ESI-TOF Waters LCT Premier XE dan Spektrofotometer Mikroplat Bio-Rad xMark.

Determinasi Tanaman

Rimpang tanaman kencur (*Kaempheria galanga* L.) yang akan digunakan dalam penelitian ini dideterminasi di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman untuk mengetahui kebenaran sampel penelitian.

Isolasi Etil-p-metoksisinamat

Sebanyak 1 kg serbuk rimpang kencur kering dimaserasi dengan pelarut *n*-heksan selama 3 x 24 jam pada suhu 4 °C. Hasil maserasi yang berupa cairan berwarna kuning kecoklatan kemudian dievaporasi pelarutnya hingga diperoleh ekstrak kasar sebanyak 34 gram. Ekstrak kasar kemudian difraksinasi dengan kromatografi vakum cair (KVC) menggunakan eluen *n*-heksan : etil asetat (30:1) hingga diperoleh delapan fraksi yaitu fraksi kf1 hingga fraksi kf8. Gabungan dari fraksi kf2 - 4 (18 g) kemudian dimurnikan lebih lanjut dengan menggunakan kromatografi kolom dengan eluen *n*-heksan : etil asetat (30:1) hingga diperoleh senyawa **1** sebanyak 4,6 g. Senyawa yang diperoleh diuji kemurniannya menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan sistem tiga eluen. Senyawa dikatakan murni apabila pada sistem tiga eluen memperlihatkan hanya satu noda pada penampakan sinar UV λ 254 nm. Senyawa **1** yang telah murni kemudian dikarakterisasi dengan spektroskopi NMR dan spektroskopi massa (MS).

Sintesis Asam-p-metoksisinamat

Sintesis asam *p*-metoksisinamat dilakukan seperti metode yang dilakukan oleh Ekowati *et al.* (2010) dengan sedikit modifikasi. Sebanyak 0,4 g etil-*p*-metoksisinamat dicampurkan dengan 5 mL larutan KOH 5 % dalam pelarut etanol p.a. Campuran reaksi kemudian direfluks selama 3 jam. Setelah dingin, kemudian campuran reaksi dinetralkan dengan HCl 37 % lalu disaring. Residu yang diperoleh kemudian diuji kemurniannya dengan sistem tiga eluen dan diperoleh produk senyawa **2** sebanyak 0,3 g (rendemen 85 %). Senyawa hasil sintesis yang diperoleh juga diuji kemurniannya menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan sistem tiga eluen. Senyawa **2** yang telah murni kemudian dikarakterisasi dengan spektroskopi IR, NMR dan spektroskopi massa (MS).

Uji Aktivitas Antibakteri

Metode uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode mikrodilusi seperti yang terdapat pada *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2012) yang meliputi beberapa tahap perlakuan diantaranya:

a. Preparasi suspensi bakteri

Koloni bakteri segar hasil subkultur dipindahkan secukupnya menggunakan *cotton bud* ke dalam tabung reaksi steril dengan tutup yang berisikan larutan fisiologis NaCl 0,9 %. Dilakukan pengocokkan larutan suspensi dengan menggunakan *vortex* agar homogen. Setelah itu, dilakukan pengenceran terhadap suspensi bakteri yang telah homogen sebesar 100 kali. Larutan suspensi tersebut kemudian didiamkan selama 1 jam. Selanjutnya, larutan suspensi tersebut diukur absorbansinya pada λ 600 nm hingga memperlihatkan serapan yang sesuai dengan standar Mc Farland 0,5.

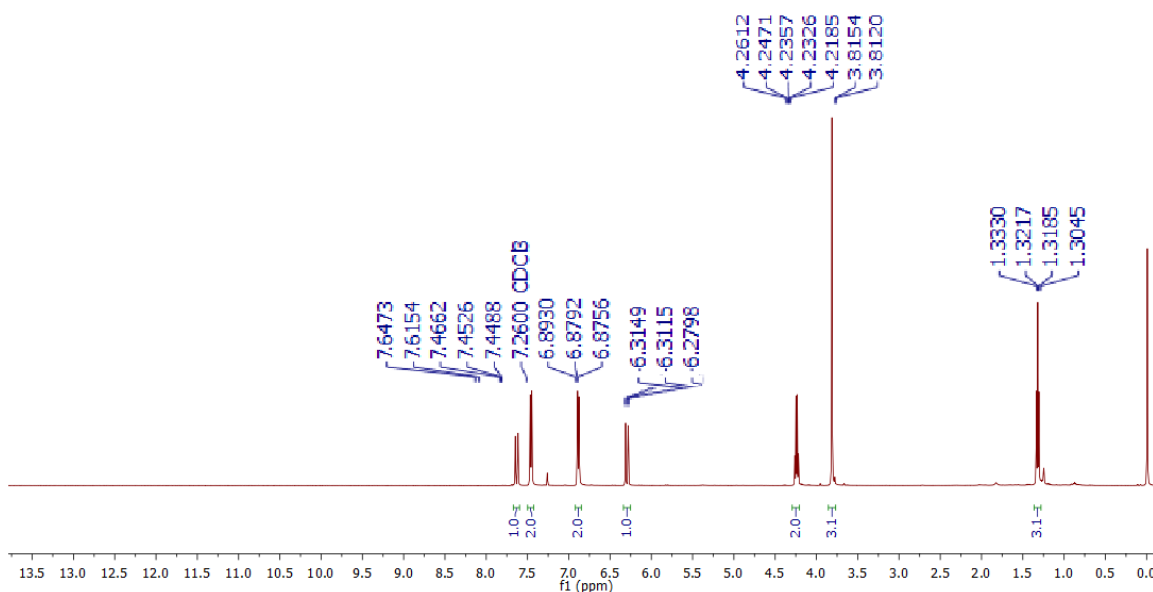
b. Penentuan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Sampel uji dilarutkan dalam pelarut DMSO hingga memperoleh konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$. Media *Mueller Hinton Broth* (MHB) yang telah steril sebanyak 200 μL dimasukkan ke dalam 96 sumur pada mikroplat. Sebanyak 200 μL sampel uji dimasukkan kedalam sumuran pada tiap baris pertama. Dilakukan pengenceran dua kali larutan sampel uji dengan cara mentransfer 200 $\mu\text{g/mL}$ larutan di sumur pertama ke sumur kedua dan seterusnya hingga memperoleh rentang konsentrasi sampel 3,9 - 500 $\mu\text{g/mL}$ sebanyak 200 μL untuk tiap sumur. Setelah itu, ditambahkan 10 μL suspensi bakteri ke dalam tiap sumur kecuali untuk kontrol negatif. Mikroplat kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Pertumbuhan bakteri kemudian diukur dengan alat spektrometer *Microplate reader* pada λ 600 nm hingga diperoleh data absorbansi. Nilai KHM ditentukan berdasarkan data absorbansi pada konsentrasi yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri. Antibiotik tetrasiklin digunakan sebagai kontrol positif. Sampel dilakukan pengukuran secara triplo.

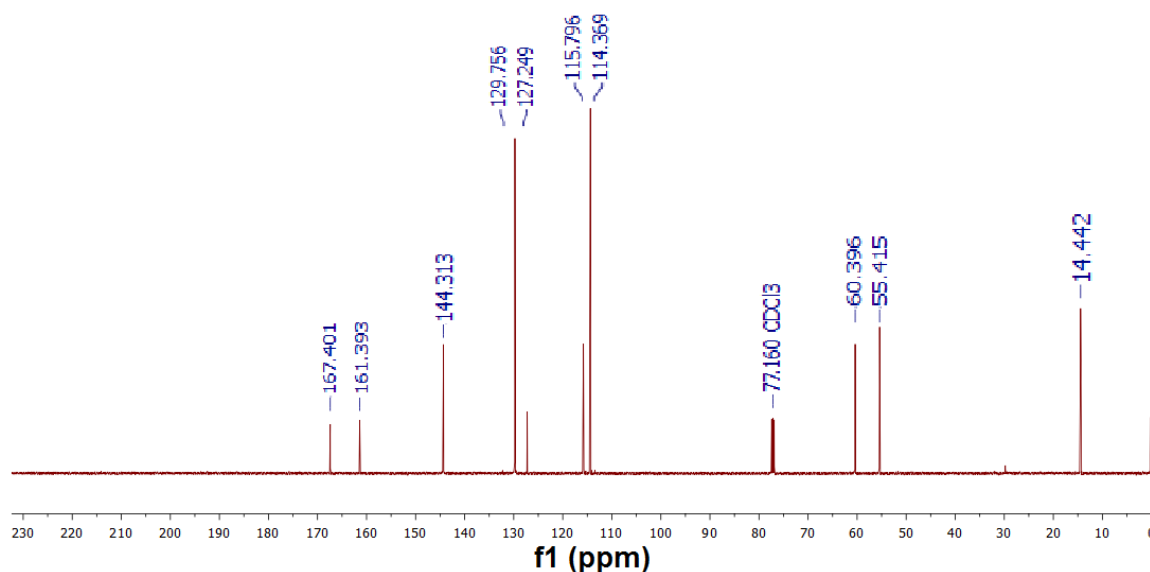
PEMBAHASAN

Isolasi dan Sintesis

Pada proses isolasi senyawa **1** difraksinasi terlebih dahulu dari ekstrak *n*-heksan serbuk kencur. Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi cair vakum (KCV). KCV merupakan metode yang sering digunakan untuk fraksinasi suatu sampel ekstrak kasar bahan alam dari yang bersifat nonpolar hingga semipolar. Hal ini dikarenakan metode ini memiliki beberapa keuntungan diantaranya lebih cepat dalam proses pemisahan yang dilakukan serta lebih aman dibandingkan metode kromatografi lainnya yang menggunakan tekanan seperti kromatografi *flash* (Sarker *et al.*, 2006). Selanjutnya, untuk mendapatkan etil-*p*-metoksisinamat murni dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi gravitasi atau kolom.



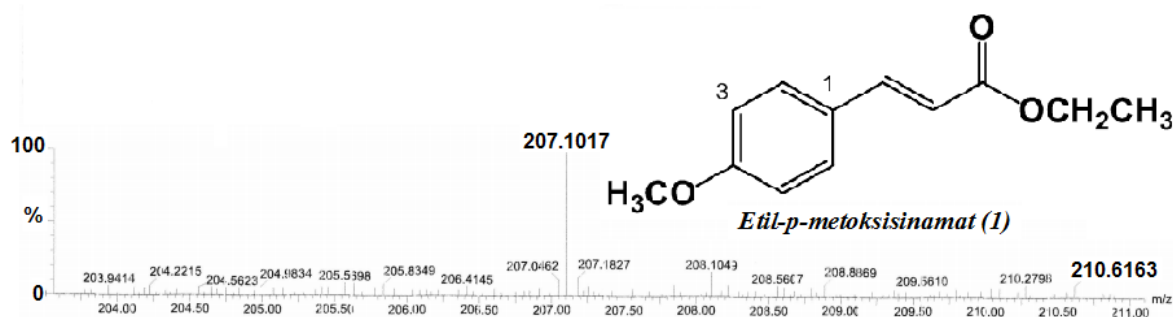
Gambar 1. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa **1** (500 MHz, CDCl_3).



Gambar 2. Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa **1** (125 MHz, CDCl_3).

Senyawa **1** yang diperoleh dari hasil isolasi rimpang kencur merupakan padatan berwarna kuning dengan titik leleh sebesar 48 – 49 °C. Berdasarkan spektrum $^1\text{H-NMR}$ (Gambar 1) untuk senyawa **1** tampak munculnya sinyal sepasang doublet sinyal proton yang menunjukkan suatu cincin aromatik tersubstitusi *para* pada δ_{H} 7,45 ppm dan 6,88 ppm. Munculnya sepasang sinyal doublet pada δ_{H} 7,63 ppm dan 6,31 ppm memperlihatkan sinyal untuk suatu proton alkena dengan stereokimia *trans*. Adapun sinyal-sinyal proton lainnya yaitu pada δ_{H} 4,23 ppm dan 1,31 ppm menunjukkan adanya gugus etoksi ($-\text{OCH}_2\text{CH}_3$) dan pada δ_{H} 3,81 ppm sesuai dengan gugus metoksi ($-\text{OCH}_3$). Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ (Gambar 2) pada senyawa **1** memperlihatkan tujuh sinyal C-sp^2 pada rentang δ_{C} 168-114 ppm yang

merupakan sinyal khas untuk suatu gugus C=O pada ester (δ_C 167,4 ppm), oksiaril (δ_C 161,4 ppm) dan C=C pada suatu cincin aromatik (δ_C 144,3 (C-3'), δ_C 129,8 (C-2/6), δ_C 127,2 (C-1), δ_C 115,8 (C-2') dan δ_C 114,4 ppm (C-3/5)). Selain itu, pada spektrum ^{13}C -NMR juga memperlihatkan tiga sinyal C-*sp*³ pada δ_C 60,4 (-OCH₂) ppm, δ_C 55,4 (-OCH₃) ppm, dan δ_C 14,4 (-CH₃) ppm. Berdasarkan analisa tersebut maka struktur yang disarankan untuk senyawa **1** adalah etil-*p*-metoksisinamat. Pembuktian lebih lanjut terhadap struktur senyawa **1** yaitu dengan membandingkan antara data ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR senyawa ini dengan data pustaka untuk struktur etil-*p*-metoksisinamat (Umar *et al.*, 2014). Hasil pengukuran spektrum massa HR-ESI-TOFMS (Gambar 3) untuk senyawa **1** memperlihatkan ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ pada m/z 207,1017 yang sesuai dengan rumus molekul C₁₂H₁₅O₃ (perhitungan $[\text{M}+\text{H}]^+$ pada m/z 207,1021).

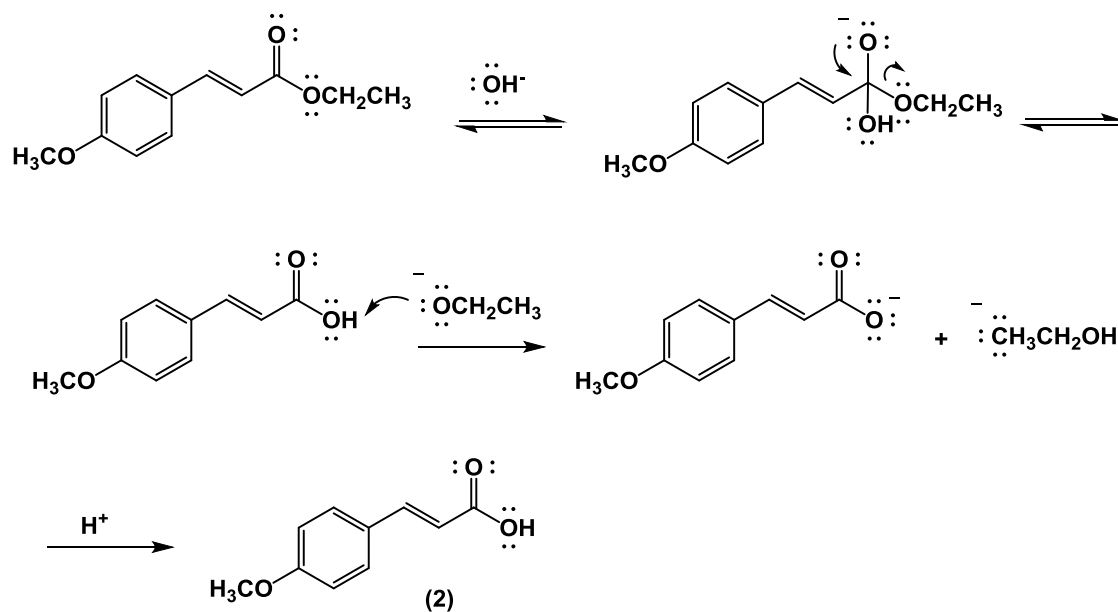


Gambar 3. Spektrum MS senyawa **1**.

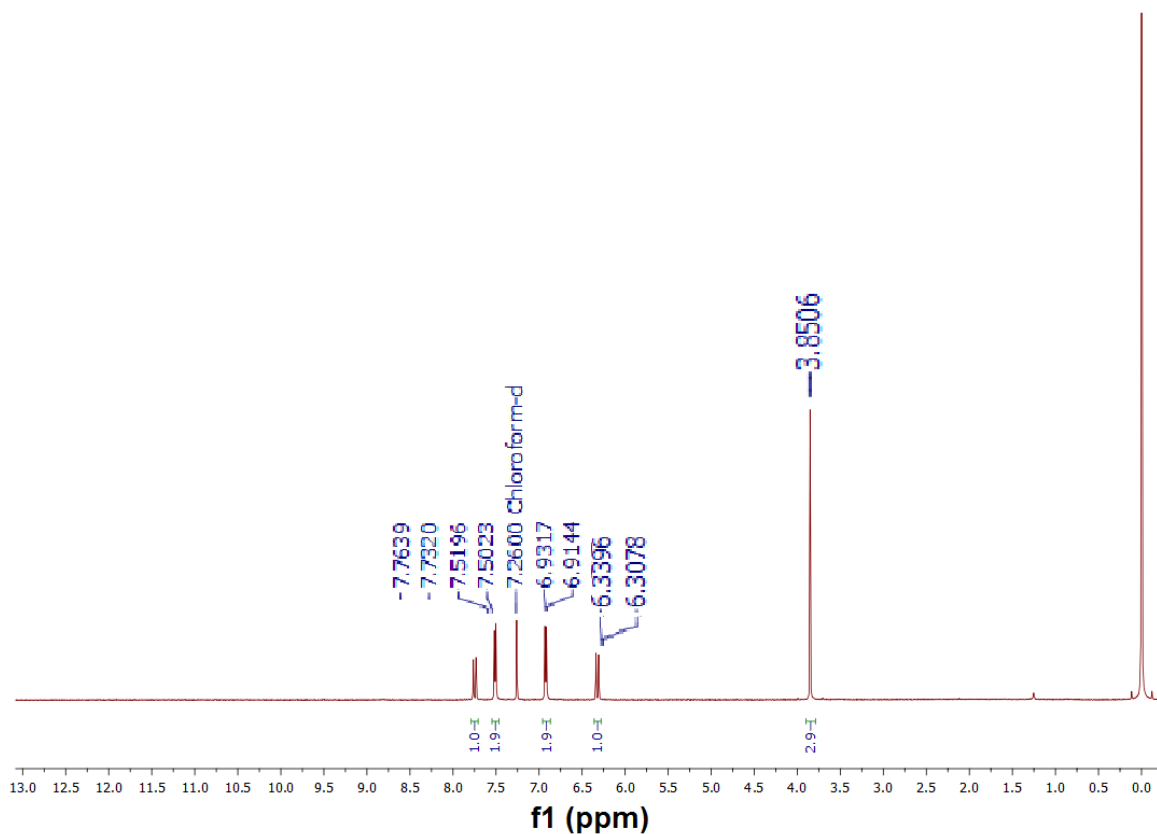
Titik leleh: 48-49°C. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_{H} (ppm): 7,63 (*d*, J = 16 Hz, 1H, H-alkene); 7,45 (*d*, J = 9 Hz, 2H, H-2/6); 6,88 (*d*, J = 9 Hz, 2H, H-3/5); 6,31 (*d*, J = 16 Hz, 1H, H-alkene); 4,23 (*q*, J = 7 Hz, 2H, -OCH₂); 3,81 (*s*, 3H, -OCH₃); 1,31 (*t*, J = 7 Hz, 3H, -CH₃). ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl₃) δ_{C} (ppm): 167,4 (C=O); 161,4 (C-4); 144,3 (C-3'); 129,8 (C-2/6); 127,2 (C-1); 115,8 (C-2'); 114,4 (C-3/5); 60,4 (-OCH₂); 55,4 (-OCH₃); 14,4 (-CH₃). HR-ESI-TOFMS: m/z 207,1017 $[\text{M}+\text{H}]^+$; perhitungan $[\text{M}+\text{H}]^+$ untuk rumus molekul C₁₂H₁₅O₃ m/z 207,1021.

Reaksi hidrolisis etil-*p*-metoksisinamat dilakukan dalam suasana basa. Reaksi hidrolisis suatu ester dalam suasana basa dikenal pula dengan reaksi saponifikasi. Mekanisme yang terjadi pada reaksi hidrolisis ester dalam suasana basa adalah melalui tahapan adisi nukleofilik dari basa OH⁻ terhadap gugus karbonil yang membentuk suatu intermediet tetrahedral. Reaksi pada tahapan tersebut biasanya berlangsung lambat. Tahap selanjutnya adalah lepasnya gugus alkosida membentuk suatu asam karboksilat. Selain dalam suasana basa, reaksi hidrolisis suatu ester dapat dilakukan pula dalam suasana asam (Solomons *and* Fryhle, 2011). Hasil reaksi hidrolisis dari etil-*p*-metoksisinamat (**1**)

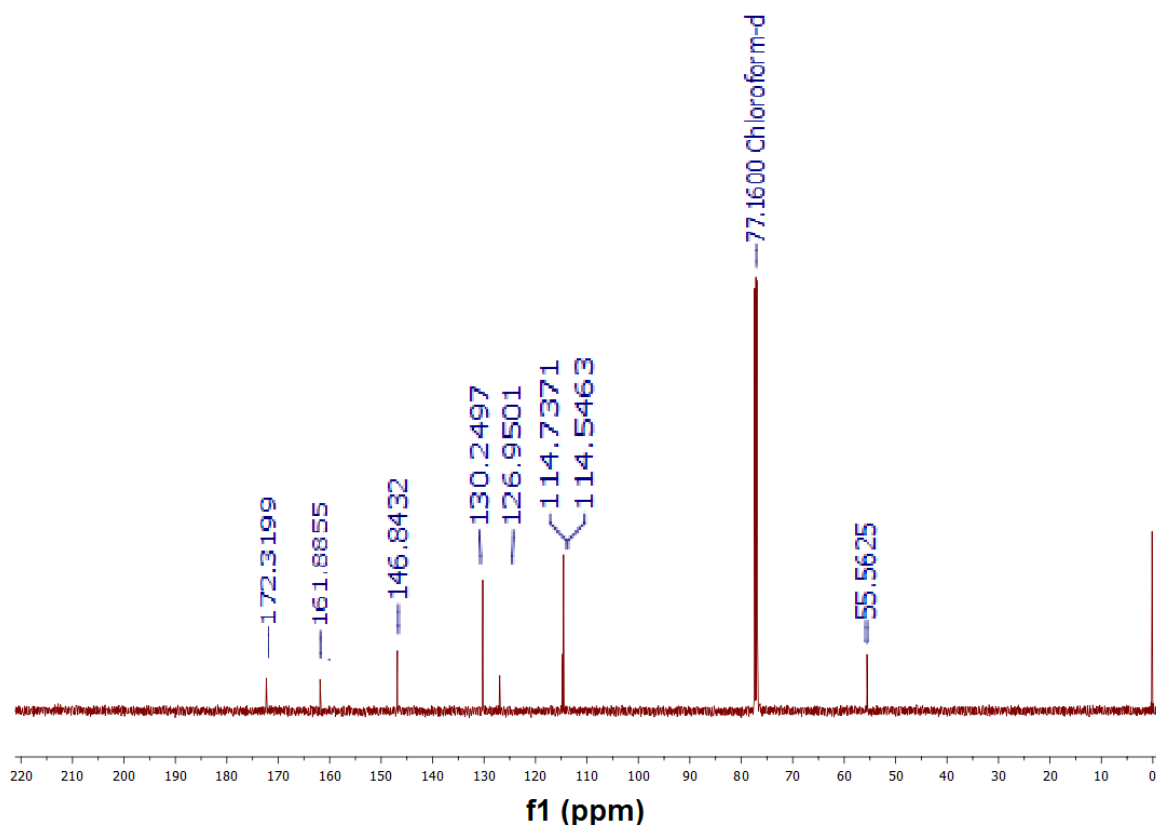
menghasilkan asam *p*-metoksisinamat (2). Adapun saran mekanisme reaksi hidrolisis tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.



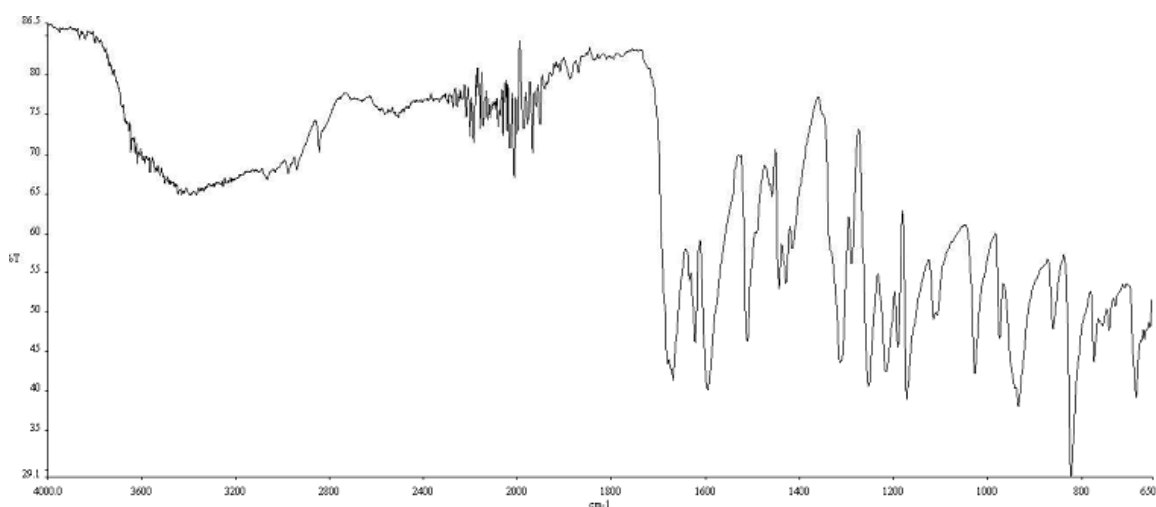
Gambar 4. Saran mekanisme reaksi hidrolisis senyawa 1 menjadi senyawa 2.



Gambar 5. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa 2.



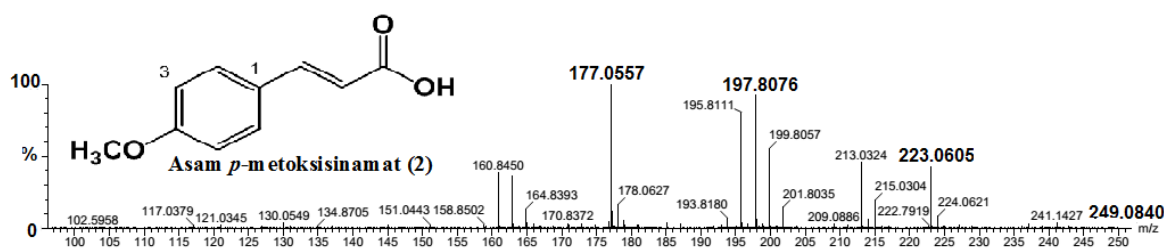
Gambar 6. Spektrum ^{13}C -NMR senyawa **2**.



Gambar 7. Spektrum IR senyawa **2**.

Senyawa **2** merupakan padatan berwarna putih dengan titik leleh sebesar 149 - 150 °C. Senyawa **2** diperoleh dari hasil hidrolisis senyawa **1**. Spektrum ^1H -NMR (Gambar 5) maupun ^{13}C -NMR (Gambar 6) untuk senyawa **2** memperlihatkan kemiripan dengan senyawa **1** kecuali pada sinyal-sinyal untuk gugus etil. Hilangnya sinyal untuk gugus etil pada spektrum ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR pada senyawa **1** menunjukkan produk reaksi senyawa **2** telah terbentuk. Berdasarkan spektrum ^1H -NMR yang diperoleh tidak ada sinyal -OH yang muncul. Hal ini dikarenakan sinyal OH pada gugus R-COOH memiliki

intensitas yang sangat rendah. Biasanya sinyal OH dapat muncul pada geseran kimia sekitar 6 - 12 ppm disebabkan adanya kandungan air atau menggunakan pelarut yang dapat mengakibatkan terjadinya transfer proton antara pelarut dengan sampel melalui ikatan hidrogen. Semakin kuat ikatan hidrogen atau semakin banyak frekuensi terjadinya pertukaran hidrogen akan membuat nilai geseran kimia dan pelebaran sinyal semakin besar (Syah, 2016). Pembuktian bahwa senyawa yang terbentuk adalah asam *p*-metoksisinamat yang mengandung gugus -OH dilakukan analisa dengan menggunakan data spektrum *infra* merah. Spektrum *infra* merah menunjukkan adanya serapan melebar pada bilangan gelombang 3550 - 3200 cm^{-1} (Gambar 7) yang merupakan ciri khas untuk gugus -OH (Silverstein *et al.*, 2005). Hasil reaksi memperoleh rendemen yang cukup baik yaitu sebesar 84,5 %. Hasil pengukuran spektrum massa HR-ESI-TOFMS senyawa **2** (Gambar 8) memperlihatkan ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ pada m/z 177,0557 yang sesuai dengan rumus molekul $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$ (perhitungan $[\text{M}+\text{H}]^+$ pada m/z 177,0552. Baik rendemen maupun data spektroskopi senyawa **2** memperlihatkan kemiripan dengan literatur sebelumnya (Ekowati *et al.*, 2010).



Gambar 8. Spektrum MS senyawa **2**.

Titik leleh: 149-150°C. FTIR (KBr): 3450 (regangan -OH), 3125 (regangan CH_3 sp^3), 1665 (regangan C=O), 1625 dan 1485 (regangan C=C aromatik), 1267 dan 1010 (regangan C-O-Ar) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 7,73 (*d*, $J = 16$ Hz, 1H, H-alkene); 7,50 (*d*, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-2/6); 6,92 (*d*, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-3/5); 6,31 (*d*, $J = 16$ Hz, 1H, H-alkene); 3,85 (*s*, 3H, -OCH₃). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): 172,3 (C=O); 161,9 (C-4); 146,8 (C-3'); 130,2 (C-2/6); 126,9 (C-1); 114,7 (C-2'); 114,5 (C-3/5); 55,6 (-OCH₃). HR-ESI-TOFMS: m/z 177,0557 $[\text{M}-\text{H}]^+$; perhitungan $[\text{M}-\text{H}]^+$ untuk rumus molekul $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$ m/z 177,0552.

Uji Aktivitas Antibakteri

Pada penelitian ini uji aktivitas antibakteri menggunakan metode mikrodilusi. Metode mikrodilusi merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk uji antibakteri dikarenakan memiliki sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode lainnya. Sensitivitas mikrodilusi mencapai 30 kali lebih sensitif (Eloff, 1998).

Metode ini dapat digunakan pula pada beberapa sampel yang berbeda dengan jumlah sampel yang sedikit atau terbatas (Langfield *et al.*, 2004). Pengujian menggunakan metode ini dilakukan dalam waktu satu kali pada *microplate* dengan jumlah sumuran yang cukup banyak, sehingga metode ini lebih cepat (Baris *et al.*, 2006). Nilai Konsentrasi Hambat Minimim (KHM) diperoleh berdasarkan data absorbansi pada konsentrasi tertentu tidak terjadi kekeruhan atau pertumbuhan bakteri.

Bakteri yang diujikan pada penelitian ini meliputi dua bakteri Gram-positif yaitu *B. cereus* ATCC 11778 dan *L. monocytogenes* ATCC 7644 serta tiga bakteri Gram-negatif yaitu *E. coli* ATCC 25922, *S. enterica sv Typhimurium* ATCC 14028 dan *E. aerogenes* ATCC 13048. Pemilihan bakteri *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. enterica* dan *E. coli* dikarenakan keempat bakteri ini merupakan bakteri patogen yang sering menyebabkan keracunan makanan (Al-zoreky and Al-Taher, 2015; Threlfall *et al.*, 2000; Smith-Palmer *et al.*, 1998). Bakteri *E. aerogenes*, merupakan salah satu bakteri patogen yang dapat menimbulkan permasalahan cukup serius bagi kesehatan manusia. Selain itu, bakteri *E. aerogenes* hingga kini telah banyak resisten terhadap berbagai antibiotik yang ada (Davin-Regli and Pages, 2015).

Hasil uji antibakteri senyawa **1** dan **2** sebagai nilai KHM memperlihatkan sifat antibakteri yang lemah yaitu sebesar 62,5-126 µg/mL terhadap beberapa bakteri uji (Tabel 1) Berdasarkan literatur, suatu senyawa murni memperlihatkan sifat antibakteri yang kuat bila memiliki nilai KHM 0,02-10 µg/mL (Saleem *et al.*, 2010). Selain itu, terlihat bahwa senyawa **1** memiliki aktivitas antibakteri yang paling kuat khususnya terhadap bakteri *B. cereus* bila dibandingkan bakteri lainnya dengan nilai KHM 62,5 µg/mL. Aktivitas antibakteri senyawa **1** berdasarkan penelitian sebelumnya memperlihatkan nilai KHM sebesar 1000 µg/mL terhadap bakteri *B. cereus* dan 50 µg/mL terhadap bakteri *E. coli* (Omar *et al.*, 2014; Nakazono *et al.*, 2006). Perubahan gugus fungsi secara umum pada kedua senyawa turunan sinamat yang diperoleh tidak terlalu memberikan pengaruh signifikan terhadap aktivitas antibakterinya. Pengaruh perubahan struktur terhadap aktivitas hanya terlihat pada bakteri *B. cereus*, yaitunn terlihat dari data bahwa senyawa **1** memiliki aktivitas antibakteri yang lebih baik dibandingkan senyawa **2**. Senyawa **1** secara struktur memiliki sifat permeabilitas lebih baik dibandingkan senyawa **2**. Adanya gugus nonpolar yaitu gugus etil (non polar) pada senyawa 1 diperkirakan memiliki peran penting dalam permeabilitas molekul tersebut. Permeabilitas merupakan kemampuan suatu molekul untuk dapat melalui suatu membran biologis (Kerns and Di, 2008). Selain itu, adanya gugus ester pada suatu struktur biasanya bertujuan untuk meningkatkan lipofilisitas

dan meningkatkan koefisien partisi dari suatu senyawa yang secara fisik membuat suatu senyawa berkurang kelarutannya dalam air. Hal ini dilakukan untuk meningkatkan sifat absorpsi suatu senyawa kepada membran biologis serta dapat meningkatkan ikatan antara ligan dengan reseptor pada suatu sisi target (Thomas, 2007).

Tabel 1. Nilai KHM ($\mu\text{g/mL}$) Senyawa 1 dan 2

Senyawa	Gram (+)			Gram (-)	
	<i>B. cer</i>	<i>L. mono</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enter</i>	<i>E. aer</i>
1	62,5	125	125	125	125
2	125	125	125	125	125
Tetrasiklin	3,9	3,9	7,8	7,8	3,9

Keterangan: *B. cer* = *Bacillus cereus* ATCC 11778; *L. mono* = *Listeria monocytogenes* ATCC 7644; *E. coli* = *Escherichia coli* ATCC 25922; *S. enter* = *Salmonella enterica* sv *Typhimurium* ATCC 14028; *E. aer* = *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, maka dapat disimpulkan bahwa etil-*p*-metoksisinamat telah berhasil diisolasi dan asam *p*-metoksisinamat dapat disintesis melalui reaksi hidrolisis etil-*p*-metoksisinamat dalam suasana basa. Rendemen asam *p*-metoksisinamat yang dihasilkan adalah sebesar 84,5 %. Hasil uji antibakteri memperlihatkan aktivitas antibakteri etil-*p*-metoksisinamat terhadap bakteri *Bacillus cereus* lebih baik dibandingkan terhadap bakteri lainnya. Transformasi gugus fungsi dari suatu ester menjadi asam karboksilat terhadap aktivitas antibakteri tidak berpengaruh secara signifikan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada Kementerian Riset dan Teknologi Indonesia dan Universitas Jenderal Soedirman atas dana BLU Riset INSTITUSI yang diberikan dengan nomor kontrak 2208/UN23.14/PN/2016.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdallah, E.M., 2011. Plants: An Alternative Source for Antimicrobial. *Journal Applied Pharmaceutical Science* 01(06), 16-20.
- Alanis, A.J., 2005. Resistance to Antibiotics: Are We in The Post-antibiotic Era. *Archives of Medicinal Research* 36(0), 697–705. doi: 10.1016/j.arcmed.2005.06.009.
- Al-zoreky, N.S. and Al-Taher, A.Y., 2015. Antibacterial Activity of Spathe from *Phoenix dactylifera* L. Against Some Foodborne Pathogens. *Industrial crops and products* 65(0), 241-246. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.12.014.

- Arambewela, L. S. R., Perera, A., and Wijesundera, R.L.C., 1999. Antibacterial Activity of *Kaempferia galanga*. *Fitoterapia* 70, 425-427. doi: 10.1016/S0367-326X(99)00053-2.
- Arias, C.A. and Murray, B.E., 2015. A New Antibiotic and The Evolution of Resistance. *The New England Journal of Medicine* 372(12), 1168-1170. doi: 10.1056/NEJMcibr1500292.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan RI., 2013. *Dokumentasi Ramuan Etnomedisin Obat Asli Indonesia*. Jakarta : BPOM RI.
- Baris, O., Gulluce, M., Sahin, F., Ozer, H., Kilie, H., Ozkan, H., Sokmen, M., and Ozbek, T., 2006. Biological Activities of The Essential Oil and Methanol Extract of *Achillea biebersteinii* Afan. (Asterceae). *Turkish Journal of Biology* 30, 65-73.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), 2012. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standars* (9th ed.).CLSI Document M07-A9.USA: Wayne PA.
- Dash, P.R., Nasrin, M., and Ali, M.S., 2014. In Vivo Cytotoxic and In Vitro Antibacterial Activities of *Kaempferia galanga*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 3(1), 172-177.
- Davin-Regli, A. and Pages, J., 2015. Enterobacter aerogenes and Enterobacter cloaceae; Versatile Bacterial Pathogens Confronting Antibiotic Treatment. *Frontiers in Microbiology* 6 (392), 1-10. doi: 10.3389/fmicb.2015.00392.
- Elder, D.P., Kuents, M., and Holm, R., 2016. Antibiotic Resistance: The Need for A Global Strategy. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 105(8), 2278-2287. Doi <http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2016.06.002>.
- Ekowati, J., Rudyanto, Sasaki, S., Budiati, T., Sukardiman, Hermawan, A., and Meiyanto, E., 2010. Structure Modification of Ethyl *p*-methoxycinnamate Isolated from *Kaempferia galanga* Linn. and Citotoxicity Assay of The Products on WiDr Cells. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention* 1(1), 12-18.
- Eloff, J.N., 1998. A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. *Planta Medica* 64(8), 711-713. doi: 10.1055/s-2006-957563.
- Guillemot, D., 1999. Antibiotic Use in Humans and Bacterial Resistance. *Current Opinion Microbiology* 2(0), 494-498. doi: 10.1016/S1369-5274(99)00006-5.
- Hardman, J.G. and Limbird, L.E., 2012. *Goodman and Gilman: Dasar farmakologi terapi*, Edisi 10 (Terjemahan), Jakarta: EGC Penerbit Buku Kedokteran.
- He, Z., Yue, G.G., Lau, C.B., Ge, W., and But, P.P., 2012. Antiangiogenic Effects and Mechanisms of *Trans*-ethyl *p*-methoxycinnamate from *Kaempferia galanga* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 11309-11317. doi: dx.doi.org/10.1021/jf304169jl.
- Huang, L., Yagura, T., and Chen, S., 2008. Sedative Activity of Hexane Extract of *Keampferia galanga* L. and Its Active Compounds. *Journal of Ethnopharmacology* 120(0), 123-125. doi: 10.1016/j.jep.2008.07.045.
- Kerns, E.D. and Di, L., 2008. *Drug-Like Properties: Concepts, Structure Design and Methods From ADME to Toxicity Optimization*, UK: Elsevier.

- Kochuthressia, K.P., Britto, S.J., Mo, J., and Raphael, R., 2012. In Vitro Antimicrobial Evaluation of *Kaempferia galanga* L. Rhizome Extract. *American Journal Biotechnology and Molecular Sciences* 2(1), 1-5. doi: 10.5251/ajbma.2012.2.1.1.5.
- Laksmanan, D., Werngren, J., Jose, L., Suja, K.P., Nair, M.S., Varma, R.L., Mundayoor, S., and Kumar, R.A., 2011. Ethyl-*p*-methoxycinnamate Isolated from A Traditional Anti-tuberculosis Medicinal Herb Inhibits Drug Resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis* In Vitro. *Fitoterapia* 82, 757-761. doi: 10.1016/j.fitote.2011.03.006.
- Langfield, R.D., Scarano, F.J., Heitzman, M.E., Kondo, M., Hammond, G.B., and Neto, C.C., 2004. Use of A Modified Microplate Bioassay Method to Investigate Antibacterial Activity in The Peruvian Medicinal Plant *Peperomia galiodes*. *Journal of Ethnopharmacology* 94(2-3), 279-281. doi: 10.1016/jep.2004.06.013.
- Lim, T.K., 2016. *Edible Medicinal and Non-medicinal Plants* 12. Switzerland: Springer.
- Liu, X.C., Liang, Y., Shi, W.P., Liu, Q.Z., Zhou, L., and Liu, Z.L., 2014. Repellent and Insecticidal Effects of The Essential Oil of *Kaempferia galanga* Rhizomes to *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera: Liposcelidae). *Journal of Economic Entomology* 107(4), 1706-1712. doi: <http://dx.doi.org/10.1603/EC13491>.
- Mahady, G.B., 2005. Medical Plants for The Prevention and Treatment of Bacterial Infections. *Current Pharmaceutical Design* 11, 2405-2427. doi: <https://doi.org/10.2174/1381612054367481>.
- Nakazono, Y., Watanabe, Y., Hashinaga, F., and Tadera, K., 2006. Studies on Antimicrobial and Antioxidative Substance of Yuzu (*Citrus junos* hort. Ex Tanaka) Seed. *Journal of Biological Sciences* 6(1), 135-139.
- Nussbaum, F., Brands, M., Hinzen, B., Weigand, S. and Habich, D., 2006. Antibacterial Natural Products in Medicinal Chemistry-Exodus or Revival. *Angewandte Chemie International Edition* 45(0), 5072-5129. doi:10.1002/anie.200600350.
- Omar, M.N., Hasali, N.H.M., Alfara, H.Y., Yarmo, M.A., and Zuberdi, A.M., 2014. Antimicrobial Activity and Microbial Transformation of Ethyl *p*-methoxycinnamate Extracted from *Kaempferia galanga*. *Oriental Journal of Chemistry* 30(3), 1037-1043. doi: <http://dx.doi.org/10.13005/ojc/300315>.
- Pervez, M.A.K., Khan, M.M., Islam, M.Z., and Hasan, S.M., 2005. Antimicrobial Activities of The Petroleum ether, Methanol, and Acetone Extracts of *Kaempferia galanga* L. Rhizome. *Journal of Life Earth Science* 1(1), 25-29. doi:10.1.1.566.4589.
- Piddock, L.J.V., 2015. Teixobactin, The First of A New Class of Antibiotics Discovered by iChip Technology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (0), 1-2. doi: <https://doi.org/10.1093/jac/dkv175>.
- Saleem, M., Nazir, M., Ali, M. S., Hussain, H., Lee, Y. S., Riaz, N., and Jabbar, A., 2010. Antimicrobial Natural Product: An Update on Future Antibiotic Drug Candidates, *Natural Product Report* 27(0), 238-254. doi:10.1039/b916096e.
- Sarker, S. D., Latif, Z., and Gray, A. I., 2006. *Natural Products Isolation 2nd Ed.* New Jersey: Humana Press.
- Silverstein, R.M., Webster, F.X., and Kiemle, D.J., 2005. *Spectrophotometric Identification of Organic Compound 7th Edition.* USA: John Wiley and Sons.

- Sirisngtragul, W. and Sripanidkulchai, B., 2011. Effects of *Kaempferia galanga*L. and Ethyl-*p*-methoxycinnamate (EPMC) on Hepatic Microsomal Cytochrome P450s Enzyme Activities in Mice. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 33(4), 411-417.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J. and Fyfe, L., 1998. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils and Essens Against Five Important Food-borne Pathogens. *Letters in Applied Microbiology* 26, 118-122.
- Solomons, T.W.G. and Fryhle, C.B., 2011. *Organic Chemistry*, 10th ed. USA: John Wiley and Sons.
- Syah, Y.M., 2016. *Dasar-dasar Penentuan Struktur Molekul Berdasarkan Data Spektrum ¹H and ¹³C NMR*. Bandung: Laboratorium Spektroskopi Massa dan NMR ITB.
- Taylor, P.W., Stapleton, P.D., and Luzio, J.P., 2002. New Ways to Threat Bacterial Infections. *Drug Discovery Today* 7, 1086-1091. doi: 10.1016/S1359-6446(02)02498-4.
- Thomas, G., 2007. *Medicinal chemistry: An introduction*, 2nd Ed., England: John Wiley & Sons.
- Threlfall, E.J., Ward, L.R., Frost, J.A., and Willshaw, G.A., 2000. The Emergence and Spread of Antibiotic Resistance in Food-borne Bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 62, 1-5.
- Umar, M.I., Asmawi, M.Z., Sadikun, A., Majid, A.M.S.A., Al-Suede, F.S.R., Hassan, L.E.A., Altaf, R., and Ahamed, M.B.K., 2014. Ethyl-*p*-methoxycinnamate Isolated from *Kaempferia galanga* Inhibits Inflammation by Suppressing Interleukin-1, Tumor Necrosis Factor- α , and Angiogenesis by Blocking Endothelial Functions. *CLINICS* 69(2), 134-144. doi: 10.6061/clinics/2014(02)10.