

MODIFIKASI VANILIN DENGAN ASAM p-HIDROKSI BENZOAT DAN UJI AKTIVITASNYA TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* DAN *Candida albicans*

CHEMICAL STRUCTURE MODIFICATION OF VANILLIN WITH PARAHYDROXYBENZOIC ACID AND ITS ANTIMICROBIAL ACTIVITY AGAINST *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, AND *Candida albicans*

Faridlatul Hasanah, Adia Putra Wirman

Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka
Klender, Jalan Delima II/IV, RT.9/RW.3, Malaka Sari, Duren Sawit, Kota Jakarta Timur,
Daerah Khusus Ibukota Jakarta 13460, Indonesia
Email: faridlahasanah@gmail.com (Faridlatul Hasanah)

ABSTRAK

Penemuan senyawa antimikroba baru merupakan hal yang menarik untuk terus dikembangkan, hal ini disebabkan meningkatnya resistensi antimikroba secara global. Penelitian ini bertujuan untuk mensintesis senyawa baru yaitu vanilil para hidroksibenzoat (vanilil p-hidroksibenzoat) yang diharapkan memiliki aktivitas antimikroba. Penelitian diawali dengan mensintesis vanilil p-hidroksibenzoat melalui reaksi reduksi dan esterifikasi. Senyawa vanillin direduksi terlebih dahulu menjadi vanilil alkohol untuk meminimalisasi halangan sterik pada reaksi esterifikasi. Senyawa hasil reduksi dilanjutkan reaksi esterifikasi menggunakan metode Steglich dengan asam para hidroksibenzoat. Senyawa yang dihasilkan dianalisis dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR), spektroskopi MS, dan spektroskopi NMR. Senyawa ester yang terbentuk mempunyai titik leleh dari yaitu 152-154 °C dengan rendemen 55,90%. Hasil elusidasi struktur dengan FTIR dan spektrum ¹H-NMR menunjukkan kesesuaian dengan senyawa yang diinginkan yaitu vanilil p-hidroksibenzoat. Daya antimikroba senyawa vanilil p-hidroksibenzoat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 200 dan 400 ppm termasuk kategori lemah. Sedangkan pada konsentrasi 600 ppm dikategorikan sedang. Uji aktivitas terhadap *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi 200 dan 400 ppm termasuk kategori sedang dan pada konsentrasi 600 ppm dikategorikan kuat. Senyawa hasil sintesis tidak memiliki aktivitas sebagai antijamur.

Kata kunci: antimikroba, metode Steglich, vanilil p-hidroksibenzoat.

ABSTRACT

New antimicrobial discovery is an interesting field of study, related to the increase of the occurrence of antibiotic resistance globally. This research aimed to synthesize a new vanillyl p-hydroxybenzoate that might possess antimicrobial properties. The synthesis of vanillyl p-hydroxybenzoate was conducted through reduction and esterification. Vanillin was reduced to vanillyl alcohol to minimize steric hindrance during esterification reaction. The compound resulted from reduction reaction was further reacted in esterification with Steglich method using p-hydroxybenzoic acid. The obtained was further analyzed with Thin Layer Chromatography (TLC), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Mass spectroscopy (MS), and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy. The ester resulted from this study had a melting point of 152-154 °C, with a total yield of 55.90%. The FTIR and ¹H-NMR spectra of the ester demonstrated similarities with those of vanillyl p-hydroxybenzoate. The antimicrobial activity of this compound against Staphylococcus aureus at concentrations of 200 and 400 ppm was weak, while that at a concentration of 600 ppm was considered moderate. When it was tested against Pseudomonas aeruginosa, it showed a moderate activity at concentrations of 200 and 400 ppm, and a strong activity at a concentration of 600 ppm. However, the product of this synthesis did not show antifungal activities.

Key words: antimicrobial, Steglich methods, vanillyl p-hydroxybenzoate.

Pendahuluan

Peningkatan resistensi antimikroba merupakan krisis global yang harus segera diatasi (WHO, 2016). Salah satu cara untuk mengatasinya adalah dengan menemukan antimikroba baru dengan struktur yang berbeda dengan antimikroba yang beredar. Vanilin merupakan senyawa yang aktif sebagai antimikroba dan sangat berpotensi untuk dikembangkan dalam pengobatan.

Vanilin (4-hidroksi-3-metoksibenzaldehida) merupakan kristal berwarna putih atau putih kekuningan yang banyak digunakan sebagai pewangi makanan. Vanilin dihasilkan dari buah panili (*Vanilla fragrans*). Tanaman panili dapat tumbuh dengan baik di kawasan tropis, salah satunya di Indonesia.

Vanilin merupakan senyawa aldehida aromatik dengan rumus molekul $C_8H_8O_3$. Dilihat dari struktur kimianya, vanilin merupakan senyawa fenol tersubstitusi gugus metoksi pada posisi orto dan gugus aldehida pada posisi para, sehingga vanilin dapat dikelompokkan sebagai senyawa antioksidan dan juga mempunyai aktivitas antibakteri (Fitzgerald *et al.*, 2004). Apabila vanilin dikenai reaksi

reduksi akan diperoleh senyawa vanilil alkohol.

Vanilil alkohol juga merupakan senyawa fenolik, sehingga memiliki potensi sebagai antioksidan. Senyawa vanilin biasa digunakan sebagai zat pengaroma pada makanan dan sediaan farmasi. Beberapa riset menunjukkan bahwa turunan vanillin memiliki beberapa aktivitas, antara lain aktivitas antimikroba (Kumar *et al.*, 2012), antijamur (Boonchird and Flegel, 1982) dan antioksidan (Oliveira *et al.*, 2014). Aktivitas antimikroba turunan vanilin meliputi gram positif dan negatif (Rakchoy *et al.*, 2009), dalam penelitian ini mikroorganisme uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Candida albicans*.

Winarto (2013) telah berhasil mensintesis turunan vanilin yaitu vanilil sinamat dari vanilil alkohol. Reaksi esterifikasi dipengaruhi beberapa faktor, salah satunya halangan atom sterik. Senyawa vanilin direduksi terlebih dahulu menjadi vanilil alkohol untuk meminimalisasi gangguan halangan sterik pada reaksi esterifikasi.

Reaksi esterifikasi yaitu reaksi langsung antara asam karboksilat dengan alkohol menghasilkan senyawa

ester. Pada dasarnya reaksi esterifikasi memiliki energi aktivasi yang tinggi dan membutuhkan waktu yang lama untuk mencapai kesetimbangannya. Katalis merupakan zat lain selain reaktan dan produk, yang ditambahkan pada suatu sistem reaksi untuk meningkatkan suatu laju reaksi kimia untuk mencapai suatu kesetimbangan reaksi kimianya. Katalis dapat mempercepat suatu laju reaksi kimia dengan menyediakan suatu jalur reaksi alternatif yang mempunyai energi aktivasi yang lebih rendah sehingga reaksi bisa berjalan dengan cepat (Fessenden dan Fessenden, 1986). Biasanya reaksi esterifikasi menggunakan katalis asam kuat dengan mekanisme Fischer (Setiadi, 2008), tetapi mekanisme ini cenderung memiliki hasil rendemen yang kurang baik.

Dengan penambahan penambahan disikloheksilkarbodiimida (DCC) dan 4-N,N-dimetilaminopiridin (DMAP) pada reaksi esterifikasi menggunakan metode Steglich, memungkinkan hasil reaksi memiliki rendemen yang jauh lebih baik dibandingkan katalis asam kuat. Pada reaksi esterifikasi Steglich terdapat aktivator asam karboksilat (DCC) sehingga asam karboksilat lebih reaktif dan terdapat katalis (DMAP). Pada penelitian yang telah dilakukan oleh

Setiadi (2008), sintesis asam vanilat dengan maltosa melalui reaksi esterifikasi dengan mekanisme Steglich menghasilkan senyawa ester maltovanilat.

Senyawa ester dapat dibuat dengan mereaksikan vanilil alkohol dengan asam p-hidroksibenzoat (paraben). Turunan asam p-hidroksi benzoat merupakan senyawa yang memiliki beberapa aktivitas di antaranya sebagai antiseptik dan pengawet.

Penelitian tentang pengembangan senyawa antimikroba telah banyak dikembangkan baik terhadap bahan dari senyawa alam ataupun senyawa sintetik. Pada penelitian ini dilakukan sintesis senyawa ester vanilil p-hidroksibenzoat dengan mereaksikan vanilil alkohol dengan asam p-hidroksibenzoat. Senyawa ester vanilil paraben (vanilil p-hidroksibenzoat) yang diperoleh diharapkan memiliki aktivitas antimikroba yang dapat digunakan untuk pengobatan.

Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah labu leher dua, *hot plate* dan *stirrer*, kondensor, termometer, spatula, corong pisah, *ring stand*, cawan petri, perangkat

ekstraksi, autoklaf, inkubator, oven, rotary evaporator, timbangan analitik, jarum ose, pinset, jangka sorong, mikropipet (brand), laminar air flow, aluminium foil, kapas, spatel, silinder, dan alat gelas lainnya. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan jamur *Candida albicans* ATCC 10231 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia. Medium yang digunakan adalah medium NA (*Nutrient Agar*) dan medium PDA (*Potato Dextrose Agar*). Bahan kimia meliputi vanilin, asam p-hidroksibenzoat, etanol, aseton, tetrahidrofuran, H₂SO₄ pekat, NaHCO₃ 10%, Na₂SO₄ anhidrat, NaBH₄, CH₂Cl₂, etil asetat, n-heksana, dan akuades.

Jalannya Penelitian

1. Reduksi vanilin dengan natrium borohidrida

Sebanyak 1,5 gram (0,04 mol) NaBH₄ dan 3 gram (0,0197 mol) vanilin dalam pelarut etanol dimasukkan ke dalam labu leher tiga kapasitas 250 mL yang dilengkapi dengan termometer, pendingin balik, dan pengaduk magnet serta penangas air. Campuran diaduk selama 40 menit pada suhu kamar. Campuran kemudian diasamkan dengan HCl 2,5

M sampai pH 4,5, kemudian diekstraksi dengan CH₂Cl₂, ditambah dengan Na₂SO₄ anhidrous, disaring dan dievaporasi. Analisis senyawa hasil dilakukan dengan FTIR.

2. Sintesis vanilil p-hidroksibenzoat dengan katalis DCC/DMAP

Proses esterifikasi dilakukan dengan menggunakan peralatan refluks dan labu leher tiga yang ditempatkan pada *waterbath* dengan rasio mol reaktan 1 : 4 (vanilil alkohol dan asam p-hidroksi benzoat). Aseton sebanyak 10 mL, DCC dan DMAP sebagai aktivator dan katalis masing-masing sebanyak 370,8 mg (1,8 mmol) dan 21,99 mg (0,18 mmol) dimasukkan ke dalam labu leher satu. Kemudian labu leher satu tersebut dihubungkan dengan kondensor dan ditempatkan pada wadah yang sudah ada parafin. Vanilil alkohol dan asam p-hidroksi benzoat dimasukkan ke dalam labu leher satu, dimasukan juga katalis dan aktivator pada suhu 60 °C. Proses ini berlangsung selama 24 jam disertai dengan pengadukan. Produk yang dihasilkan kemudian diidentifikasi.

3. Pemurnian hasil reaksi

Setelah hasil reaksi, filtrat kemudian ditambahkan dengan larutan NaHCO_3 10% sampai tidak terbentuk lagi CO_2 . Filtrat kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah yang telah berisi kloroform, lalu dikocok. Campuran dicuci sebanyak 3 kali. Hal ini bertujuan agar ester yang terbentuk terpisah dari pengotor yang bersifat polar. Kemudian fase organik dipisahkan dari fase airnya, ditambahkan dengan Na_2SO_4 , lalu disaring. Setelah disaring kemudian pelarutnya diuapkan. Untuk meningkatkan kemurnian, perlu dilakukan juga pemurnian dengan kromatografi kolom.

4. Karakterisasi dan elusidasi struktur senyawa hasil sintesis

Senyawa ester yang dihasilkan diuji kualitatif dengan KLT menggunakan pelarut pengembang

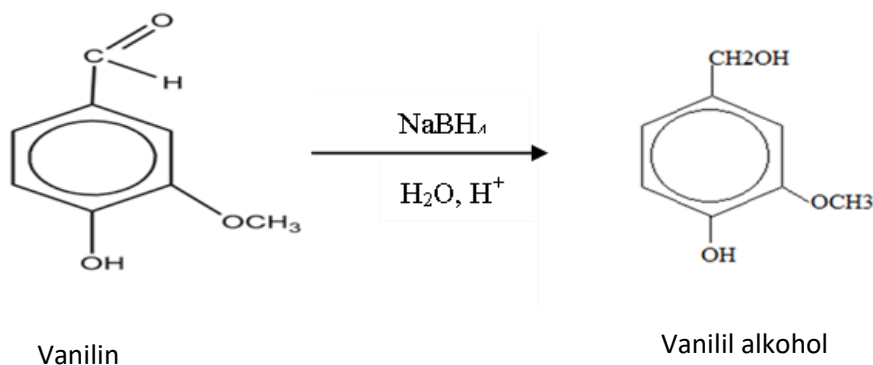
etil asetat dan n-heksana. Setelah produk ester dimurnikan, dikarakterisasi dengan FTIR, LCMS, NMR, dan penentuan titik leleh. Rendemen hasil sintesis diperoleh sesuai dengan Persamaan 1.

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot hasil sintesis}}{\text{Bobot teoritis}} \times 100\% \quad (1)$$

Hasil dan Pembahasan

Hasil Reduksi Vanilin dengan Natrium Borohidrida

Vanilin yang digunakan untuk mensintesis senyawa ester vanilil p-hidroksibenzoat, harus direduksi terlebih dahulu. Reduksi dilakukan pada gugus aldehida $[\text{R}-\text{COH}]$ menjadi gugus alkohol $[\text{R}-\text{OH}]$. Proses pembentukan vanilil alkohol adalah dengan cara mereduksikan vanilin menggunakan natrium borohidrida (NaBH_4), sesuai dengan reaksi pada Gambar 1.

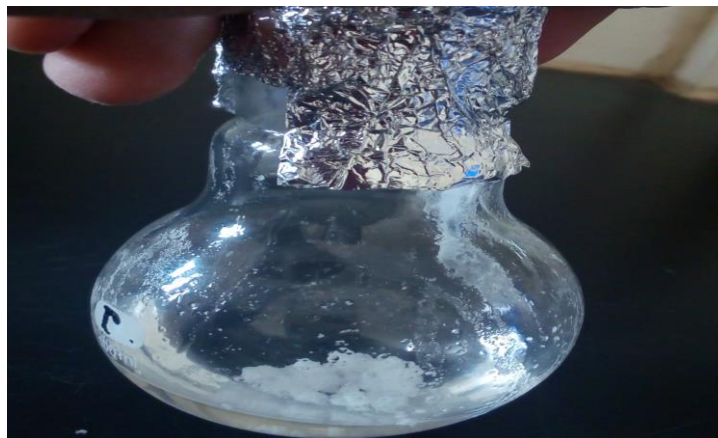


Gambar 1. Reduksi vanilin.

Reaksi reduksi vanilin menjadi vanilil alkohol dapat dilakukan dalam air atau alkohol berair sebagai pelarut. Untuk mereduksi suatu aldehida atau keton dipilih NaBH_4 , karena lebih mudah penanganannya dan tidak reaktif terhadap air.

Pencampuran antara vanilin dan NaBH_4 menghasilkan uap panas karena penambahan NaBH_4 menghasilkan panas dari dalam tempat keluar lingkungan atau bersifat eksoterm, sehingga tidak diperlukan adanya pemanasan dalam proses reduksi

vanilin menjadi vanilil alkohol. Hasil reduksi kemudian diasamkan dengan penambahan HCl 2,5 M sampai pH 4,5. Hal ini ditandai dengan terbentuknya gumpalan putih dan larutan berwarna putih. NaBH_4 bersifat basa jika mengikat ion hidroksi, penambahan HCl 2,5 M adalah untuk penambahan atom H^+ ke gugus O^- agar terbentuknya alkohol sekunder yang ditandai dengan adanya endapan putih dari campuran karena sudah terbentuk NaCl dari hasil penambahan HCl 2,5 M (Gambar 2).



Gambar 2. Endapan putih NaCl.

Filtrat hasil penyaringan kemudian diekstraksi untuk mendapatkan senyawa polar dengan menggunakan pelarut CH_2Cl_2 (diklorometana) sebanyak 10 mL, ekstraksi dengan corong pisah

merupakan ekstraksi cair-cair dengan prinsip pemisahan berdasarkan perbedaan kepolaran dan perbedaan bobot jenis, sehingga akan terdapat 2 lapisan pada corong pisah. Sifat dari pelarut diklorometana adalah semipolar,

sehingga pada ekstraksi cair-cair ini senyawa yang bersifat polar akan tertarik ke bagian polar dan senyawa yang bersifat nonpolar akan tertarik ke bagian nonpolar (*like dissolve like*). Vanilil alkohol merupakan senyawa yang bersifat polar. Lapisan paling bawah diambil dan dimasukkan ke dalam *beaker glass* kemudian ditambahkan dengan Na_2SO_4 anhidrat. Fungsi penambahan natrium sulfat adalah untuk mengikat molekul air yang masih terdapat pada hasil fraksi diklorometana. Proses perendaman dengan natrium sulfat dilakukan selama 30 menit kemudian dilakukan filtrasi. Hasil filtrasi ditampung ke labu bulat 100 mL untuk segera dievaporasi yang bertujuan untuk mendapatkan serbuk vanilil alkohol.

Serbuk vanilil alkohol diuji secara kualitatif yang bertujuan untuk melihat parameter spesifik dari senyawa yang dihasilkan. Uji pertama yaitu mengamati organoleptis meliputi bentuk, warna, dan bau. Uji kedua yaitu melihat titik leleh dari vanilil alkohol yang bertujuan untuk menentukan kemurnian dari vanilil alkohol. Uji ketiga yaitu menentukan faktor retensi (R_f) dengan metode KLT menggunakan eluen diklorometana : benzena : asam asetat = 50 : 1 : 1 dan menggunakan plat KLT

silika gel 60 F254 yang akan terfluoresensi pada panjang gelombang 254 nm. Uji keempat yaitu menggunakan alat instrumentasi FTIR untuk membandingkan grafik puncak yang terbentuk dari vanilil alkohol dengan vanilin yang dilihat pada rentang panjang gelombang gugus karbonil aldehida yang sudah direduksi menjadi gugus fungsi karbonil alkohol.

Pada proses KLT didapatkan hasil bahwa bercak spot dari vanilil alkohol lebih rendah dibandingkan dengan bercak spot dari vanilin yang menandai sudah hilangnya gugus aldehida dan berubah menjadi gugus alkohol. Sifat kepolaran dari gugus aldehida lebih rendah dibandingkan dengan gugus alkohol sehingga R_f dari vanilil alkohol lebih rendah dari vanillin, sehingga waktu retensi untuk melewati fase diam lebih lama.

Tabel 1 memperlihatkan organoleptis, nilai R_f , dan persentase rendemen vanilil alkohol yang telah berhasil direduksi. Senyawa vanilil alkohol hasil sintesis dibandingkan dengan data hasil reduksi yang dilakukan pada penelitian sebelumnya yang pernah mereduksi vanilin untuk mensintesis senyawa ester dengan bahan dasar vanilil alkohol (Budimarwanti, 2009).

Tabel 1. Karakteristik dan pengamatan hasil reaksi reduksi

Karakteristik	Hasil Pengamatan
Bentuk	Serbuk hablur
Warna	Putih
Bau	Berbau khas
KLT	Rf vanilin alkohol 0,54
Rendemen	76,03%

Hasil dari pembacaan dengan FTIR menggunakan interval daerah serapan 650 – 4000 cm^{-1} dapat dilihat pada Tabel 2. Sampel serbuk diletakkan pada kaca yang terbuat dari zinc selenium yang dilengkapi dengan detektor (dTGS). Molekul yang menyerap sinar IR akan mengalami perubahan tingkat energi vibrasi/rotasi. Senyawa vanilil alkohol memiliki daerah serapan pada 3438,5 cm^{-1} yang menyatakan gugus fungsi dari alkohol dengan interval frekuensi 3500–3200 cm^{-1} . Hasil analisis spektrum IR

senyawa hasil reduksi vanilin menunjukkan tidak adanya serapan gugus karbonil aldehida. Hal ini menunjukkan bahwa gugus aldehida vanilin sudah mengalami reaksi reduksi menjadi alkohol primer. Terjadinya alkohol primer didukung adanya serapan –OH bebas (tidak ada ikatan hidrogen) di 3438,5 cm^{-1} . Serapan –OH bebas ini tidak dimiliki oleh spektrum IR vanilin. Adanya alkohol primer juga didukung oleh serapan di daerah 1466,7 cm^{-1} yang menunjukkan gugus metilena CH_2 .

Tabel 2. Serapan senyawa vanillin dan vanilil alkohol dengan FTIR

Gugus Fungsi	Kisaran Frekuensi IR (cm^{-1})	Vanilin (cm^{-1})	Vanilil alkohol (cm^{-1})
–C=O aldehida	1740-1720	1661,4	-
–CH aldehida	2900-2800	2858,5	-
OH Bebas	3650-3600	-	3438,5
OH ikatan Hidrogen	3500-3200	3149	3151,5
–OCH ₃	2850-2810	2810	2888,7
–CH ₂ –	1465	-	1466,7

Hasil Sintesis Vanilil p-Hidroksibenzoat

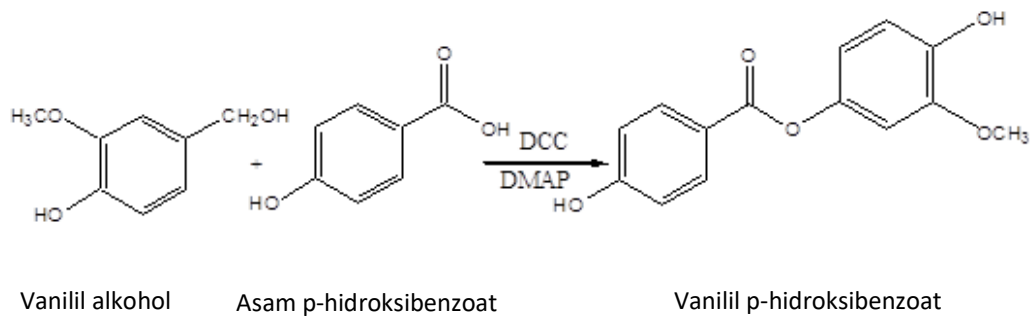
Penggunaan bahan pereaksi vanilil alkohol dan asam p-

hidroksibenzoat dengan perbandingan mol 2 : 1, bertujuan supaya senyawa asam p-hidroksibenzoat dapat

teresterifikasi ke dalam vanilil alkohol, yaitu pada gugus OH primer vanilil alkohol karena halangan steriknya yang lebih rendah. Asam p-hidroksibenzoat memiliki gugus Hidroksi (-OH) pada posisi para, terdapatnya gugus hidroksi pada posisi para tidak akan menghambat terbentuknya ester dari gugus karboksilat pada asam p-hidroksibenzoat dengan alkohol primer dari vanilil alkohol karena posisi para merupakan posisi yang paling reaktif sehingga tidak akan menghambat proses esterifikasi. Adanya halangan sterik yang sedikit pada proses esterifikasi dari senyawa asam p-hidroksibenzoat dengan vanilil alkohol, memerlukan adanya katalis untuk mempercepat terbentuknya reaksi dan perlu adanya proses pengadukan setiap detiknya. Umumnya proses esterifikasi menggunakan katalis asam. Katalis yang bersifat asam dapat menghidrolisis vanilil alkohol, akibatnya produk ester tidak dapat diperoleh. Oleh karena itu, dalam penelitian ini esterifikasi asam p-hidroksibenzoat dengan vanilil alkohol tidak menggunakan katalis asam, namun menggunakan katalis DMAP dengan dibantu senyawa DCC sebagai aktivator. Dengan kombinasi kerja dari kedua

senyawa tersebut, diharapkan reaksi esterifikasi dapat berlangsung dalam waktu yang relatif singkat dan diperoleh produk vanilil p-hidroksibenzoat secara optimal. DMAP sebagai katalis dapat dikombinasikan dengan aktivatornya DCC yang menghasilkan metode yang berguna untuk meragamkan asam karboksilat agar dapat bereaksi dengan alkohol untuk menghasilkan ester (Gambar 3).

Senyawa asam p-hidroksibenzoat memiliki gugus asam karboksilat. Gugus asam karboksilat mempunyai gugus H^+ sehingga pada senyawa DCC akan berikatan dengan H^+ . Ikatan H^+ dengan nukleofil pada DCC (karena N memiliki 1 pasang elektron bebas), kemudian O yang bermuatan negatif (nukleofil) pada asam p-hidroksi akan berikatan dengan atom C (elektrofil) pada DCC, dan memutus ikatan rangkap dua sehingga terjadi rotasi ikatan rangkap N pada DCC, dan selanjutnya akan membentuk senyawa intermediet O-asilisourea, yang kereaktifannya serupa dengan tingkat kereaktifan senyawa anhidrida karboksilat.



Gambar 3. Reaksi esterifikasi dari vanilil alkohol dan asam p-hidroksi benzoat dengan katalis DCC dan DMAP.

Senyawa anhidrida asam akan mudah bereaksi dengan katalis DMAP. Adanya gugus alkohol primer berfungsi untuk menstabilkan senyawa ester yang akan terbentuk supaya tidak kembali lagi ke senyawa asam karboksilat. Setelah proses terbentuk senyawa ester telah selesai, DMAP akan terlepas kembali. Oleh karena itu pada akhir reaksi akan terbentuk ester dan DCU (disikloheksilurea).

Proses sintesis senyawa vanilil p-hidroksibenzoat menggunakan pelarut tetrahidrofuran. Pemilihan pelarut pada proses sintesis senyawa organik merupakan hal yang penting diperhatikan. Pelarut tetrahidrofuran memiliki titik didih rendah yaitu 65 °C. Pelarut tetrahidrofuran merupakan pelarut amfiprotik yang baik digunakan untuk sintesis organik dan juga tidak

akan merusak senyawa hasil sintesis. Vanilil alkohol larut dengan THF, asam p-hidroksibenzoat larut dengan THF, serta katalis dan aktivator yang digunakan yaitu DCC dan DMAP larut dalam THF. Waktu yang digunakan untuk mensintesis senyawa vanilil p-hidroksibenzoat dengan menggunakan metode esterifikasi Steglich yaitu selama 24 jam. Proses sintesis harus diaduk menggunakan refluks selama 24 jam. Setiap 6 jam, cuplikan hasil sintesis pada labu bulat diambil untuk diuji menggunakan KLT yang bertujuan untuk mengamati terbentuknya produk ester yang ditandai dengan adanya spot yang lebih tinggi dari pereaksinya. Eluen yang digunakan untuk menentukan adanya produk yang terbentuk adalah campuran yang terdiri dari 2-3 pelarut yang berbeda untuk fase gerak. Eluen yang

digunakan yaitu n-heksana : etil asetat (1 : 2). Hasil Rf yang didapatkan menunjukkan Rf produk ester vanilil p-hidroksibenzoat menggunakan pelarut THF, lebih besar, dengan nilai Rf 0,7. Dari hasil KLT diketahui bahwa setelah 24 jam sudah terbentuk vanilil p-hidroksibenzoat.

Setelah 24 jam, campuran disaring untuk menghilangkan DCU, kemudian filtratnya dibilas dengan air untuk menarik kembali DCU yang masih tertinggal pada campuran tersebut. Karena DCU merupakan pengotor atau produk samping, setelah dibilas dengan air, campuran tersebut kemudian dinetralkan dengan NaHCO_3 . Sebelum ditambahkan NaHCO_3 , pH awal campuran diukur terlebih dahulu. pH awal campuran ini yaitu 6 sehingga untuk mendapatkan pH 7 NaHCO_3 yang ditambahkan tidak terlalu banyak yaitu sekitar 20 tetes.

Setelah netral, campuran dipisahkan dengan metode ekstraksi cair-cair (fraksinasi) dengan menggunakan alat corong pisah, yang bertujuan untuk memisahkan campuran yang ada pada zat cair berdasarkan perbedaan kepolarannya. Pelarut yang digunakan untuk proses fraksinasi adalah n-heksana yang bersifat nonpolar.

Pemilihan pelarut untuk proses fraksinasi bertujuan untuk menarik senyawa yang bersifat nonpolar karena senyawa ester yang terbentuk bersifat nonpolar sehingga akan tertarik dengan pelarut nonpolar yaitu n-heksana. Pada proses fraksinasi terdapat 2 lapisan pada corong pisah setelah dikocok, 2 lapisan ini disebabkan karena adanya perbedaan bobot jenis dari kedua larutannya. Fraksi yang diambil adalah fraksi n-heksana yang terdapat pada lapisan atas di corong pisah, karena BJ dari n-heksana (0,6548 g/mL) lebih kecil dari BJ air (1,000 g/mL). Proses selanjutnya yaitu dilakukannya penguapan pelarut untuk didapatkan serbuk. Untuk meningkatkan kemurnian, dilakukan juga kromatografi kolom dengan menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (1 : 2). Kelarutan dari vanilil p-hidroksibenzoat yaitu larut dalam etanol, metanol, dan diklorometana, berat sampel yang didapat dari hasil sintesis menggunakan pelarut THF adalah 1223 mg dengan persentase rendemen 55,90%.

Karakterisasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Hasil Sintesis

1. Uji organoleptis

Uji organoleptis bertujuan untuk melihat bentuk fisik dari produk hasil sintesis yang dihasilkan. Sampel

ester merupakan sampel ester yang terbentuk dari sintesis metode Steglich menggunakan pelarut THF.

Organoleptis dari produk ester yang dihasilkan bisa dilihat di Tabel 3.

Tabel 3. Perbandingan organoleptis sampel ester

Organoleptis	Sampel Ester
Warna	Kuning kecoklatan
Bentuk	Serbuk kasar
Bau	Berbau khas

2. Uji kualitatif pembentukkan ester dengan uji KLT

Setelah didapatkan serbuk vanilil p-hidroksibenzoat, kemudian diuji kualitatif dengan KLT untuk melihat adanya produk ester yang terbentuk. Pelarut pengembang yang digunakan yaitu n-heksana : etil asetat (1 : 2).

Pengujian KLT ini dibandingkan dengan dengan senyawa pembanding vanilil alkohol dan asam p-hidroksibenzoat. Produk hasil sintesis bersifat lebih nonpolar sehingga bisa mendapatkan nilai Rf yang lebih tinggi yaitu Rf vanilil p-hidroksibenzoat sebesar 0,7 (Tabel 4).

Tabel 4. Nilai faktor retensi senyawa produk ester

Sampel	Jarak Spot (cm)	Jarak Elusi Eluen (cm)	Nilai RF
Sampel Ester	3,5	5	0,7

3. Penentuan jarak lebur senyawa hasil sintesis

Penentuan titik leleh bertujuan untuk melihat kemurnian suatu senyawa yang dihasilkan. Rentang kemurnian suatu senyawa melalui titik leleh yaitu ± 2 °C. Alat yang digunakan untuk menentukan titik leleh disebut dengan *melting point block* dengan

prinsip kerja melihat suhu melelehnya sampel padatan menjadi cairan. Struktur senyawa dari vanilil p-hidroksibenzoat menyerupai dengan struktur senyawa dari benzilbenzoat yang memiliki titik leleh pada suhu 154-157 °C. Pengamatan titik leleh dari senyawa vanilil p-hidroksibenzoat menunjukkan terbentuknya produk

ester yang murni karena titik lelehnya sama dengan titik leleh benzilbenzoat dengan rentang kemurnian sebesar 0-2 °C.

4. Karakterisasi senyawa dengan spektrometri infra merah

Teknik infra merah dalam analisis kualitatif mempunyai keterbatasan yang tidak dapat diabaikan. Pertama tidak adanya hubungan antara hukum Beer dan kompleksitas spektrum sehingga tumpang-tindihnya puncak-puncak. Kedua, sempitnya puncak akibat dari sinar hamburan menyebabkan pemakaian lebar slit menjadi besar. Sel yang sempit juga tidak banyak digunakan untuk mengerjakan pekerjaan praktis.

Penentuan spektrum infra merah ini bertujuan untuk menganalisis spektrum senyawa ester yang sudah terbentuk dari hasil sintesis. Spektrum infra merah senyawa vanilil p-hidroksibenzoat memperlihatkan gugus fungsi senyawa ester pada puncak-puncak pada bilangan gelombang hasil FTIR. Analisis gugus fungsi vanilil p-hidroksibenzoat melalui adanya puncak pada spektrum infra merah menunjukkan adanya gugus C=O pada frekuensi

1735,1 cm^{-1} dengan puncak yang lemah, adanya gugus C-O pada frekuensi 1258 cm^{-1} dengan puncak yang tajam, adanya gugus >CO ester pada frekuensi 2117,1 cm^{-1} dengan puncak lemah, adanya gugus OH bebas pada frekuensi 3322,9 cm^{-1} dengan puncak yang lemah dan adanya posisi para untuk OH pada frekuensi 830 cm^{-1} dengan puncak yang sedang.

Tabel 5 menunjukkan perbandingan frekuensi serapan bilangan gelombang dari produk ester yang terbentuk dibandingkan dengan frekuensi dari pereaksinya. Pembacaan frekuensi bilangan gelombang spektrum infra merah diperoleh adanya gugus ester pada bilangan gelombang 2117,1; 1735,1; dan 1258,1 cm^{-1} . Puncak pada bilangan gelombang 2117,1 cm^{-1} terlihat lebih jelas dibandingkan dengan bilangan gelombang 1735,1 cm^{-1} . Gugus C=O pada spektrum infra merah berada pada frekuensi 1735-1750 cm^{-1} dan C-O pada spektrum infra merah berada pada rentang frekuensi 1300-1100 cm^{-1} . Proses esterifikasi vanilil alkohol dengan asam p-hidroksibenzoat menghasilkan senyawa ester vanilil p-

hidroksibenzoat, hal ini ditandai dengan hilangnya gugus OH primer pada senyawa vanilil alkohol yang

sudah bereaksi menjadi senyawa ester.

Tabel 5. Identifikasi gugus fungsi spektrum FTIR pada ester vanilil p-hidroksibenzoat

Gugus Fungsi	Standar Frekuensi IR (cm ⁻¹)	Vanilil Alkohol (cm ⁻¹)	Asam p-hidroksibenzoat (cm ⁻¹)	Vanilil p-hidroksibenzoat (cm ⁻¹)
OH Bebas	3650-3600	3438,5	3345,3	3322,9
-OCH ₃	2850-2810	2888,7	-	2851,4
C-H tidak Berfungsional	2960-2850	2965,1	-	2927,8
OH Ikatan Hidrogen	3500-3200	3151,5	-	-
Posisi Para (OH)	800-850	-	850	830
>CO Ester	2000-2300	-	-	2117,1
C=O	1750-1730	-	-	1735,1
C-O	1300-1000	-	-	1258,1
OH Karboksilat	3400-2400	-	2814,1	-
-CH ₂ -	1465-1458	1466,7	-	1448,1

5. Karakterisasi senyawa hasil sintesis dengan MS

Elusidasi struktur dengan LCMS memberikan hasil yang belum dapat mengkonfirmasi bobot molekul produk hasil sintesis yang seharusnya sekitar 272. Bobot molekul yang mendekati didapat pada kisaran 259-260. Hal ini disebabkan kemungkinan kurang stabilnya produk senyawa hasil sintesis selama analisis. Pada hasil analisis juga menunjukkan masih adanya pengotor produk samping yaitu DCU dan ditunjukkan adanya bobot molekul DCU sebesar 225,30 (M+H).

6. Karakterisasi senyawa hasil sintesis dengan spektroskopi resonansi magnet inti (¹H -NMR)

Elusidasi struktur menggunakan spektroskopi ¹H-NMR menunjukkan hasil sebagai berikut: pada δ 3,5 (*singlet*, 3H) dari -OCH₃; pada δ 3,9 (*singlet*, 2H) dari -OCH₂; pada δ 5,5 (*singlet*, 1H) dari -OH; pada δ 7,4 (*doublet-doublet*, 2H) dan δ 7,5 (*doublet-doublet*, 2H) dari Ar-CH=; pada δ 6,8 (*triplet*, 1H); δ 7,45 (*triplet*, 1H); δ 6,9 (*triplet*, 1H) dari gugus aromatis.

7. Uji aktivitas terhadap *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, dan *Candida albicans*

Metode yang dilakukan pada uji aktivitas ini menggunakan metode difusi agar, karena metoda ini paling sering digunakan untuk menentukan aktivitas antimikroba. Prinsip kerjanya adalah dengan mengamati daerah yang bening, yang mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh antimikroba pada permukaan media agar (Jawets *et al.*, 1995) menggunakan kertas cakram berdiameter 6 mm dan mikroorganisme yang akan diuji adalah *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, dan *Candida albicans*. Pengujian ini bertujuan untuk melihat kemampuan vanilil p-hidroksibenzoat dalam menghambat pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, dan *Candida albicans* yang dilihat dari zona bening yang ditimbulkan. Ukuran zona hambatan dapat dipengaruhi oleh kepadatan media biakan, kecepatan difusi antimikroba, konsentrasi antimikroba pada cakram filter, sensitivitas organisme terhadap antimikroba, dan interaksi antimikroba terhadap media. Suatu zat yang mempunyai efek samping signifikan tidak boleh digunakan.

Konsentrasi yang digunakan pada uji aktivitas antimikroba adalah 200, 400, dan 600 ppm untuk produk vanilil p-hidroksibenzoat; 200 ppm untuk DCU; 200 ppm untuk vanilil alkohol; dan 10 ppm untuk kontrol positif kloramfenikol (untuk *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*); dan 10 ppm untuk kontrol positif ketokonazol (untuk *Candida albicans*). Hasil pengukuran diameter daerah hambat terhadap *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, dan *Candida albicans* dapat dilihat pada Tabel 6.

Hasil pada Tabel 6 menunjukkan bahwa vanilil alkohol maupun senyawa hasil sintesis (vanilil p-hidroksibenzoat) mampu memberikan aktivitas dan membentuk zona bening terhadap *Staphylococcus aureus*. DCU tidak memiliki aktivitas antimikroba. Uji pada *Candida albicans* menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis tidak memiliki aktivitas sebagai antijamur.

Menurut Davis dan Stout (1971), kriteria kekuatan daya antibakteri adalah sebagai berikut: diameter zona hambat 5 mm atau kurang dikategorikan lemah, zona hambat 5-10 mm dikategorikan sedang, zona

hambat 10-20 mm dikategorikan kuat dan zona hambat 20 mm atau lebih dikategorikan sangat kuat. Berdasarkan kriteria tersebut, maka daya antibakteri senyawa vanilil p-hidroksibenzoat pada bakteri *staphylococcus aureus* pada konsentrasi produk 200 dan 400 ppm termasuk lemah, sedangkan pada konsentrasi 600 ppm termasuk sedang. Uji aktivitas terhadap

Pseudomonas aeruginosa pada konsentrasi produk 200 dan 400 ppm termasuk sedang dan pada konsentrasi 600 ppm termasuk kuat. Dengan demikian, diketahui bahwa konsentrasi produk vanilil p-hidroksibenzoat pada konsentrasi 600 ppm merupakan konsentrasi efektif untuk menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* maupun *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabel 6. Uji aktivitas antimikroba senyawa p-hidroksibenzoat terhadap *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, dan *Candida albicans*

Jenis mikroba	Senyawa Uji	Pertumbuhan Mikroba			Rata-rata (mm)
		1	2	3	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Va	+	+	+	10,10
	P2	+	+	+	5,20
	P4	+	+	+	5,70
	P6	+	+	+	10,10
	D	-	-	-	0
	K	+	+	+	13,30
<i>Staphylococcus aureus</i>	Va	+	+	+	4,30
	P2	+	+	+	4,20
	P4	+	+	+	4,60
	P6	+	+	+	5,13
	D	-	-	-	0
	K	+	+	+	6,28
<i>Candida albicans</i>	Va	-	-	-	0
	P2	-	-	-	0
	P4	-	-	-	0
	P6	-	-	-	0
	D	-	-	-	0
	K	+	+	+	13,00

Keterangan: Va=vanilil alkohol 200 ppm, P2=produk senyawa vanilil p-hidroksibenzoat 200 ppm, P4=produk senyawa vanilil p-hidroksibenzoat 400 ppm, P6=produk senyawa vanilil p-hidroksibenzoat 600 ppm, D=DCU (disikloheksil isourea) 200 ppm, K=kontrol positif (kloramfenikol dan ketokonazol).

Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa senyawa hasil reduksi dengan NaBH_4 telah terkonfirmasi vanilil alkohol melalui spektrum infra merah pada bilangan gelombang OH bebas 3438,5 dan 1466,7 cm^{-1} yang menunjukkan gugus metilen CH_2 serta didapatkan rendemen sebesar 76,03%. Hasil sintesis esterifikasi metode Steglich antara vanilil alkohol dan asam p-hidroksibenzoat dengan perbandingan molar 2 : 1 dalam THF, diaduk dengan pengaduk magnetik menggunakan refluks suhu 65 °C selama 24 jam menghasilkan senyawa berbentuk serbuk berwarna kuning, mempunyai titik lebur 154-157 °C, dengan persentase rendemen sebesar 55,9%, dan dari hasil karakterisasi dengan spektrometer infra merah dan spektroskopi resonansi magnet inti menunjukkan bahwa senyawa tersebut adalah vanilil p-hidroksibenzoat. Daya antimikroba senyawa vanilil p-hidroksibenzoat pada bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi produk 200 dan 400 ppm termasuk lemah, sedangkan pada konsentrasi 600 ppm termasuk sedang. Uji aktivitas terhadap *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi produk 200 dan 400 ppm

termasuk sedang dan pada konsentrasi 600 ppm termasuk kuat. Senyawa hasil sintesis tidak memiliki aktivitas sebagai antijamur.

Ucapan Terima Kasih

Tim peneliti mengucapkan terima kasih atas pendanaan penelitian ini melalui Kemenristek Dikti dan Lemlit Uhamka.

Daftar Pustaka

- Boonchird, C. and Flegel, T.W. 1982. In vitro antifungal activity of eugenol and vanillin against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Canadian Journal of Microbiology*, 28(11):1235- 1241.
- Budimarwanti, C. 2009. Sintesis senyawa 4-hidroksi-5-dimetilaminometil-3-metoksibenzil alkohol dengan bahan dasar vanilin melalui reaksi Mannich. *Skripsi*. Jurusan Pendidikan Kimia, FMIPA, Universitas Negeri Yogyakarta.
- Davis, W.W. and Stout, T.R. 1971. Disc plate method of microbiological antibiotic assay. *Applied microbiology*, 22(4):659–665.
- Winarto, D. 2013. Sintesis vanilil sinamat dari vanilil alkohol dan asam sinamat melalui reaksi esterifikasi Fischer. *Skripsi*. Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Negeri Yogyakarta.
- Fessenden, R.J. dan Fessenden, J.S. 1986. *Kimia Organik*. Jilid 2. Jakarta: Erlangga.

- Fitzgerald, D.J., Stratford, M., Gasson, M.J., Ueckert, J., Bos, A., and Narbad, A. 2004. Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*, and *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology*. 97:104–113.
- Jawetz, Melnick, dan Adelberg's. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Salemba Medika.
- Kumar, R., Sharma, P.K., and Mishra, P.S. 2012. A review on the vanillin derivatives showing various biological activities. *International Journal of PharmTech Research*, 4(1):266–279.
- Oliveira, C.B., Meurer, Y.S., Oliveira, M.G., Medeiros, W.M., Silva, F.O., Brito, A.C., Pontes, Dde.L., Andrade-Neto, V.F. 2014. Comparative study on the antioxidant and anti-toxoplasma activities of vanillin and its resorcinarene derivative. *Molecules*, 19(5):5898–5912.
- Rakchoy, S., Suppakul, P., and Jinkarn, T. 2009. Antimicrobial effects of vanillin coated solution for coating paperboard intended for packaging bakery products. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 2(04):189–196.
- Setiadi, M.I. 2008. Sintesis maltovanilat melalui mekanisme Steglich menggunakan pelarut aseton. *Skripsi*. Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Indonesia.
- WHO. 2016. General briefs UN on antimicrobial resistance. <http://www.who.int/dg/speeches/2016/antimicrobial-resistance-un/en/>. Data diakses pada 23 Desember 2017.