

ANSY

SINTESIS KOMPONEN BAWANG PUTIH VINIL-DITIIN DAN TURUNANNYA SERTA UJI AKTIVITAS ANTI KAPANGNYA DENGAN METODE BIOAUTOGRAFI

SYNTHESIS OF GARLIC COMPOUND VINYL-DITHIIN AND ITS DERIVATIVES, ALSO THEIR ANTI-FUNGAL DETERMINATION USING BIOAUTOGRAPHY METHODE

C. Hanny Wijaya¹

Staf Pengajar Jurusan TPG-FATETA, IPB

ABSTRACT

Perbaikan kestabilan, sifat fisik dan aktivitas fisiologis aktif komponen vinil-ditiin dilakukan dengan pembentukan sulfoksida dan penambahan gugus metil. Uji bioautografi pada kromatografi lapis tipis dengan *Cladosporium cucumerinum* menunjukkan bahwa keberadaan gugus sulfoksida meningkatkan kemampuan anti-kapang komponen secara nyata. Aktivitas terbaik diberikan oleh komponen dengan gugus -S-S-O. Penambahan gugus metil menurunkan aktivitas, walaupun tidak terlalu nyata. Stereoisomer juga berpengaruh pada aktivitas anti-kapang. Isomer 3,4-dihidro-3-isopropenil-5-metil-4H-1,2-ditiin-1-oksidia merupakan komponen yang paling menarik karena mudah terkristalkan, stabil, bau khas sulfur sangat lemah dan aktivitas relatif kuat. Pada penelitian ini juga berhasil dikembangkan metode sintesis metallil disulfida dari metallil klorida dengan tahapan yang lebih pendek dan mudah.

(Improvement on stability, physical characteristics and physiological activities of vinyl-dithiin has been attempted through oxidation and methylation. Determination using bioautography methode with *Cladosporium cucumerinum* showed that the exist of sulfoxide increased the anti-fungal activity sharply. Best activity has been determined on the compounds with SSO functional group. Activity was slightly decreased by addition of methyl-group. Stereoisomer has also influenced the activity of compound, although not so significant. Isomer 3,4-dihidro-3-isopropenil-5-metil-4H-1,2-ditiin-1-oxsidia seems very challenging due to its stability, easy handling physical form (crystallized and weak odor) and having significant activities. Simple synthesized pathway of metallil disulfide has been developed using metallil chloride as starting material)

PENDAHULUAN

Bawang putih sebagai rempah dikenal mempunyai aktivitas fisiologis aktif yang cukup handal (Cavallito et al., 1944; Delaha and Garagusi, 1985; Ade Tumbi and Lau, 1983; Sugiarto et al, 1986). Salah satu komponen bawang putih yang dikenal mempunyai aktivitas mikroba yang kuat adalah allisin (Cavallito et al, 1944). Allisin adalah komponen yang secara alami terbentuk pada bawang putih dan kerabatnya bila jaringan terluka (Stoll and Seebeck, 1951). Hanya saja komponen ini bukanlah komponen yang bersifat stabil, sehingga pemanfaatannya sangat terbatas.

Vinil-ditiin merupakan salah satu hasil transformasi allisin (Block, 1992). Menurut Muller (1991), komponen vinil-ditiin berdasarkan hasil pengujian biologis menunjukkan kemampuan fisiologis aktif. Belum ada laporan secara terperinci akan aktivitas vinil ditiin sebagai antimikroba, namun berdasarkan pada postulat bahwa aktivitas antimikroba allisin disebabkan oleh gugus S-S-O yang dimiliki (Small et al, 1947; Tahara et al., 1977), maka diduga aktivitas kelompok komponen vinil-ditiin ini akan lemah. Guna memperbaiki aktivitas fisiologis vinil-ditiin khususnya aktivitas anti-mikrobanya, sekaligus mendapatkan komponen poten yang memiliki sifat fisik (berbentuk padat/kristal, tidak

berbau kuat) dan kestabilan yang lebih baik, maka pada penelitian ini dicoba untuk mensintesa komponen turunan-turunan vinil-ditiin.

Perbaikan kinerja aktivitas dan sekaligus kestabilan komponen dilakukan dengan pendekatan pembentukan gugus sulfoksida dan modifikasi gugus alkil dengan penambahan gugus metil pada cabangnya. Komponen yang terbentuk selanjutnya dianalisis aktivitas anti-kapangnya dengan metode bioautografi hingga diperoleh informasi kemampuan aktivitas masing-masing komponen dan korelasi antara aktivitas dengan struktur kimianya.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Metallil-klorida (1,3-kloro-2-metil-1-propen, 1,2-dialil disulfida, NaOH, thiourea, iodida, m-kloroperbenzoat(m-CPBA), KH₂PO₄, Na₂HPO₄. 2H₂O, KNO₃, MgSO₄. 7H₂O, NaCl, sikloheksamin, tetrametilsilan (TMS), silika lapis tipis (TLC) dan berbagai pelarut organik diperoleh dari Nippon Kasei Chemical Ltd.

Kultur *Cladosporium cucumerinum* diperoleh dari Departement of Bioscience and Chemistry, Faculty of Agriculture, Hokkaido University.

Sintesis komponen-komponen uji

Vinil-ditiin dan oksidanya

Komponen vinil-ditiin disintesis dari komponen awal diallitil disulfida komersial dengan metode Block et al. (1992) yang sedikit dimodifikasi. Oksidasi vinil-ditiin dilakukan dengan menggunakan m-CPBA sebagai oksidator (Wijaya, 1990). Komponen-komponen yang terbentuk dimurnikan dengan kromatografi lapis tipis (TLC) atau kolom preparatif. Identifikasi dilakukan berdasarkan data spektroskopi yang antara lain diperoleh dengan spektrofotometer ultra lembayung (UV) dan infra merah (IR), spektrometer massa (MS) dan spektrometer resonansi magnetik inti (NMR) untuk pengukuran proton (¹H-NMR) dan karbon (¹³C-NMR) serta pengukuran dua dimensi (¹H-¹H, ¹H-¹³C, HMQC). Konfirmasi data dilakukan dengan pembandingan terhadap data terdahulu (Wijaya et al., 1991).

Isokrotol-ditiin dan oksidanya

Metallil khlorida dan thiourea direaksikan dalam pelarut ETOH dengan kondisi N₂ terkontrol dan refluks. Hasil reaksi yang terbentuk selanjutnya dievaporasi sehingga diperoleh kristal putih, lalu dicuci dengan dietil eter sehingga diperoleh prekursor untuk pembuatan metallil disulfida. Dalam pembuatan metallil disulfida, prekursor dinetralkan dengan larutan NaOH 25% dan direaksikan dengan iodida (I₂) dalam EtoH. Setelah prekursor habis direaksikan membentuk isokrotol-ditiin (cek dengan TLC silika, elusi dengan heksana 100%), dilakukan ekstraksi dengan pentana. Larutan pentana selanjutnya dicuci dengan larutan NaHCO₃ 5%. Isokrotol-ditiin yang terbentuk direaksikan dengan m-CPBA untuk membentuk sulfoksidanya. Isokrotol-ditiin diperoleh dengan dekomposisi spontan dari larutan isokrotol-ditiin sulfoksid dalam larutan air:aseton (2:3) pada suhu 37°C. Isolasi dua isomer 3,4-dihidro-3-isopropenil-5-metil-1,2-ditiin (Isokrotol 1,2-ditiin, 1) dan 2-isopropenil-5-metil-4H-1,3-ditiin (Isokrotol 1,3-ditiin, 2) dilakukan dengan kolom silika preparatif yang dipercepat, yang dielusi dengan heksana 100% dan secara gradien dipolarkan dengan etil asetat. Oksidasi isokrotol-ditiin diperoleh dengan mengoksidasisokrotol-ditiin dengan oksidator m-CPBA (Wijaya, 1990). Reaksi lengkap dapat dilihat pada Gambar 1.

Bioautografi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

KLT gelas setelah dipotong sesuai dengan kebutuhan, dengan menggunakan pinsil yang lunak dipetakan sesuai dengan jumlah sampel yang akan diuji. Jarak antara satu dengan lain harus diatur agar sampel tidak saling bertindih, demikian juga pertumbuhan kapang nantinya. Sampel langsung dispotkan pada setiap titik yang telah disiapkan dengan menggunakan jarum dengan ujung yang tak runcing. Sampel dapat disuntikkan pada volume yang sama dengan pengenceran dilakukan sebelum sampel

disuntikkan atau pada volume yang berbeda dari sampel dengan konsentrasi yang sama. Berikutnya, KLT diangin-anginkan agar semua pelarut hilang. KLT yang telah berisi sampel ini selanjutnya disemprot dengan suspensi konidial *Cladosporium cucumerinum* yang telah dipersiapkan sebelumnya. Penyiapan suspensi diawali dengan pembuatan stok yang terdiri dari 7g KHPO₄, 3g Na₂HPO₄.2H₂O, 4 g KNO₃, 1 g MgSO₄.H₂O, 1g NaCl dalam 1 liter air keran yang disterilkan pada suhu 120 oC selama 20 menit. Tepat sebelum penyemprotan, suspensi dibuat dengan mencampurkan 60ml larutan stok dengan 10ml larutan glukosa 3%. Kultur selanjutnya dilarutkan kedalamnya dengan cara mencuci agar pembiakan dengan campuran larutan tersebut. Penyemprotan KLT yang telah dibubuh komponen uji dilakukan dengan botol plastik penyemprot, dengan menjaga jarak dan volume penyemprotan yang tepat. Perlu diusahakan agar penyemprotan merata ke seluruh permukaan dan tetap dijaga agar tidak terlalu basah. Setelah penyemprotan, KLT secepatnya diinkubasikan pada suhu 25°C dengan kelembaban yang terjaga selama 2-3 hari. Pengamatan dilakukan dengan melihat pertumbuhan kapang setelah inkubasi. Aktivitas anti-kapang diperlihatkan dengan tidak adanya pertumbuhan pada area spot pada KLT. KLT uji bisa disimpan dengan membungkus KLT yang telah ditumbuhkan terlebih dahulu dengan plastik "wrapping". Untuk komponen pembanding digunakan sikloheksamin 25 µg/spot.

Analisis spektroskopik

Analisis spektrometri absorpsi sinar ultra lembayung (UV) dan infra merah (IR) dilaksanakan dengan masing-masing spektrofotometer Hitachi 285 dan Hitachi EPS-3T. Spektrometri massa diukur dengan impak elektron (EI-MS) dan ionisasi lapang (Field Ionization-MS). Untuk EI-MS digunakan alat JEOL JMS-DX 300 dengan parameter sbb: temperatur inlet 30-70°C, tekanan sumber ion 10-6 Torr, temperatur sumber ion 250°C, voltase akselerasi 3kV, voltase chamber 70eV. Sedang FI-MS digunakan JEOL JMS-01SG-2 dengan parameter operasi sbb: temperatur inlet 25°C, tekanan sumber ion 0.2 x 10⁻⁶ Torr, voltase akselerasi 9kV, voltase tinggi katode 4kV. Resonansi nuklir magnetik dicatat dengan JEOL JNM-GX FT (270-MHZ) dan Bruker AM-500 (500MHz) spektrometer dengan pelarut CDCl₃ dan internal standar tetrametilsilan (TMS).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Komponen hasil sintesis

Sintesis disulfida umumnya menggunakan metode Kirner dan Richter (1929), namun pada penelitian kali ini metallil disulfida tidak disintesis dengan metode tersebut. Komponen metallil disulfida

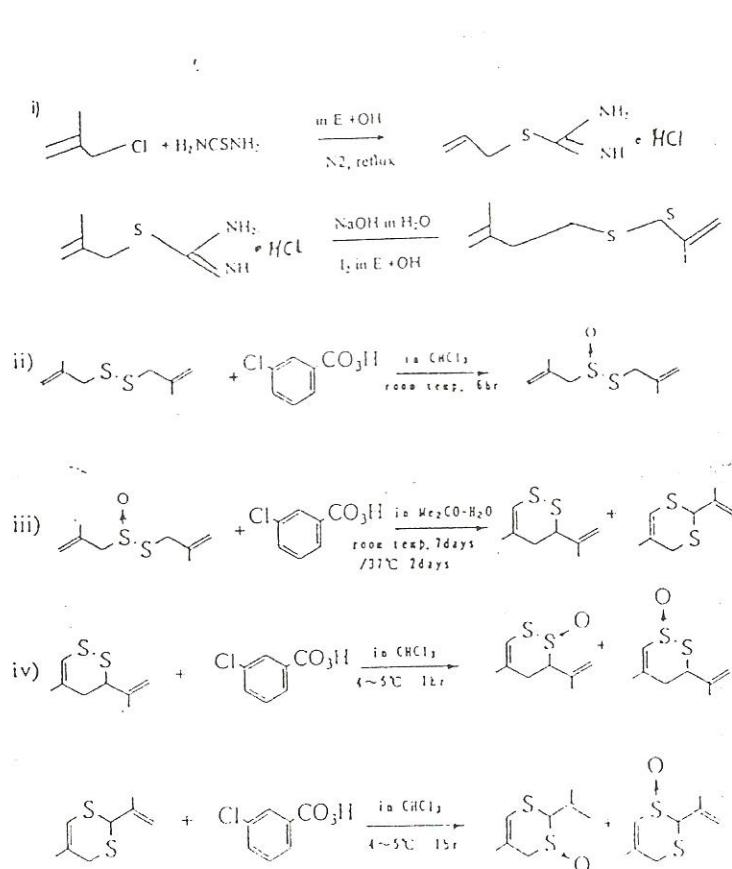
diperoleh dengan mereaksikan metallil khlorida dan thiourea membentuk komponen intermediat yang relatif murni dan stabil. Dengan metode ini, metallil disulfida diperoleh dengan cara lebih mudah dan kemurnian serta tingkat rendemen yang lebih baik. Pada tahap perubahan intermediat menjadi disulfida, hal yang perlu diperhatikan ialah penetralan dengan NaOH dan penambahan Iodida . Baik penambahan NaOH maupun Iodida dilakukan dalam bentuk larutan dan harus ditambahkan tetes demi tetes hingga tercampur sempurna.

Pembentukan isokrotil ditiin dilakukan dengan metode yang sama dengan pembentukan vinil ditiin, yaitu melalui pembentukan metallil sulfoksida. Hanya saja, dalam reaksi dekomposisi diperlukan waktu yang lebih lama dengan suhu yang agak lebih tinggi (Wijaya, 1990).

Pada reaksi oksidasi diperoleh hasil oksida dalam beberapa bentuk isomer. Penambahan

oksidator yang terlalu banyak dan waktu reaksi yang panjang akan membawa reaksi pada pembentukan sulfon. Pengaturan jumlah oksidator dan lama oksidasi dapat mengarahkan reaksi pada beberapa hasil isomer oksida saja sebagai komponen major (Wijaya, 1990). Isomer yang terbentuk dapat disebabkan oleh baik oleh perbedaan letak sulfur yang teroksidasi ataupun stereoisomer dari gugus siklis dan alkilnya. Tahapan reaksi lengkap dari pembentukan isokrotil ditiin dan oksidanya ini dapat dilihat pada Gambar 1.

Data spektroskopi dan sifat fisik dari beberapa komponen utama hasil oksidasi dapat dilihat sebagai berikut:



Gambar 1. Reaksi pembentukan isokrotil ditiin dan oksidanya

3,4-Dihydro-3-isopropenyl-5-methyl-1,2-dithiin (1)

Almost transparent oil, specific grassy odor

IR ν_{max} (Film) cm⁻¹ : 1630 (C=C), 899 (exo-methylene)

¹H-NMR (270 MHz) δ _{TMS} (CDCl₃) ppm :

- 1) 1.93 (d, 3H, $J = 0,7$ Hz, isopropenyl CH₃)
- 2) 1.85 (s, 3H, C5-CH₃)
- 3) 2.41-2.46 (broad m, 2H, allylic methylene)
- 4) 3.56 (dd, 1H, $J = 5.5$ and 8 Hz, methine proton)
- 5) 4.84 and 5.02 (two q, 2 H, $J = 0.7$ and 0.7, CH₂=C)
- 6) 6.09 (m, 1H, endo-olefinic S-CH-C-)

¹³C-NMR (67.5 MHz) δ _{TMS} (CDCl₃) ppm :

- 1) 21.6 (C₉)

- 2) 26.1 (C₁₀)

- 3) 35.6 (C₄)

- 4) 49.6 (C₃)

- 5) 113.0 (C₆)

- 6) 113.2 (C₆)

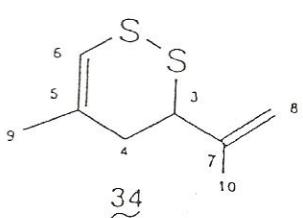
- 7) 134.7 (C₅)

- 8) 143.6 (C₇)

EI - MS m/z (rel. int. %) : 172 (M+ 50), 139 (50),

125 (100), 117 (27), 99 (41), 86 (34), 71 (21), 41 (31)

HR-MS : 17.0386 (C₈H₁₂S₂)



1

2-Isopropenyl-5-methyl-4H-1,3-dithiin (2)

Pale yellowish oil, specific grassy odor

IR ν_{max} (Film) cm⁻¹ : 1640 (C=C), 895 (exo-methylene)

¹H-NMR (270 MHz) δ _{TMS} (CDCl₃) ppm :

- 1) 1.94 (d, 3H, $J = 0.7$ Hz, isopropenyl CH₃)

- 2) 1.88 (s, 3H C5-CH₃)

- 3) 3.06 and 3.37 (two dd, 2 H, $J=17$ 1 Hz, allylic methylene)

- 4) 4.63 (s, 1H, methine proton)

- 5) 5.05 and 5.17 (two q, 2 H, $J=0.7$ and 0.7, CH₂=C)

- 6) 6.00 (m, 1H, endo-olefinic S-CH-C-)

¹³C-NMR (67.5 MHz) δ _{TMS} (CDCl₃) ppm :

- 1) 20.3 (C₉)

- 2) 25.6 (C₁₀)

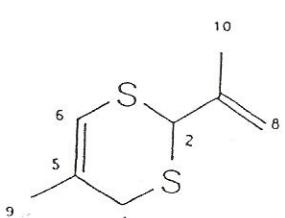
- 3) 30.6 (C₄)

- 4) 48.8 (C₂)

- 5) 115.3 (C₆)

- 6) 115.6 (C₆)

- 7) 125.0 (C₅)



2

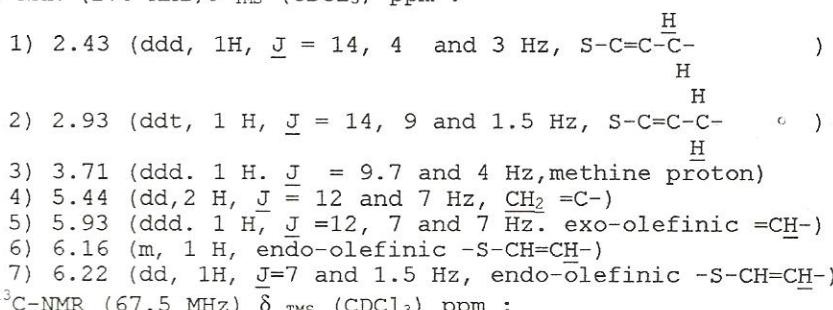
EI-MS m/z (rel. int. %) : 172 (M+ 1), 150 (80), 117 (28), 85 (100), 71 (40), 45 (47)

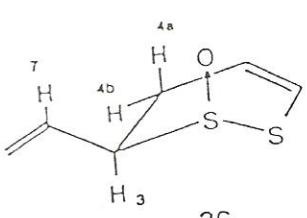
HR-MS : 172.0370 (C₈H₁₂S₂)

3,4-Dihydro-3-vinyl-1,2-dithiin-2-oxide (cis) (3)

Pale yellowish oil, weak sulfurous odor

IR ν_{max} (neat) cm^{-1} : 1620 (C=C), 985 and 925 (vinyl double bond). 1080 (sulfoxide) $^1\text{H-NMR}$ (270 MHz) δ TMS (CDCl_3) ppm :

- 1) 2.43 (ddd, 1H, $J = 14, 4$ and 3 Hz, S-C=C-

-
- 2) 2.93 (ddt, 1H,
- $J = 14, 9$
- and 1.5 Hz, S-C=C-
-
-
- 3) 3.71 (ddd, 1H,
- $J = 9.7$
- and 4 Hz, methine proton)
-
- 4) 5.44 (dd, 2H,
- $J = 12$
- and 7 Hz,
- $\text{CH}_2=\text{C}-$
-)
-
- 5) 5.93 (ddd, 1H,
- $J = 12, 7$
- and 7 Hz, exo-olefinic
- $=\text{CH}-$
-)
-
- 6) 6.16 (m, 1H, endo-olefinic
- $-\text{S}-\text{CH}=\text{CH}-$
-)
-
- 7) 6.22 (dd, 1H,
- $J=7$
- and 1.5 Hz, endo-olefinic
- $-\text{S}-\text{CH}=\text{CH}-$
-)

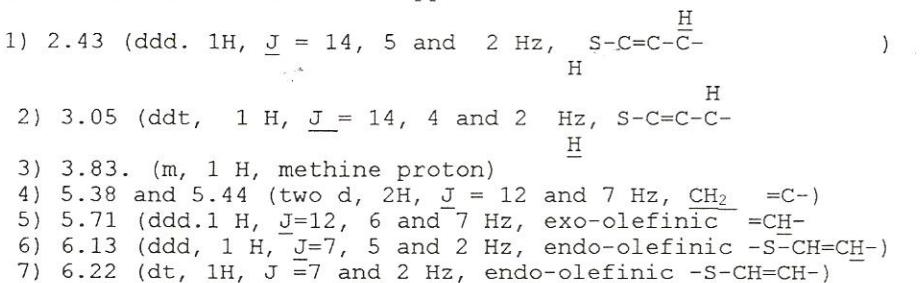
 $^{13}\text{C-NMR}$ (67.5 MHz) δ TMS (CDCl_3) ppm :

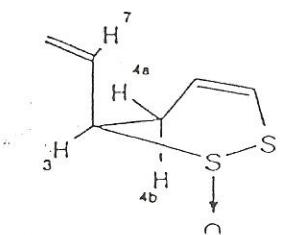
- 1) 20.0 (C₄)
 2) 61.0 (C₃)
 3) 112.6 (C₅)
 4) 121.6 (C₈)
 5) 123.9 (C₆)
 6) 134.4 (C₇)

F1-MS m/z (rel. int. %): 160 (M^+)3,4-Dihydro-3-vinyl-1,2-dithiin-2-oxide (4) (trans)

Pale yellowish oil, week sulfurous odor

IR ν_{max} (net) cm^{-1} : 1610 (C=C), 980 and 930 (Vinyl double bond). 1080 (sulfoxide) $^1\text{H-NMR}$ (270 MHz) δ TMS (CDCl_3) ppm :

- 1) 2.43 (ddd, 1H, $J = 14, 5$ and 2 Hz, S-C=C-

-
- 2) 3.05 (ddt, 1H,
- $J = 14, 4$
- and 2 Hz, S-C=C-
-
-
- 3) 3.83. (m, 1H, methine proton)
-
- 4) 5.38 and 5.44 (two d, 2H,
- $J = 12$
- and 7 Hz,
- $\text{CH}_2=\text{C}-$
-)
-
- 5) 5.71 (ddd, 1H,
- $J=12, 6$
- and 7 Hz, exo-olefinic
- $=\text{CH}-$
-)
-
- 6) 6.13 (ddd, 1H,
- $J=7, 5$
- and 2 Hz, endo-olefinic
- $-\text{S}-\text{CH}=\text{CH}-$
-)
-
- 7) 6.22 (dt, 1H,
- $J=7$
- and 2 Hz, endo-olefinic
- $-\text{S}-\text{CH}=\text{CH}-$
-)

 $^{13}\text{C-NMR}$ (67.5 MHz) δ TMS (CDCl_3) ppm :

- 1) 18.3 (C₄)
 2) 57.6 (C₃)
 3) 113.6 (C₅)
 4) 121.7 (C₆)
 5) 122.2 (C₈)
 6) 129.9 (C₇)

F1-MS m/z (rel. int. %): 160 (M^+)

3,4-Dihydro-3-vinyl-1,2-dithiin-2-oxide (5)

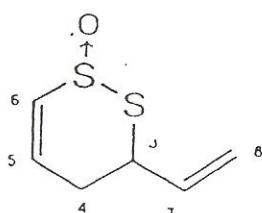
Tranparant needle crystal. sulfurous odor

IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 1630 (C=C), 975 and 920 (vinyl double bond).
1040 (sulfoxide) 1H -NMR (270 MHz) δ TMS ($CDCl_3$) ppm :

- 1) 2.70-2.81 (m. 2H. allylic methylene)
- 2) 4.14-4.23 (m. 1H, methine proton)
- 3) 3.35 and 5.42 (two d. 2H, J = (and 17 Hz. $CH_2=C-$)
- 4) 5.93 (m, 1H, exo-olefinic $=CH-$)
- 5) 6.56 (m 1 H. endo-olefinic $-S-CH=CH-$)
- 6) 6.95 (m 1 H, endo-olefinic $-S-CH=CH-$)

 ^{13}C NMR (67.5 MHz) δ TMS ($CDCl_3$) ppm :

- 1) 31.2 (C_4)



- 2) 34.8 (C_3)

- 3) 120.1 (C_8)

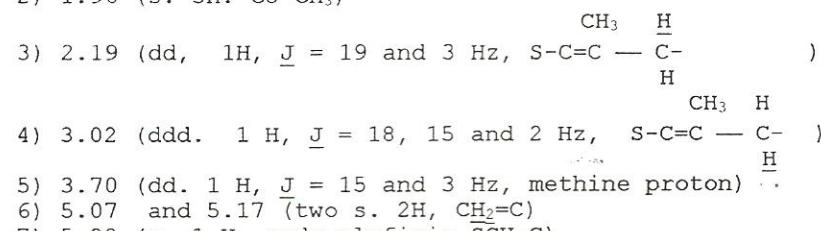
- 4) 130.8 (C_6)

- 5) 135.0 (C_7)

- 6) 136.1 (C_5)

FI-MS m/z (rel.int.%): 160 (M^+)53-4-Dihydro-3-isopropenyl-5-methyl-4H-1,2-dithiin-2-oxide (cis) (6)
Yellowish oil, weak sulfurous odorIR ν_{max} (neat) cm^{-1} : 1730 (C=C), 895 and (exo-methylene), 1070 (sulfoxide) 1H -NMR (270 MHz) δ TMS ($CDCl_3$) ppm :

- 1) 1.91 (s. 3 H. isopropyl CH_3)
- 2) 1.96 (s. 3H. C_5-CH_3)

 ^{13}C -NMR (67.5 MHz) δ TMS ($CDCl_3$) ppm :

- 1) 21.8 (C_{10})

- 2) 24.5 (C_4)

- 3) 26.0 (C_9)

- 4) 65.0 (C_3)

- 5) 104.9 (C_6)

- 6) 116.8 (C_8)

- 7) 132.7 (C_5)

- 8) 141.1 (C_7)

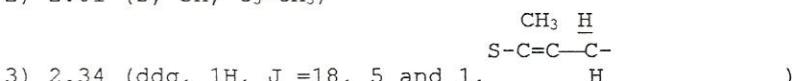
FI-MS m/z (rel. int. %) : 188 (M^+)6

3,4-Dihydro-3-isopropenyl-5-methyl-4H-1,2-dithiin-2-oxide (trans) (7)
Yellowish ol, sulfurous odor

IR ν_{max} (neat) cm^{-1} : 1635 (C=C), 890 (exo-methylene). 1070 (sulfoxide)

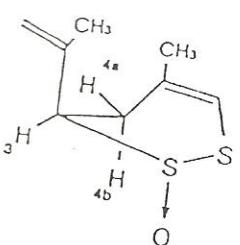
$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz) δ_{TMS} (CDCl_3) ppm :

- 1) 1.86 (s, 3H, isopropenyl CH_3)
- 2) 2.01 (s, 3H, $\text{C}_5\text{-CH}_3$)



- 4) 2.91 (ddt, 1H, $J = 18, 7$ and 2 Hz)
- 5) 3.81 (t, 1H, $J = 5$ Hz, methine proton)
- 6) 5.00 and 5.07 (two s, 2H, $\text{CH}_2=\text{C}$)
- 7) 5.86 (s, 1H, endo-olefinic $\text{SCH}=\text{C}$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (67.5 MHz) δ_{TMS} (CDCl_3) ppm :



- 1) 21.4 (C_{10})
- 2) 25.6 (C_4)
- 3) 26.0 (C_9)
- 4) 67.2 (C_3)
- 5) 106.0 (C_6)
- 6) 115.5 (C_8)
- 7) 134.1 (C_5)
- 8) 138.5 (C_7)

7

F I-MS (m/z (rel. int. %) : 188 (M^+)

HR-MS : 188.0321 ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{OS}_2$)

3,4-Dihydro-3-isopropenyl-5-methyl-4H-1,2-dithiin-1-oxide (8)
Transparant cube crystal, almost no odor

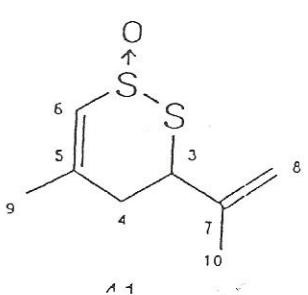
IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 1620 (C=C), 899 (exo-methylene). 1050 (sulfoxide)

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz) δ_{TMS} (CDCl_3) ppm :

- 1) 1.90 (s, 3H, isopropenyl CH_3)
- 2) 2.01 (s, 3H, $\text{C}_5\text{-CH}_3$)
- 3) 2.49 and 2.53 (two s, 2H, allylic methylene)
- 4) 4.10 (t, 1H, $J = 7$ Hz, methine proton)
- 5) 5.10 (s, 2H, $\text{CH}_2=\text{C}$)
- 6) 6.73 (s, 1H, endo-olefinic $\text{SCH}=\text{C}$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (67.5 MHz) δ_{TMS} (CDCl_3) ppm :

- 1) 21.2 (C_9)
- 2) 26.1 (C_{10})
- 3) 35.8 (C_4)
- 4) 39.6 (C_3)
- 5) 115.1 (C_8)
- 6) 124.6 (C_6)
- 7) 142.3 (C_7)
- 8) 146.8 (C_5)



F1-MS m/z (rel.int. %) : 188 (M^+)

HR-MS : 188.0361 ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{OS}_2$)

2-Vinyl-4H-1,3-dithiin-3-oxide (isomer 1) (9)

Transparant oil, needle crystal in refrigerator, weak sulfurous odor

IR ν_{max} (Film) cm^{-1} : 1630 (C=C), 990 and 930 (vinyl double bond).

1050 (sulfoxide)

$^1\text{H-NMR}$ (270 Mhz) δ TMS (CDCl_3) ppm :

- 1) 3.43 and 3.44 (two d, $J = 4$, 3 and 1 Hz, allylic methylene)
- 2) 4.59 (d. 1 H, $J = 5$ Hz, methine proton)
- 3) 5.52 and 5.59 (two d, 2H, $J = 10$ and 17 Hz. $\text{CH}_2=\text{C}$)
- 4) 5.75-5.88 (m 2H, exo olefinic = CH and endo olefinic $\text{SC}=\text{CH}$)
- 5) 6.30 (d. 1H, $J = 7$ Hz, $\text{SCH}=\text{C}$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (67.5 Mhz) δ TMS (CDCl_3) ppm :

1) 43.2 (C_4)

2) 60.5 (C_2)

3) 113.2 (C_5)

4) 120.6 (C_6)

5) 123.1 (C_8)

6) 128.6 (C_7)

F1-MS m/z (rel. int. %) : 160 (M^+)

HR-MS : 159.9979 ($\text{C}_6\text{H}_2\text{OS}_2$)

2-Vinyl-4H-1,3-dithiin-3-oxide (isomer 2) (10)

Yellowish oil, strong sulfurous odor

IR ν_{max} (neat) cm^{-1} : 1620 (C=C), 990 and 940 (vinyl double bond).

1050 (sulfoxide)

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz) δ TMS (CDCl_3) ppm :

- 1) 3.36 (ddd. 1H, $J = 18$, 5 and 2 Hz, allylic methylene)
- 2) 3.43 (ddd. 1H, $J = 18$, 5 and — 1 Hz, allylic methylene)
- 3). 4.52 (d. 1H, $J = 7$ Hz, methine proton)
- 4) 5.59 and 5.64 (two d, 2H, $J = 17$ and 11 Hz, $\text{CH}_2=\text{C}$)
- 5) 5.74 (ddd. 1 H, $J = 10$, 5 and 5 Hz, endo-olefinic $\text{SC}=\text{CH}$)
- 6) 6.05 (ddd, 1 H, $J = 17$, 11 and 7 Hz, exo-olefinic $=\text{CH}$)
- 7) 6.20 (ddd. 1 H, $J = 10$, — 1 and — 1Hz, $\text{SCH}=\text{C}$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (67.5 MHz) δ TMS (CDCl_3) ppm :

1) 45.7 (C_4)

2) 57.9 (C_2)

3) 114.6 (C_5)

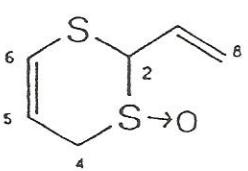
4). 121.2 (C_6)

5) 123. 6 (C_8)

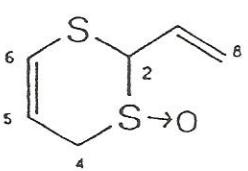
6) 126.6 (C_7)

I-MS m/z (rel. int. %) : 160 (M^+)

HR-MS : 160.0011 ($\text{C}_6\text{H}_2\text{OS}_2$)



9



10

Pada oksidasi komponen ditiin baik pada vinil maupun isokrotol diperoleh isomer yang berbentuk padat dengan bau khas sulfur yang lebih "mild". Hasil pengamatan dengan H1-NMR 2 secara F1-MS berkala terhadap komponen selama penyimpanan sebagai larutan dalam suhu kamar diketahui bahwa komponen-komponen hasil oksidasi yang berbentuk kristal ini bersifat lebih stabil.

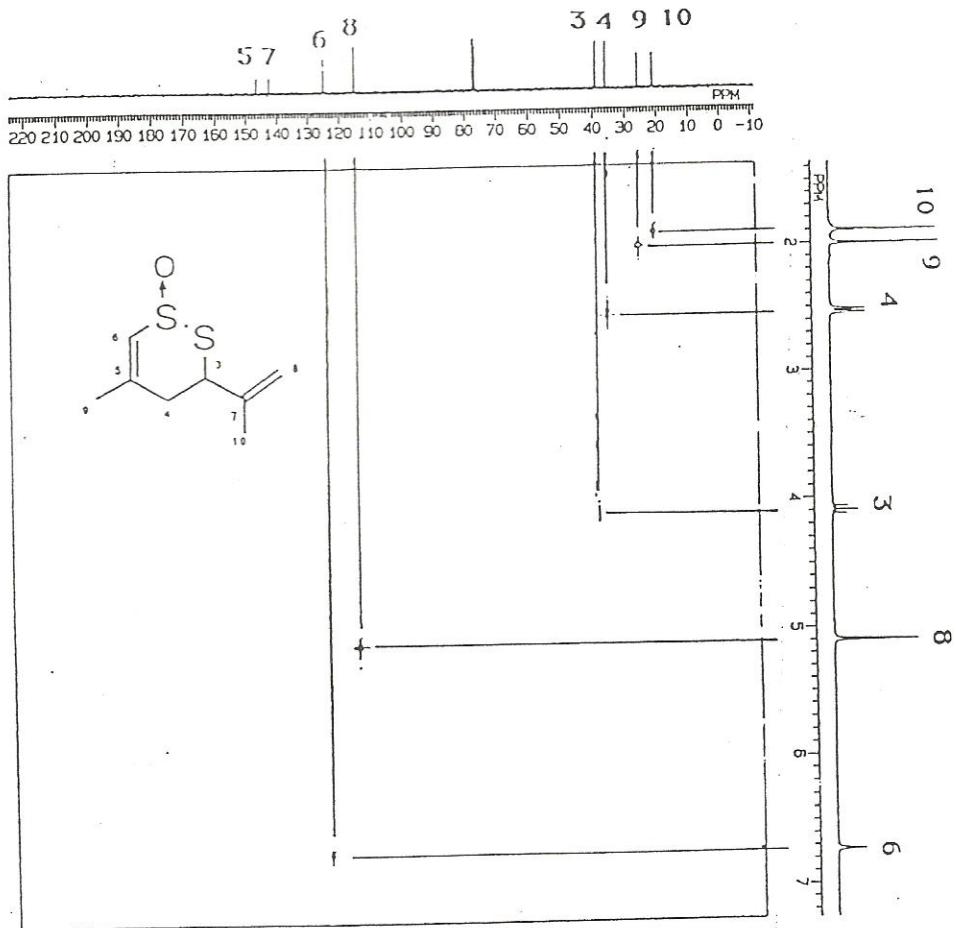
Di antara komponen hasil sintesis yang dihasilkan Isomer 3,4-dihidro-3-isopropenil-5-metil-4H-1,2-ditiin-1-oksida (stereoisomer isokrotol ditiin 1,2-oksida, 8) merupakan komponen yang menarik. Selain merupakan komponen yang terbentuk dalam proporsi terbesar, juga mempunyai kelebihan sifat fisik seperti mudah terkristalkan, stabil dan tidak berbau tajam. Spektrum HMQC dari komponen ini dapat dilihat pada Gambar 2.

Aktivitas anti-kapang

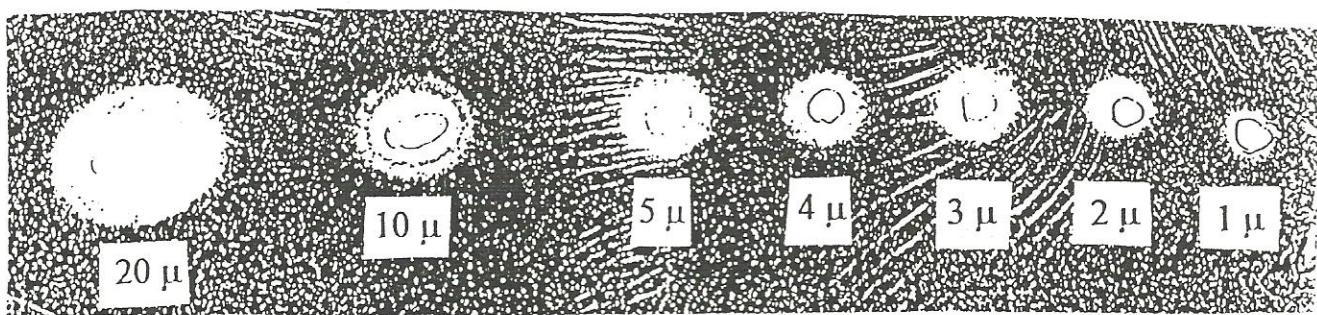
Metode biautografi merupakan metode perpaduan yang menggabungkan antara analisis kimia dan mikrobiologis sekaligus.

Pada uji ekstrak kasar, sampel yang dispotkan pada KTL dapat lebih dahulu dielusi dengan pelarut yang cocok. Spot hasil elusi tidak perlu diwarnai tetapi cukup dideteksi di bawah sinar ultra lembayung (UV) dan ditandai dengan pensil dan dilanjutkan dengan pemberian inokulum.

Untuk komponen murni, sampel yang diuji dapat dispotkan pada volume tetap akan tetapi konsentrasi sampel diencerkan secara bertahap atau sampel dengan konsentrasi yang sama dispotkan pada volume yang bervariasi secara gradien (Gambar 3). Dengan spot sampel yang bergradien dalam jumlah dapat diperoleh gambaran tentang sejauh mana aktivitas suatu sampel. Sedangkan dengan menspotkan beberapa sampel sekaligus secara berseri akan dapat diperoleh informasi tentang kekuatan relatif dari masing-masing sampel.



Gambar 2. Spektrum HMQC 3,4-dihidro-3-isopropenil-5-metil-4H-1,2-ditiin-1-oksida (8)



Gambar 3. Kromatogram lapis tipis hasil bioutografi dengan *Cladosporium cucumerinum* terhadap 3,4-dihidro-3-isopropenil-5-meti-4H-1,2-ditiin1-oksida

Pengujian Menggunakan autobiografi hanya dilakukan bagi isomer utama. Aktivitas dari beberapa komponen hasil sintesis dapat dilihat pada Gambar 4 dengan spot awal sejumlah 100 μ g dan diencerkan seratus persen setiap spot berikutnya pada setiap komponen yang sama. Sesuai dengan postulat Tahara et al. (1977) hasil autobiografi menunjukkan bahwa keberadaan -S-S-O diperlukan untuk mendapatkan aktivitas anti-kapang. Tanpa adanya gugus oksida, aktivitas anti-kapang yang dimiliki sangat lemah, hal ini tunjukkan oleh hampir tidak nyatanya luasan hambatan pada spot sampel-sampel termaksud seperti halnya dialil disulfida dan vinil ditiin (Gambar 4).

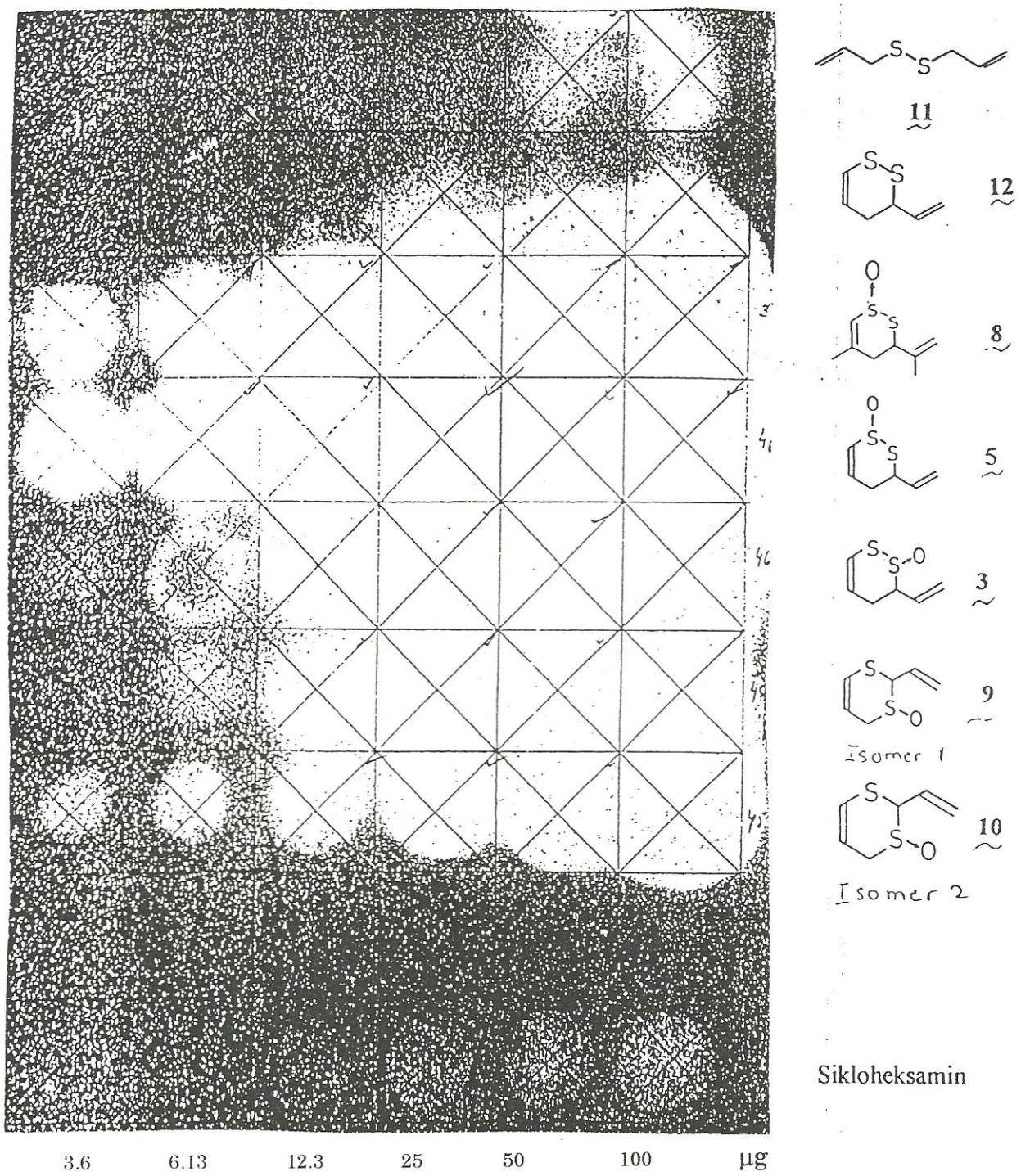
Dari hasil pengamatan hasil bioautografi, nampak adanya korelasi nyata antara struktur komponen dengan aktivitas anti-kapang. Luasan komponen hambatan terkuat terlihat pada komponen 3,4-dihidro-3-vinil-1,2-ditiin-1-oksida(8). Memperkaya hasil pengamatan terdahulu (Small et al., 1947; Tahara et al., 1977), sifat anti-kapang yang cukup kuat ternyata dapat diperoleh hanya dengan keberadaan gugus sulfoksida (S-O) saja, tidak harus S-S-O. Hal ini ditunjukkan dengan tetap kuatnya aktivitas komponen 1,3 ditiin oksida, walau tak sekuat komponen dengan 1,2 ditiin.

Bentuk stereoisomer dan letak sulfur yang teroksidasi juga berpengaruh pada kekuatan aktivitas, walau tak berbeda nyata seperti antara 3,4-dihidro-3-vinil-1,2-ditiin-1-oksida (5) dengan 3,4-dihidro-3-vinil-1,2-ditiin-2-oksida (3) Perbedaan alkil cabang pun mempengaruhi aktivitas anti-kapang, dimana kelompok isokrotol mempunyai aktivitas yang lebih lemah dibanding kelompok vinil, walau tetap saja tidak terlalu nyata.

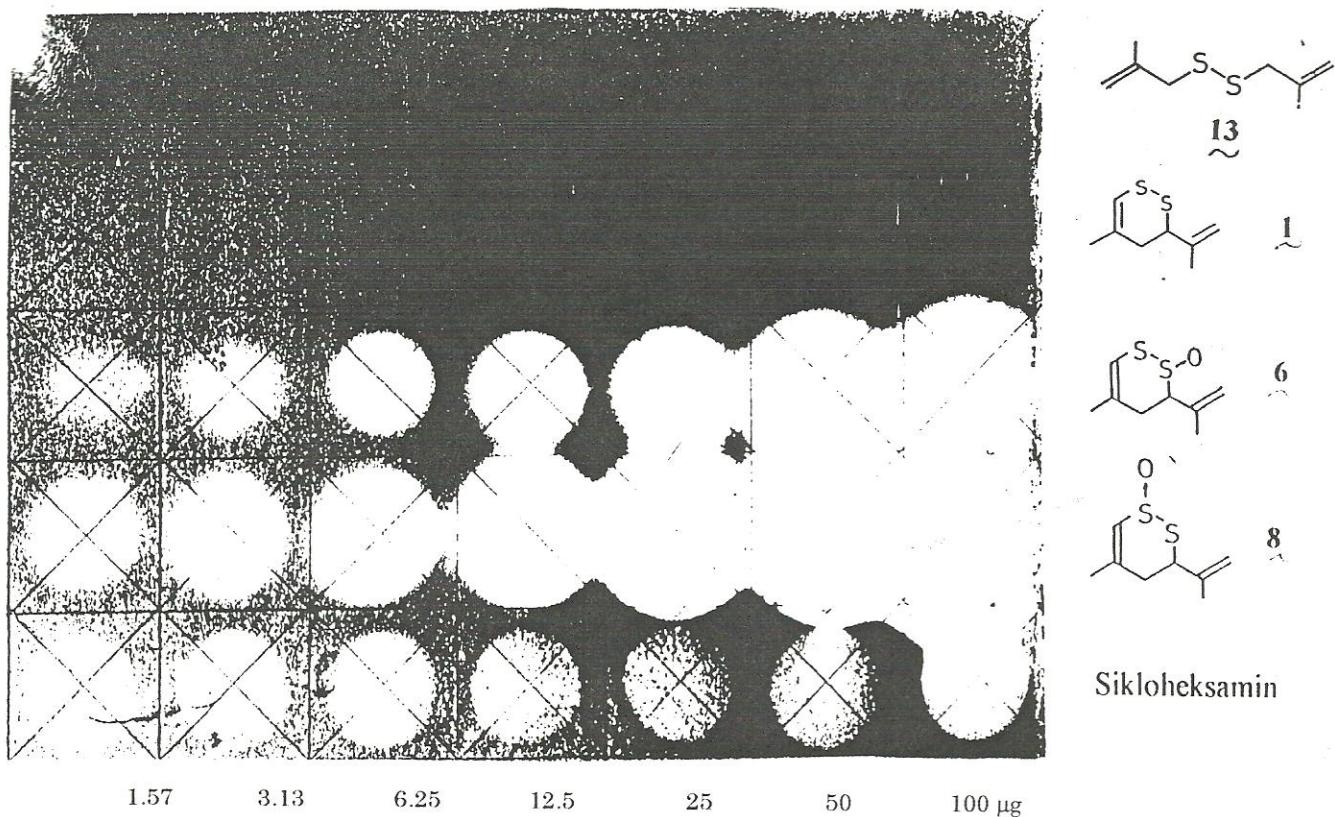
Seperti halnya pada dialil disulfida, hasil uji satu seri kelompok metallil (Gambar 5) menunjukkan bahwa tidak ada aktivitas anti kapang yang nyata pada metallil disulfida maupun isokrotol-ditiin.

Aktivitas anti kapang terlihat jelas pada komponen hasil oksidasi baik 1,3-ditiin maupun 1,2-ditiin. Hasil uji ini sekali lagi menunjukkan bahwa gugus sulfoksida menunjukkan peranan yang penting dalam kemampuan komponen memberi aktivitas anti-kapang. Small et al. (1947) menyatakan bahwa -S-S- merupakan kunci reaktivitas yang dimiliki oleh grup-grup sulfhidril yang memegang peranan penting secara biologis. Namun, terlihat disini bahwa SO lebih menentukan aktivitas, walaupun -S-S-O akan lebih memperkuat aktivitas anti-kapang. Hasil serupa diperlihatkan oleh kemampuan komponen-komponen oksida ini dalam menghambat bakteri atau mikroba pembusuk dan patogen (Indriani, 1999). Fenomena korelasi antara struktur dan aktivitas yang serupa diperlihatkan pada hasil bioautobiografi satu seri kelompok komponen isokrotol ditiin ini. Penelusuran hubungan antar struktur dan aktivitas ini sangat menarik untuk dipelajari lebih lanjut.

Aktivitas komponen-komponen oksida sangat baik, bahkan jauh lebih kuat dari komponen pembanding, dalam hal ini sikloheksamin. Komponen 3,4-dihidro-3-vinil-1,2-ditiin-1-oksida (5) masih mempunyai aktivitas yang kuat hingga pada pengenceran 3.6 μ g/spot.



Gambar 4. Kromatogram lapis tipis hasil biautografi dengan *Cladosporium Cucumerium* terhadap komponen seri ditiin



Gambar 5. Kromatogram tipis hasil bioautografi dengan *Cladosporium Cucumerinum* terhadap komponen seri metallil

KESIMPULAN DAN SARAN

Uji bioautografi dapat digunakan untuk pemantauan awal aktifitas anti-kapang suatu seri komponen dengan mudah. Semua komponen ditin oksida menunjukkan aktivitas anti-kapang yang kuat. Komponen 3,4-dihidro-3-vinil-1,2-ditiin-1-oksida dan 3,4-dihidro-3-isopropenil-5-metil-4H-1,2-ditiin-1-oksida masih mempunyai aktivitas pada pengenceran masing-masing hingga 3.6 µg/spot dan 1.6 µg/spot. Aktivitas anti kapang komponen vinil-ditiin dan turunnannya ditentukan dengan keberadaan gugus sulfokсида. Terdapat korelasi antara aktivitas dengan struktur kimia komponen.

Sintesis metallil disulfida akan lebih mudah dengan cara mereaksikan metallil khlorida dengan thiourea via pembentukan garam intermediat.

Aktivitas antimikroba komponen 3,4-dihidro-3-isopropenil-5-metil-4H-1,2-ditiin-1-oksida(8) nampaknya mempunyai potensi untuk dimanfaatkan lebih lanjut, mengingat selain lebih mudah dalam sintesis, mempunyai sifat fisiko-kimia yang lebih menguntungkan juga aktivitas anti-kapang yang

cukup kuat.

Sintesis metalliel disulfida akan lebih mudah dengan cara mereaksikan metallil khlorida dengan thioureavia pembentukan garam antermediat.

UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Dr. Y. Fukushi atas pengarahan teknik sintesis yang diberikan. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada Prof. Dr. S. Tahara dan Dr. Y. Hashidoko, Hokkaido University, atas penyediaan kesempatan dan fasilitas penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Adetumbi, M.A. and B.H.S. Lau, 1983.** *Allium sativum* (garlic)-anatural antibiotic. Med.Hypoth. 12:227-237
- Block, E. 1992.** The organosulfur chemistry of the genus *Allium* -Implications for the organic chemistry of sulfur. Angew. Chem. Int. Ed.Eng., 31-1135

- Cavallito , C.J., J.S. Buck and C.M. Suter, 1944,** Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. *J.Am.Chem.Soc.* 66:1950-1951
- Delaha, E.C and V.F. Garagusi, 1985,** Inhibition of mycobacteria by garlic extract (*Allium sativum*). *Antimicro Agents Chemother.* 27:485-486
- Dekhuijzen, H.M. 1961.** Mededel. Landbouwhogeschool Opzoekingsstat. Staat Gent, 26, 1542
- Indriani, S. 1999.** Aktivitas Antimikroba Senyawa Turunan Vinil-ditiin terhadap Beberapa Bakteri Patogen dan Pembusuk Makanan. Skripsi , Fateta-IPB
- Homans, A.L. and A. Fuchs. 1970.** Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic subsatances. *J. Chromatog.* 51, 327
- Kirner, R.W. and H.G. Richter, 1929,** λ - Furfuryl chloride and its derivatives. *2 J.Am. Chem. Soc.* 51, 3131
- Muller, B. 1991.** Standardisation of garlic preparations. Cardioly in practise supplement June, 4
- Sugiarto, E., S. Fardiaz dan R. Dewanti, 1986,** Rempah-rempah dan pengaruhnya terhadap pertumbuhan mikroba. *Media Teknol. Pangan* 2(4):29-35
- Stoll, A. and E. Seebeck, 1951.** Chemical investigations on allium the specific principle of garlic *Adr. Enzym* 377-400 *Helv.Chim. Acta* 32, 197
- Small , L.V.D, J.H. Bailey and C.J. Cavallito. 1947.** Alkyl thiosulfinate. *J. Am. Chem. Soc.*, 69, 1710
- Tahara, S. Y. Miura and J. Mizutani, 1977.** Alkyl thiosulfinates: antimicrobial principles of 5-alkylthiomethylhydantoin-S-oxides. *Agric. Biol. Chem.*, 41(1), 221
- Wijaya, C.H. 1990.** Bio-organic Chemical Studies on Flavor of Caucas (*allium victorialis L.*). Doctor desertation. Hokkaido University. Japan.
- Wijaya, C.H. , H. Nishimura, T. Tanaka and J. Mizutani. 1991.** Influence of drying methods on volatile sulfur constituents of Caucas. *J. Food Science* (1): 72