KARAKTERISTIK SPEKTROSKOPI ISOLAT KOMPONEN ANTIBAKTERI BIJI ATUNG (*Parinarium glaberrimum* Hassk)

[Spectroscopic Characteristics of Antibacterial Components of "Atung" (*Parinarium glaberrimum* Hassk) Seeds]

Murhadi [1], Soewarno T.S.[2], Betty S.L. Jennie [2], Anton Apriyantono [2], dan Sedarnawati Yasni [2]

[1] Staf Pengajar Jurusan Teknologi Hasil Pertanian (THP), Fakultas Pertanian, Universitas Lampung (Unila)
[2] Staf Pengajar Departemen Teknologi Pangan dan Gizi, FATETA-IPB, Kampus IPB Darmaga Bogor 16002

Diterima 28 April 2003 / Disetujui 17 Maret 2004

ABSTRACT

Relative purity assay on antibacterial components (isolates) of "atung" seeds using HPLC system (linier gradient of water-methanol, detection on UV at 280/254 nm) showed that the isolate-9 had the highest purity (94%), followed by isolate-6 (69%), isolate-7 (66%), and isolate-12 (66%) respectively; while the other isolates only had 50% of purity. The UV-Visible spectrophotometer analysis on the isolat-9, showed that the λ_{max} (in methanol) were at 213 and 269 nm. From IR spectrum of the isolate, no more information can be obtained except the presence of C-H stretching. Furthermore, the MS spectrum showed that the fragment ion series of 44 (100%), 57, 69, 83, 97, 115, maybe predicted as aliphatic amine compounds.

Key words : *Relative purity, methanol, C-H stretching, fragment ion series, aliphatic amine compounds*

PENDAHULUAN

Penggunaan beberapa bahan pengawet kimia sintetik masih dalam kontroversi, baik dalam jenis maupun dosis yang digunakan, terutama oleh pelaku-pelaku industri rumah tangga dan industri pangan menengah. Diduga beberapa bahan pengawet kimia sintetik, dapat berpotensi meracuni tubuh secara akumulatif jika penggunaannya terus menerus dalam waktu lama. Atas pertimbangan tersebut banyak tekanan terhadap perusahaan pengolahan pangan untuk tidak menggunakan bahan pengawet kimia sintetik tertentu, dan menggantikannya dengan bahan yang lebih alami untuk tujuan pengawetan. Kondisi ini telah memberi peluang baru untuk mencari alternatif bahan-bahan pengawet alami bagi produk pangan dan/atau produk-produk yang sesuai.

Sampai saat ini para ahli mikrobiologi pangan telah banyak meneliti dan menemukan aktivitas antimikroba terutama antibakteri pada beberapa jenis tanaman, terutama pada: rempah-rempah, tanaman obat, tanaman untuk jamu dan tanaman pangan. Ditinjau dari keuntungan farmakologis, banyak peneliti mikrobiologi pangan masih mengabaikan jenis-jenis tanaman hutan, yang diduga juga sangat berpotensi sebagai sumber bahan-bahan antimikroba khususnya yang bersifat antibakteri. Salah satu tanaman hutan tropis yang berpotensi sebagai sumber bahan-bahan antimikroba, adalah tanaman atung (*Parinarium glaberrimum* Hassk) yang banyak tumbuh di Kawasan Timur Indonesia terutama di Daerah Maluku. Atung adalah tanaman yang termasuk ke dalam genus *Parinarium* yang diperkirakan memiliki 50 spesies, sebagian besar termasuk tanaman tropis, tumbuh di daerah tropis dari daerah dataran rendah sampai ketinggian 300 m di atas permukaan laut (Heyne, 1926).

Bagian tanaman atung yang mempunyai aktivitas antimikroba, adalah pada buah atung terutama bagian biji buah. Hasil penelitian terhadap daya antibakteri biji atung, menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat dari biji atung tua segar ataupun yang telah disimpan 3 bulan pada suhu ruang (28±2°C) memiliki aktivitas antibakteri yang relatif sama tinggi, terutama jika diekstraksi menggunakan metode refluks pada suhu relatif tinggi 60-70°C (Moniharapon, 1998; Adawiyah, 1998). Daya antibakteri ekstrak etil asetat biji atung umumnya memiliki spektrum yang luas dan kuat terutama terhadap tujuh jenis bakteri, yaitu: *Staphylococcus aureus, Salmonella enteritidis, Escherichia coli, Bacillus subtilis, Enterococcus faecalis, Micrococcus luteus* dan *Pseudomonas aeruginosa* (Moniharapon, 1998). Dari ketujuh bakteri tersebut, *S. aureus* merupakan bakteri yang relatif paling sensitif terhadap senyawa-senyawa antibakteri di dalam biji atung.

Peneliti-peneliti terdahulu khususnya yang melakukan kajian terhadap aktivitas antimikroba dan antioksidan dari ekstrak biji atung (*Parinarium glaberrimum* Hassk), diantaranya adalah: Moniharapon (1998), Adawiyah (1998), Syamsir (2001), dan Sarastani et al., (2002), belum melakukan karakterisasi spektroskopi terhadap isolat komponen antibakteri utama dari biji atung. Karakterisasi spektroskopi isolat-isolat komponen antibakteri biji atung dilakukan dengan menganalisis pola dan karakteristik spektra-spektra yang dihasilkan oleh spektrofotometer UV-Vis, spektrofotometer infra merah dan spektrometer massa dalam bentuk alat DI-MS, setelah dilakukan uji kemurnian relatif komponen utama dalam masing-masing isolat komponen antibakteri menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) sistem gradien.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik spektroskopi beberapa isolat komponen antibakteri dari fraksi ekstrak antibakteri teraktif biji atung yang selanjutnya dapat digunakan untuk dapat mengetahui golongan dan gugus fungsional komponen antibakteri biji atung serta dapat memprediksi jenis komponen antibakteri utama dalam biji atung.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan utama adalah 9 jenis isolat komponen antibakteri dari fraksi ekstrak antibakteri biji atung. Bahan kimia, terdiri dari: dietil eter, metanol, kloroform, diklorometana, aseton dan Na_2SO_4 anhidrat (semua p.a. dari E. Merck), sel KBr siap pakai (*Shimadzu*), gas helium, gas nitrogen, etanol 95% dan air bebas ion. Alat-alat terdiri dari: kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT; terdiri dari: *Shimadzu SCL-6A system controller, Shimadzu SIL-6A autoinjector, Rheodyne loop injector, Shimadzu SPD-6AV UV-Vis spectrophotometric detector, Shimadzu LC-6A liquid chromatograph* dan *Shimadzu C-R3A chromatopac*), kolom *LiChrosorb RP 18* (ukuran partikel 5 µm, 200 mm x 4.6 mm; *Hewlett Packard*), kolom *Zorbax Sil* (46 mm x 25 cm, *DuPont Chromatography*), spektrofotometer UV-Vis (*Shimadzu-UV-160*, Jepang), spektrofotometer infra merah (IR; *Shimadzu IR-470*, kisaran frekuensi 400-4000 cm^{-1}, Jepang), spektrometer massa dalam bentuk alat DI-MS (*Direct Insertion Mass Spectrometer; Shimadzu QP 5000*, Jepang), lampu UV (λ pendek/panjang), alat vorteks, injektor, tabung-tabung vial, dan alat-alat gelas.

Metode penelitian

Uji kemurnian relatif isolat komponen antibakteri biji atung

Pengujian kemurnian relatif isolat-isolat komponen antibakteri biji atung, menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan fase bergerak (eluen) air-metanol, sistem gradien. Spesifikasi alat, kolom, kondisi dan program gradien pada alat KCKT, disajikan pada Tabel 1.

Mula-mula alat KCKT dihidupkan dan setelah 5-10 menit dilakukan pencucian sistem pompa (2 pompa) dengan aseton atau metanol dengan cara membuka kedua keran pompa dan menjalankannya pada tekanan total 6 mL/menit (masing-masing pompa 3 mL/menit) selama 15 menit, lalu menutup kedua keran pompa.

Tabel 1. Kondisi dan program gradien linier pada alat KCKT untuk uji kemurnian relatif isolat komponen antibakteri biji atung

Kondisi Alat dan Program	***Spesifikasi dan Pengaturan***
Jenis HPLC	*Shimadzu-6A*, terdiri dari: *Shimadzu SCL-6A system controller, Shi-madzu SIL-6A auto injector, Shimadzu C-R3A chromatopac, Shi-madzu SPD-6AV spectrophotometric detector*, *Rheodyne loop injector*
	LiChrosorb RP 18, serial 79915OD-574 hp
	Hewlett Packard (5 µm, 200 mm x 4.6 mm)
Kolom	280 nm dan/atau 254 nm
Panjang gelombang	1 mL/menit
Total laju aliran eluen	gradien air - metanol
Fase bergerak (eluen)	menit ke 0-10 : air 100% (tetap)
Program gradien	menit ke 10-40 : air 100% ke metanol 100% (gradien linier)
	menit ke 40-50 : metanol 100% (tetap)
	menit ke 50-80 : metanol 100% ke air 100% (gradien linier)
	menit ke 80-110: air 100% (tetap)
Volume sampel	20 µL
Tekanan maks. & min.	250 kgf/cm^2 & 0
Waktu elusi	110 menit

Pengkondisian sistem KCKT dengan eluen metanol (laju alir 1.5 mL/menit) dilakukan selama 30 menit atau sampai diperoleh *base line* kromatogram yang lurus, lalu dilanjutkan dengan pengkondisian air bebas ion (laju alir 1.0 mL/menit) sampai diperoleh *base line* kromatogram yang lurus dengan pengamatan detektor UV pada panjang gelombang (λ) = 280 dan/atau 254 nm. Selanjutnya alat KCKT siap digunakan untuk menyuntik (20 μL) pengencer (kontrol) atau sampel yang akan diuji kemurniannya, lalu dijalankan selama 110 menit sesuai program gradien linier yang ditetapkan.

Kemurnian relatif isolat komponen antibakteri dinyatakan sebagai nilai persentase (%) relatif salah satu puncak tunggal utama diantara beberapa puncak (minor) yang muncul dalam kromatogram KCKT dengan pengamatan detektor UV pada panjang gelombang (λ) = 280 atau 254 nm.

Karakterisasi spektra isolat komponen antibakteri biji atung

Spektrofotometer UV-Vis

Tahap pertama pengkondisian alat dilanjutkan dengan analisa spektra serapan sampel dan pelarut pada rentang panjang gelombang (λ) = 200-800 nm, untuk menentukan panjang gelombang maksimum dan pola spektra sampel dan pelarut. Selanjutnya kurang lebih 2.5 mL isolat komponen dilarutkan di dalam metanol p.a. dengan konsentrasi 0.2-0.8 mg/5 mL (sesuai sampel yang tersedia), ditempatkan di dalam kuvet silika 1 cm, lalu dicatat λ_{maks} dan pola spektra serapannya pada kisaran λ = 200-400 nm.

Secara umum data dari alat spektrofotometer UV-Vis ditampilkan sebagai nilai A (absorbansi) atau ε (absorptifitas molar, $L.cm^{-1}.mol^{-1}$) pada sumbu ordinat (Y) dan nilai λ (panjang gelombang, nm) pada sumbu absis (X). Selanjutnya kedua nilai parameter tersebut (ε dan λ) dijadikan dasar karakterisasi komponen untuk menentukan jenis transisi elektronik yang mungkin terjadi, sehingga dapat diprediksi jenis gugus fungsional dan sifat struktur senyawa berupa struktur alipatik atau aromatik (Sorell, 1988; Williams dan Fleming, 1995).

Spektrofotometer infra merah

Operasi alat spektrofotometer infra merah IR-470 dilakukan selama 10 menit pada frekuensi 4000-400 cm^{-1}, waktu tunggu 5 menit, ordinat %T (100-0) dan absorbansi 2.00-0.00. Sampel berupa cairan (*oily*) isolat antibakteri biji atung ditempatkan secara merata sebagai suatu lapisan tipis di permukaan sel KBr, dikeringkan dengan pengering udara panas, diulang berkali-kali sampai keberadaan sampel pada permukaan sel KBr cukup untuk dianalisa. Selanjutnya sel KBr tersebut diletakkan di tempat sampel pada alat spektrofotometer infra merah, kemudian alat dijalankan sampai diperoleh cetakan spektra transmisi infra merah dari frekuensi 4000-400 cm^{-1} pada ordinat 100-0 %T. Analisa juga dilakukan terhadap sel KBr tanpa sampel sebagai kontrol.

Spektrum infra merah secara normal berkisar antara panjang gelombang 2.5-20 μm yang diekspresikan sebagai mikron (μ). Dalam interpretasi praktis, satuan spektrum infra merah dinyatakan dalam besaran frekuensi atau jumlah gelombang (wave number, cm^{-1}) yang berkisar antara 4000-500 cm^{-1} (Sorrell, 1988). Identifikasi gugus-gugus fungsional suatu komponen alami dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa skema, tabel, atau gambar diagram alir untuk interpretasi spektrum infra merah sesuai kelompok senyawa (Silverstein et al., 1991; Brown et al., 1988; Sorrell, 1988; Williams dan Fleming, 1995).

Spektrometer massa (DI-MS)

Alat DI-MS (*Shimadzu QP-5000*, Jepang) dikondisikan selama kurang lebih satu jam sesuai parameter yang ditetapkan, seperti disajikan pada Tabel 2. Tahap pertama adalah pembersihan *probe* (tempat sampel) dengan cara memasukkan *probe* kosong (tanpa sampel) ke dalam alat DI-MS dan dijalankan pada suhu tinggi (350^oC) selama 20 menit, lalu dianalisa spektrum massanya hingga diperoleh *base line* spektrum yang lurus. Tahap kedua adalah analisa spektra massa pengencer metanol p.a. sebagai kontrol. Tahap ketiga adalah analisa spektra massa isolat komponen antibakteri biji atung, dengan cara menempatkan 1 μL isolat ke dalam *probe* khusus pada alat DI menggunakan mikro-injektor yang sudah bersih (dibilas berulang-uang dengan dietil eter). Selanjutnya alat DI-MS dijalankan sesuai parameter yang ditetapkan.

Tabel 2. Parameter dan pengaturan alat DI-MS untuk identifikasi komponen

Parameter	Pengaturan
DI	
Program suhu:	
- Laju kenaikan suhu	80^{0}C per menit
- Suhu akhir	350^{0}C, ditahan selama 20 menit
Solvent out time	0.3 menit
MS	
Energi detektor	1.2 kv
Kisaran massa	40-700
Kisaran waktu	interval 0.5 detik, 0.3-20 menit

Karakterisasi spektra-spektra isolat komponen antibakteri biji atung, dilakukan dengan cara menganalisa pola-pola spektra secara keseluruhan sesuai dengan teori dan prosedur analisis sprktra komponen dengan sistem spektrometri (Markham, 1988; Sorrell, 1988; Brown et al., 1988; Criddle dan Elis, 1990; Silverstein et al., 1991 Mc.Lafferty dan Turecek, 1993; Williams dan Fleming, 1995; Stuart, 1996), lalu membandingkan pola spektra yang dihasilkan sampel dengan pola spektra dari pustaka yang otentik (jika ada), selanjutnya dikonfirmasi dengan hasil dari beberapa metode spektroskopi lain.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kemurnian relatif isolat komponen antibakteri biji atung

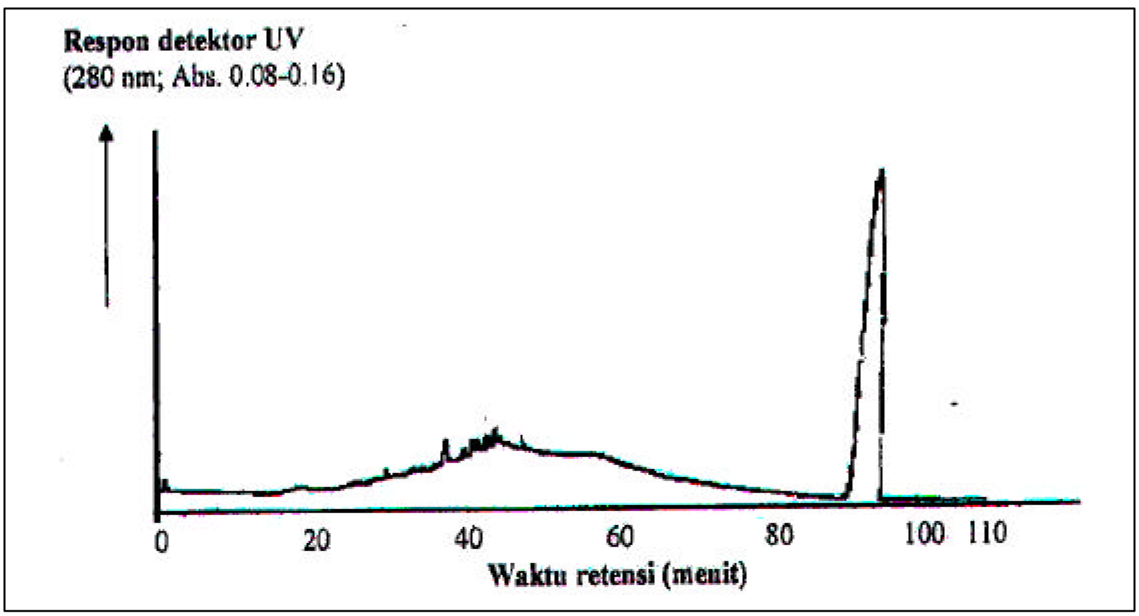
Persentase kemurnian relatif (%) dan waktu retensi (t_R) masing-masing puncak utama dari isolat-isolat komponen antibakteri biji atung menggunakan alat KCKT, disajikan pada Tabel 3. Persentase kemurnian relatif tertinggi (94%; λ = 280 nm) adalah pada komponen utama isolat komponen 9, dengan waktu retensi (t_R) 89.9 menit dalam bentuk puncak (*peak*) tunggal dan beberapa puncak kecil (minor) yang sebagian besar muncul pada t_R antara 30 sampai 50 menit dengan total persentase puncak minor hanya sekitar 6%, seperti disajikan pada Gambar 1.

Puncak-puncak minor tersebut diduga sebagian besar berasal dari kontaminasi pengencer/pelarut metanol p.a., seperti diperlihatkan kromatogram pengencer metanol p.a. (kontrol) pada Gambar 2.

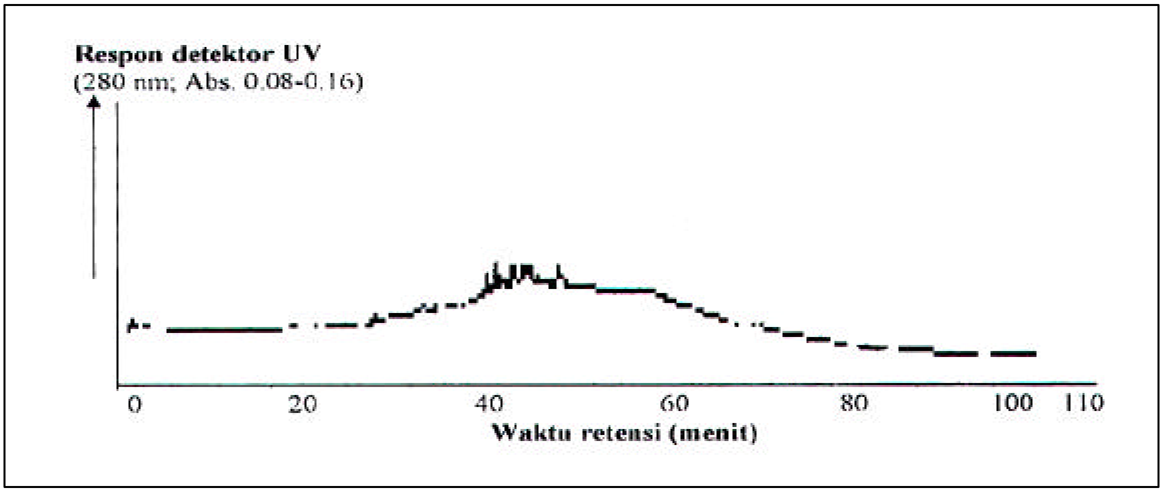
Tabel 3. Persentase kemurnian relatif dan waktu retensi komponen utama dari isolat-isolat komponen antibakteri biji atung menggunakan KCKT (gradien air-metanol, detektor UV pada λ 280 atau 254 nm)

Isolat komponen	Persentase kemurnian relatif dan (Waktu retensi,(t_R, menit))			Keterangan
	λ = 280 nm		λ = 254 nm	
	Puncak 1*	Puncak 2		
1	-	-	42% (55.3)	Sukar larut dalam air, tetapi sangat larut dalam metanol
4	11% (42.7)	9% (43.9)	31% (56.5)	Idem
5	36% (85.8)	10% (82.9)	-	Larut dalam eluen air-metanol
6	69% (87.0)	16% (83.6)	-	Idem
7	66% (92.0)	26% (91.4)	-	Idem
8	48% (85.4)	22% (91.3)	-	Idem
9	94% (89.9)	-	52% (43.3)	Idem
11	55% (91.9)	30% (90.8)	-	Idem
12	66% (43.3)	26% (38.9)	-	Sangat larut dalam metanol

*puncak utama



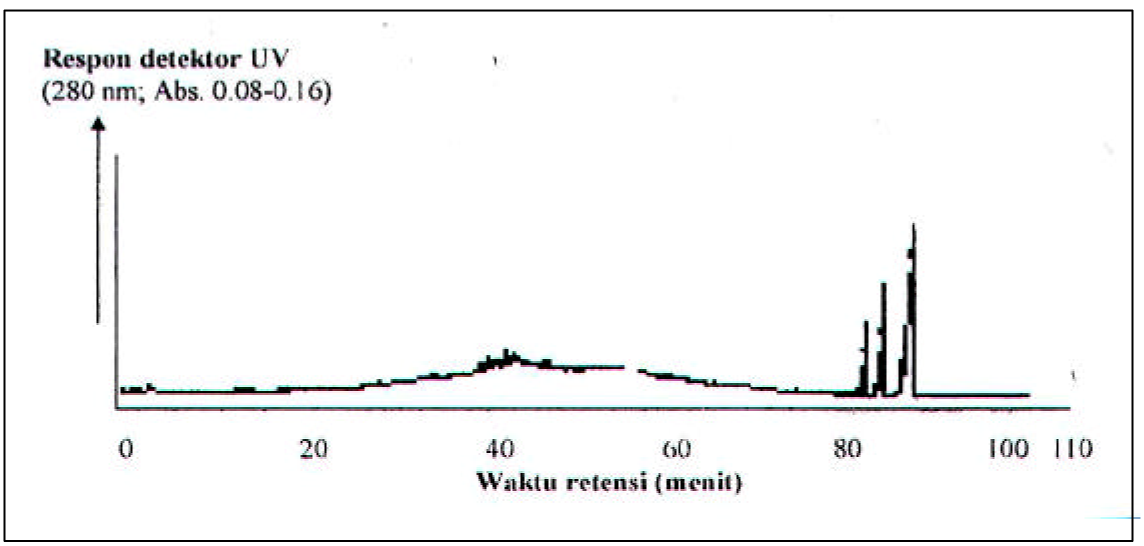
Gambar 1. Pola kromatogram isolat komponen 9 hasil analisis dengan KCKT sistem gradien air-metanol



Gambar 2. Pola kromatogram pengencer/pelarut metanol (kontrol) hasil analisis dengan KCKT sistem gradien air-metanol

Puncak tunggal komponen utama isolat 9 yang keluar pada waktu retensi 89.9 menit (λ = 280 nm), mengindikasikan komponen tersebut tertahan pada kolom nonpolar C18, sehingga diprediksi komponen tersebut bersifat relatif nonpolar. Hasil pengujian pendahuluan menggunakan kolom polar silika (*Zorbax Sil* 4.6 mm x 25 cm, *DuPont Chromatography*) dengan eluen diklorometana:dietil eter (1:1, v/v) pada alat KCKT yang sama, terhadap isolat komponen 9, 8 dan 7, masing-masing menghasilkan puncak utama yang keluar di awal kromatogram yaitu pada waktu retensi antara 2 sampai 4 menit (detektor UV, λ = 268 nm). Hal ini mengindikasikan bahwa komponen-komponen tersebut bersifat relatif nonpolar, karena terbukti tidak dapat ditahan oleh kolom polar silika.

Isolat-isolat komponen lain yang menghasilkan puncak utama mendekati waktu retensi puncak utama dari isolat komponen 9, adalah isolat komponen 6 (87.0 menit, kemurnian relatif 69%), isolat 7 (92.0 menit, kemurnian relatif 66%) dan isolat 11 (91.9 menit, kemurnian relatif 55%). Oleh karena itu diprediksi komponen-komponen utama yang terdapat di dalam isolat komponen 6, 7 dan 11 bersifat relatif nonpolar. Kromatogram isolat komponen 6 disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Pola kromatogram isolat komponen 6 hasil analisis dengan KCKT sistem gradien air-metanol

Kemurnian relatif puncak utama dari isolat komponen 6 hanya mencapai 69% (λ = 280 nm) pada waktu retensi (t_R) = 87.0 menit, di dampingi dua puncak sedang pada t_R = 83.6 menit (16%) dan 81.7 menit (6%) serta beberapa puncak kecil (minor) pada t_R sekitar 30 sampai 50 menit (total sekitar 8%). Hal ini mengindikasikan adanya tiga komponen utama di dalam isolat komponen 6, dan ketiganya bersifat relatif nonpolar. Sementara pada isolat komponen 7, muncul dua puncak utama komponen yang saling berimpitan (*broad*) pada waktu retensi 92.0 menit (66%) dan 91.4 menit (26%) serta diikuti tiga puncak kecil masing-masing pada t_R = 80.9, 83.0 dan 85.7 menit (*sharp*) dengan total persentase sekitar 7%.

Pada isolat komponen 12 yang diketahui bersifat relatif polar (Rf_{100} = 0-1 pada KLT silika gel) tidak tampak puncak/komponen di sekitar waktu retensi antara 50 sampai 110 menit dengan pendeteksian menggunakan detektor UV pada 280 nm. Puncak utama isolat komponen 12 justru muncul pada waktu retensi 43.3 menit (66%) dan pada 38.9 menit (26%) serta beberapa komponen minor (total sekitar 3%) di awal kromatogram (t_R = 0-10 menit) dan sisanya pada t_R antara 30 sampai 50 menit (sekitar 5%). Hal ini membuktikan bahwa komponen-komponen yang ada di dalam isolat komponen 12, sebagian besar bersifat relatif polar yang sangat larut di dalam metanol (t_R = 40-50 menit) dan sebagian kecil sangat larut di dalam air (t_R = 0-10 menit).

Karakteristik spektroskopi isolat komponen antibakteri biji atung

Pengukuran spektrum serapan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, dilakukan terhadap masing-masing dari seluruh (12) isolat-isolat komponen antibakteri biji atung yang berhasil diisolasi. Secara umum, berdasarkan hasil pengamatan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}, nm) isolat-isolat komponen (0-12) di dalam pelarut metanol p.a., mendapatkan bahwa isolat komponen 3, 4, 5, 6, 7, 8 dan 9, rata-rata memiliki daerah serapan (puncak) maksimum pada panjang gelombang 214 nm (212-217 nm) dan 269 nm (268-272 nm) serta puncak lemah pada daerah sekitar 310-312 nm. Prediksi nilai absorptifitas molar (ε, dalam satuan $L.cm^{-1}.mol^{-1}$) masing-masing isolat komponen tersebut, dengan perkiraan berat molekul (BM) masing-masing komponen antara 100-500, menghasilkan nilai ε rata-rata antara 564-2820 $L.cm^{-1}.mol^{-1}$ (untuk puncak 1, λ = 214 nm) dan antara 317-1587 $L.cm^{-1}.mol^{-1}$ (untuk puncak 2, λ = 269 nm). Sementara isolat komponen 0, 1 dan 2 memiliki puncak utama dengan λ_{maks} pada 209 nm, serta isolat komponen 11 dan 12 pada 213 dan 212 nm. Karakteristik spektrum serapan isolat-isolat komponen antibakteri biji atung hasil analisis dengan spektrofotometer UV-Vis, selengkapnya disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Karakteristik spektrum serapan 12 isolat komponen antibakteri biji atung di dalam metanol hasil analisis dengan spektrofotometer UV-Vis (λ = 200-400 nm dan A = 0.00-1.00)

Isolat Komponen (Rf_{100})	Konsentrasi (mg/5 mL) dan Nilai A	*Nilai absorptifitas pada* puncak 1		Panjang gelombang (λ) maksimum	
		a [1] ($L.cm^{-1}.g^{-1}$)	ε [2] ($L.cm^{-1}.mol^{-1}$)	Puncak 1 (nm)	Puncak 2 (nm)
0 (92.5)	0.2 (0.723)	18.08	1808 – 9040	209	-
1 (91.5)	0.2 (0.749)	18.73	1873 – 9365	209	225
2 (89)	0.2 (0.490)	12.25	1225 – 6125	209	-
3 (87)	0.3 (0.406)	6.77	677 – 3385	217	272
4 (85)	0.7 (0.794)	5.67	567 – 2835	215	269
5 (82)	0.6 (0.818)	6.82	682 – 3410	215	268
6 (78)	0.8 (0.817)	5.11	511 – 2555	214	268
7 (70)	0.8 (0.586)	3.66	366 – 1830	212	268
8 (68)	0.8 (0.918)	5.74	574 – 2870	215	271
9 (64)	0.8 (0.914)	5.71	571 – 2855	213	269
11 (33)	0.8 (0.878)	5.49	549 – 2745	213	-
12 (0 –1)	0.9 (0.802)	4.46	446 – 2230	212	-
Ekstrak MT [3]				219	268
Ekstrak EA [3]				271	223 318 [4]

[1] a = A/b.c_1, dimana; A = absorbansi hasil pengukuran, b = tebal kuvet (1 cm) dan c_1 = konsentrasi sampel dalam gram per liter (g/L).
[2] ε = A/b.c_2, dimana; A = absorbansi hasil pengukuran, b = tebal kuvet (1 cm) dan c_2 = konsentrasi sampel dalam mol per liter (mol/L). Karena berat molekul (BM) masing-masing isolat komponen belum dike tahui, maka prediksi nilai ε menggunakan nilai BM dari skala 100-500, sehingga nilai ε (puncak 1, λ_{maks} = 214 nm) = nilai a x BM (prediksi).
[3] dalam etanol 95%; [4] puncak 3.

Isolat komponen 3, 4, 5, 6, 7, 8 dan 9, memiliki pola spektrum serapan relatif sama dengan pola spektrum serapan bahan asal (ekstrak MT), tetapi berbeda dengan pola spektrum serapan ekstrak EA dari ekstrak etil asetat biji atung. Perbedaan tersebut kemungkinan besar akibat adanya perbedaan jenis dan/atau proporsi komponen-komponen utama yang terkandung di dalam ekstrak MT dan ekstrak EA, seperti yang telah dibuktikan pada analisis karakteristik nilai Rf_{100} masing-masing fraksi yang terpisah dari kedua ekstrak tersebut pada KLT.

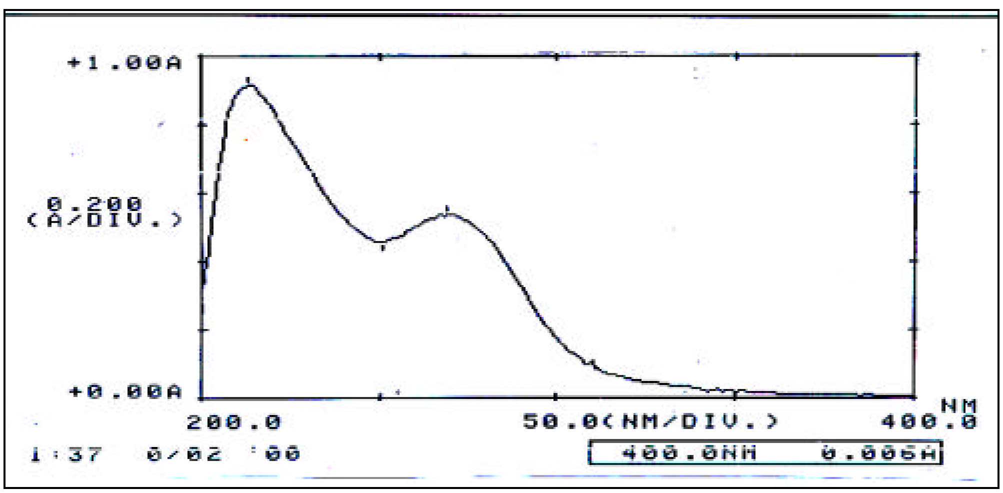
Analisis spektrum menggunakan spektrofotometer infra merah dan alat DI-MS, masing-masing hanya dilakukan terhadap beberapa isolat komponen antibakteri utama yang memiliki persentase kemurnian relatif tinggi, yaitu isolat komponen 9 (94%), 6 (69%), 7 (66%) dan 12 (66%). Namun, interpretasi spektrum dari spektra-spektra yang dihasilkan oleh spektrofotometer UV-Vis, infra merah dan spektrometer massa dalam rangka identifikasi komponen, hanya dilakukan terhadap isolat komponen 9 saja didukung dari data kromatogram hasil analisis dengan alat KCKT, nilai Rf_{100} dan sifat fluoresensi isolat dari alat KLT.

Dari pola spektrum serapan isolat komponen 9 yang dihasilkan oleh alat spektro-fotometer UV-Vis, diketahui panjang gelombang maksimumnya ($\lambda_{maks.}$, metanol p.a.) berada pada 213 nm (ε = 571-2855 $L.cm^{-1}.mol^{-1}$ pada puncak 1) dan 269 nm (ε = 297-1485 pada puncak 2) serta puncak lemah pada sekitar 310-312 nm, seperti disajikan pada Gambar 4.

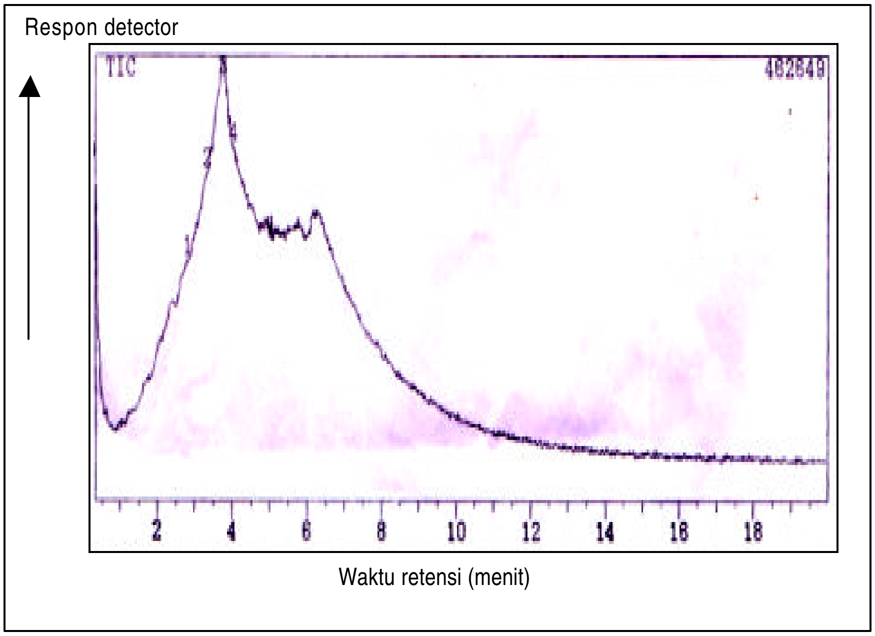
Pola spektrum serapan dan nilai absorptifitas molar tersebut, mengindikasikan adanya transisi elektronik $\pi \rightarrow \pi^*$ pada kisaran λ = 200-700 nm dengan nilai ε antara 1000-10000 $L.cm^{-1}.mol^{-1}$. Transisi elektronik $\pi \rightarrow \pi^*$ dengan $\lambda_{maks.}$ puncak utama sekitar 217 nm, lebih condong ke pola *conjugated band* (*K-band*) yang merupakan konjugasi *diene* atau *polyene system* dengan 2 atau lebih ikatan rangkap terkonjugasi dan umumnya bersifat relatif nonpolar (Silverstein et al., 1991). Sifat relatif nonpolar isolat komponen 9 telah dibuktikan dengan waktu retensi (t_R) yang tinggi (89.9 menit), mendekati akhir (110 menit) proses pemisahan komponen dengan alat KCKT sistem gradien air-metanol menggunakan kolom nonpolar C18.

Dari spektrum infra merah isolat komponen 9, tidak banyak informasi penting yang dapat diperoleh, karena rendahnya intensitas puncak-puncak penting di sekitar frekuensi 1500-1800 cm^{-1}. Hal ini diduga akibat rendahnya konsentrasi sampel isolat komponen 9 yang dianalisa dan/atau akibat resolusi alat spektrofotometer IR yang digunakan relatif rendah (bukan FTIR). Frekuensi penting yang dapat dicatat hanya pada 2910-2850 cm^{-1} (C-H *stretch*), sedangkan pada 3410 cm^{-1} dengan intensitas kuat (sedikit *broad*) kemungkinan mengindikasikan adanya gugus OH dari R-OH (alkohol; Sorrell, 1988; Williams dan Fleming, 1995).

Kromatogram isolat komponen 9 hasil analisis menggunakan alat DI-MS, disajikan pada Gambar 5. Puncak 3 (t_R = 3.750 menit) pada Gambar 5, diyakini berasal dari komponen utama dalam isolat 9 dengan kemurnian relatif 94% (hasil analiis dengan KCKT). Pola seri ion fragmen komponen utama dari isolat komponen 9 adalah (m/z): 44 (100%), 57, 69, 83, 97, 115. Diketahui bahwa pola seri ion fragmen (m/z): 55, 69, 83, 97, 111, 125, 139, mengindikasikan adanya suatu senyawa rantai hidrokarbon alifatik dengan jumlah karbon besar, sebagai senyawa alifatik dengan formula $C_nH_{2n-1}^+$ yang mengandung beberapa ikatan rangkap (Johnstone dan Rose, 1996).

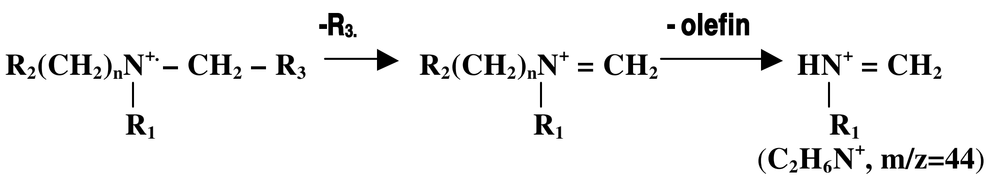


Gambar 4. Spektrum serapan isolat komponen 9 dalam metanol p.a. (spektrofotometer UV-Vis: λ = 200-400 nm, A = 0.00-1.00)

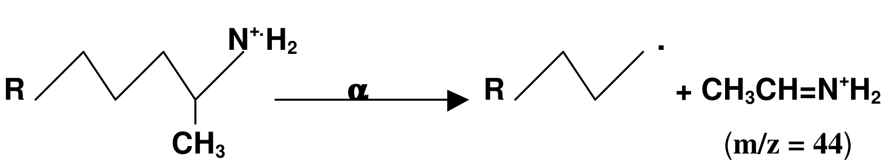


Gambar 5. Kromatogram isolat komponen 9 hasil analisis menggunakan alat DI-MS

Ion fragmen dengan massa terendah dan genap, m/z = 44 (intens, 100%), merupakan ciri khas ion $C_2H_6N^+$ ($CH_3CH=N^+H_2$) dengan jumlah N ganjil dari senyawa-senyawa amina alifatik (Williams dan Fleming, 1995), dengan pola fragmentasi umum seperti disajikan pada Gambar 6. Umumnya fragmentasi senyawa-senyawa amina alifatik melalui pemecahan alfa (*α-cleavage*) yang menghasilkan *base peak* (intensitas relatif 100%) pada n-alkilamina dan α-amina primer tersubstitusi dengan kehilangan grup alkil yang lebih besar. Khusus untuk n-alkilamina primer dengan rantai yang lebih panjang, umumnya menghasilkan *base peak* pada m/z = 44 ($CH_3CH=N^+H_2$) melalui pemecahan *pseudo-α-cleavage*, seperti disajikan pada Gambar 7.



Gambar 6. Pola umum fragmentasi komponen dari senyawa-senyawa alifatik yang mengandung N (Williams dan Fleming, 1995)



Gambar 7. Fragmentasi komponen amina alifatik dengan gugus R panjang melalui *pseudo-α-cleavage* (McLafferty dan Turecek, 1993)

Sifat alifatik komponen utama isolat 9, dapat diprediksi dari ciri-ciri yang ditunjukkan oleh intensitas rata-rata spektra massanya yang lemah dengan teknik EI (*electron impact*) pada alat DI-MS yang digunakan, dan intensitas massa Ion fragmen terbesar (m/z =115) juga sangat lemah atau tidak terlihat (tidak intens); sehingga senyawa yang paling mungkin adalah dari kelompok senyawa alifatik. Diketahui bahwa senyawa amina primer alifatik, intensitas ion molekulnya pada spektra massa sangat lemah atau tidak terlihat (Lee, 1998).

Dengan massa Ion fragmen terbesar, yaitu m/z =115 (ganjil) dan massa ion fragmen terendah adalah 44 (genap), belum dapat diprediksi bahwa ion fragmen dengan massa terbesar tersebut sebagai ion melekul ($M^{+\cdot}$). Kepastian keberadaan ion molekul isolat komponen 9, masih harus dikonfirmasi dengan menggunakan alat spektrometer massa dengan jenis ionisasi *soft ionization,* seperti teknik CI (*chemical ionization*) atau FAB (*fast atom bombardment*). Selanjutnya sifat alifatik komponen utama isolat 9, dapat diprediksi dari ciri-ciri intensitas rata-rata spektra massanya yang lemah dengan teknik EI (*electron impact*) pada alat DI-MS, dan intensitas massa Ion fragmen terbesar (m/z =115) juga sangat lemah (tidak intens); sehingga senyawa yang paling mungkin adalah dari kelompok senyawa alifatik. Namun, dari ion fragmen dengan m/z = 44, maka formula yang lebih mungkin adalah R-amina, dimana gugus amina dapat berbentuk amina primer (NH_2) atau sekunder (NH).

Secara umum senyawa amina alifatik diketahui bersifat polar dan sangat larut di dalam air, karena adanya total resultan momen dipol (μ) dari ikatan C-N dan N-H relatif tinggi (Wade, 1991). Namun demikian, kelarutan senyawa amina di dalam air sangat tergantung pada struktur R-nya. Senyawa amina primer (NH_2) alifatik dengan gugus rantai C yang besar pada nitrogennya, cenderung bersifat tidak larut dalam air; kecuali substituennya kecil (< C_6) seperti metilamina (CH_3NH_2) yang diketahui sangat larut dalam air (Wilbraham dan Matta, 1992). Demikian juga senyawa-senyawa amina sekunder (NH) alifatik seperti: di-n-propilamina (C_6), siisopropilamina (C_6) dan di-n-butilamina (C_8), masing-masing diketahui sukar larur di dalam air (Wade, 1991). Hal ini diduga akibat pengaruh sifat nonpolar dari gugus R alifatik (rantai C besar) lebih tinggi dibandingkan sifat polar gugus aminanya.

Secara keseluruhan, karakteristik isolat komponen 9 adalah sebagai berikut: (1) memiliki tingkat kemurnian relatif komponen antibakteri mencapai 94%; (2) memiliki absorbsi serapan maksimum pada λ_{maks} = 213 dan 269 nm dengan prediksi nilai ε = 571-2855 $L.cm^{-1}.mol^{-1}$ (dalam metanol p.a.) yang mengindikasikan adanya transisi elektronik $\pi \rightarrow \pi^*$ yang lebih condong ke pola *conjugated band* (*K-band*, pada λ_{maks} = 217 nm) yang merupakan konjugasi *diene* atau *triene system* dengan 2 atau 3 ikatan rangkap terkonjugasi dan umumnya bersifat relatif nonpolar (Silverstein et al., 1991); (3) spektrum infra merah pada frekuensi 2910-2850 cm^{-1} (C-H *stretch*) dan 3410 cm^{-1} (O-H, sedikit *broad*); dan (4) spektrum massa dengan pola seri ion fragmen (m/z): 44 (100%), 57, 69, 83, 97, 115, yang mengindikasikan adanya senyawa amina alifatik.

Berdasarkan beberapa karakteristik khas yang dimiliki oleh isolat komponen antibakteri No. 9 dari biji atung yang memperlihatkan adanya beberapa ikatan rangkap terkonjugasi ($\pi \rightarrow \pi^*$) dilihat pada pola spektrum serapan spektrofotometer UV, gugus OH pada frekuensi 3410 cm^{-1} pada spektrum infra merah, dan adanya N yang diindikasikan dengan ion fragmen m/z = 44 (100%, *base peak*) pada spektrum massa serta tidak tampaknya ion molekul ($M^{+\cdot}$) pada spektrum massa, maka kemungkinan besar komponen utama di dalam isolat komponen 9 merupakan senyawa amina alifatik (R-amina) dengan gugus amina berupa amina primer (NH_2) dan struktur R-nya merupakan rantai karbon alifatik dengan jumlah C yang besar, mengandung OH dan beberapa ikatan rangkap, serta bersifat sukar larut di dalam air atau bersifat relatif nonpolar.

KESIMPULAN DAN SARAN

Isolat komponen antibakteri biji atung yaitu isolat komponen 9 memiliki karakteristik spektroskopi, diantaranya: serapan maksimum pada $\lambda_{maks.}$ = 213 dan 269 nm dengan prediksi nilai ε = 571-2855 $L.cm^{-1}.mol^{-1}$ (dalam metanol p.a.), spektrum infra merah pada frekuensi 2910-2850 cm^{-1} (C-H *stretch*) dan 3410 cm^{-1} (O-H), serta spektrum massa dengan pola seri ion fragmen (m/z): 44 (100%), 57, 69, 83, 97, 115 yang mengindikasikan adanya senyawa amina alifatik (R-amina) dengan gugus amina diduga berupa amina primer (NH_2) dan struktur R-nya diduga merupakan rantai karbon alifatik panjang yang mengandung OH dan beberapa ikatan rangkap terkonjugasi serta sukar larut di dalam air dan menunjukkan ciri-ciri sifat relatif nonpolar.

Berdasarkan hasil penelitian ini, untuk memperoleh informasi konfigurasi struktur lengkap komponen antibakteri utama biji atung, disarankan melakukan analisis menggunakan spektrometer massa resolusi tinggi *soft ionization* dengan teknik CI (*chemical ionization*), FAB (*fast atom bombardment*) atau ESI (*electrospray ionization*) untuk menetapkan keberadaan ion molekul ($M^{+\cdot}$) dan formula struktur komponen, dilanjutkan dengan analisis kerangka struktur lengkap dari komponen menggunakan spektrometer resonansi magnet inti (NMR-^{13}C dan NMR–^{1}H).

DAFTAR PUSTAKA

Adawiyah, D.R. 1998. Kajian Pengembangan Metode Ekstraksi Komponen Anti-mikroba Biji Buah Atung (*Parinarium glaberrimum* Hassk). Tesis S2. PPs IPB. Bogor.

Anonim. 1994. Gas Chromatograph/Mass Spectrometer QP-5000 [Class-5000 Ver.1.1] Quick Guide. Shimadzu Corporation. Kyoto-Japan.

Brown, D.W., Floyds, A.J. and Sainsbury, M. 1988. Organic Spectroscopy. John Wiley & Sons. Chichester.

Criddle, W.J. and Ellis, G.P. 1990. Spectral and Chemical Characterization of Organic Compounds. A laboratory Hand Book. John Wiley & Sons. Chichester.

Heyne, K. 1926. *De Nuttige Planten Van Nederlandesch Indie 1926.* Jilid I (II) Departemen Van Landboun, Nyverheiden Handel in Nederlandsch Indie.

Johnstone, R.A.W. and Rose, M.E. 1996. Mass Spectrometery for Chemists and Biochemists (2nd Ed.) Cmabridge University Press.

Lee, T.A. 1998. A Beginner's Guide to Mass Spectral Interpretation. John Wiley & Sons. Chichester.

Markham, K.R. 1988. Cara Mengidentifikasi Flavonoid (Penerjemah: K. Padma-winata). Penerbit ITB. Bandung.

Mc.Lafferty, F.W. and Turecek, F. 1993. Interpretation of Mass Spectra (4th Ed.). USB. Mill Valey.

Moniharapon, T., Soekarto, S. T., Putro, S. dan Nitibaskara, R.R. 1993. Biji buah atung (*Parinarium glaberrimum* Hassk) sebagai pengawet udang windu segar. J. Ilmu Pertanian Indonesia. IPB. Bogor. 3(2).

Moniharapon, T. 1998. Kajian Fraksi Bioaktif dari Buah Atung (*Parinarium glaberrimum* Hassk) sebagai Bahan Pengawet Pangan. Disertasi S3. PPs IPB. Bogor.

Sarastani, D., Soekarto, S.T., Muchtadi, T.R. dan Fardiaz, D. 2002. Aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi ekstrak biji atung (*Parinarium glaberrimum* Hassk). J. Teknol. dan Industri Pangan, Vol. XIII No. 2:149-156.

Silverstein, R.M., Bassler, G.C. and Morrill, T.C. 1991. Spectrometric Identification of Organic Compounds (5th Ed.). John Wiley & Sons. New York.

Sorrell, T.N. 1988. Interpreting Spectra of Organic Molecules. University Science Books. California.

Stuart, B. 1996. Modern Infrared Spectroscopy (Ed.): Analytical chemistry by open learning. John Wiley & Sons. Chichester.

Syamsir, E. 2001. Mempelajari Stabilitas Aktivitas Antimikroba Ekstrak Biji Atung (*Parinarium glaberrimum* Hassk) Selama Penyimpanan terhadap *Staphylo-coccus aureus.* Tesis S2. PPs IPB. Bogor.

Wade, L.G. 1991. Organic Chemistry (2nd Ed.). Prentice Hall. Englewood cliffs. New Jersey.

Wilbraham, A.C. dan Matta, M.S. 1992. Pengantar Kimia Organik dan Hayati (Penerjemah: S. Achmadi). Penerbit ITB. Bandung.

Williams, D.H. and Fleming, I. 1995. Spectroscopic Methods in Organic Chemistry (4th Ed.). McGraw-Hill Book Co. London.