

Flavonoid dari *Myrmecodia pendans* dan aktivitas antibakteri terhadap *Enterococcus faecalis*

Eti Apriyanti, Dadan Sumiarsa Dikdik Kurnia, Hendra Dian Adhita Dharsono dan Mieke H. Satari

Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam, Departemen Kimia Fakultas matematika dan Ilmu Pengetahuan alam, Universitas Padjadjaran-Bandung, Indonesia.

Abstrak:

Dari dua per tiga kasus infeksi endodontik yang persisten pada gigi yang telah dilakukan perawatan saluran akar, ditemukan *Enterococcus faecalis*. Bakteri ini dikenal sebagai spesies yang paling resisten pada rongga mulut. Infeksi pada rongga mulut ini cukup berbahaya karena dapat mengakibatkan penyakit degeneratif. Oleh karena itu, diperlukan suatu senyawa bioaktif yang dapat menjadi agen antibakteri khususnya pada *E. faecalis*. Pencarian senyawa bioaktif dari bahan alam masih menjadi alternatif, salah satunya *Myrmecodia pendans* banyak digunakan oleh masyarakat di papua barat sebagai ramuan berkhasiat untuk terapi berbagai penyakit. Pada penelitian sebelumnya, diketahui bahwa ekstrak etilasetat *M. pendans* ini dapat menghambat pertumbuhan *Enterococcus faecalis*. Pada penelitian ini digunakan metode sokletasi dengan pelarut etil asetat untuk menarik komponen-komponen senyawa di dalamnya. Ekstrak dipisahkan menggunakan kombinasi teknik kromatografi kolom (fasa normal dan terbalik) sehingga mendapatkan senyawa **1**, **2** dan **3**. Ketiga senyawa ini diujikan terhadap bakteri *E. faecalis* menggunakan metode mikro dilusi sehingga mendapatkan nilai konsentrasi hambat minimum (KHM). Dalam studi ini, ditemukan dua flavonoid (3"-methoxy-epikatekin-3-*O*-epikatekin (**2**) dengan KHM 1,25 mg/mL dan butein (**1**) dengan KHM 0,62 mg/mL) dan asam dibenzo-p-dioxin-2,8-dikarbosilat dengan KHM 5 mg/mL terhadap *E. faecalis*.

Kata kunci: *Myrmecodia pendans*, *Enterococcus faecalis* dan flavonoid

1. Pendahuluan

Lebih dari dua dekade, *enterococci* telah dikenal sebagai bakteri patogen penyebab infeksi pada manusia. Resistensi antimikroba bakteri ini juga meningkat terhadap zat-zat antimikroba yang baru-baru ini diakui. [1]. *Enterococcus faecalis* mendominasi infeksi sekitar 80-90% yang disebabkan oleh enterococci [2,3,4]. *Enterococcus faecalis* dikenal sebagai spesies yang paling resisten pada rongga mulut dan paling sering ditemukan pada infeksi endodontik yang persisten pada gigi yang telah dilakukan perawatan saluran akar [2, 5]. Infeksi oral ini tidak bisa dianggap enteng, karena hal itu dapat menyebabkan penyakit sistemik seperti kanker, penyakit kardiovaskular dan lain-lain [6]. Pencarian antimikroba yang lebih efektif dan baru menjadi kebutuhan yang mendesak karena resistensi antibiotik yang semakin meningkat setiap tahunnya [7]. Bahan alam merupakan sumber agen antimikroba baru, namun belum banyak pengetahuan mengenai potensi metabolit sekunder terhadap patogen oral [8]. Tumbuhan sarang semut, *Myrmecodia pendans*, banyak digunakan oleh masyarakat di papua barat sebagai ramuan berkhasiat untuk terapi berbagai penyakit. Tanaman ini berpotensi untuk dikembangkan dalam obat-obatan herbal modern karena mereka bisa tumbuh dengan baik sebagai tanaman epifit. Oleh karena itu eksploitasi pada tumbuhan ini tidak akan membahayakan lingkungan [9]. Penelitian sebelumnya mengatakan bahwa ekstrak etilasetat *M. pendans* ini dapat menghambat pertumbuhan *E. faecalis*. Selain itu, dikatakan pula bahwa kandungan flavonoid tertinggi pada *M. pendans* terdapat pada ekstrak etil asetat, bukan ekstrak *n*-heksana ataupun ekstrak air. Flavonoid memiliki banyak aktivitas biologis seperti antikanker, antioksidan, antivirus, antimicrobial [10], anti

antihepatotoxic, antiosteoporosis, antialergi, dan antispasmodic, antiulcer [11]. Dengan demikian, penelitian ini difokuskan untuk mendapatkan flavonoid yang beraktivitas antibakteri terhadap *E. faecalis*.

2. Hasil dan Pembahasan

2.1 Isolasi dan Elusidasi Struktur

Umbi tumbuhan *M. pendans* dipotong kecil-kecil berukuran sekitar 0,5 cm untuk memaksimalkan jumlah komponen senyawa yang terambil oleh pelarut. Sampel ditempatkan pada alat sokletasi (kapasitas sampel 300 g) dan labu sokletasi (ukuran 5 L) diisi dengan 3 L EtOAc, kemudian proses sokletasi berlangsung pada suhu 40°C selama 8 jam (1 siklus pelarut mengekstraksi sampel adalah 1 jam). Ekstrak cair yang dihasilkan dari proses sokletasi kemudian dipekatkan menggunakan alat *rotatory evaporator* (suhu *water bath* 40°C) untuk menghilangkan EtOAc sebagai pelarut pengekstraksi. Penelitian sebelumnya mengatakan ekstrak EtOAc *M. pendans* kaya akan flavonoid. Oleh karena itu, untuk melihat pola noda pemisahan senyawa-senyawa flavonoid yang ada di dalamnya dilakukan analisis menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) fasa normal (menggunakan lempeng alumunium silika (Kiesel gel 60 F₂₅₄) dengan campuran eluen *n*-heksana-EtOAc (3:7, v/v). Identifikasi bercak noda flavonoid diamati di bawah sinar UV pada λ 254 dan 365 nm. Flavonoid memberikan pendaran berfluorensi kuning ketika dilihat di bawah kedua lampu UV tersebut [12]. Untuk lebih mempertegas identifikasi, lempeng KLT diberi larutan penampak noda AlCl₃ 10% dalam etanol dan dipanaskan di atas pemanas (*hot plate*). Noda berwarna kuning yang muncul setelah diberi larutan penampak noda menunjukkan bahwa noda tersebut adalah flavonoid [12]. Pemisahan ekstrak EtOAc menggunakan kombinasi kromatografi fasa normal (menggunakan fasa diam silika gel 60 F₂₅₄) dan fasa terbalik (menggunakan fasa diam ODS, okta desil silan) menghasilkan tiga senyawa murni. Untuk menentukan struktur kimia senyawa, ketiga senyawa tersebut dikarakterisasi menggunakan spektroskopi UV, FTIR, massa dan NMR.

Senyawa **1** berupa padatan kuning menghasilkan noda berwarna kuning ketika dianalisis KLT menggunakan larutan penampak noda 10% FeCl₃, menunjukkan bahwa senyawa ini termasuk golongan flavonoid [12]. Spektrum ultraviolet menunjukkan puncak pada panjang gelombang 257,2 dan 269,2 (pita I) serta 387 (pita II) nm. Puncak ini merupakan puncak khas flavonoid yang memiliki dua pita, khususnya golongan chalcone atau auron. Rentang serapan pita I (menunjukkan serapan benzoil) untuk chalcone dan auron adalah 230-270 nm, sedangkan pita II (menunjukkan serapan sinamoil) untuk chalcone adalah 340-390 nm dan untuk auron 380-430 nm [12]. Untuk mempertegas dugaan gugus fungsi yang dimiliki senyawa **1**, maka dilakukan analisis spektroskopi infra merah. Pada spektrum infra merah terdapat pita pada bilangan gelombang (ν_{\max}) 3437 cm⁻¹ menunjukkan regang OH. Selain itu ν_{\max} 1639 cm⁻¹ mengindikasikan adanya karbonil, ν_{\max} 1512 dan 1458 cm⁻¹ merupakan ciri khas benzena, sedangkan regang C-O diperlihatkan dengan pita pada ν_{\max} 1244. Spektrum ¹H-NMR menunjukkan delapan sinyal proton aromatik. Tiga sinyal proton pada 7,93 (*d*; *J* = 9,05 Hz, H-6'); 6,41 (*d*; *J* = 1,95 dan 8,4 Hz, H-5') dan 6,28 (*d*; *J* = 1,95 Hz, H-3') membentuk spin-system ABX yang diduga merupakan fragmen cincin B flavonoid yang tersubstitusi pada posisi 2',4'. Proton cincin A sama dengan proton cincin B memiliki spin-system ABX yang diduga merupakan fragmen cincin A pada flavonoid yang tersubstitusi pada posisi 3, dan 4. Sinyal proton pada cincin A adalah 7,18 (*d*; *J* = 1,9 Hz, H-2); 7,12 (*dd*; *J* = 1,9 dan 7,8 Hz, H-6), 6,81 (*d*; *J* = 8,4 Hz, H-5). Dua sinyal proton pada 7,70 (*d*; *J* = 15,5 Hz, H-), 7,52 (*d*; *J* = 15,5 Hz, H-), mengindikasikan pasangan proton etilenik yang berposisi *trans* [13]. Adanya H- dan H- , mengakibatkan dugaan senyawa **1** merupakan chalcone, bukan auron (auron tidak memiliki H- dan H-) [12]. Semua substituen adalah gugus hidroksil karena tidak ada sinyal proton teroksidasi pada spektrum ¹H-NMR. Data

$^1\text{H-NMR}$ dibandingkan dengan referensi menghasilkan dugaan bahwa senyawa **1** adalah butein [14-16]. MS menunjukkan puncak ion molekular yang terprotonasi pada m/z 271,0027 $[\text{M}-1]^+$, menghasilkan rumus molekul $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$ [17].

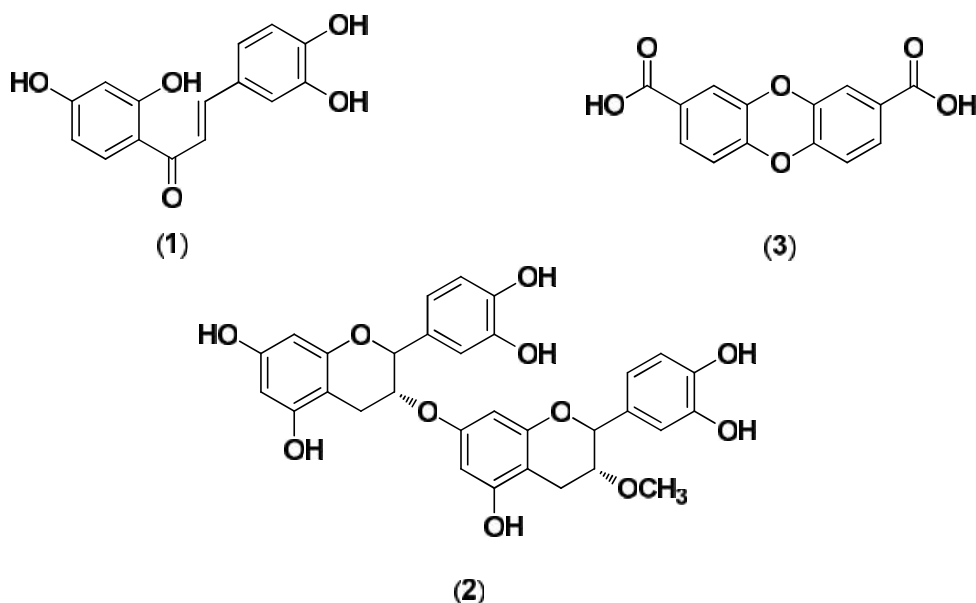
Senyawa **2** berbentuk padatan merah kecoklatan. Pada spektrum ultraviolet, senyawa **2** memiliki puncak dua puncak. Puncak pertama pada λ_{max} 208,4 (ϵ 3,31) yang berasal dari transisi elektronik $n \rightarrow \pi^*$ menunjukkan adanya gugus karbonil. Puncak kedua λ_{max} 279,4 (ϵ 1,26) yang berasal dari transisi elektronik $\pi \rightarrow \pi^*$ menunjukkan adanya gugus benzena. Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa **2** menunjukkan 19 sinyal pada rentang pergeseran kimia antara 158,1-29,4. Berdasarkan spektrum HMQC, setiap sinyal karbon pada rentang 146-29,4 kecuali sinyal pada 56,8 mengandung dua karbon. Sehingga senyawa **2** memiliki 31 karbon (24 karbon sp^2 dan 7 karbon sp^3) yang diduga terdiri dari dua kerangka flavonoid (kerangka flavonoid mengandung 15 karbon, $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$), bukan kerangka triterpenoid [18]. Karena sebagian besar karbon senyawa **2** merupakan karbons sp^2 yang lebih mirip dengan karbon flavonoid, bukan karbon triterpenoid yang didominasi oleh karbon sp^3 . Struktur kerangka flavonoid senyawa **2** termasuk jenis kerangka katekin karena senyawa **2** tidak memiliki karbonil [12].

Spektrum $^1\text{H-NMR}$ menunjukkan lima sinyal aromatik. Tiga sinyal pada 6,97 (d ; $J = 1,95$ Hz, H-2' & H-2'''); 6,80 (d ; $J = 1,95$ dan 8,45 Hz, H-6' & H-6'''), dan 6,74 (d , $J = 1,95$ Hz, H-5' & H-5''') membentuk sistem penjodohan ABD karena pergeseran kimia ketinganya berdekatan, diduga merupakan cincin A flavonoid yang tersubstitusi pada posisi 3' dan 4'. Proton cincin B muncul pada 5,94 (d ; $J = 1,9$ Hz, H-6 & H-6'') dan 5,91 (d ; $J=1,9$ Hz, H-8 & H-8'') menunjukkan nilai penjodohan yang sama, mengindikasikan keduanya berposisi *meta*. Satu sinyal proton pada 3,88 (s ; 3''- OCH_3), mengindikasikan gugus metoksi [13]. Data NMR senyawa **2** (Tabel 1) menunjukkan dua kerangka katekin.

Struktur senyawa ditentukan menggunakan analisis data NMR yang telah dibandingkan dengan data sebelumnya [19-21]. Spektrum massa menunjukkan puncak ion molekular yang terprotonasi pada m/z 575,2751 $[\text{M}-1]^+$, menghasilkan rumus molekul $\text{C}_{31}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$. Puncak ion fragmen pada m/z 290,1418 muncul yang menunjukkan monomer senyawa **2** (methoxy-epikatekin).

Senyawa **3** berupa kristal putih memiliki rumus molekul $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{O}_6$ berdasarkan spektrum massa dengan adanya puncak ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 272,5866. Spektrum ultraviolet senyawa **3** menunjukkan puncak pada λ_{max} 206,4 berasal dari transisi elektronik $n \rightarrow \pi^*$ menunjukkan adanya gugus karbonil. Puncak kedua λ_{max} 257,6 (ϵ 1,26) dan 294,2 nm (ϵ 0,92) yang berasal dari transisi elektronik $\pi \rightarrow \pi^*$ menunjukkan adanya gugus benzena. Gugus hidroksil senyawa **3** menunjukkan puncak pada bilangan gelombang 3247,8 cm^{-1} pada spektrum IR. Terdapat tujuh buah sinyal karbon pada spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ pada δ 170,4; 151,6; 146,1 dan 123,3. Gugus karboksil ditunjukkan pada δ 170,4 ($^{13}\text{C-NMR}$) dan puncak pada bilangan gelombang 1673,3 cm^{-1} (spektrum IR). Data DEPT menunjukkan tiga metin (δ 123,9; 117,8 dan 115,8) dan empat karbon kuarternar (δ 170,4; 151,6; 146,1 dan 123,3). Namun data HMQC menunjukkan setiap karbon metin berkorelasi dengan dua buah proton. Oleh karena itu, diduga bahwa jumlah karbon senyawa **3** adalah dua kali dari jumlah sinyal karbonnya. Dengan demikian, senyawa **3** diduga merupakan gabungan yang terdiri dari dua buah fragmen yang sama. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa **3** (dalam CD_3OD) menunjukkan resonansi tiga buah proton aromatik pada δ_{H} 7,44 (d ; $J = 1,95$ Hz, H-4); 7,42 (d ; $J = 1,95$ Hz, H-6), dan 6,80 (dd ; $J = 7,8$ Hz, H-5), membentuk sistem penjodohan ABX [13]. Satu substituen pada sistem aromatik tersebut adalah gugus karboksilat yang berkorelasi dengan karbon pada δ 123,3 dan substituen lainnya merupakan oksigen yang ditunjukkan pada δ 151,6 dan 146,1 (karbon sp^2 teroksigenasi). Analisis spektrum HMBC membentuk fragmen asam 3,4-dihidroksi benzoat. Setelah dibandingkan dengan referensi, kami menemukan senyawa **3** memiliki pergeseran kimia karbon dan proton yang sangat mirip dengan asam 3,4-dihidroksi

benzoat [22-24]. Berdasarkan data spektrum UV, IR, NMR dan MS, senyawa **3** adalah sebuah dimer dari asam 3,4-dihidroksi benzoat yang bernama asam dibenzo-p-dioxin-2,8-dikarboksilat.



Gambar 1. Struktur senyawa 1-3

Tabel 1. Data NMR senyawa 2

Posisi	c	H (Multp, J)	DEPT	HMBC		COSY
				² J	³ J	
2	79,9	4,57 (s)	CH	H-6'	H-2'	-
3	67,6	4,18 (m)	CH	H-4	-	H-4
4	29,4	2,84 (dd; J= 4,5 & 16,9 Hz) 2,72 (dd; J= 2,6 & 16,9 Hz)	CH ₂	-	-	H-4, H-3 H-4, H-3
4a	100,2	-	C	H-4	H-8	-
5	158,1	-	C	H-6	-	-
6	95,9	5,91 (d; J= 1,9 Hz)	CH	-	-	-
7	157,8	-	C	H-6	-	-
8	96,4	5,94 (d; J= 1,9 Hz)	CH	H-6	-	-
8a	157,5	-	C	H-6	-	-
1'	132,4	-	C	-	H-5'	-
2'	115,4	6,97 (d; J= 1,95 Hz)	CH	H-2	H-6'	-
3'	146,0	-	C	H-2'	H-5'	-
4'	145,9	-	C	H-5'	H-2'	-
5'	115,9	6,74 (d; J= 8,45 Hz)	CH	H-2	H-6'	H-6'
6'	119,5	6,80 (d; J= 1,95 & 8,45 Hz)	CH	-	H-2'	H-5'
2''	79,9	4,57 (s)	CH	H-6''	H-2''	-
3''	67,6	4,18 (m)	CH	H-4''	-	H-4''
4''	29,4	2,84 (dd; J= 4,5 & 16,9 Hz) 2,72 (dd; J= 2,6 & 16,9 Hz)	CH ₂	-	-	H-4'', H-3'' H-4'', H-3''
4a''	100,2	-	C	H-4''	H-8''	-
5''	158,0	-	C	H-6''	-	-
6''	95,9	5,91 (d; J= 1,9 Hz)	CH	-	-	-
7''	157,7	-	C	H-6''	-	-
8''	96,4	5,94 (d; J= 1,9 Hz)	CH	H-6''	-	-
8a''	157,4	-	C	-	-	-
1'''	132,4	-	C	-	H-5'''	-
2'''	115,4	6,97 (d; J= 1,95 Hz)	CH	H-2'''	H-6'''	-
3'''	146,0	-	C	H-2'''	H-5'''	-
4'''	145,9	-	C	H-5'''	H-2'''	-
5'''	115,9	6,74 (d; J= 8,45 Hz)	CH	H-2'''	H-6'''	H-6'''
6'''	119,5	6,80 (d; J= 1,95 & 8,45 Hz)	CH	-	H-2'''	H-5'''

OCH ₃	56,8	3,88 (3H; s)	CH ₃	-	-	-
------------------	------	--------------	-----------------	---	---	---

2.2 Aktivitas antibakteri senyawa

Senyawa **1-3** diujikan pada bakteri *E. faecalis* sehingga mendapatkan nilai MIC yang ditunjukkan pada tabel 2. Nilai MIC senyawa **1** memiliki aktivitas antibakteri paling tinggi di antara ketiga senyawa yang lainnya. Namun kedua senyawa kontrol positif (klorheksidin dan fosfomicin) memiliki nilai MIC yang lebih tinggi dari senyawa uji. Aktivitas antibakteri senyawa **3** memiliki nilai MIC yang paling rendah (5,00 mg/mL). Senyawa **1** dan **2** adalah flavonoid, keduanya memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. faecalis*. Aktivitas ini belum pernah diketahui sebelumnya dari ketiga senyawa ini.

Butein diketahui merupakan agen anti-adipogenic [25], inhibitor protein tyrosine kinase, agen antineoplastik dan antiproliferasi [26]. Selain itu, butein juga memiliki aktivitas sebagai anti-inflamasi, antidiabetes, antinephritic, antithrombin, anti-angiogenic, hepatoprotective [27] dan antikanker [28] melalui banyak mekanisme seperti penghambatan NF- κ B, induksi apoptosis melalui tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), regulasi *death receptor 5* [29], penghambatan stress oksidatif dan jalur signaling JNK [30]. Butein telah diisolasi dari akar tumbuhan *Salvia leriifolia* [31] dan *Hydnophytum formicarum* [32]. Tumbuhan *Hydnophytum formicarum* ini merupakan tumbuhan yang satu Famili dengan *M. pendans*.

Senyawa **2** (3-methoxy-3-epikatekin-epikatekin) diduga merupakan dimer dari epikatekin. Berdasarkan studi literatur, senyawa ini belum pernah ditemukan sebelumnya sehingga belum ada laporan aktivitas dari senyawa ini. Sedangkan epikatekin (monomer senyawa **2**) sudah banyak ditemukan pada tumbuhan diantaranya terdapat pada *Adansonia digitata* [19], *Carapa guianensis* [20] *Loranthus kanoi* [21] dan *black catechu* [33]. Epikatekin dikenal sebagai agen antioksidan [34], antiploriferatif [35], antikanker payudara [36].

Asam dibenzo-p-dioxin-2,8-dikarboksilat belum pernah dilaporkan sebelumnya terdapat dalam tumbuhan, merupakan senyawa dimer asam 3,4 dihidroksi benzoat. Adapun struktur senyawa yang mirip dengan senyawa **3** adalah carcapinoside, berupa asam 8(2-0- -D-4,5-anhydroglucitoyl 1 2glucopyranosyl carbonyl) dibenzo [b,e] [1,4] dioxine-2-karboksilat berhasil diisolasi dari buah papaya [37]. Aktivitas yang dimiliki asam dibenzo-p-dioxin-2,8-dikarboksilat juga belum diketahui. Oleh karena itu, aktivitas antibakteri terhadap *E. faecalis* merupakan aktivitas pertama kali dari senyawa ini.

Tabel 2. Aktivitas antibakteri senyawa **1-3** terhadap *E. faecalis*

Senyawa	Zona Hambat (mm) pada konsentrasi (mg/mL)						MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
	5			1				
	1	2	Rata-rata	1	2	Rata-rata		
1	8,05	8,40	8,22	8,55	8,20	8,37	0,62	None
2	8,70	8,40	8,55	8,10	8,00	8,05	1,25	2,5
3	8,00	8,65	8,33	8,30	8,20	8,25	5,00	10
Chlorhexidin*	**	**	**	12,9	12,9	12,9	0,04	
Fosfomicyn*	23,1	22,3	22,7	8,40	8,40	8,40	0,31	None

*standard

**tidak diujikan

3. Prosedur

3.1 Bahan tanaman

Tumbuhan sarang semut (*Myrmecodia pendans*) kering didapat dari pulau papua yang diidentifikasi oleh Joko, Laboratorium Taksonomi Tanaman, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam-Universitas Padjadjaran, Bandung, Indonesia.

3.2 Prosedur Penelitian Umum

Spektroskopi NMR menggunakan 500 MHz FT-NMR spectrometer (Varian ECA 500 JOEL, Japan). Spektroskopi IR menggunakan Perkin Elmer Spectrum One FT-IR spectrometer (Buckinghamshire, England). ES-MS spectrometer (UPLC MS/MS TQD type, Waters). Kiesel gel 60 silica gel resin digunakan untuk kromatografi kolom (c.c.) (Merck, Darmstadt, Germany) dan ODS yang merupakan LiChroprep RP-18 (Merck). Analisis KLT menggunakan Kiesel gel 60 F₂₅₄ dan RP-18 F_{254s} (Merck). Palrut yang digunakan didapat dari Merck Co. Ltd. and Sigma Aldrich Co. Ltd. (St. Louis, MO, USA).

3.3 Isolasi Flavonoid dari Ekstrak EtOAc *M. pendans*

Sampel (*Myrmecodia pendans*, 3 Kg), diekstraksi dengan 100% EtOAc (3x3 L) pada suhu 40°C di atas pemanas listrik alat sokletasi. Ekstrak dievaporasi menghasilkan ekstrak pekat (30 g). Ekstrak EtOAc dipisahkan dengan kromatografi kolom fasa diam silika gel 60 (300 g, 70-230 mesh, Merck, Munish, Germany) dielusi dengan pelarut bergradien 10% *n*-Hexane/EtOAc, menghasilkan sebelas fraksi. Fraksi 8 (0,45 g) dipisahkan dengan kromatografi kolom fasa diam silika gel 60 (9 g, 70-230 mesh) dielusi dengan pelarut bergradien 5% *n*-Heksana/EtOAc (70:30 to 30:70 v/v), menghasilkan delapan fraksi. Fraksi 8,4 (38 mg) dipisahkan dengan kromatografi kolom fasa terbalik (RP-C18), dielusi dengan pelarut isokratik H₂O/MeOH (70:30 v/v) menghasilkan **1** (10 mg). Fraksi 9 (0,65 g) dipisahkan dengan kromatografi kolom fasa diam silika gel 60 (150 g, 70-230 mesh) dielusi dengan pelarut bergradien 5% *n*-Hexane/EtOAc (75:25 to 25:75 v/v), menghasilkan tujuh fraksi. Fraksi 9,6 (167 mg) dipisahkan dengan kromatografi kolom fasa terbalik (RP-C18), dielusi dengan pelarut isokratik H₂O/MeOH (70:30 v/v) menghasilkan **2** (4 mg) dan **3** (15 mg). Nilai R_f senyawa **1**, **2** dan **3** berturut-turut adalah 0,1; 0,2 dan 0,4 pada plat KLT ODS (RP-18 F_{254s}) dengan pelarut MeOH/H₂O (1:1, v/v).

Butein (**1**): UV λ_{\max} nm: (MeOH): 206,6 (1,74); 257,2 (7,58); 269,2 (6,31) dan 387 (1,64). FTIR ν_{\max} (KBr, cm⁻¹): 3437, 1639, 1512, 1458, 1244. ES-MS m/z 271,0027 [M+H]⁺. ¹H-NMR (CD₃OD): δ 7,93 (*d*; *J* = 9,05 Hz, H-6'); 7,70 (*d*; *J* = 15,5 Hz, H-); 7,52 (*d*; *J* = 15,5 Hz, H-); 7,18 (*d*; *J* = 1,9 Hz, H-2); 7,12 (*dd*; *J* = 1,9 dan 7,8 Hz, H-6); 6,81 (*d*, *J* = 8,4 Hz, H-5); 6,41 (*d*, *J* = 1,95 dan 8,4 Hz, H-5') dan 6,28 (*d*, *J* = 1,95 Hz, H-3').

3-methoxy-3-epikatekin-epikatekin (**2**): UV λ_{\max} nm: (MeOH): 208,4 (3,31) dan 279,4 (1,26). FTIR ν_{\max} (KBr, cm⁻¹): 3429, 2926, 1622, 1562, 1516, 1244, 1149. ES-MS m/z 575,2751 [M+H]⁺. ¹H-NMR (CD₃OD): δ 6,80 (*d*, *J* = 1,95 & 8,45 Hz, H-6' & H-6'''); 6,97 (*d*, *J* = 1,95 Hz, H-2' & H-2'''); 6,74 (*d*, *J* = 1,95 Hz, H-5' & H-5'''); 5,94 (*d*, *J*=1,9 Hz, H-8 & H-8''); 5,91 (*d*, *J*=1,9 Hz, H-6 & H-6''); 4,57 (*s*, H-2 & H-2''); 3,88 (*s*, OCH₃); 2,84 (*dd*, *J*= 4,5 & 16,9 Hz, H-3 & H-3'') dan 2,72 (*dd*, *J*= 2,6 & 16,9 Hz, H-4 & H-4''). ¹³C-NMR (CD₃OD): δ 158,1(C-5); 158(C-5''); 157,8(C-7); 157,7(C-7''); 157,5(C-8a); 157,4(C-8a''); 146(C-3'&C-3'''); 145,9(C-4'&C-4'''); 132,4(C-1'&C-1'''); 119,5(C-6'&C-6'''); 115,9(C-5'&C-5'''); 115,4(C-2'&C-2'''); 100,2(C-4a&4a''); 96,4(C-8&C-8''); 95,9(C-6&C-6''); 79,9(C-2&C-2''); 67,6(C-3&C-3''); 56,8(OCH₃) dan 29,4(C-4&C-4'').

Asam dibenzo-p-dioxin-2,8-dikarboksilat (**3**): UV λ_{\max} nm: (MeOH): 206,4; 257,6 (3,02) dan 294,2 (0,92). IR ν_{\max} (KBr) cm⁻¹: 3247, 1673, 1602, 1307, 1131. ES-MS m/z 273,5866 [M+H]⁺. ¹H-NMR (CD₃OD): δ 7,44 (*d*, *J* = 1,95 Hz, H-4); 7,42 (*d*, *J* = 1,95 Hz, H-6) dan 6,80 (*dd*, *J* = 7,8 Hz, H-5). ¹³C-NMR (CD₃OD): δ 170,4(COOH); 151,6(C-4); 146,1(C-3); 123,9(C-6); 123,3(C-1); 117,8(C-2) dan 115,8(C-5).

3.4 Pengujian antibakteri

Pengujian antibakteri senyawa **1**, **2** dan **3** terhadap *E. faecalis* ATCC 29212 pada penelitian ini menggunakan metode mikro dilusi [38]. Sel bakteri yang telah dikulturkan pada media agar Muller Hinton pada suhu 37°C di bawah kondisi aerob. Sel bakteri diinkubasi setelah diberikan perlakuan senyawa uji yang telah ditentukan konsentrasinya dengan pengenceran bertingkat pada suhu 37°C tanpa pengocokan dalam agar yang sama selama 24 jam pada mikro plate sesuai dengan instruksi/prosedur pengujian dari Clinical and Laboratory Standards Institute. Penentuan nilai MIC adalah pengamatan penghambatan sel bakteri pada konsentrasi terkecil. Akuades dan MeOH yang digunakan untuk melarutkan senyawa uji tidak memberikan pengaruh. Kontrol positif, chlorhexidin dan fosfomisin dilarutkan di dalam air. Nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Mimum (KBM) senyawa ditentukan dengan dua kali pengulangan menggunakan metode mikro dilusi pada mikro plate 96-sumur [39].

4. Penutup

Pada penelitian ini didapat tiga senyawa dari *M. pendans* dengan aktivitas antibakteri terhadap *E. faecalis* yang belum pernah diketahui sebelumnya. Ketiga senyawa ini diidentifikasi sebagai butein (**1**, MIC 0,62 mg/mL), 3"-methoxy-epikatekin-3-*O*-epikatekin (**2**, MIC 1,25 mg/mL) dan asam dibenzo-*p*-dioxin-2,8-dikarboksilat (**3**, MIC 5 mg/mL). Berdasarkan penelusuran pustaka pada data *Scifinder* [40], 3"-methoxy-epikatekin-3-*O*-epikatekin adalah flavonoid baru dan asam dibenzo-*p*-dioxin-2,8-dikarboksilat pertama kali diisolasi dari tumbuhan.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge

References

1. Togay, S.O., Keskin, A.C, Acik, L. & Temiz A. Virulence genes, antibiotic resistance and plasmid profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from naturally fermented Turkish foods. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 1084-1092.
2. Portenier, I. Waltimo, T.M.T & Haapasalo, M. *Enterococcus faecalis*—the root canal survivor and ‘star’ in posttreatment disease. *Endodontic Topics*, 2003, 6, 135-159.
3. Suchitra, U. & Kundabala, M. *Enterococcus Faecalis*: An Endodontic Pathogen. *Endodontology*. Vol. 18(2):11-13.
4. Pinheiro, E.T., Gomes, B.P.F.A, Drucker, D.B., Zaia, A.A, Ferraz, C.C.R. & Souza-Filho, F.J. Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions. *International Endodontic Journal*. 2004, 37, 756-763.
5. Sebeena, M & Boopathy, T. *Enterococcus faecalis*-An Endodontic Challenge. *J Indian Acad Dent Spec*. 1:46–48.
6. Li, X.; Kristin, M.K.; Leif, T; Ingar, O. Systemic diseases caused by oral infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 2000, Vol.13, No.4, 547–558.
7. Orms, N.F. *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment.
8. Ambrosio, S.R., Furtado, N.A.J.C., de Oliviera, D.C.R., da Costa, F.B., Martins, C.H.G., de Carvalho, T.C., Porto, T.S. Veneziani, R.C.S. *Z. Naturforsch*, 2008, 63c, 326-330.
9. Hertiani, T.; Sasmito, E.; Sumardi; Ulfah, M. Preliminary Study on Immunomodulatory Effect of Sarang-Semut Tubers *Myrmecodia tuberosa* and *Myrmecodia pendens*. *Journal of Biological Science*, 2010, 10 (3), 136-141.
10. Kumar, S. & Pandey, A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013; 16 pages.

11. Cuyckens, F. and Claeys, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal Mass Spectrometry*. 2004; 39: 1–15
12. Andersen, Ø.M. and Markham, K.R. Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications. Taylor & Francis Group. 2006.
13. Shriner, R.L., Hermann, C.K.F., Morrill, T.C., Curtin, D.Y. and Fuson, R.C. The Systematic Identification of Organic Compounds. Eighth edition. Jhon Wiley & Son. 2004.
14. Seo, Y. H. Butein disrupts Hsp90's molecular chaperoning function and exhibits anti-proliferative effects against drug-resistant cancer cells. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2013, Vol. 34, No. 11.
15. Prachayasittikul, S., Buraparungsang, P., Worachartcheewan, A., Ayudhya, C.I.N., Ruchirawat, S. & Prachayasittikul, V. Antimicrobial and antioxidative activities of bioactive constituents from *Hydnophytum formicarum* Jack. *Molecules*. 2008, 13, 904-921.
16. Tun, A.A., Hlaing, A.M., Aung, H.P. & Htay, M.M. Isolation and characterization of flavonoids from the flowers of *Butea monosperma* Lam (Pauk). *The Jour. Myan. Acad. Arts & Sc.* 2004, Vol. II(Part One) No. 2 (Science).
17. Prachayasittikul, S., Buraparungsang, P., Worachartcheewan, A., Ayudhya, C.I.N., Ruchirawat, S. & Prachayasittikul, V. Antimicrobial and antioxidative activities of bioactive constituents from *Hydnophytum formicarum* Jack. *Molecules*. 2008, 13, 904-921.
18. Dewick, P.M. Medicinal Natural Product: A Biosynthetic Approach Second Edition. School of Pharmaceutical Sciences University of Nottingham, UK. John Wiley & Sons, Ltd. 2002.
19. Shahat, A.A. Procyanidins from *Adansonia digitata*. *Pharmaceutical Biology*. 2006, Vol. 44, No. 6, 445–450.
20. Qi, S.I., Wu, D.G., Ma, Y.B. & Luo, X.D. A novel flavane from *Carapa guianensis*. *Acta Botanica Sinica*. 2003, 45(9): 1129-1133.
21. Lin, H.H. & Lin, Y.T. Flavonoids from the leaves of *Loranthus kaoi* (Chao) Kiu. *Journal of Food and Drug Analysis*. 1999, 7(3): 185-190.
22. Syafni, N., Putra, D. P. & Arbain, D. 3,4-dihydroxybenzoic acid and 3,4-dihydroxybenzaldehyde from the fern *Trichomanes chinense* L.; isolation, antimicrobial and antioxidant properties. *Indo. J. Chem*, 2012,12 (3), 273-278.
23. Kang, W.Y., Li, G.H. & Hao, X.J. Two new triterpenoid from *Neonauclea sessilifolia*. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45 (8), 1003-1007.
24. Nguyen, D.M.C, Seo, D.J., Kim, K.Y., Park, R.D. Kim, D.H., Han, Y.S. et al. Nematicidal activity of 3,4-dihydroxybenzoic acid purified from *Terminalia nigrovenulosa* bark against *Meloidogyne incognita*. *Microbial Pathogenesis*, 2013, 52-59.
25. Song, N.J., Yoon, H.J., Kim, K.H., Jung, S.R., Jang, W.S., Seo, C.R., Lee, Y.M., Kweon, D.H., Hong, J.W., Lee, J.S., Park, K.M., Lee, K.R. & Park, K.W. Butein is a novel anti-adipogenic compound. *Journal of lipid research*.
26. Yang, L.H., Ho, Y.J., Lin, J.F., Yeh, C.W., Kao, S.H & Hsu, L.S. Butein inhibits the proliferation of breast cancer cells through generation of reactive oxygen species and modulation of ERK and p38 activities. *Molecular Medicine Reports*, 2012, 6, 1126-1132.
27. Semwal, R.B., Semwal, D.K., Combrinck, S. & Viljoen, A. Butein: From ancient traditional remedy to modern nutraceutical. *Phytochemistry Letter*, 2015, 11, 188-201.
28. Rahman, M.A. Chalcone: A Valuable Insight into the Recent Advances and Potential Pharmacological Activities. *Chemical Sciences Journal*, 2012, CSJ-29.

29. Moon, D.O., Kim, M.O., Choi, Y.H. & Kim, G.Y. Butein Sensitizes Human Hepatoma Cells to TRAIL-Induced Apoptosis via Extracellular Signal-Regulated Kinase/Sp1-Dependent DR5 Upregulation and NF- κ B Inactivation. *American Association for Cancer Research-Molecular Cancer Therapeutics*, 2010, 9, 1583-1595.
30. Szuster-Ciesielka, A. Mizerska-Dudka, M. Daniluk, J. & Kandefler-Szerzzen, M. Butein inhibits ethanol-induced activation of liver stellate cells through TGF- β , NF κ B, p38, and JNK signaling pathways and inhibition of oxidative stress. *J Gastroenterol*, 2013, 48, 222-237.
31. Khodaparast, M.H.H., Haghdoost, A. & Movahhed, G.G. New source of Butein in Root of *Salvia leriifolia*. *American-Burasian J. Agric & Environ Sci.*, 2008, 4(6): 731-736.
32. Prachayasittikul, S., Buraparungsang, P., Worachartcheewan, A., Isarankura-Nayudhya, C., Ruchirawat, S. & Prachayasittikul, V. Antimicrobial and Antioxidative Activities of Bioactive Constituents from *Hydnophytum formicarum* Jack. (*Rubiaceae*). 2008, *Molecules*, 13, 904-921.
33. Duangyod, T., Palanuvej, C. & Ruangrunsi, N. (+)-Catechin and (-)-Epicatechin contents and antioxidant activity of commercial black catechu and pale catechu, 2014, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(7):2225-2232.
34. Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P. & Sebastiani, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions, 2008, *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 589-598.
35. Nagarajan, S., Nagarajan, R., Brauhut, S.J., Bruno, F., McIntosh, D., Samuelson, L. & Kumar, J. Biocatalytically Oligomerized Epicatechin with Potent and Specific Antiproliferative Activity for Human Breast Cancer Cells, 2008, *Molecules*, 13, 2704-2716.
36. Saha, A., Kuzuhara, T., Echigo, N., Sukanuma, M. & Fujiki, H. New Role of (-)-Epicatechin in Enhancing the Induction of Growth Inhibition and Apoptosis in Human Lung Cancer Cells by Curcumin. *American Association for cancer prevention research*, 2010, 3(8), 953-962.
37. Oduola, T., Idowu, T.O., Bello, I.S., Adeniyi, F.A. & Ogunyemi, E.O. Haematological Response to Intake of Unripe Carica Papaya Fruit Extract and The Isolation and Characterization of Caricapinoside: A New Antisickling Agent from The Extract, 2012, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, Vol 5, Suppl 3, 77-81.
38. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI - formerly NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard, 11th ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2012
39. Clinical and Laboratory Standards Institute document M7-A8. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard, 9th ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2012
40. www.scifinder.