

**SINTESIS SENYAWA 2-SINAMAMIDO-4-METILPENTANAMIDA DAN
N-(2-HIDROKSIPROPANOIL)SINAMAMIDA SERTA UJI AKTIVITAS
SEBAGAI ANTIBAKTERI SECARA *IN VITRO* DAN *IN SILICO***

INDAH MUTHMAINNAH MONOARFA

H031 191 034



**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

**SINTESIS SENYAWA 2-SINAMAMIDO-4-METILPENTANAMIDA DAN
N-(2-HIDROKSIPROPANOIL)SINAMAMIDA SERTA UJI AKTIVITAS
SEBAGAI ANTIBAKTERI SECARA *IN VITRO* DAN *IN SILICO***

*Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar sarjana sains*

Oleh:

INDAH MUTHMAINNAH MONOARFA

H031 191 034



MAKASSAR

2023

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

SINTESIS SENYAWA 2-SINAMAMIDO-4-METILPENTANAMIDA DAN N-(2-HIDROKSIPROPANOIL)SINAMAMIDA SERTA UJI AKTIVITAS SEBAGAI ANTIBAKTERI SECARA *IN VITRO* DAN *IN SILICO*

Disusun dan diajukan oleh:

INDAH MUTHMAINNAH MONOARFA

H031 19 1034

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sidang Sarjana Program Studi
Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin
Pada 07 November 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama



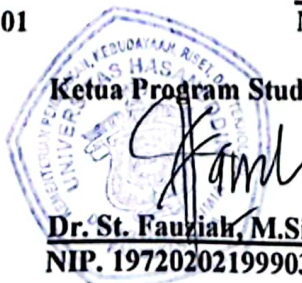
Dr. Herlina Rasyid, S.Si
NIP. 19930414 202204 4 001

Pembimbing Pertama



Dr. Teni Ernawati, M.Sc
NIP. 19751210 199903 2 004

Ketua Program Studi



Dr. St. Fauziah, M.Si
NIP. 19720202199903200202

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Indah Muthmainnah Monoarfa

NIM : H031 191 034

Program Studi : Kimia

Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul “Sintesis 2-Sinamamido-4-Metilpentanamida dan *N*-(2-Hidroksipropanoil)Sinamamida serta Uji Aktivitas sebagai Antibakteri Secara *in Vitro* dan *in Silico*” adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila dikemudian hari terbukti bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 07 November 2023



Yang Menyatakan,

Indah Muthmainnah Monoarfa

PRAKATA

Bismillahirrahmanirrahim

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas berkat, rahmat, dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Sintesis Senyawa 2-Sinamamido-4-Metilpentanamida dan N-(2-Hidroksipropanoil)Sinamamida serta Uji Aktivitas sebagai Antibakteri secara *in Vitro* dan *in Silico*”** sebagai salah satu syarat memperoleh gelar sarjana.

Shalawat serta salam penulis hantarkan kepada **Rasulullah Muhammad SAW** yang menjadi inspirasi dan sumber tauladan bagi umat manusia dalam menjalani kehidupan di dunia dan akhirat. Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari hambatan serta rintangan, namun Alhamdulillah pada akhirnya penulis dapat melaluinya berkat bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu penulis dalam penyusunan dan penyelesaian skripsi ini.

Tulus kasih dan hormat, serta bakti setinggi-tingginya kepada orang yang paling berjasa dalam hidup penulis, wanita hebat Ibunda **A. Jumliawati, S** dan Ayahanda **Irwan Jefri Monoarfa**, atas semua dukungan luar biasanya, baik secara moril, materil, maupun spiritual. Skripsi ini juga persembahkan kepada adik-adik, **Siti Nur Rahmah Monoarfa dan Mohammad Dzaky Mumtaaz**, yang selalu menjadi penghibur, semangat, dan selalu penulis repotkan dalam menyelesaikan skripsi ini. Semoga Allah SWT selalu memberikan perlindungan serta rahmat-Nya kepada mereka di dunia dan akhirat, aamiin.

Ucapan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada Ibu **Dr. Herlina Rasyid, S.Si.** selaku pembimbing utama dan Ibu **Teni Ernawati, M.Si.**

selaku pembimbing pertama yang senantiasa meluangkan waktu, tenaga, pikiran, serta telah memfasiliasi penulis dalam melakukan penelitian hingga menyelesaikan skripsi ini. Tanpanya, penulis mungkin tidak akan menyelesaikan penelitian dalam waktu yang cukup singkat ini.

Penulis juga mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sedalam-dalamnya karena telah berjasa memberikan bantuan baik secara moral, materil, maupun tenaga kepada:

1. Ketua dan Sekretaris Departemen Kimia, Ibunda **Dr. St. Fauziah, M.Si** dan Ibunda **Dr. Nur Umriani Permatasari, S.Si, M.Si** serta seluruh Dosen Kimia yang telah memberikan ilmunya kepada penulis dan Staf Departemen Kimia yang telah banyak membantu penulis.
2. Kepada Tim Penguji Ujian Sarjana, **Prof. Ahyar Ahmad, Dr. St. Fauziah, M.Si.**, serta Tim dosen Laboratorium Organik **Prof. Dr. Nunuk Hariani S, M.S., Drs. Frederyk Mandey, M.Sc., Syadza Firdausiah, S.Si, M.Sc., dan alm Dr. Firdaus Zenta, M.S.** Terima kasih atas bimbingan, motivasi, dan saran serta kritik yang sifatnya membangun.
3. Seluruh Analis Laboratorium yang membantu penulis, khususnya Ibu **Tini** dan Ibu **Puspa**, selaku penanggungjawab Laboratorium Kimia Organik FMIPA Unhas dan Laboratorium NPPC BRIN.
4. Kepada **Seluruh Keluarga Besar Dg. Ngerang dan Monoarfa-Manese** yang selalu mendukung dan membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
5. Untuk yang selalu menemani penulis dari maba hingga saat ini, **Urifatun'nisa, Rusmiah, Alfiyah Nur'Aini Musyahadah, Annisa Rifdah Maghfira, Sri Helmi, Wanda Wardyanti, Kiswan Setiawan Majid, dan Adam Nur Ahmad.**

6. Rekan dan kakak-kakak peneliti sekaligus tentor **Organik, Putri Ayu, Kak Salman, Kak Bahrin, Kak Michael**, yang membantu penulis dalam penyusunan skripsi.
7. Keluarga besar **Kimia Konf19urasi**, yang telah memberikan banyak pembelajaran selama 4 tahun bersama.
8. Kepada kakak-kakak Kimia 2016, 2017, 2018, serta segenap keluarga KMK.
9. Rekan-rekan **KKNT Perhutsos Gel. 108 Posko Marayoka**, serta seluruh pihak yang telah membantu penulis selama melakukan pengabdian.
10. Untuk rekan-rekan **Laboratorium NPPC BRIN** yang telah menemani, membantu penulis baik selama di Serpong maupun hingga saat ini.
11. Teruntuk warga **Pursen**, khususnya **Kost A2**, Ibu **Febri**, Kak **Nana**, Kak **Hana**, Kak **Harni**, **Sharina**, dan **Selyn**. Serta Ibu **Ade**, Pak **Dika**, Bang **Bucex**, dan **Shafwan** atas warna baru dalam perjalanan penulis selama di Serpong.
12. Kepada **Nurinayah, Ainun Salsabila, Meriana, Nadiya Nurul**, dan **Masyita Sagenati Umar** sebagai garda terdepan yang selalu membantu penulis dan menjadi teman belajar penulis.
13. Kak **Nur Alim**, yang selalu menemani penulis dan membantu penulis dalam segala hal, serta menjadi *supporting system* penulis.

Penulis sadar bahwa masih banyak kekurangan dalam tulisan ini, maka penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dalam perbaikan dan penyempurnaannya. Akhir kata penulis berharap semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan dan dapat diterapkan dalam dunia industri.

Penulis
2023

ABSTRAK

Sintesis asam sinamat telah banyak ditemukan potensinya untuk pengobatan, terutama sebagai antibiotik. Sintesis senyawa 2-sinamamido-4-metilpentanamida (CAD-1) dan *N*-(2-hidroksipropanoil)sinamamida (CAD-2) dilakukan melalui reaksi amidasi dengan menggunakan reagen kopling karbodiimida selama 24 jam. Senyawa target sintesis dikarakterisasi dengan menggunakan spektroskopi FTIR, GCMS-MS, dan ¹H- dan ¹³C-NMR. Proses sintesis CAD-1 dan CAD-2 ini menghasilkan rendemen sebesar 22,13% dan 25,20%. Pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri Metisilin-resisten *Staphylococcus aureus* (MRSA) dan *Escherichia coli* dilakukan secara *in vitro* menggunakan metode difusi cakram untuk mengukur zona hambat dengan variasi 6 konsentrasi dan kontrol *streptomycin* dan *in silico* menggunakan *molecular docking*. Pada uji *in vitro*, senyawa CAD-1 dan CAD-2 memiliki aktivitas terhadap bakteri MRSA, tapi tidak dengan bakteri *Escherichia coli*. Senyawa potensial dianalisis lebih lanjut secara *in silico* untuk melihat interaksi penghambatan terhadap protein target. Hasil yang diperoleh dari analisis *docking* protein PBP2a dengan senyawa CAD-1 dan CAD-2 menunjukkan energi ikatan yang lebih rendah dibandingkan dengan *streptomycin* sebagai kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa CAD-1 dan CAD-2 memiliki afinitas yang lebih tinggi terhadap protein PBP2a dan berpotensi sebagai antibakteri.

Kata Kunci: Amidasi, antibakteri, 2-sinamamido-4-metilpentanamida, *N*-(2-hidroksipropanoil)sinamamida, *in vitro*, *in silico*

ABSTRACT

*Synthesis of cinnamic acid has been found to have medicinal potential, especially as an antibiotic. The synthesis of 2-cinnamamido-4-methylpentanamide (CAD-1) and N-(2-hydroxypropanoyl)cinnamamide (CAD-2) was carried out through amidation reaction using carbodiimide coupling reagent for 24 hours. The synthesized target compounds were characterized using FTIR, GCMS-MS, and ^1H - and ^{13}C -NMR spectroscopy. The synthesis process of CAD-1 and CAD-2 produced yields of 22.13% and 25.20%. Antibacterial activity testing against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Escherichia coli* bacteria was carried out in vitro using disc diffusion method to measure inhibit zone with variation of 6 concentrations and streptomycin as a control and in silico using molecular docking. In the in vitro test, CAD-1 and CAD-2 compounds had activity against MRSA bacteria, but not *Escherichia coli* bacteria. Potential compounds were further analyzed in silico to see the inhibitory interaction with the target protein. The results obtained from the docking analysis of PBP2a protein with CAD-1 and CAD-2 compounds showed lower binding energy compared to streptomycin as a positive control. This indicates that CAD-1 and CAD2 compounds have a higher affinity for PBP2a protein and have potential as antibacterials.*

Keywords: *Amidation, antibacterial, 2-cinnamamido-4-methylpentanamide, N-(2-hydroxypropanoyl)cinnamamida, in vitro, in silico*

DAFTAR ISI

	Halaman
PRAKATA.....	v
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	
xiv	
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN.....	
xvii	
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian.....	7
1.3.1 Maksud Penelitian.....	7
1.3.2 Tujuan Penelitian.....	7
1.4 Manfaat Penelitian.....	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1 Tinjauan Umum Asam Sinamat.....	9
2.2 Senyawa Turunan Asam Sinamat.....	10
2.3 Amidasi.....	14
2.4 Tinjauan Umum Bakteri.....	17

2.4.1 Bakteri <i>Metisilin-Resisten Staphylococcus aureus</i>	17
2.4.2 Bakteri <i>Escherichia coli</i>	19
2.5 Uji Aktivitas Antibakteri.....	20
2.6 Analisis Penambatan Molekul (<i>Molecular Docking</i>)	21
BAB III METODE PENELITIAN	24
3.1 Bahan Penelitian	24
3.2 Alat Penelitian.....	24
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian	25
3.4 Metode Penelitian	25
3.4.1 Sintesis Senyawa Turunan Asam Sinamat.....	25
3.4.1.1 Sintesis 2-sinamamido-4-metilpentanamida	25
3.4.1.2 Sintesis <i>N</i> -(2-hidroksipropanoil)sinamamida	26
3.4.2 Uji Aktivitas Antibakteri.....	26
3.4.2.1 Pembuatan Media <i>Brain Heart Infusion Agar</i> (BHIA).....	26
3.4.2.2 Pembuatan McFarland 0.5	26
3.4.2.3 Pengujian Aktivitas Antibakteri Menggunakan Metode Cakram.....	27
3.4.3 Analisis <i>Molecular Docking</i>	27
3.4.3.1 Preparasi Protein Bakteri dan Ligan Standar	27
3.4.3.2 Preparasi Ligan	28
3.4.3.3 Proses <i>Molecular Docking</i>	28
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1 Sintesis Senyawa Turunan Asam Sinamat.....	29
4.1.1 Sintesis Senyawa 2-sinamamido-4-metilpentanamida (CAD-1)	29

4.1.2 Sintesis Senyawa <i>N</i> -(2-hidroksipropanoil)-sinamamida (CAD-2)	39
4.2 Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Turunan Asam Sinamat ..	47
4.3 Analisis <i>Molecular Docking</i>	49
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	53
5.1 Kesimpulan	53
5.2 Saran.....	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN.....	63

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Interpretasi spektrum FTIR senyawa CAD-1	35
2. Interpretasi spektrum ^1H - dan ^{13}C -NMR senyawa CAD-1	38
3. Interpretasi spektrum FTIR senyawa CAD-2	44
4. Interpretasi spektrum ^1H - dan ^{13}C -NMR senyawa CAD-2	47
5. Hasil <i>docking</i> senyawa hasil sintesis terhadap protein PBP2a.....	50

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur asam sinamat	9
2. Struktur senyawa asam kafeat, asam ferulat, dan asam <i>p</i> -kumarat	10
3. Struktur asam 2-sinamamidobenzoat, <i>N</i> -(3-(trifluorometil)fenil) sinamamida, <i>N</i> -(2,6-dimetilfenil)sinamamida, 4-bromofenil sinamat, 2-isopropil-5-metilfenil sinamat, dan 4-alil-2-metoksifenil sinamat	11
4. Struktur (e)-4-(3-oso-3-(fenetilamino) prop-1-en-1-yl)-1,2 fenilin diasetat	12
5. Struktur propilsinamida	12
6. Persamaan reaksi asam sinamat menggunakan reaksi perkin	13
7. Struktur asam <i>p</i> -metoksisinamat	14
8. Bakteri <i>Metisilin-Resisten Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	18
9. Bakteri <i>Escherichia coli</i>	19
10. Persamaan reaksi pembentukan 2-sinamamido-4-metilpentanamida (CAD-1)	29
11. <i>Monitoring</i> waktu refluks menggunakan KLT	30
12. <i>Monitoring</i> hasil evaporasi menggunakan KLT	31
13. <i>Monitoring</i> tampungan hasil KKG menggunakan KLT	32
14. Kromatogram senyawa CAD-1 dengan menggunakan sistem tiga eluen	32
15. Mekanisme reaksi sintesis senyawa 2-sinamamido-4-metilpentanamida (CAD-1)	33
16. Spektrum FTIR senyawa CAD-1	34
17. Spektrum massa senyawa CAD-1	35
18. Pola fragmentasi senyawa CAD-1	36

19. Spektrum ^1H -NMR senyawa CAD-1	37
20. Spektrum ^{13}C -NMR senyawa CAD-1	38
21. Persamaan reaksi pembentukan <i>N</i> -(2-hidroksipropanoil)sinamamida (CAD-2)	39
22. <i>Monitoring</i> waktu refluks menggunakan KLT	39
23. <i>Monitoring</i> hasil evaporasi menggunakan KLT	40
24. <i>Monitoring</i> tampungan hasil KKG menggunakan KLT	41
25. Kromatogram senyawa CAD-1 dengan menggunakan sistem tiga eluen	41
26. Mekanisme reaksi sintesis senyawa <i>N</i> -(2-hidroksipropanoil)sinamamida (CAD-2)	42
27. Spektrum FTIR senyawa CAD-2	43
28. Spektrum massa senyawa CAD-2	44
29. Pola fragmentasi senyawa CAD-2	45
30. Spektrum ^1H -NMR senyawa CAD-2	46
31. Spektrum ^{13}C -NMR senyawa CAD-2	46
32. Diameter zona hambat senyawa turunan asam sinamat terhadap bakteri MRSA	48
33. Diameter zona hambat senyawa turunan asam sinamat terhadap bakteri <i>Escherichia coli</i>	49
34. Visualisasi interaksi antara reseptor protein PBP2a dengan senyawa CAD-1 dan CAD-2	51

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Bagan kerja sintesis 2-sinamamido-4-metilpentanamida	63
2. Bagan kerja sintesis <i>N</i> -(2-hidroksipropanoil)sinamamida	64
3. Bagan kerja pengujian aktivitas antibakteri	65
4. Bagan kerja analisis <i>molecular docking</i>	66
5. Perhitungan data penelitian	69
6. Dokumentasi penelitian	73
7. Spektrum IR 2-sinamamido-4-metilpentanamida (CAD-1)	75
8. Spektrum IR <i>N</i> -(2-hidroksipropanoil)sinamamida (CAD-2)	76
9. Spektrum massa 2-sinamamido-4-metilpentanamida (CAD-1)	77
10. Spektrum massa <i>N</i> -(2-hidroksipropanoil)sinamamida (CAD-2)	79
11. Spektrum ¹ H-NMR dan ¹³ C-NMR 2-sinamamido-4-metil pentanamida (CAD-1)	81
12. Spektrum ¹ H-NMR dan ¹³ C-NMR <i>N</i> -(2-hidroksipropanoil)sinamamida (CAD-2)	82

DAFTAR ARTI SIMBOL DAN SINGKATAN

Simbol/Singkatan	Arti
PAL	<i>Phenylalanine Ammonia Lyase</i>
DCC	<i>N,N'</i> -disikloheksilkarbodiimida
DMAP	4-dimetilaminopiridin
DCU	Disikloheksil urea
SOCl ₂	Tionil klorida
TEA	Trietilamin
WHO	<i>World Health Organization</i>
MDR	<i>Multidrug-Resistant</i>
CDC	<i>The Center for Disease Control and Prevention</i>
MRSA	<i>Metisilin-Resisten Staphylococcus aureus</i>
PBP2a	<i>Penicilin Binding Protein 2a</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
KLT	Kromatografi Lapis Tipis
¹ H-NMR	<i>Hydrogen-Nuclear Magnetic Resonance</i>
¹³ C-NMR	<i>Carbon-Nuclear Magnetic Resonance</i>
FT-IR	<i>Fourier Transform-Infra Red</i>
GC/MS	<i>Gass Chromatography-Mass Spectrometry</i>
CAD-1	<i>Cinnamic Acid Derivatives-1</i>
CAD-2	<i>Cinnamic Acid Derivatives-2</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Asam sinamat merupakan salah satu senyawa bioaktif alami yang ditemukan pada hampir semua tanaman hijau karena memiliki banyak kegunaan dalam pengobatan. Secara umum, asam sinamat dapat diperoleh dari kayu manis (*Cinnamomum cassia*). Asam sinamat dan turunannya seperti asam kafeat, asam ferulat, asam kumarat, dan asam *p*-hidroksisinamat banyak ditemukan dalam makanan seperti buah-buahan, sayuran, dan biji-bijian (Adisakwattana, 2017). Kelimpahan senyawa tersebut dapat diperoleh dari mengisolasi tanaman dari bahan alam, akan tetapi jumlah yang dihasilkan sangat kecil sehingga peneliti melakukan sintesis terhadap asam sinamat (Kadidae dkk., 2020).

Asam sinamat adalah asam karboksilat aromatik yang disintesis melalui jalur *shikimate* dengan prekursor fenilalanin dan tirosin (Kumar dan Parle, 2019). Asam sinamat juga dapat terbentuk dari proses deaminasi fenilalanin oleh enzim *Phenylalanine Ammonia Lyase* (PAL) menghasilkan asam sinamat yang mengalami modifikasi enzimatik (Chandra dkk., 2019). Asam sinamat terdiri dari gugus fungsi yang aktif yaitu substitusi pada cincin fenil, ikatan rangkap α , β -tak jenuh, dan gugus karboksilat (Çalışkan dkk., 2022).

Modifikasi terhadap asam sinamat dapat dilakukan pada sisi *cis* maupun *trans* (Razzaghi-Asl dkk., 2013). Asam sinamat dapat ditemukan sebagai asam maupun dalam bentuk terkonjugasi dengan amida, ester, aldehid (Chockova dkk., 2017). Umumnya, turunan ester lebih reaktif dan mudah terurai daripada amida,

tetapi senyawa tersebut harus diubah terlebih dahulu menjadi amida agar dapat digunakan sebagai obat (Firdaus dkk., 2019). Senyawa amida juga merupakan turunan asam sinamat yang ramai disintesis karena bersifat stabil sehingga tidak mudah terhidrolisis (Lu dan Ralph, 1998). Konjugasi senyawa asam sinamat dengan adanya perbedaan struktur dan gugus yang mensubstitusi suatu senyawa telah diketahui memberikan efek farmakologis yang berbeda (Silva dkk., 2019).

Turunan amida dari senyawa asam sinamat merupakan salah satu turunan yang paling banyak digunakan di bidang kimia medisinal. Pembentukan ikatan amida terjadi melalui kondensasi asam karboksilat dengan amina. Beberapa penelitian skala besar menggunakan kopling asam klorida untuk mengaktifkan asam agar dapat membentuk amida. Reagen umum yang sering digunakan berupa tionil klorida (SOCl_2), fosforus oksiklorida (POCl_3), dan oksalil klorida (COCl_2) (Dunetz dkk., 2016). Namun, pada saat ini reagen kopling karbodiimida seperti *N,N'*-disikloheksilkarbodiimida (DCC), *N,N'*-diisopropilkarbodiimida, dan *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)karbodiimida (EDC) menjadi reagen kopling yang cukup banyak digunakan (Dabhi dkk., 2023).

Ernawati dkk., (2017) telah berhasil melakukan sintesis terhadap senyawa amida *N*-oktilsinamamida dari metil *trans*-sinamat melalui reaksi hidrolisis dengan basa yang menghasilkan rendemen sebesar 85% dan dilanjutkan reaksi amidasi menggunakan reagen kopling DCC dan 4-dimetilaminopiridin (DMAP) sebagai katalisator karena memiliki efek katalitik yang kuat. Rendemen produk yang diperoleh dari reaksi amidasi sebesar 53,65% dengan produk samping berupa

disikloheksil urea (DCU) sebesar 30%. Senyawa sintesis tersebut diuji aktivitasnya terhadap sel kanker leukemia P388 dan diperoleh nilai $IC_{50} = 6,71 \mu\text{g/mL}$.

Silveira dkk. (2018) melakukan sintesis terhadap asam sinamat melalui amidasi dengan feniletilamin yang disubstitusikan dengan dua metode berbeda yaitu reagen kopling DCC dan NO_2 pada suhu ruang dan diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 48 jam di bawah suasana argon. Beberapa amida yang berhasil disintesis ialah *N*-[2-(4-metoksifenil)etil]-3-fenil-akrilamida, 3-fenil-*N*-(2-m-toliletil)-akrilamida, *N*-[2-(4-klorofenil)etil]-3-fenil-akrilamida, *N*-[2-(4-nitrofenil)etil]-3-fenil-akrilamida, *N*-[2-(3,4-dimetoksifenil)etil]-3-fenil-akrilamida, *N*-[2-(4-bromofenil)etil]-3-(nitrofenil)-akrilamida, 3-(4-nitrofenil)-*N*-[2-(4-nitrofenil)etil]-akrilamida. Senyawa tersebut kemudian diuji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Staphylococcus epidermidis* dan menunjukkan aktivitas yang baik pada nilai konsentrasi lebih dari $250 \mu\text{g/mL}$.

Turunan asam sinamat lain yaitu asam *p*-kumarat yang mengandung fenetil fenil juga dilakukan sintesis untuk membentuk ester, fenetil *p*-kumarat, dan amida *N*-fenetil-*p*-kumaramida. Sintesis dilakukan melalui tahap asetilasi, klorinasi menggunakan tionil klorida (SOCl_2), dilanjutkan esterifikasi menggunakan fenetil alkohol dan amidasi fenetilamin dengan penambahan DMAP, trietilamin (TEA), kemudian tahap terakhir yaitu deasetilasi dengan penambahan pirolidin untuk menghilangkan gugus pelindung. Senyawa ester yang terbentuk memiliki rendemen sebesar 47,20%, sedangkan amida sebesar 76,02%. Dalam proses esterifikasi, senyawa tersebut berubah menjadi pirolidin amida sebagai produk

samping reaksi, berbeda dengan proses amidasi terdapat gugus amida yang tahan terhadap serangan pirolidin (Firdaus dkk., 2022).

Sintesis senyawa *N*-sikloheksil-3-(4-hidroksi-3,5-dimetoksifenil)-2(fenilformamido)prop-2-enamida yang dilakukan oleh Karnati dkk. (2018) menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram positif *S. aureus*, dan Gram negatif *E. coli* dengan antibiotik standar ciprofloksasin dan flukonazol dengan diameter zona inhibisi 22 mm. Aktivitas antibakteri senyawa tersebut disebabkan oleh adanya gugus fenol yang mengandung substituen metoksi (-OCH₃) pada posisi *ortho* sehingga menunjukkan aktivitas antibakteri yang baik.

Penelitian yang dilakukan oleh De Moris dkk. (2023) tentang senyawa ester dan amida turunan asam sinamat mengemukakan bahwa senyawa butil sinamat dan 4-isopropilbenzilsinamida memiliki aktivitas antibakteri yang sangat baik dibandingkan senyawa modifikasi lainnya dengan nilai MIC masing-masing adalah 626,62 μ M dan 458 μ M. Aktivitas antibakteri dari senyawa tersebut disebabkan oleh adanya penambahan substituen butil dan isopropil yang menempel pada cincin aromatik. Senyawa amida lain yang ditemukan adalah 4-klorobenzil sinamida, memiliki potensi sebagai antibakteri tetapi memiliki nilai yang cukup lemah dengan MIC 2021,31 μ M.

Penelitian terkait penambahan gugus substituen pada struktur asam sinamat juga dilakukan oleh Alghamdi dkk. (2020) yang mengemukakan bahwa penambahan gugus -Cl di posisi *ortho* dan *para* pada cincin fenil senyawa 2-((5-((2,5-diklorofenoksi)metil)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)metoksi)benzo [d] tiazol menunjukkan aktivitas sebagai antibakteri terhadap bakteri *E. coli* dengan nilai MIC 12.5 $\pm$ 0.4 μ g yang sebanding dengan obat standar amoksisilin. Selain itu,

senyawa 3-(5-((benzo[d]thiazol-2-yloksi)metil)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzenamin ditemukan memiliki zona inhibisi yang lebih besar daripada standar amoksisilin yaitu 14 ± 1.3 mm untuk menghambat *P. aeruginosa*. Berdasarkan penelitian tersebut, gugus -NH₂ pada cincin aromatik dapat memberikan aktivitas yang baik sebagai antibakteri.

Penelitian terkait pengujian senyawa hasil sintesis asam sinamat terutama sebagai antibakteri bisa menjadi salah satu upaya mendukung langkah *World Health Organization* (WHO) dalam hal pengobatan akibat resistensi bakteri MDR yang semakin berkembang dalam waktu singkat (O'Neill, 2016). Bakteri *multidrug-resistant* (MDR) atau yang dikenal dengan bakteri yang resisten terhadap lebih dari tiga kelas antibiotik ini terus berkembang tanpa disertai pengembangan antibiotik (Oliveira dkk., 2020). *The Center for Disease Control and Prevention* (CDC) melaporkan bahwa pada tahun 2025 diprediksi sekitar 23.000 orang akan meninggal karena penyakit menular dengan resistensi antibiotik (Bintari dan Risandiansyah, 2019).

Semakin pesatnya peningkatan resistensi bakteri dan minimnya antibiotik baru untuk membunuh bakteri, maka perlu upaya berkelanjutan yang berfokus pada pengembangan agen antibakteri (Benitez-Chao dkk., 2021) maupun pencarian metode baru untuk mengobati resistensi tersebut. Deng dan Song (2020) dalam penelitiannya menuliskan bahwa obat antibakteri baru sangat diperlukan untuk memerangi infeksi karena *strain* yang resisten terhadap antibiotik. Apalagi pendekatan yang diterapkan dalam pengembangan obat masa sekarang sangat mahal dan lambat terlepas dari perkembangan kemajuan teknologi (Coumar, 2022). Maka selain melakukan eksperimen skala laboratorium secara *in vitro*, juga perlu dilakukan studi komputasi secara *in silico*.

Studi komputasi telah banyak diterapkan untuk memprediksi target potensial senyawa bioaktif. Studi komputasi dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak komputer untuk melakukan simulasi protein-ligan molekul obat ke target tertentu yang dinamakan dengan *docking* molekuler (Yu dkk., 2018). Hal ini didasarkan pada informasi yang tersedia dalam literatur dan basis data yang berisi asosiasi protein-ligan, menggunakan metodologi berbasis ligan atau struktur (Perez-Castillo dkk., 2021). *Docking* molekuler digunakan untuk mengandaikan model pengikatan dominan ligan dengan protein struktur tiga dimensi, memberi peringkat hasil sesuai dengan afinitas pengikatannya, dan mengusulkan hipotesis struktural tentang bagaimana suatu ligan dapat menghambat target (Mourad dan Shuaibalahmad, 2022).

Berdasarkan uraian tersebut, turunan senyawa asam sinamat memiliki potensi yang tinggi sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut melalui modifikasi struktur. Penelitian ini akan dilakukan sintesis melalui proses amidasi menggunakan *L*-leusinamid dan laktamid sebagai reagen. Hasil sintesis tersebut kemudian diuji potensinya sebagai antibakteri secara *in vitro* melalui pengujian daya hambat dengan menggunakan bakteri Gram positif *Metisilin-resistan Staphylococcus aureus* (MRSA) dan Gram negatif *Escherichia coli*, serta uji *in silico* menggunakan *molecular docking*.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. berapa rendemen dari proses reaksi amidasi senyawa asam sinamat dengan reagen *L*-leusinamid dan laktamid?

2. bagaimana karakterisasi senyawa turunan asam sinamat yang diperoleh dari hasil amidasi?
3. bagaimana aktivitas senyawa turunan asam sinamat sebagai antibakteri berdasarkan nilai daya hambat terhadap *Metisilin-resistan Staphylococcus aureus* (MRSA) dan *Escherichia coli*?
4. Bagaimana interaksi senyawa turunan asam sinamat sebagai antibakteri berdasarkan studi *molecular docking*?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui rendemen dan struktur dari proses sintesis senyawa asam sinamat melalui proses amidasi dan menguji bioaktivitas senyawa sebagai antibakteri melalui *in vitro* dan *in silico*.

1.3.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. melakukan sintesis senyawa asam sinamat menjadi senyawa turunan asam sinamat dengan reaksi amidasi menggunakan reagen *L-leusinamid* dan laktamid dan menentukan rendemen reaksinya.
2. menentukan karakterisasi hasil sintesis amidasi senyawa asam sinamat.
3. mempelajari aktivitas senyawa turunan asam sinamat sebagai agen antibakteri berdasarkan nilai daya hambat terhadap *Metisilin-Resisten Staphylococcus aureus* (MRSA) dan *Escherichia coli*.
4. mengidentifikasi interaksi senyawa turunan asam sinamat sebagai antibakteri berdasarkan studi *molecular docking*.

1.4 Manfaat Penelitian

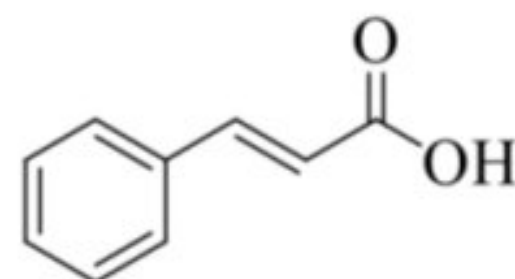
Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai struktur dari hasil sintesis senyawa turunan asam sinamat melalui proses amidasi dan bioaktivitas senyawa tersebut sebagai antibakteri berdasarkan pengujian nilai daya hambat secara *in vitro* dan bagaimana interaksi senyawa tersebut berdasarkan studi *molecular docking* secara *in silico*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum Senyawa Asam Sinamat

Asam sinamat (Gambar 1) merupakan kelompok asam karboksilat yang banyak ditemukan pada tanaman hijau. Istilah sinamat berasal dari rempah-rempah kayu manis (*Cinnamomum zeylanicum*) (França dkk., 2021). Asam sinamat juga dikenal dengan asam 3-fenil-2-propenoat atau asam β -fenilakrilat (Julianus dan Luckyvano, 2014). Asam sinamat biasanya dapat ditemukan dalam madu, propolis, jeruk, biji kopi, kakao, sereal (Wahid dkk., 2022). Asam sinamat memiliki struktur sederhana yaitu C6-C3 yang berbentuk kristal berwarna putih dengan titik leleh 133-135 °C dan titik didih 300 °C. Asam sinamat memiliki banyak kegunaan antara lain sebagai bahan pengawet, pewangi makanan, kosmetik, sabun, dan juga mempunyai efek farmakologis yang banyak (Indriyanti dan Prahasiwi, 2020).



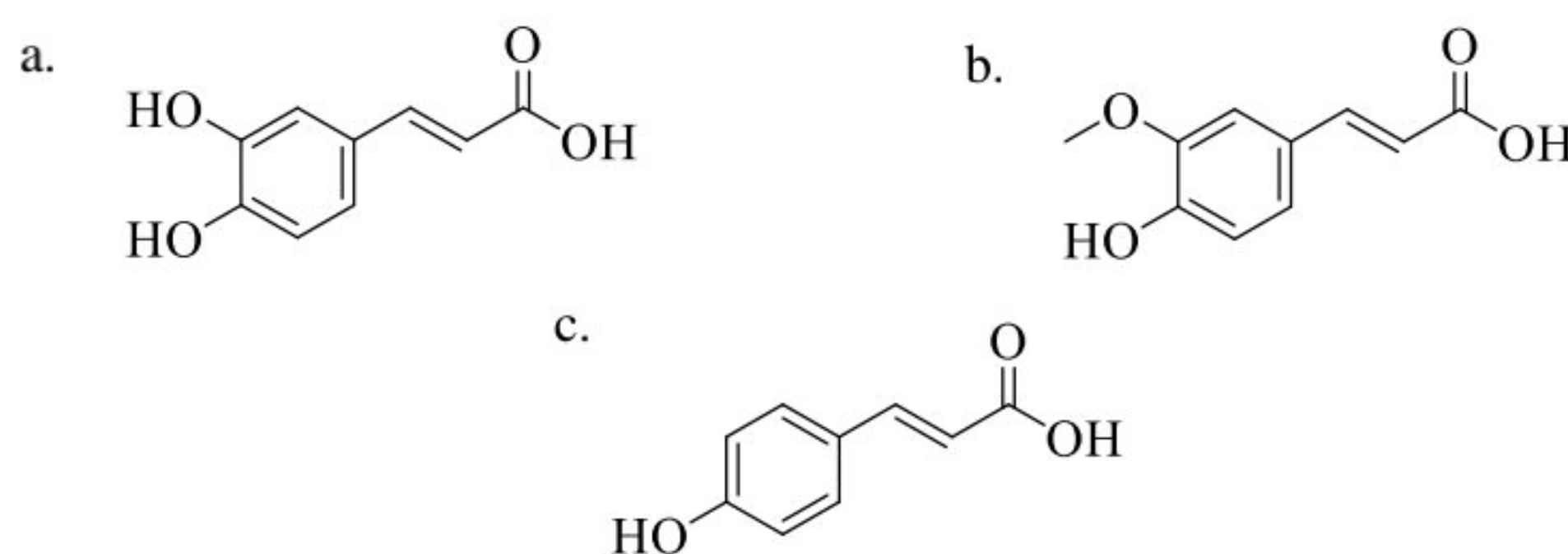
Gambar 1. Struktur asam sinamat (França dkk., 2021)

Senyawa asam sinamat umumnya diperoleh dari isolasi kayu manis (*Cinnamomum spp*) family *Lauraceae* menggunakan metode ekstraksi. Beberapa bagian dari tanaman kayu manis seperti kulit, daun, batang, bunga, dan buah digunakan untuk mengekstrak minyak esensial dari kayu manis dengan senyawa aktif yang berbeda-beda. Senyawa tersebut berupa sinamaldehyd, eugenol, asam sinamat, dan masing-masing memiliki sifat terapeutik (Khedkar dan Khan, 2023).

Isolasi senyawa asam sinamat pada kulit kayu manis juga dilakukan oleh Wardatun dkk., (2017) menggunakan metode maserasi dan sokletasi dengan menggunakan variasi konsentrasi pelarut etanol. Penggunaan pelarut etanol dengan konsentrasi berbeda menghasilkan rendemen senyawa yang berbeda pula. Semakin tinggi konsentrasi yang digunakan maka kandungan senyawa yang ada di dalam ekstrak juga semakin besar.

2.2 Senyawa Turunan Asam Sinamat

Asam sinamat merupakan prekursor yang mengalami transformasi biogenetik melalui reaksi-reaksi sekunder sehingga menghasilkan senyawa turunan fenilpropanoid seperti asam kafeat, asam ferulat, asam *p*-kumarat seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2 (Usmah, 2012). Sejumlah penelitian terkait senyawa turunan asam sinamat telah membuktikan bahwa senyawa dalam bentuk bebas atau sebagai turunan ester, amida, atau aldehida menunjukkan berbagai macam aktivitas (Kumar dan Parle, 2019).

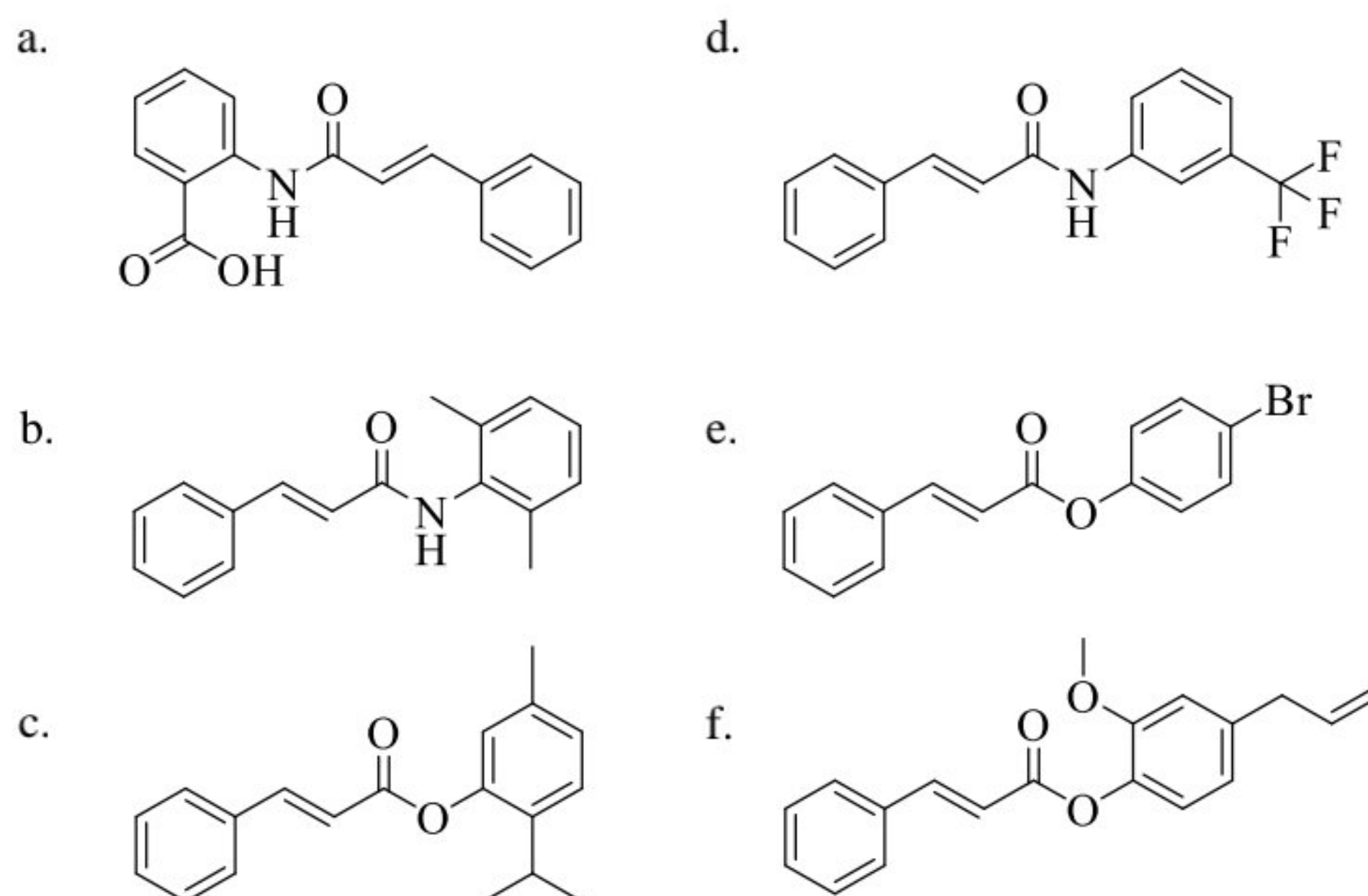


Gambar 2. Struktur senyawa (a) asam kafeat, (b) asam ferulat, dan (b) asam *p*-kumarat (Usmah, 2012)

Beberapa senyawa turunan ester dan amida dari asam sinamat berhasil disintesis dan diuji aktivitasnya sebagai antibakteri dan antijamur. Isobutil sinamat dan dibromo sinamat menunjukkan aktivitas antibakteri yang baik terhadap bakteri

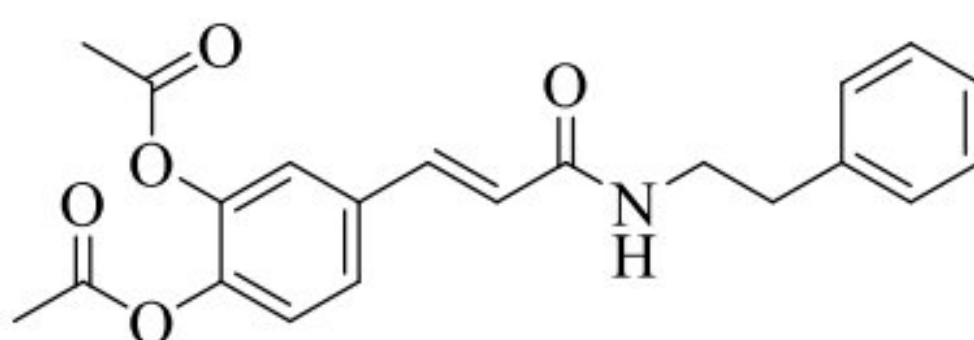
gram positif *S. aureus* dan gram negatif *E. coli*, serta jamur *Candida albicans* dan *Aspergillus niger* (Narasimhan dkk., 2004).

Asam sinamat dapat diperoleh dari mengisolasi tanaman bahan alam, serta dapat pula diperoleh melalui sintesis dengan beragam metode. Wahid dkk., (2022) berhasil melakukan sintesis asam sinamat terhadap turunan amida dan ester menjadi asam 2-sinamamidobenzoat, *N*-(3-(trifluorometil)fenil) sinamamida, *N*-(2,6-dimetilfenil)sinamamida, 4-bromofenil sinamat, 2-isopropil-5-metilfenil sinamat, dan 4-alil-2-metoksifenil sinamat. Masing-masing Senyawa disintesis menggunakan sinamoil klorida dengan variasi amin seperti asam antranilat, 3-aminobenzotrifluorida, dan 2,6-dimetilanilin serta menggunakan pelarut diklorometana anhidrat (DCM). Rendemen yang dihasilkan oleh senyawa tersebut rata-rata sebesar 35-61%. Senyawa hasil sintesis tersebut disajikan pada Gambar 3.



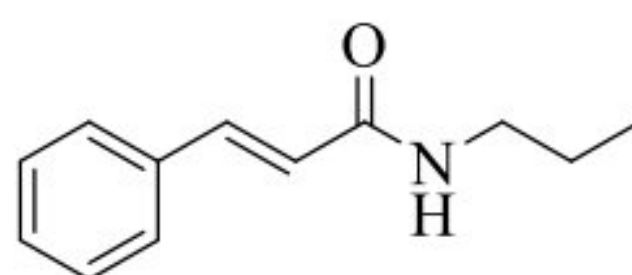
Gambar 3. Struktur (a) asam 2-sinamamidobenzoat, (b) *N*-(3-(trifluorometil)fenil)sinamamida, (c) *N*-(2,6-dimetilfenil)sinamamida, (d) 4-bromofenil sinamat, (e) 2-isopropil-5-metilfenil sinamat, dan (f) 4-alil-2-metoksifenil sinamat (Wahid dkk., 2022)

Turunan senyawa asam sinamat lain yaitu (*E*)-4-(3-*o*-3-(fenetilamino)prop-1-en-1-yl)-1,2 fenilin diasetat yang ditunjukkan pada Gambar 4 diperoleh melalui proses sintesis dengan reaksi asetilasi menggunakan asetat anhidrida, kemudian hasil asetilasi dilanjutkan dengan klorinasi dengan melarutkan dengan benzena dan menggunakan tionil klorida (SOCl₂) sebagai reagen. Hasil klorinasi dilanjutkan dengan proses amidasi menggunakan fenetilamin, piridin, dan trietilamin (TEA). Senyawa tersebut diuji bioaktivitasnya dalam menghambat pertumbuhan sel kanker leukemia P-388 dengan nilai IC₅₀ sebesar 0,5 µg/mL (Fattah dkk., 2020).



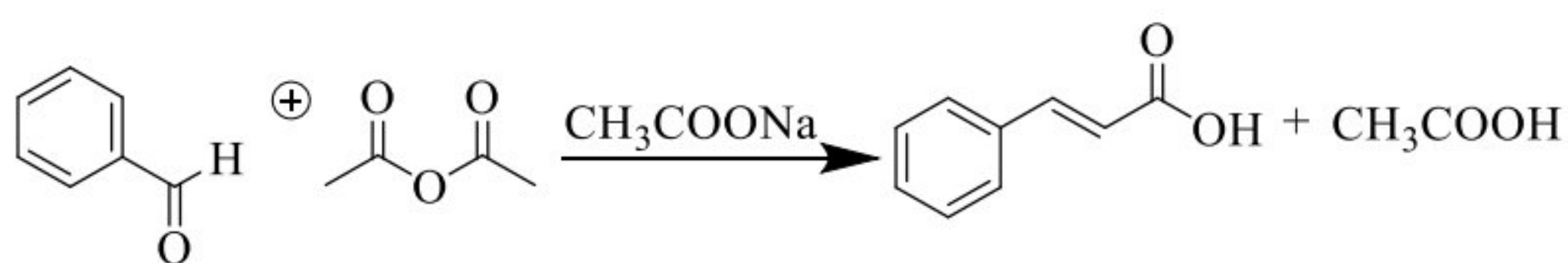
Gambar 4. Struktur (*E*)-4-(3-*o*-3-(fenetilamino)prop-1-en-1-yl)-1,2 fenilin diasetat (Fattah dkk., 2020)

Penelitian terkait turunan sinamat juga dilakukan oleh Ernawati dkk., (2020) melalui reaksi hidrolisis terhadap metil *trans*-sinamat, kemudian dilanjutkan dengan reaksi amidasi menggunakan SOCl₂, dan nitrasi terhadap senyawa asam sinamat dan sinamamida menggunakan H₂SO₄ dan HNO₃. Senyawa yang terbentuk kemudian diuji aktivitasnya terhadap α -glukosidase. Senyawa dengan aktivitas inhibisi terbaik ditunjukkan pada Gambar 5 yaitu senyawa propilsinamamida dengan nilai inhibisi IC₅₀ 0.37 ± 0.145 mM.



Gambar 5. Struktur propilsinamida (Ernawati dkk., 2020)

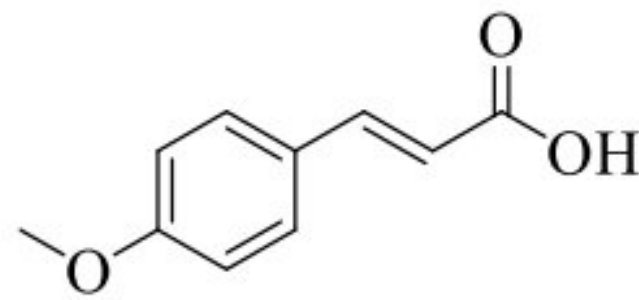
Indriyanti dan Prahasiwi (2020) dalam penelitiannya juga berhasil melakukan sintesis terhadap asam sinamat melalui reaksi perkin menggunakan benzaldehid yang dilarutkan dalam asam asetat anhidrida dan natrium asetat sebagai katalis (Gambar 6). Selama reaksi terjadi kondensasi antara gugus karbonil dari benzaldehid dan aktivasi gugus metil pada asetat anhidrida dengan adanya penambahan katalis basa. Reaksi yang dilakukan menggunakan gelombang ultrasonik agar dapat meminimalisir penggunaan waktu serta mendapatkan rendemen yang besar. Hasil sintesis diperoleh kristal halus berwarna putih mengkilat dengan rendemen sebesar 4,98%. Senyawa hasil sintesis tersebut kemudian dilakukan uji antioksidan dan terbukti mampu mereduksi radikal bebas sebesar 46,69%.



Gambar 6. Persamaan reaksi asam sinamat menggunakan reaksi perkin (Indriyanti dan Prahasiwi, 2020)

Senyawa turunan asam sinamat lainnya yaitu asam *p*-metoksisinamat (APMS) seperti yang ditunjukkan pada Gambar 7 diperoleh dari modifikasi Knoevenagel menggunakan asam malonat dan alanin yang dilarutkan dalam piridin sebagai katalis. Penggunaan asam malonat dan analin memperlihatkan potensi yang bagus dalam memproduksi turunan asam sinamat. Reaksi ini juga dilakukan dengan menggunakan gelombang ultrasonik dengan 20kHz hingga 100 MHz. Senyawa APMS yang diperoleh kemudian dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap *E. coli*

dengan variasi zona hambat 5%, 10%, dan 15%. Konsentrasi optimal dalam penghambatan tersebut berada pada konsentrasi 15% sebesar 0,855 cm (Masduqi dkk., 2021).



Gambar 7. Struktur asam *p*-metoksisinamat (Masduqi dkk., 2021)

2.3 Amidasi

Ikatan amida adalah kelompok fungsional yang sangat umum ditemukan dalam senyawa alami dan sintetis. Ikatan amida memiliki peranan yang sangat penting dalam metabolisme karena terlibat dalam proses biologis (Çalışkan dkk., 2022). Ikatan amida terbentuk dari reaksi asam karboksilat aktif dengan amina tertentu (Ghosh dan Shahabi, 2021). Hampir seperempat obat yang terdaftar mempunyai molekul yang mengandung gugus amida. Penelitian oleh Constanble dkk., (2007) telah lama membuktikan bahwa pembentukan ikatan amida menyumbang 65% dari semua reaksi awal dalam industri farmasi.

Amida merupakan sekelompok senyawa karbonil yang berasal dari asam karboksilat dimana gugus asil melekat pada atom nitrogen. Senyawa ini termasuk kelompok senyawa organik penting karena dapat diaplikasikan di berbagai bidang seperti obat-obatan dan bahan kimia pertanian (Pulle, 2020). Beberapa turunan amida ditinjau memiliki aktivitas biologis yang penting seperti antimikroba (De Morais dkk., 2023), antioksidan (Seelolla, 2014), antikanker (Fattah dkk., 2020)

antituberkulosis (Permatasari dan Ritmaleni, 2019), dan antidiabetes (Ernawati dkk., 2020).

Metode paling umum yang biasanya digunakan untuk mendapatkan amida ialah dengan melibatkan aktivasi fungsi karboksilat melalui konversi asam karboksilat menjadi asam klorida melalui penggunaan reagen SOCl_2 , POCl_3 , $(\text{COCl})_2$ (Leggio dkk., 2017). Seiring berjalannya waktu, sintesis amida kemudian menggunakan aktivator dari kopling karbodiimida seperti *N,N'*-disikloheksil karbodiimida (DCC) dan direaksikan dengan amina. Penggunaan DCC sebagai reagen kopling pada suatu reaksi menghasilkan produk samping berupa disikloheksil urea (DCU) (Ken dkk., 2019 dan Ernawati dan Nurhalimah, 2017).

Penelitian sintesis asam *p*-kumarat amida berhasil dilakukan oleh Firdaus dkk., (2018) dimana gugus fenol diganti menjadi gugus asetil. Walaupun aktivitas senyawa ester lebih tinggi daripada senyawa amida, turunan amida masih banyak digunakan dalam bidang kesehatan. Hal ini karena senyawa amida merupakan senyawa netral, stabil, dan mempunyai ikatan hidrogen yang dapat menerima reseptor dan juga mendonor. Selain itu, beberapa senyawa ester bersifat toksik terhadap sel maka dari itu perlu dilakukan pengujian terlebih dahulu sebelum menjadi obat.

Rodrigues dkk., (2020) berhasil melakukan sintesis turunan asam sinamat menggunakan metode esterifikasi *Steglich* atau menggunakan DCC sebagai kopling dan DMAP sebagai katalis. Turunan asam sinamat yang disintesis meliputi 4-fluorofenil, 4-metoksifenil, 3,4,5-trimetoksifenil, 4-nitrofenil, 4-bromofenil, dan

4-klorofenil yang kemudian direaksikan dengan isobenzofuran. Masing-masing senyawa yang diperoleh memiliki rendemen rata-rata sebesar 54-76%.

Pengembangan metode amidasi selama beberapa tahun terakhir mulai dari penggunaan reagen dengan biaya rendah atau katalis yang mudah terpisah dari produk yang terbentuk juga masih berlanjut. Salah satu diantara metode tersebut yang mampu untuk meningkatkan fungsionalitas dari senyawa dan masih sangat jarang diaplikasikan ialah amidasi langsung dari asam amino bebas. Maka dari itu, Lanigan dkk., (2016) melakukan amidasi dari alanin dan fenilalanin menggunakan benzilamin dalam kondisi refluks. Rendemen yang diperoleh dari masing-masing reaksi adalah 35% dan 61%. Setelah dilakukan penambahan reagen borat, rendemen dari keduanya meningkat menjadi 71% dan 90%. Asam amino lain yang mengandung rantai samping alkil atau aril meliputi *glycine*, *valine*, *L-leusin*, *proline*, dan *isoleucine* juga menghasilkan rendemen yang tinggi sebesar 71%, 83%, 87%, 91%, dan 90%.

Penelitian yang dilakukan oleh Milkova dkk., (2007) terkait sintesis amida dari sinamoil dan hidroksisinamoil konjugasi asam amino juga telah lebih dahulu dilakukan. Sebanyak lima belas amida yang diperoleh dari metode standar kopling asam fenilpropanoat alami dan terproteksi asam amino. Dimana amida feruloil dan sinapoil dari fenilalanin menunjukkan aktivitas antibakteri dalam menghambat *E. coli* dan *B. subtilis*. Asam sinamat amida 3-fluorofenilalanin dan tirosin juga ditemukan dapat menghambat virus Cocksakivirus B1 dan poliovirus tipe 1.

Çalışkan dkk., (2022) juga telah berhasil melakukan sintesis terhadap asam sinamat dengan menggunakan asam amino. Beberapa asam amino yang dimaksud diantaranya adalah *glysin*, *L-alanin*, *L-leusin*, *L-metionin*. Konjugat asam amino

dilarutkan dalam MeCN/H₂O (7:3) dan TEA pada suhu ruang, kemudian ditambahkan senyawa sinamoil-benzotriazol setelah 15 menit dan dilanjutkan reaksi hingga semalam. Penggunaan asam amino sebagai konjugat dari asam amino menghasilkan rendemen sebesar 87%.

2.4 Tinjauan Umum Bakteri

2.4.1 Bakteri *Metisilin-Resisten Staphylococcus aureus* (MRSA)

Staphylococcus aureus pertama kali ditemukan pada tahun 1880 di Aberdeen, Skotlandia, oleh ahli bedah Alexander Ogston dari pasien dengan luka ulserasi. *S. aureus* termasuk dalam genus *Staphylococcus*, bakteri Gram positif dengan diameter 0,8 µm, berbentuk seperti untaian anggur, aerobik atau anaerob, dan tumbuh optimal pada suhu 37 °C, dan pada pH 7 (Guo dkk., 2020).

S. aureus adalah bakteri yang dapat ditemukan pada kulit, selaput lendir, dan saluran pernapasan bagian atas hewan dan manusia. Namun, itu bisa menjadi patogen oportunistik yang menyebabkan berbagai penyakit menular pada manusia dan hewan (Khanal dkk., 2022). *S. aureus* adalah penyebab utama infeksi terkait rumah sakit dan komunitas di seluruh dunia dengan morbiditas dan mortalitas yang tinggi (Tacconelli dkk., 2018), terutama dengan munculnya dan penyebaran cepat dari *metisilin-resisten S. aureus* (MRSA) yang membuat infeksi bakteri lebih sulit disembuhkan.

S. aureus yang resisten terhadap penisilin dapat menghasilkan penisilinase yang dapat menghidrolisis cincin penisilin β-laktam yang mengarah pada resistensi terhadap antibiotik penisilin. Kemudian, para ilmuwan mengembangkan penisilin semisintetik baru yang resisten terhadap penisilase bernama metisilin, yang tahan

terhadap hidrolisis β -laktamase. Setelah diterapkan pada tahun 1959, metisilin secara efektif mengendalikan infeksi *S. aureus* yang resisten terhadap penisilin. Namun, 2 tahun setelah metisilin diterapkan, ilmuwan Inggris Jevons melaporkan terkait isolasi *strain* MRSA, resistensi yang dihasilkan oleh gen yang mengkode protein pengikat penisilin 2a atau 2' (PBP2a atau PBP2 (Schulte dan Munson, 2019).



Gambar 8. Bakteri *Metisilin-Resisten Staphylococcus aureus* (MRSA) (Minto, 2019)

Bakteri *Metisilin-Resisten Staphylococcus aureus* (MRSA) merupakan *strain* bakteri Gram positif yang secara genetik berbeda dari *S. aureus*. MRSA menyebabkan infeksi aliran darah, pneumonia, dan infeksi bedah pada manusia. MRSA dikaitkan dengan kematian yang lebih tinggi karena resistensi terhadap beberapa antibiotik β -laktam yang digunakan secara klinis. Saat ini, antibiotik pilihan untuk mengobati infeksi MRSA adalah ceftarolin (Natalia dkk., 2012), daptomisin, vankomisin, dan linezolid (Novy dkk., 2011). Namun, dalam 20 tahun terakhir, perkembangan antibiotik baru tidak mengikuti munculnya resistensi obat. Ada banyak laporan tentang *strain* MRSA menjadi resisten terhadap antibiotik lini terakhir (Guan dkk., 2022). Diperkirakan bahwa pada tahun 2050, tingkat kematian

akan meningkat menjadi lebih 100 juta dan kerugian ekonomi akan menjadi lebih dari 100 dolar triliun jika bakteri resisten antimikroba tetap bertahan. *The World Health Organization* (WHO) menempatkan bakteri MRSA dalam daftar patogen prioritas tinggi (Arshad dkk., 2022).

2.4.2 Bakteri *Escherichia coli*

Bakteri *E. coli* merupakan bakteri koliform yang bersifat motil dengan flagella peritrikus dan fimbria (Sutiknowati, 2016). Berdasarkan data *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS), klasifikasi *E. coli* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria
Phylum : Proteobacteria
Class : Gammaproteobacteria
Ordo : Enterobacteriales
Famili : Enterobacteriaceae
Genus : *Escherichia*
Species : *Escherichia coli*

Escherichia adalah patogen bakteri gram negatif yang paling umum menyebabkan infeksi saluran kemih di komunitas dan rumah sakit. Bakteri ini memiliki karakteristik berbentuk batang dengan panjang sekitar 2 μm dan diameter 0,5 μm . Volume sel *E. coli* berkisar 0,6-0,7 m^3 dan dapat hidup pada rentang suhu 20-40 $^{\circ}\text{C}$ dengan suhu optimumnya pada 37 $^{\circ}\text{C}$ serta memiliki sifat fakultatif. *E. coli* membentuk koloni yang bundar, cembung, dan halus dengan tepi yang nyata (Jawetz dkk., 1995).



Gambar 9. Bakteri *Escherichia coli* (Ramadina, 2021)

2.5 Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dapat dilakukan menggunakan beberapa metode, yaitu metode dilusi, metode difusi agar, dan metode difusi dilusi. Metode difusi adalah metode yang sering digunakan untuk menganalisis aktivitas antibakteri. Ada tiga cara dari metode difusi yang dapat dilakukan yaitu metode sumuran, cakram, dan silinder (Pratiwi, 2008). Prinsip kerja dari metode tersebut adalah terdifusinya senyawa antibakteri ke dalam media padat dimana mikroba uji telah diinokulasikan. Hasil pengamatan yang diperoleh berupa ada atau tidaknya daerah hambat yang terbentuk di sekeliling kertas cakram yang menunjukkan zona hambat pada pertumbuhan bakteri (Balaouri dkk., 2016).

Metode sumuran dilakukan dengan membuat lubang yang dibuat tegak lurus pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri uji. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang diisi dengan sampel yang akan diuji. Setelah dilakukan inkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling lubang. Kelebihan dari metode ini karena mudah mengukur luas zona hambat yang terbentuk karena bakteri

beraktivitas tidak hanya di permukaan atas nutrien agar tetapi juga sampai ke bawah. Pembuatan sumuran memiliki beberapa kesulitan seperti terdapatnya sisa-sisa agar pada suatu media yang digunakan untuk membuat sumuran, selain itu juga besar kemungkinan media agar retak atau pecah di sekitar lokasi sumuran sehingga dapat mengganggu proses peresapan antibiotik ke dalam media yang akan memengaruhi terbentuknya diameter zona hambat saat melakukan uji sensitivitas (Pelzcar, 2006).

Metode difusi menggunakan cakram (*Kirby Bauer*) merupakan cara yang paling sering digunakan untuk menentukan kepekaan bakteri terhadap suatu antiiotik. Pada cara ini kertas cakram digunakan sebagai media untuk menampung zat antimikroba yang dijenuhkan ke dalam bahan uji. Setelah itu kertas cakram diletakkan pada permukaan media agar yang telah diinokulasi dengan biakan mikroba uji, kemudian diinkubasikan secara aerobik pada suhu 35 °C selama 18 jam. Area atau zona hambat di sekitar kertas cakram diamati untuk menunjukkan ada tidaknya pertumbuhan mikroba. Diameter area atau zona hambat sebanding dengan jumlah mik mikroba uji yang ditambahkan pada kertas cakram (Bonang, 1992). Kelebihan dari metoda cakram yaitu dapat dilakukan pengujian dengan lebih cepat pada penyiapan cakram (Listari, 2009).

Minarti dkk. (2016) dalam penelitiannya melakukan sintesis terhadap metil sinamat dan turunannya melalui reaksi esterifikasi kemudian melakukan uji antibakteri terhadap bakteri *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*, dan *P. aeruginosa*. Senyawa yang dievaluasi terhadap antibakteri di antara lain adalah metil sinamat, etil sinamat, butil sinamat, 2-butil sinamat, dan asam sinamat. Keempat bakteri diujikan menggunakan kertas cakram berdiameter 6 mm lalu dicelupkan ke dalam

petri dish dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 18 jam kemudian dilanjutkan dengan mengukur zona hambat. Masing-masing sampel dibuat dengan konsentrasi 1%, 2,5%, 2,5%, 5%, dan 10%. Di antara sampel tersebut, asam sinamat menunjukkan bioaktivitas hambatan terbesar pada konsentrasi 10% terhadap bakteri uji.

2.6 Analisis Penambatan Molekul (*Molecular Docking*)

Molecular docking telah banyak digunakan sebagai teknik yang cepat dan murah selama beberapa dekade terakhir, baik dalam akademik maupun industri. *Molecular docking* adalah metode yang menganalisis konformasi dan orientasi molekul ke dalam situs pengikatan target makromolekul (Torres dkk., 2019). Sebuah proses komputasi untuk menentukan apakah molekul kecil (ligan) berikatan dengan makromolekul (reseptor). *Molecular docking* dapat digunakan dalam memprediksi afinitas molekul yang belum disintesis atau melakukan penyaringan virtual database ligan untuk target tertentu. Selain itu, juga dapat memberikan wawasan tentang mekanisme pengikatan ligan, mengidentifikasi residu reseptor terhadap aktivitas ligan, dan memungkinkan optimalisasi ligan lebih lanjut untuk mendapatkan senyawa dengan karakteristik optimal (Rimac dkk., 2021).

Molecular docking adalah perancah yang menarik untuk memahami interaksi *drug biomolecular* untuk desain dan penemuan obat, serta dalam studi mekanistik dengan menempatkan molekul (ligan) ke dalam situs pengikatan spesifik target DNA/protein (reseptor) untuk membentuk kompleks potensial yang stabil dan lebih spesifisitas (Dar dan Mir, 2017). Pendekatan berbasis studi komputasi ini memungkinkan sebagai langkah awal dalam banyak program

penemuan obat karena dapat dilakukan dalam waktu singkat tanpa perlu melakukan eksperimen fisik lebih dulu.

Tujuan utama studi *molecular docking* adalah untuk mencapai kompleks ligan-reseptor dengan konformasi yang optimal dan energi ikat bebas yang rendah (Dar dan Mir, 2017). Beberapa perangkat lunak yang dikembangkan selama dekade terakhir, diantaranya seperti *AutoDock*, *AutoDock Vina*, *DockThor*, *GOLD*, *FlexX*, dan *Molegro Virtual Docker* (Torres dkk., 2019).

Parle dan Arora (2017) melakukan *molecular docking* terhadap senyawa turunan asam sinamat terhadap aktivitas inhibitor NDM-1. Pada penelitian tersebut terdapat 12 senyawa hasil sintesis turunan asam sinamat yang akan diujikan dan antibiotik standar yang digunakan adalah azetreonam. Studi *molecular docking* menunjukkan bahwa senyawa *N*-hidroksi-1-[(2E)-3-(3,4-dihidroksifenil)prop-2-enoil]azetidine-2-karboksamida dan *N*-hidroksi-1-[(2E)-3-(3,4-dimetoksi fenil)prop-2-enoil]azetidine-2-karboksamida menunjukkan hasil yang jauh lebih baik daripada senyawa *N*-hidroksi-1-[(2E)-3-(4-hidroksifenil)prop-2-enoil]azetidine-2-karboksamida dan standar azetreonam.

Sebanyak 20 senyawa turunan asam sinamat yang berhasil disintesis oleh De Morais dkk. (2023), dua diantaranya yaitu desil sinamat dan 4-isopropilbenzil sinamamida yang memberikan hasil yang terbaik sebagai antibakteri. Kedua senyawa tersebut kemudian dilanjutkan dengan proses *molecular docking* terhadap protein GBSD (kode PDB 5eyu) dari bakteri *S. aureus*. Hasil menunjukkan bahwa senyawa tersebut dapat digunakan sebagai prototipe untuk menemukan obat antibakteri baru karena memiliki energi ikat -7 kkal/mol. Nilai energi ikat yang

lebih rendah daripada -5,0 kkal/mol dapat dianggap sebagai interaksi yang optimal (Bahrin dan Soekanto, 2021).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah metanol, akuades, kloroform p.a (*Merck*), etil asetat p.a (*Merck*), aseton teknis (*Merck*), *n*-heksana teknis (*Merck*), asam klorida p.a (*Merck*), *N,N'*-disikloheksilkarbodiimida (DCC) (*Sigma Aldrich*), 4-dimetilaminopiridin (DMAP) (*Sigma Aldrich*), piridin (*Merck*), *L*-leusinamid (*Sigma Aldrich*), laktamid (*Sigma Aldrich*), NaCl (*Merck*), kertas saring Whatman No. 42 (*Merck*), *plastic wrap*, aluminium foil, pipa kapiler, *tissue roll*, kertas pH (*Merck*), plat kromatografi lapis tipis (KLT) (*Merck*, Kieselgel 60F₂₅₄ 0,25 mm), *silica gel* 60 (*Merck*, Kiesel gel 60F₂₅₄ 0,5 mm), kapas, H₂SO₄ (*Merck*), BaCl₂ (*Sigma-Aldrich*), media *Brain Heart Infusion Agar (BHIA)*, akuades steril, kultur bakteri uji MRSA dan *E. coli*, *paper disc* steril (diameter 6 mm), *streptomycin*, dan kompleks protein bakteri yang diunduh melalui laman *Protein Data Bank* (www.rcsb.org/structure).

3.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan diantaranya adalah peralatan gelas, seperangkat alat refluks, timbangan digital, *chamber* KLT, botol vial, corong, kolom, oven, mikropipet, cawan petri, inkubator, jangka sorong, gunting, jarum ose, labu erlenmeyer, pembakar bunsen, pinset, rak tabung reaksi, tabung reaksi, tabung *centrifuge*, *eppendorf*, *rotary evaporator*, autoklaf, *laminar airflow*, spektrofotometer FTIR Shimadzu 8501, spektrometri massa GC/MS Agilent, spektrofotometer NMR JEOL ECZ500R yang bekerja pada 500 MHz untuk

spektrum ^1H -NMR dan 125 MHz untuk spektrum ^{13}C -NMR, komputer dengan perangkat lunak *Chemdraw*, Autodock 4.2, *Autodock Tools*, Chimera, *Discovery Studio Visualizer*.

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan November 2022 hingga bulan Agustus 2023 di Laboratorium Kimia Organik Departemen Kimia Universitas Hasanuddin dan Laboratorium *Natural Product and Pharmaceutical Chemistry*, Pusat Riset Bahan Baku Obat dan Obat Tradisional, BRIN, Serpong.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Sintesis Senyawa Turunan Asam Sinamat (Vale dkk., 2022)

3.4.1.1 Sintesis 2-sinamamido-4-metilpentanamida

Asam sinamat sebanyak 1000 mg (6,73 mmol, 1 equiv) ditambahkan dengan reagen *L*-leusinamid 2243,1 mg (13,46 mmol, 2 equiv), *N,N'*-disikloheksil karbodiimida (DCC) 1388,6009 mg (1 equiv), dan 4-dimetilaminopiridin (DMAP) 411,102 mg (3,365 mmol, 0,5 equiv). Larutan tersebut dilarutkan dengan 5 mL piridin kemudian direfluks pada suhu 100 °C selama 24 jam. Hasil reaksi yang diperoleh kemudian dilakukan ekstraksi menggunakan pelarut etil asetat sebagai fase organik dan akuades sebagai fase anorganik. Fase organik ditambahkan dengan MgSO_4 anhidrat untuk menarik air, lalu dievaporasi kemudian difraksinasi dengan kromatografi kolom gravitasi. Fraksi yang mempunyai nilai R_f yang sama kemudian digabung, lalu dievaporasi hingga diperoleh padatan. Selanjutnya dilakukan uji kemurnian dengan analisis KLT dan titik leleh. Kristal murni yang diperoleh dianalisis dengan spektroskopi FTIR, GCMS-MS, ^1H -NMR, dan ^{13}C -

NMR untuk menentukan struktur dari senyawa hasil sintesis tersebut.

3.4.1.3 Sintesis *N*-(2-hidroksipropanoil)sinamamida

Asam sinamat sebanyak 1000 mg (6,73 mmol, 1 equiv) ditambahkan dengan laktamid 1210,05 mg (13,46 mmol, 2 equiv), *N,N'*-disikloheksil karbodiimida (DCC) 1388,6009 mg (1 equiv) dan 4-dimetilaminopiridin (DMAP) 411,102 mg (3,365 mmol, 0,5 equiv). Larutan tersebut dilarutkan dengan 5 mL piridin kemudian direfluks pada suhu 100 °C selama 24 jam. Hasil reaksi yang diperoleh kemudian dilakukan ekstraksi menggunakan pelarut etil asetat sebagai fase organik dan akuades sebagai fase anorganik. Fase organik ditambahkan dengan MgSO₄ anhidrat untuk menarik air, lalu dievaporasi kemudian difraksinasi dengan kromatografi kolom gravitasi. Fraksi yang mempunyai nilai R_f yang sama kemudian digabung, lalu dievaporasi hingga diperoleh padatan. Selanjutnya dilakukan uji kemurnian dengan analisis KLT dan titik leleh. Kristal murni yang diperoleh dianalisis dengan spektroskopi FTIR, GCMS-MS, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR untuk menentukan struktur dari senyawa hasil sintesis tersebut.

3.4.2 Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi Cakram (El-Bashiti dkk., 2019)

3.4.2.1 Pembuatan Media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA)

Media BHIA ditimbang sebanyak 6,76 g lalu dilarutkan dengan 130 mL akuades dalam labu erlenmeyer 250 mL, kemudian media dihomogenkan dan disterilisasi dalam autoklaf pada tekanan 2 atm dan suhu 121 °C selama 30 menit. Setelah itu media didinginkan kemudian dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak ± 10 mL lalu ditutup dan didiamkan hingga memadat.

3.4.2.2 Pembuatan Standar McFarland 0,5

Standar kekeruhan 0,5 McFarland digunakan untuk menyiapkan inokulum standar antimikroba. Pembuatan reagen standar McFarland dilakukan dengan mencampurkan 1% H_2SO_4 (Merck) dan 1% BaCl (Sigma Aldrich) untuk mendapatkan densitas optik tertentu. Bakteri dibiakkan pada media BHIA dan diinkubasi pada 37 °C selama 20-24 jam di dalam inkubator. Koloni murni diambil dan diencerkan dalam NaCl steril. Setelah itu, kekeruhan disesuaikan dengan standar McFarland 0,5% yang setara dengan 10^8 CFU/mL.

3.4.2.3 Pengujian Antibakteri Menggunakan Metode Cakram

Aktivitas antimikroba senyawa turunan asam sinamat diuji aktivitasnya dengan menggunakan metode difusi cakram. Senyawa turunan asam sinamat dilarutkan dalam metanol dan kloroform dalam pengenceran berseri mulai dari 15%, 10%, 7,5%, 5%, 2,5%, dan 1%. Pengujian dilakukan dengan menyiapkan bakteri sebanyak 100 μl dituangkan ke dalam cawan petri yang telah digaris menjadi 6 bagian, kemudian ditambahkan media BHIA sebanyak 10 mL lalu dihomogenkan dan dibiarkan hingga memadat. Setelah itu, kertas cakram dengan diameter 6 mm dimuat pada permukaan lempeng media BHIA. Senyawa yang telah diencerkan kemudian diuji secara *in vitro* terhadap bakteri Gram positif (*metisilin resisten Staphylococcus aureus*) dan Gram negatif (*Escherichia coli*) strain bakteri dengan mengambil sebanyak 5 μl yang dimuat diatas kertas cakram. Kontrol positif yang digunakan adalah obat antibiotik *streptomycin*. Cawan petri diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam dan diukur zona penghambatan menggunakan jangka sorong. Aktivitas antibakteri dinyatakan sebagai zona rata-rata diameter hambat (milimeter) oleh senyawa turunan asam sinamat terhadap mikroorganisme patogen.

3.4.3 Analisis *Molecular Docking* (Reynaldi dkk, 2021)

3.4.3.1 Preparasi Protein Bakteri dan Ligan Standar

Data struktur 3D protein target yang akan digunakan diunduh melalui *RCSB Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/structure>). Semua residu pada struktur protein dihilangkan dan dipreparasi dengan menu *Prep Dock* pada *software* Chimera. Ligan dari struktur protein kemudian diambil dan dipreparasi dengan metode yang sama dengan protein. Protein dan ligan yang telah dipreparasi disimpan dalam format .pdb.

3.4.3.2 Preparasi Ligan

Struktur 3D senyawa hasil sintesis dibuat dengan *software* Chem 3D Pro. Selanjutnya ligan tersebut dipreparasi dengan mengoptimasinya menggunakan *software* Chimera. Proses optimasi menggunakan metode semi empiris dan disimpan dalam format .pdb.

3.4.3.3 Proses *Molecular Docking*

Proses *molecular docking* dilakukan dengan menggunakan program *Auto Dock 4.2* dengan bantuan *AutoDock Tools*. Setiap ligan ditambatkan pada sisi aktif dari protein bakteri. Parameter *docking* dibuat dengan mengatur ukuran *grid box* sebesar $60 \times 66 \times 60 \text{ \AA}$ dan *spacing* sebesar $0,375 \text{ \AA}$ dengan X-center -34.264 , Y-center 44.65 , Z-center 66.778 , kemudian disimpan dalam format .gpf. Proses *docking* diatur sehingga menghasilkan 10 konformasi dan berjalan pada energi evaluasi maksimum sebesar 2.500.000. Algoritma *sampling* yang digunakan adalah *Lamarckian genetic algorithm* untuk memperoleh data energi ikatan dan memprediksikan konstanta inhibisi. Hasil docking diamati menggunakan *software* *Discovery Studio Visualizer*.

BAB IV

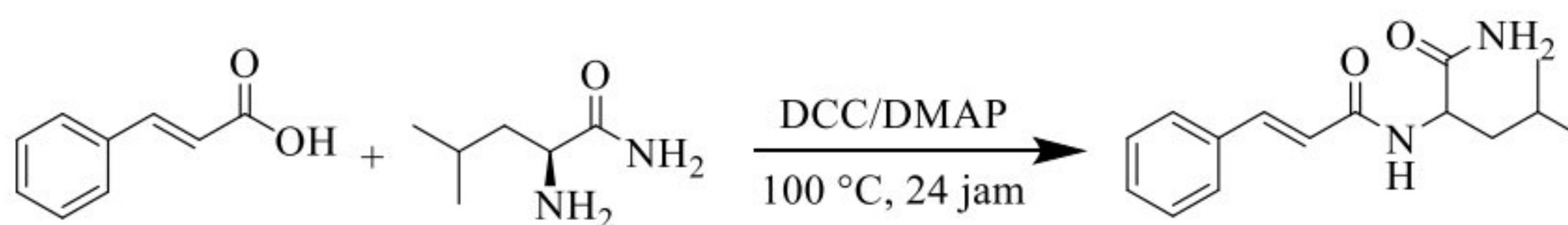
HASIL DAN PEMBAHASAN

Sintesis senyawa 2-sinamamido-4-metilpentanamida dan *N*-(2-hidroksi propanoil)sinamamida telah berhasil dilakukan. Proses tersebut dilakukan melalui reaksi amidasi antara gugus karboksilat dari asam sinamat dan gugus -NH₂ dari reagen *L*-leusinamid dan laktamid menggunakan reagen kopling karbodiimida hingga menghasilkan senyawa turunan amida asam sinamat. Senyawa murni hasil reaksi dilanjutkan dengan karakterisasi menggunakan FTIR, GCMS-MS, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR, kemudian diuji aktivitas antibakterinya secara *in vitro* menggunakan metode difusi cakram dan *in silico* melalui *molecular docking*.

4.1 Sintesis Senyawa Turunan Asam Sinamat

4.1.1 Sintesis Senyawa 2-sinamamido-4-metilpentanamida (CAD-1)

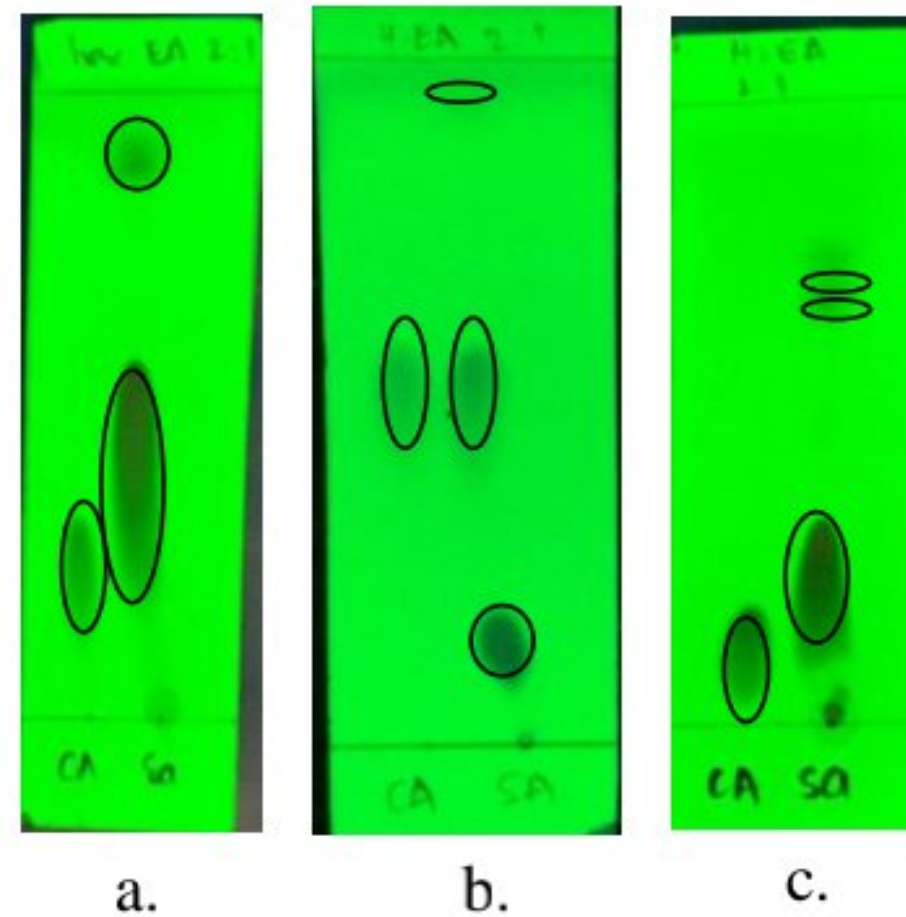
Sintesis senyawa CAD-1 dilakukan dengan mereaksikan asam sinamat dengan *L*-leusinamid menggunakan reagen DCC/DMAP. Persamaan reaksi pembentukan senyawa CAD-1 ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 10. Persamaan reaksi pembentukan 2-sinamamido-4-metilpentanamida (CAD-1)

Reaksi dilakukan pada suhu 100 °C dalam kondisi refluks selama 24 jam dan dilakukan *monitoring* menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) pada 3 jam,

6 jam, dan 24 jam melalui perbandingan nilai Rf antara *starting material* dan produk amidasi. Kromatogram hasil *monitoring* dapat dilihat pada Gambar 11.



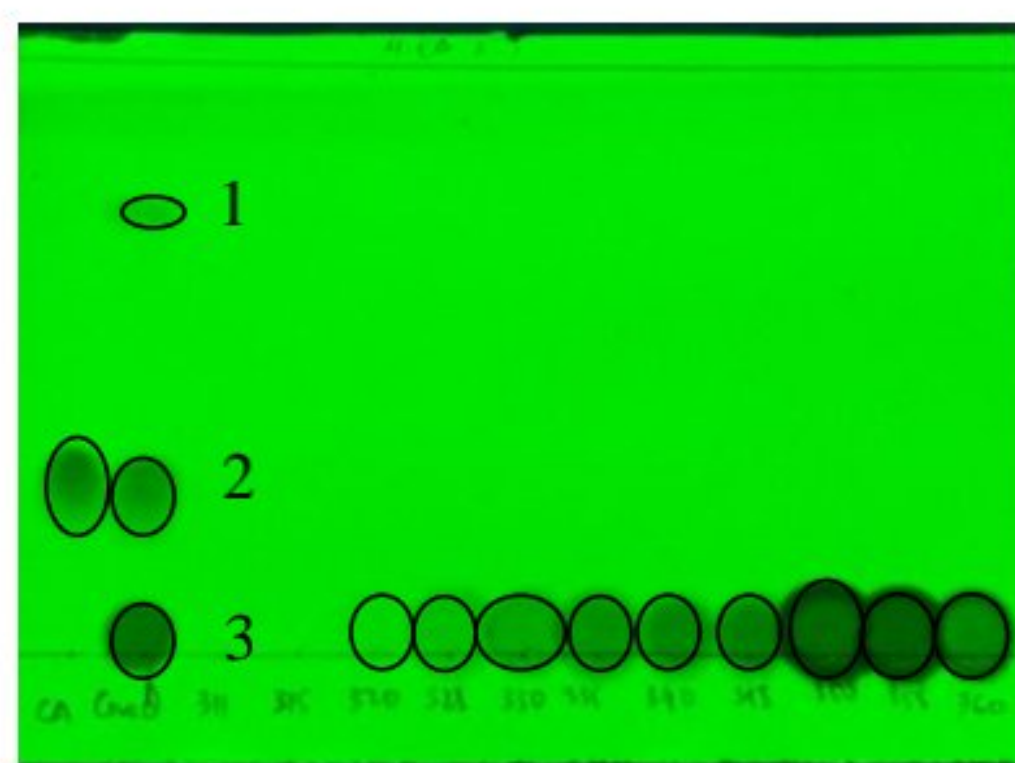
Gambar 11. *Monitoring* waktu refluks menggunakan KLT (*n*-heksana : etil asetat 2 : 1) (a) jam ke-3, (b) jam ke-6, (c) jam ke-24 (CA : asam sinamat; SA : produk reaksi)

Pada jam ke-24 spot kanan memiliki perbedaan nilai Rf yang cukup signifikan antara *starting material* dan produk sehingga proses reaksi dihentikan. Hasil reaksi dilanjutkan pemisahan menggunakan metode ekstraksi cair-cair. Pelarut ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini yaitu etil asetat dan akuades karena diharapkan dapat menarik senyawa yang bersifat polar akan tertarik ke bagian polar dan senyawa yang bersifat nonpolar akan tertarik ke bagian nonpolar (*like dissolve like*). Fase etil asetat hasil ekstraksi diambil dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan dengan MgSO_4 anhidrat yang bertujuan untuk mengikat molekul air yang masih terdapat pada hasil fraksi etil asetat. Selanjutnya dilakukan filtrasi kemudian ditampung ke labu bulat 500 mL untuk dievaporasi menggunakan *rotary evaporator*. Hasil evaporasi kemudian dilakukan *monitoring* menggunakan KLT seperti pada Gambar 12.



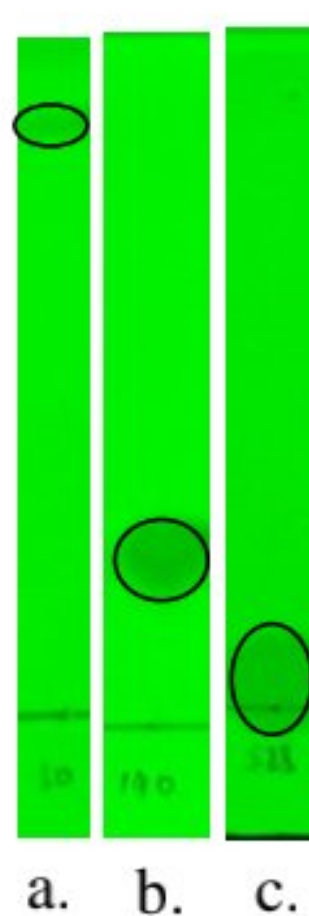
Gambar 12. *Monitoring* hasil evaporasi menggunakan KLT (*n*-heksana : etil asetat 2 : 1) (CA : asam sinamat; leusinamid : produk reaksi)

Analisis kualitatif menggunakan KLT pada hasil evaporasi terdapat 3 spot. *Crude* hasil evaporasi dilakukan pemisahan menggunakan kolom kromatografi gravitasi (KKG) untuk memperoleh senyawa murni. Pemisahan dilakukan menggunakan eluen *n*-heksana dan etil asetat 50:1 sebagai pelarut dalam kolom. *Crude* hasil evaporasi ditambahkan dengan silika gel dan digerus hingga harus lalu dimasukkan ke dalam kolom di bagian ujung atas kolom. Proses pemisahan akan terjadi dengan adanya gravitasi dimana eluen atau pelarut akan melewati kolom. Hasil kolom dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebagai tampungan, kemudian dilakukan *monitoring* menggunakan KLT dengan eluen *n*-heksana : etil asetat 2:1 (Reynaldi dkk., 2021). Hasil *monitoring* KLT dengan spot yang sama kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* dan disimpan ke dalam botol vial. Botol vial yang berisi senyawa tunggal tersebut dilakukan rekristalisasi dengan menambahkan pelarut etil asetat, kemudian filtrasi hingga diperoleh padatan putih. Senyawa tunggal hasil pemisahan kolom terdapat pada spot 3 yang mana merupakan spot yang paling dominan (Gambar 13).



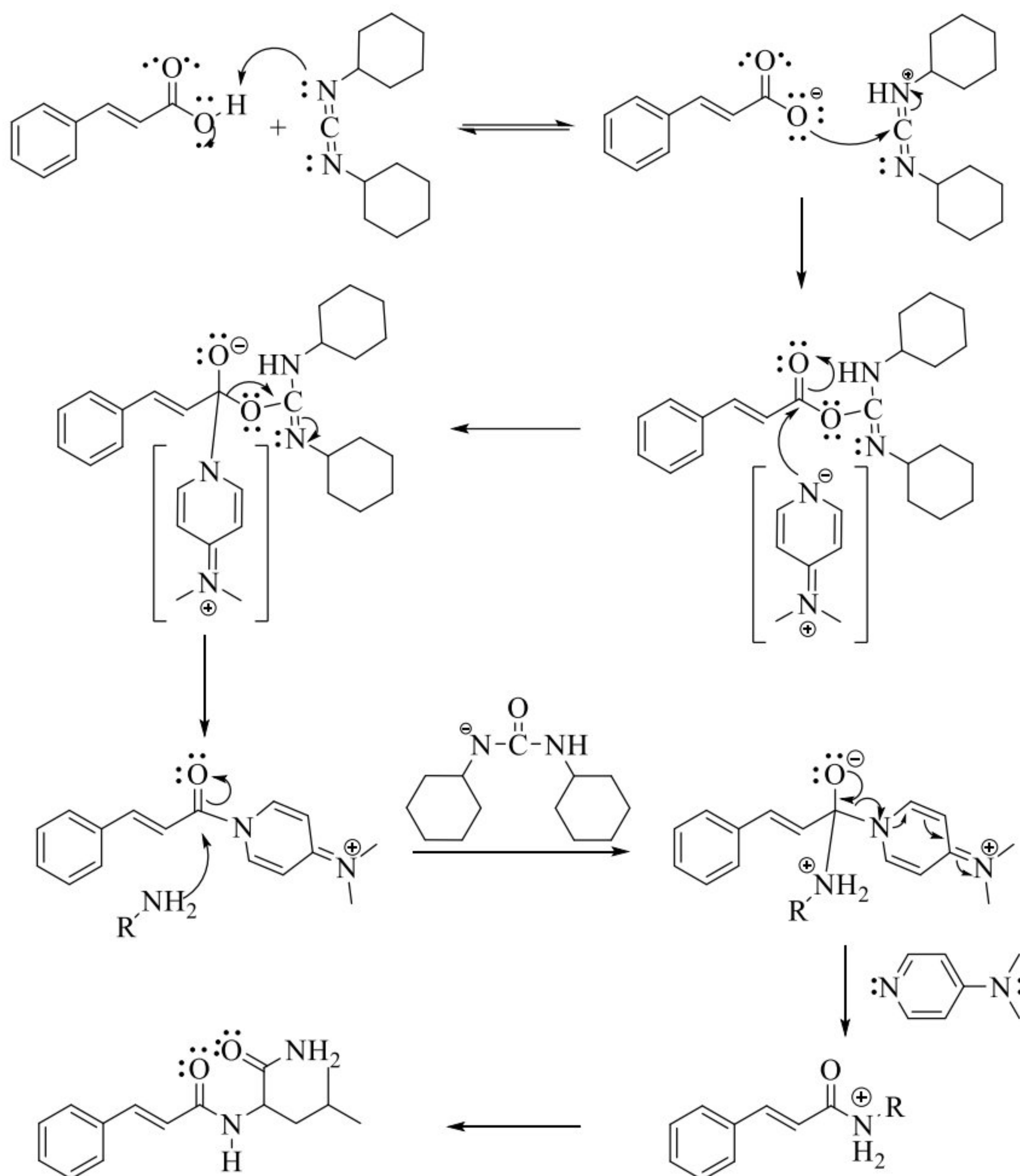
Gambar 13. *Monitoring* tampungan hasil KKG menggunakan KLT (*n*-heksana : etil asetat 2 : 1) (CA : asam sinamat; *Crude* : *crude* hasil evaporasi reaksi; 311-360 : tampungan kolom)

Senyawa tunggal hasil pemisahan dilanjutkan dengan pengujian kemurnian senyawa yang dilakukan dengan menggunakan metode KLT sistem tiga eluen. Timbulnya noda tunggal pada plat KLT Gambar 14 menunjukkan bahwa senyawa CAD-1 telah bebas dari pengotor atau murni. Senyawa hasil pemisahan yang diperoleh memiliki karakteristik berbentuk padat berwarna putih dengan persentase rendemen 22,13% dan titik leleh sebesar 170 °C. Rendemen hasil sintesis yang rendah dapat diakibatkan karena waktu yang digunakan saat reaksi belum teroptimasi sehingga reaksi belum berlangsung secara optimal.



Gambar 14. Kromatogram senyawa CAD-1 dengan menggunakan sistem tiga eluen (a) *n*-heksana : etil asetat (6:1), (b) *n*-heksana : etil asetat (4:1), dan (c) *n*-heksana : etil asetat (2:1)

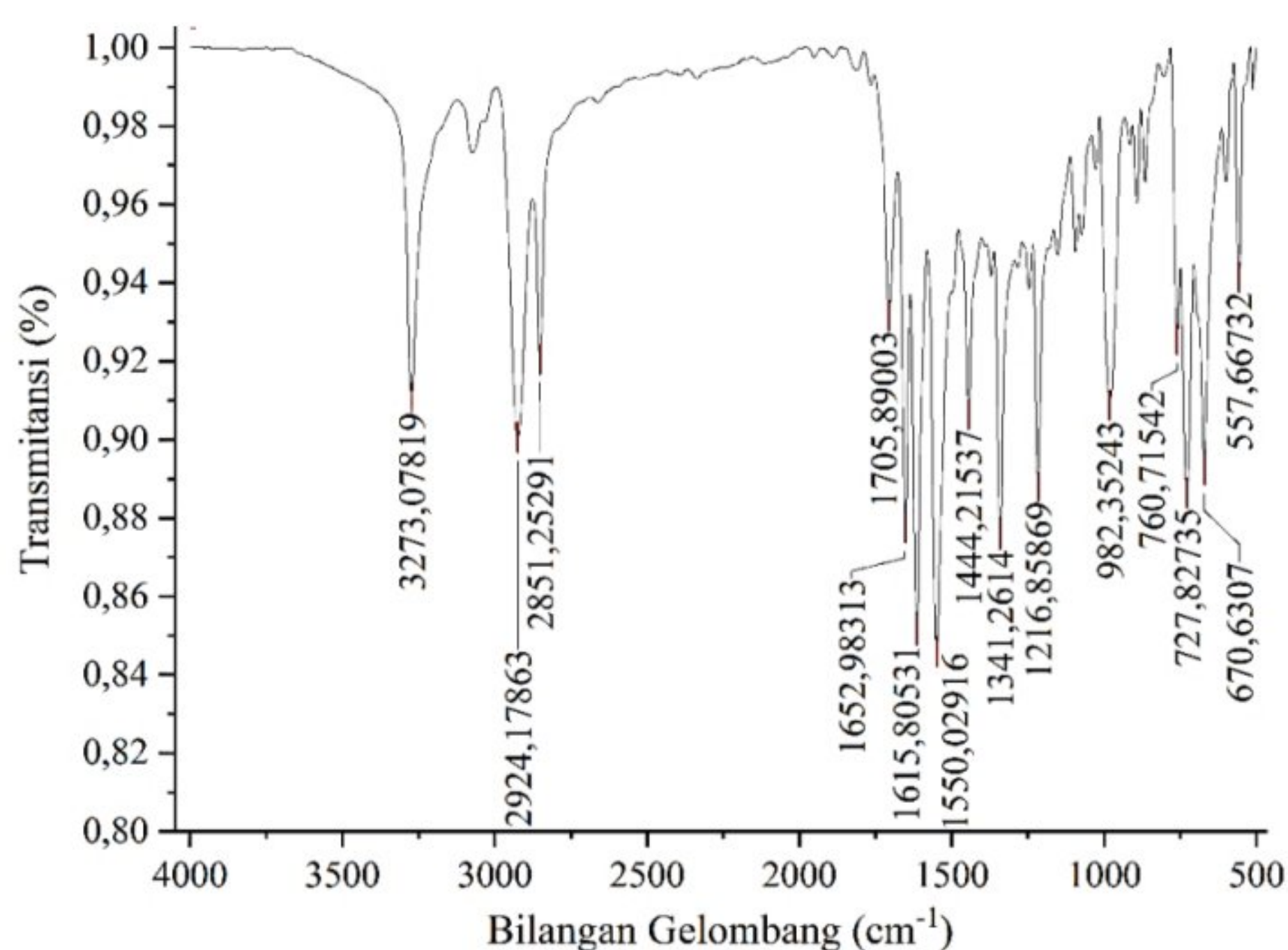
Adapun mekanisme reaksi amidasi asam sinamat dengan reagen *L*-leusinamid yang telah dilakukan disajikan pada Gambar 15.



Gambar 15. Mekanisme reaksi sintesis senyawa 2-sinamamido-4-metilpentanamida (CAD-1)

Senyawa murni hasil amidasi telah dikarakterisasi menggunakan FTIR. Spektrum FTIR pada senyawa CAD-1 disajikan pada Gambar 16. Berdasarkan spektrum FTIR tersebut menunjukkan adanya pita serapan tunggal dan tajam pada

bilangan gelombang $3273,01\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan adanya gugus -NH . Hal ini diperkuat oleh adanya pita serapan pada gelombang $1341,04\text{ cm}^{-1}$ yang berasal dari vibrasi rentangan C-N . Serapan pada bilangan gelombang $1705,86\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus C=O amida yang terkonjugasi. Spektrum pada bilangan gelombang $2851,59\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus C-H sp^3 *stretching*. Hal ini didukung oleh adanya serapan pada bilangan gelombang $1370,50\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan adanya gugus CH_3 *bending*.



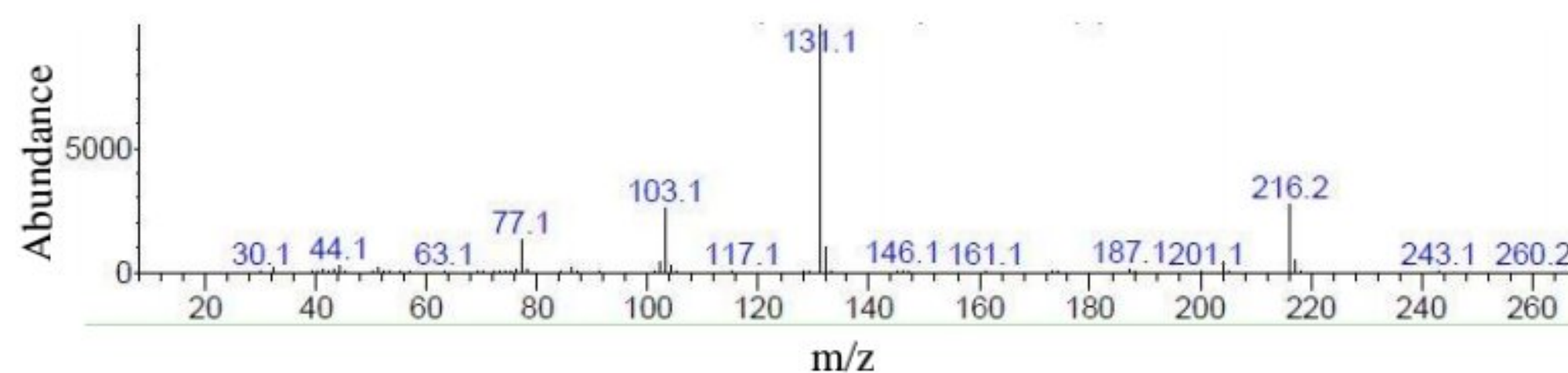
Gambar 16. Spektrum FTIR senyawa CAD-1

Keberadaan gugus C-H sp^2 *stretching* pada gambar ditunjukkan pada bilangan gelombang $2924,03\text{ cm}^{-1}$ yang didukung oleh adanya pita serapan pada bilangan gelombang $1444,64\text{ cm}^{-1}$ dan $1615,47\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan adanya gugus CH_2 *bending* dan C=C aromatik. Gugus C=C olefin pada senyawa ditunjukkan oleh serapan pada bilangan gelombang $1652,44\text{ cm}^{-1}$. Pita serapan yang terdapat dalam spektrum FTIR pada Lampiran 7 secara singkat dipaparkan pada Tabel 1.

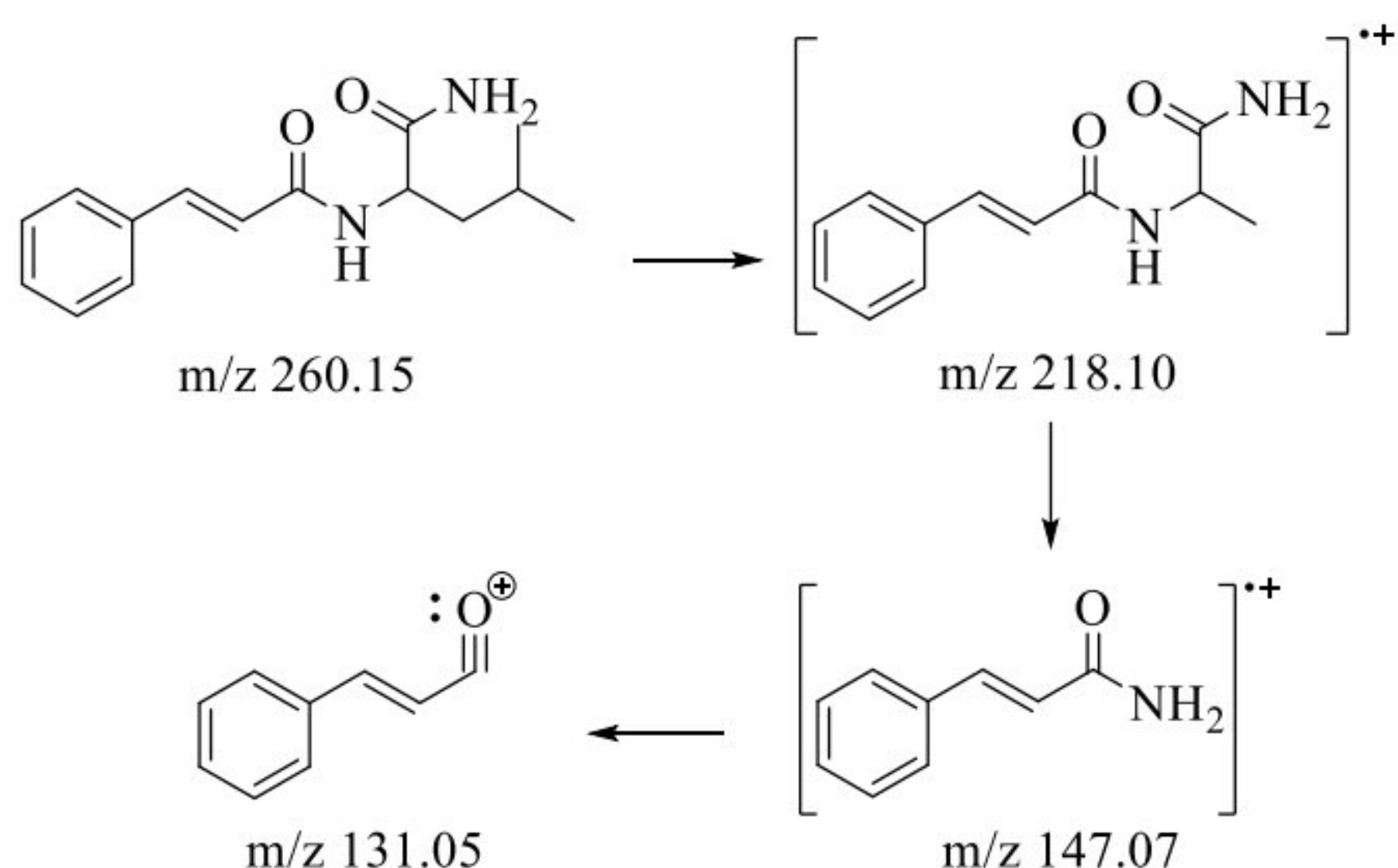
Tabel 1. Interpretasi Spektrum FTIR Senyawa CAD-1 (Pavia dkk., 2021)

Bilangan Gelombang CAD-1 (cm ⁻¹)	Bilangan Gelombang Teoritis (cm ⁻¹)	Vibrasi Ikatan
1615,47	1600 dan 1475	C=C aromatik
1652,44	1680-1600	C=C olefin
2924,03	3100-3000	C-H sp ² <i>stretching</i>
1705,86	1725-1700	C=O
3273,01	3500-3100	N-H <i>stretching</i>
1341,04	1350-1000	C-N
1370,50	1450 dan 1375	CH ₃ <i>bending</i>
2851,59	3000-2850	C-H sp ³ <i>stretching</i>
1444,64	1465	CH ₂ <i>bending</i>

Spektrum massa yang dihasilkan dari analisis senyawa CAD-1 menggunakan instrument GCMS-MS disajikan pada Lampiran 9. Data kromatogram MS menunjukkan adanya keberadaan senyawa dengan berat molekul atau m/z sekitar 260 pada waktu retensi sebesar 24,424 menit. Spektrum massa senyawa CAD-1 dapat dilihat pada Gambar 17.

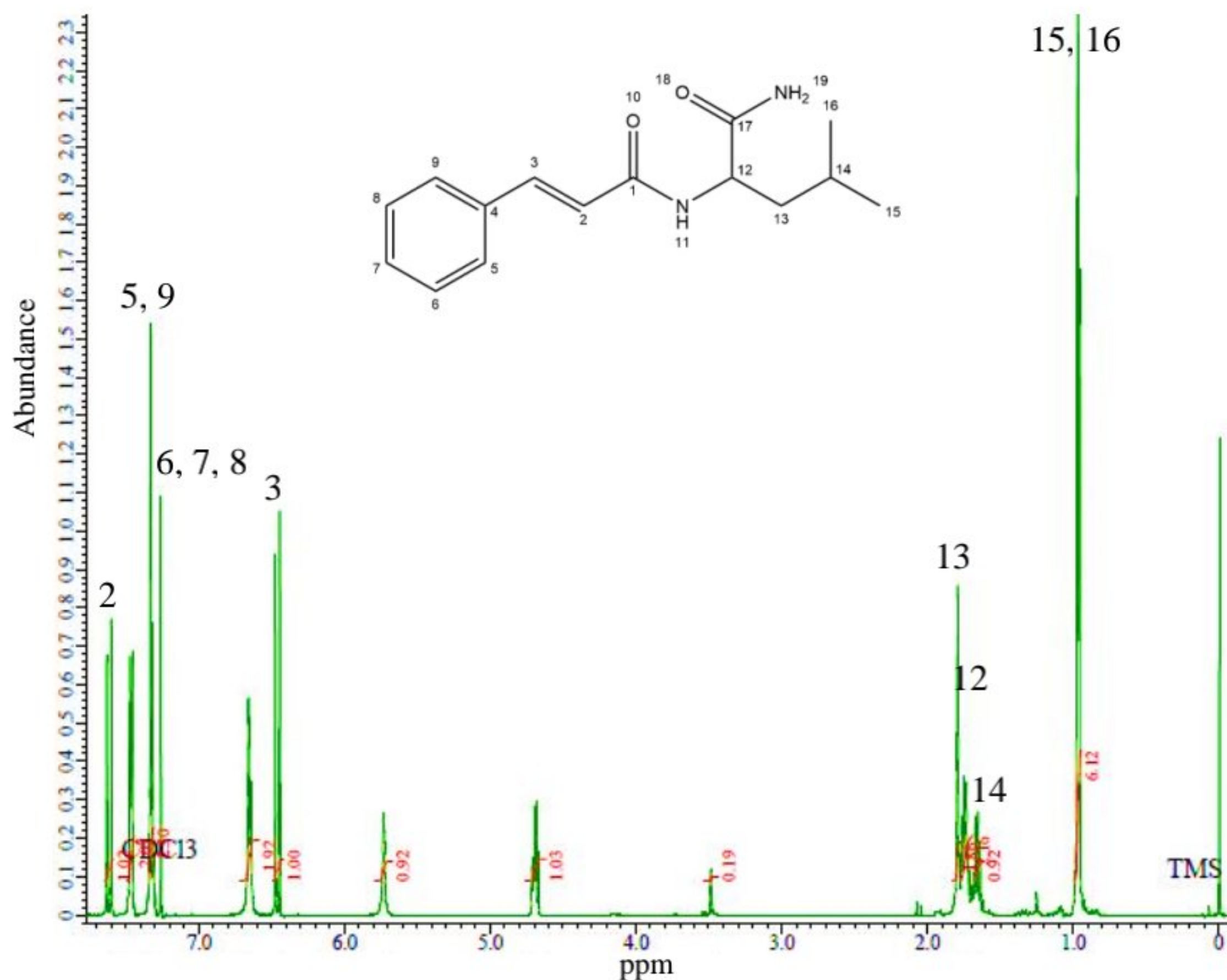
**Gambar 17.** Spektrum massa senyawa CAD-1

Pola fragmentasi senyawa CAD-1 ditunjukkan pada Gambar 18. Ion molekular m/z 260,2 mengalami fragmentasi melepaskan isopropil membentuk fragmen m/z 216,2. Fragmen m/z 216,2 melepaskan -NH₂ dan -C=O membentuk fragmen m/z 161,1. Fragmen m/z 161,1 melepaskan -NH₂ sehingga membentuk fragmen m/z 131,1. Berikut ini merupakan pola fragmentasi senyawa yang diusulkan:



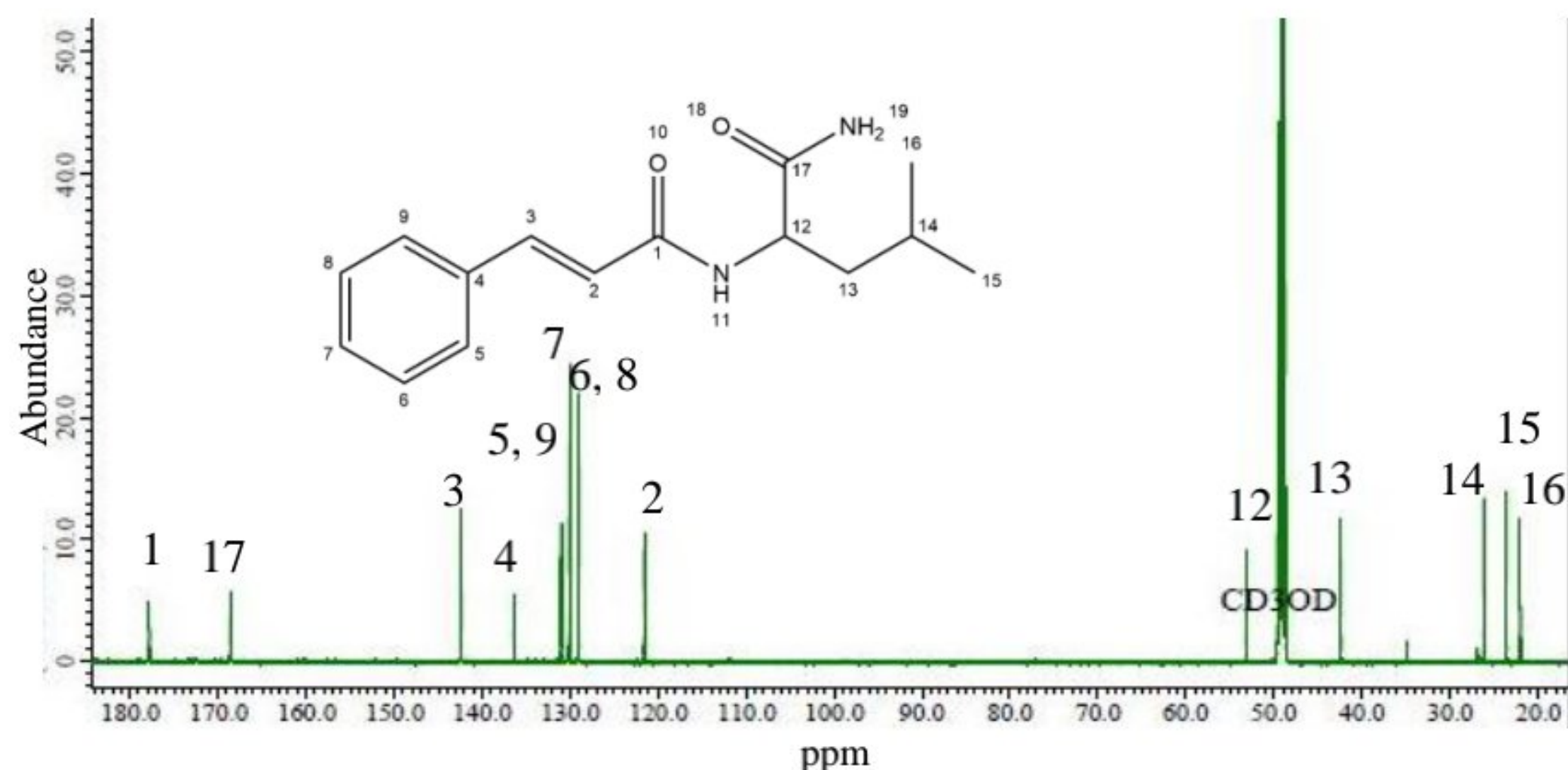
Gambar 18. Pola fragmentasi senyawa CAD-1

Analisis selanjutnya terhadap senyawa CAD-1 yaitu menggunakan ^1H -NMR. Berdasarkan data FTIR dan GCMS-MS, senyawa hasil sintesis memiliki gugus karbonil dan amida. Hal ini diperkuat dengan data hasil spektrum ^1H -NMR yang ditunjukkan pada Gambar 19 terlihat adanya 12 puncak proton yang berbeda dimiliki oleh senyawa CAD-1. Keberadaan gugus *cis trans* pada nomor 2 dan 3 masing-masing muncul sebagai *doublet* ($J_2 = 16\text{ Hz}$ dan $J_3 = 15,5\text{ Hz}$) pada daerah serapan 7,631 dan 6,474 ppm. Proton pada atom karbon nomor 5 dan 9 muncul sebagai *multiplet* ($J_5 = 1,5\text{ Hz}$ dan $J_6 = 1,5\text{ Hz}$) pada daerah serapan 7,474 ppm. Proton pada atom karbon 6, 7, dan 8 muncul sebagai *multiplet* ($J_6 = 1,5\text{ Hz}$, $J_7 = 1,5\text{ Hz}$, dan $J_8 = 1,5\text{ Hz}$) pada 7,340 ppm. Proton pada atom karbon nomor 12 muncul sebagai *doublet* ($J_{12} = 7\text{ Hz}$) pada serapan 1,791 ppm. Proton pada gugus CH_2 yang ditunjukkan dengan nomor atom karbon 13 muncul sebagai *doublet* ($J_{13} = 7\text{ Hz}$) pada 1,761 ppm. Proton pada atom karbon 14 muncul sebagai *multiplet* ($J_{14} = 3,5\text{ Hz}$) pada daerah 1,677 ppm. Proton pada gugus metil $-\text{CH}_3$ pada atom karbon nomor 15 dan 16 muncul sebagai *multiplet* ($J_{15} = 4,5\text{ Hz}$ dan $J_{16} = 4,5\text{ Hz}$) pada daerah 0,975 ppm.



Gambar 19. Spektrum ^1H -NMR senyawa CAD-1

Data hasil spektrum ^{13}C -NMR pada senyawa CAD-1 disajikan pada Gambar 20. Senyawa CAD-1 memiliki 15 jumlah atom karbon yang terdiri dari 6 atom karbon pada cincin aromatik, 2 atom karbon pada sisi *cis trans*, 1 atom karbon pada gugus karbonil, dan 6 atom karbon sesuai pada struktur reagen yang direaksikan. Berdasarkan data FTIR, senyawa CAD-1 hasil sintesis memiliki gugus karbonil. Hal ini diperkuat dengan keberadaan sinyal ^{13}C -NMR dengan δ 177,799 ppm yang berasal dari karbon karbonil (C-1'). Karbon-karbon pada senyawa produk CAD-1 hasil dari reaksi sintesis asam sinamat dan reagen *L*-leusinamid ditunjukkan oleh 5 sinyal yaitu pada δ 53,141 ppm, δ 42,381 ppm, δ 26,169 ppm, δ 23,596 ppm, dan δ 22,003 ppm.



Gambar 20. Spektrum ^{13}C -NMR senyawa CAD-1

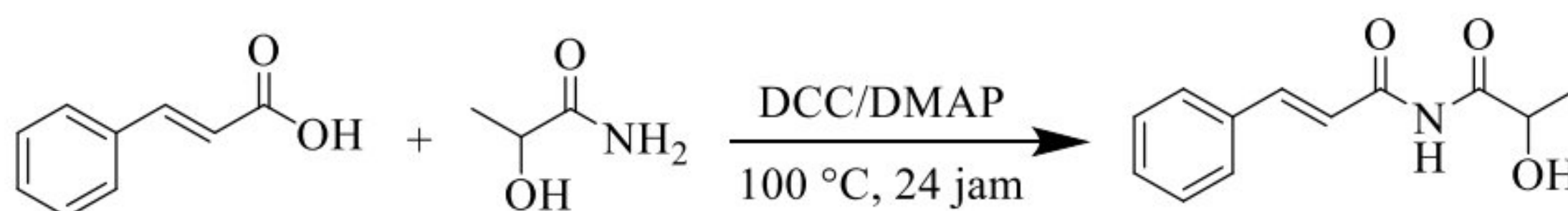
Sinyal pada δ 53,141 berasal dari gugus -CH yang berada pada atom karbon C-12'. Sinyal pada δ 42,381 ppm berasal dari karbon C-13'. Sinyal pada δ 26,169 ppm berasal dari karbon C-14'. Sinyal pada δ 23,596 ppm dan 22,003 ppm berasal dari karbon C-15' dan C-16'. Kedua karbon tersebut meskipun terikat pada atom C yang sama, namun memberikan sinyal yang berbeda. Berdasarkan data dari spektrum FTIR, GCMS-MS, ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR, senyawa hasil sintesis dapat dipastikan merupakan senyawa target yaitu CAD-1. Adapun data interpretasi spektrum ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR pada senyawa CAD-1 disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Interpretasi spektrum ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR senyawa CAD-1

Posisi	δC (ppm)	δH (ppm) (Σ , j, m)
1	177,799	-
2	121,580	7,631 (1 H, 16 Hz, <i>d</i>)
3	142,371	6,474 (1 H, 15,5 Hz, <i>d</i>)
4	136,352	-
5, 9	130,056	7,474 (2 H, 1,5 Hz, <i>m</i>)
6, 8	129,009	7,340 (2 H, 1,5 Hz, <i>m</i>)
7	131,015	7,340 (1 H, 1,5 Hz, <i>m</i>)
12	53,141	1,761 (1 H, 6 Hz, <i>d</i>)
13	42,381	1,791 (2 H, 7 Hz, <i>d</i>)
14	26,841	1,677 (1 H, 3,5 Hz, <i>m</i>)
15	23,596	0,975 (3 H, 4,5 Hz, <i>m</i>)
16	22,003	0,975 (3 H, 4,5 Hz, <i>m</i>)
17	168,604	-

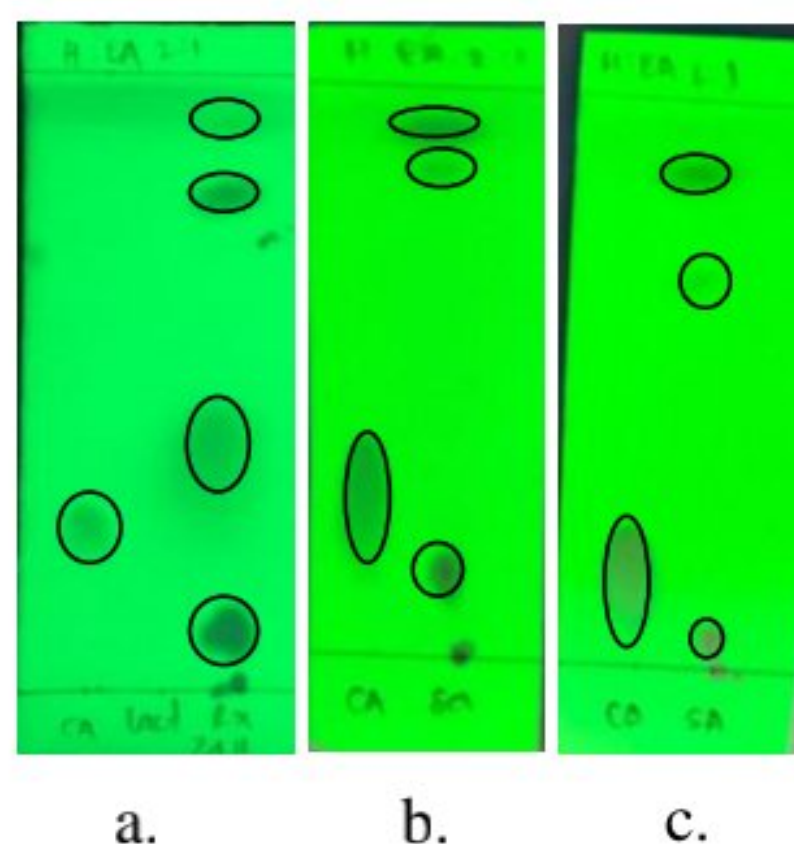
4.1.2 Sintesis Senyawa *N*-(2-hidroksipropanoil)sinamamida (CAD-2)

Sintesis senyawa CAD-2 dilakukan dengan mereaksikan asam sinamat dengan laktamid menggunakan reagen DCC/DMAP. Persamaan reaksi pembentukan senyawa CAD-2 sebagai berikut.



Gambar 21. Persamaan reaksi pembentukan *N*-(2-hidroksipropanoil)sinamamida (CAD-2)

Reaksi dilakukan menggunakan refluks pada suhu 100 °C selama 24 jam dan dilakukan *monitoring* menggunakan KLT pada 3 jam, 6 jam, dan 24 jam. Kromatogram hasil *monitoring* dapat dilihat pada Gambar 22.



Gambar 22. *Monitoring* waktu refluks menggunakan KLT (*n*-heksana : etil asetat 2 : 1) (a) jam ke-3, (b) jam ke-6, (c) jam ke-24 (spot kiri : asam sinamat; spot kanan : produk reaksi)

Pada jam ke-24 spot kanan memiliki perbedaan nilai *R_f* yang cukup signifikan antara *starting material* dan produk sehingga proses reaksi dihentikan. Hasil reaksi dilanjutkan dengan melakukan pemisahan menggunakan metode ekstraksi cair-cair untuk memperoleh spot tunggal. Pelarut ekstraksi yang

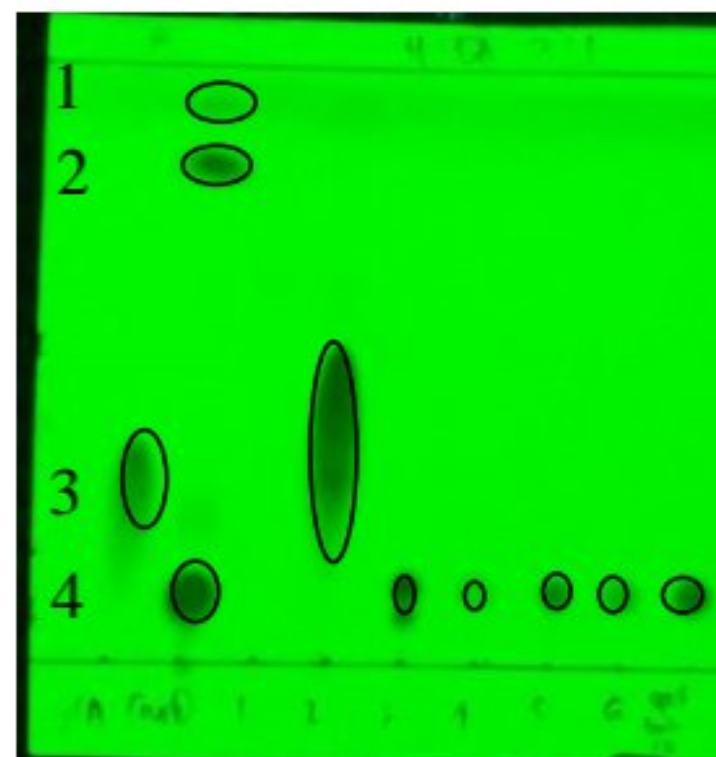
digunakan pada penelitian ini yaitu etil asetat dan akuades. Fase etil asetat hasil ekstraksi diambil dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan dengan MgSO_4 anhidrat yang bertujuan untuk mengikat molekul air yang masih terdapat pada hasil fraksi etil asetat. Selanjutnya dilakukan filtrasi kemudian ditampung ke labu bulat 500 mL untuk dievaporasi menggunakan *rotary evaporator*. *Crude* hasil evaporasi kemudian *dimonitoring* menggunakan KLT seperti pada Gambar 23.



Gambar 23. *Monitoring* hasil evaporasi menggunakan KLT (*n*-heksana : etil asetat 2 : 1) (spot kiri : asam sinamat; spot kanan : produk reaksi)

Analisis kualitatif menggunakan KLT pada hasil evaporasi terdapat 3 spot. *Crude* hasil evaporasi dilakukan pemisahan menggunakan kolom kromatografi gravitasi (KKG) untuk memperoleh senyawa murni. Pemisahan dilakukan menggunakan eluen *n*-heksana dan etil asetat 50 : 1 sebagai pelarut dalam kolom. *Crude* hasil evaporasi ditambahkan dengan silika gel dan digerus hingga halus lalu dimasukkan ke dalam kolom di bagian ujung atas kolom. Hasil kolom dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebagai tampungan, kemudian dilakukan *monitoring* menggunakan KLT dengan eluen *n*-heksana : etil asetat 2:1 (Reynaldi dkk., 2021). Hasil *monitoring* KLT dengan spot yang sama kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* dan disimpan ke dalam botol vial. Botol vial yang berisi senyawa tunggal tersebut dilakukan rekristalisasi dengan menambahkan pelarut etil asetat, kemudian filtrasi hingga diperoleh padatan putih. Senyawa tunggal hasil pemisahan

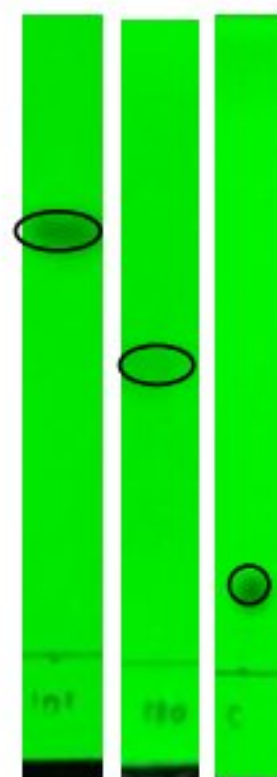
kolom terdapat pada spot 4 yang mana merupakan spot yang paling dominan (Gambar 24).



CA Crued 1 - 6

Gambar 24. Monitoring tampungan hasil KKG menggunakan KLT (*n*-heksana : etil asetat 2 : 1) (CA : asam sinamat; *Crude* : *crude* hasil evaporasi reaksi; 1 - 6 : tampungan kolom)

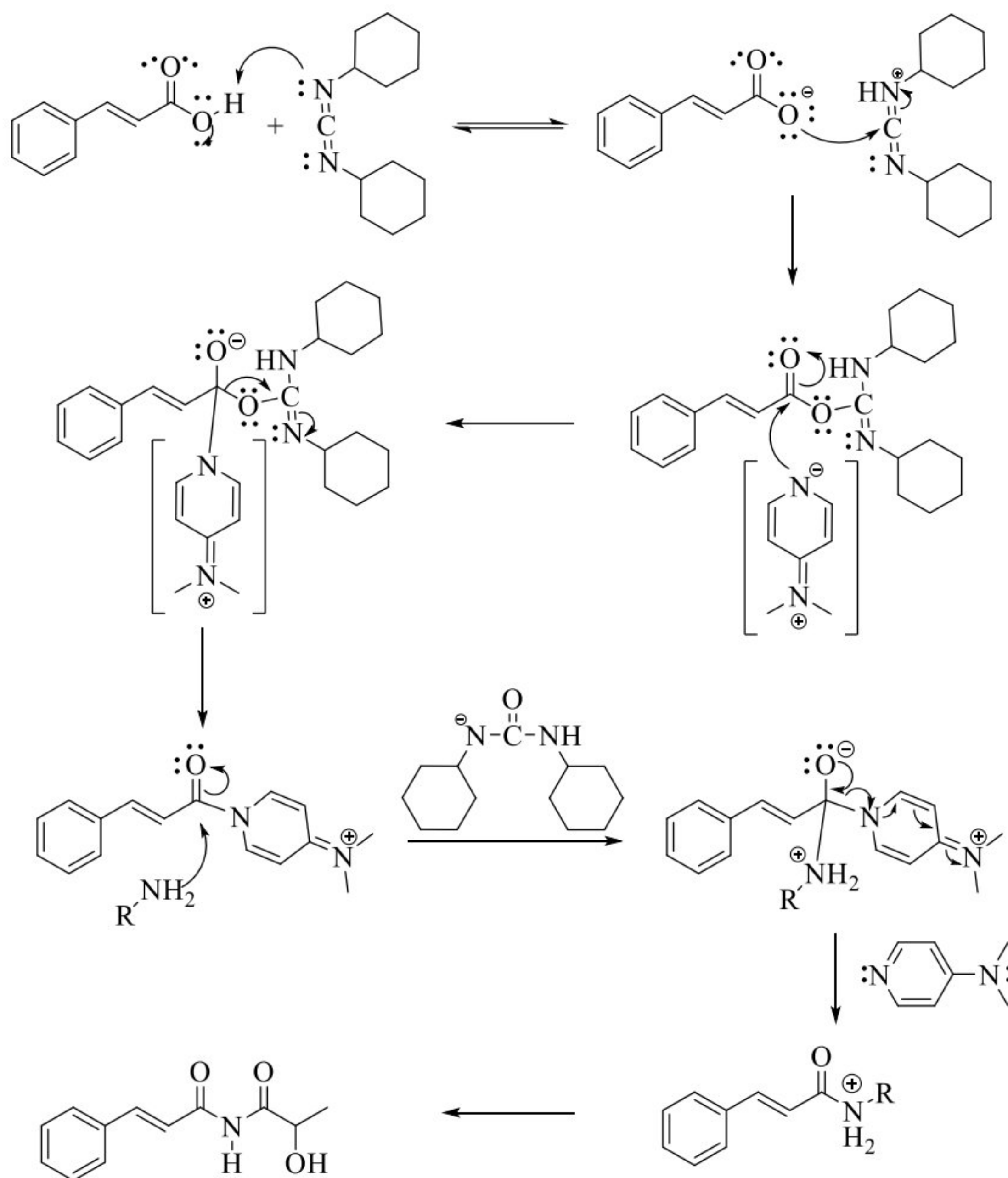
Senyawa tunggal hasil pemisahan dilanjutkan dengan pengujian kemurnian menggunakan metode KLT sistem tiga eluen. Timbulnya noda tunggal pada plat KLT Gambar 25 menunjukkan bahwa senyawa CAD-2 telah bebas dari pengotor. Senyawa hasil pemisahan yang diperoleh memiliki karakteristik berbentuk padat berwarna putih dengan persentase rendemen 25,20% dan titik leleh sebesar 180 °C. Rendemen hasil sintesis yang rendah dapat diakibatkan karena waktu yang digunakan saat reaksi belum berlangsung lama sehingga reaksinya belum optimal.



a. b. c.

Gambar 25. Kromatogram senyawa CAD-2 dengan menggunakan sistem tiga eluen (a) *n*-heksana : etil asetat (6:1), (b) *n*-heksana : etil asetat (4:1), dan (c) *n*-heksana : etil asetat (2:1)

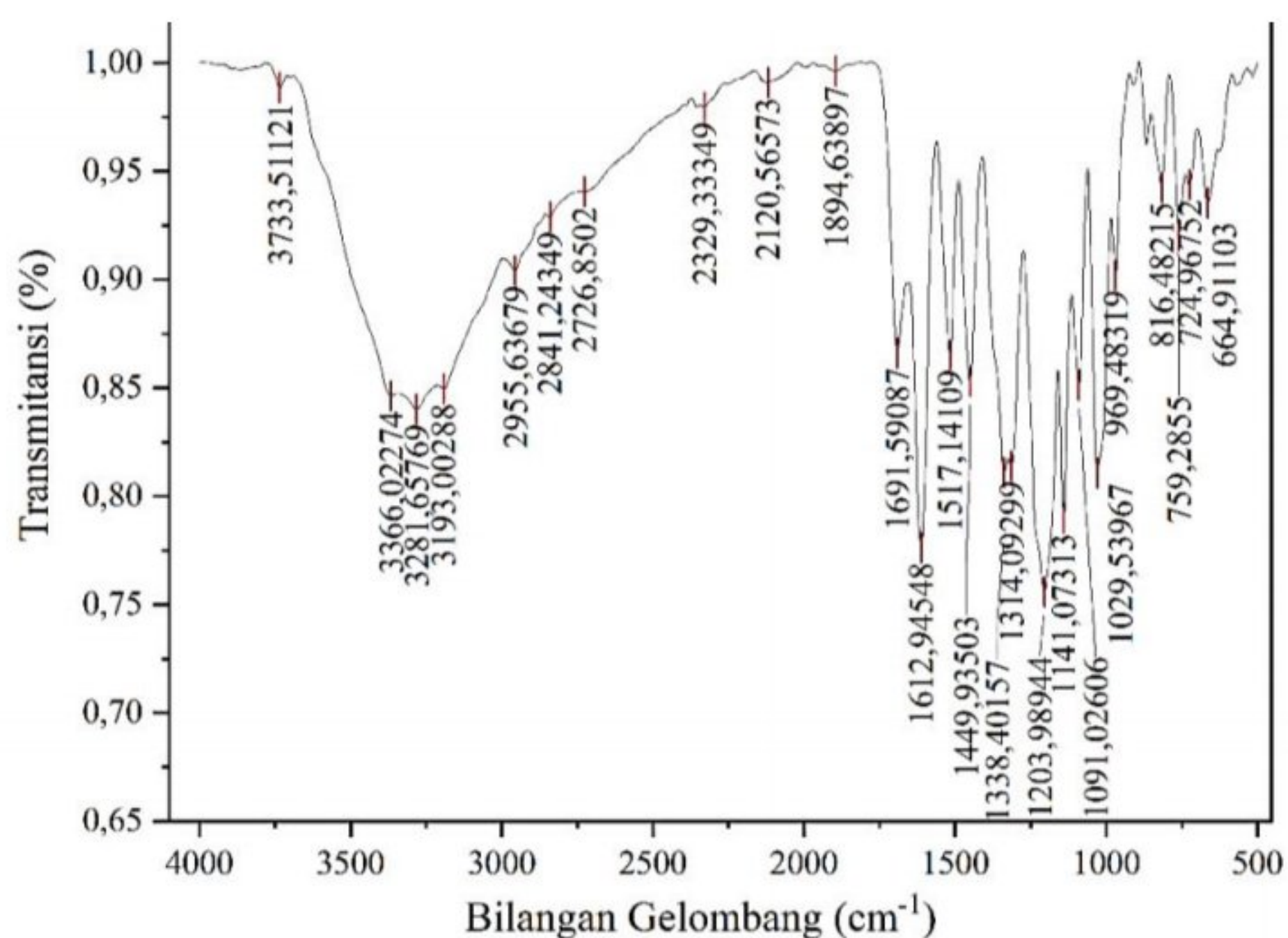
Adapun mekanisme reaksi amidasi asam sinamat dengan reagen laktamid yang telah dilakukan disajikan pada Gambar 26.



Gambar 26. Mekanisme reaksi sintesis senyawa *N*-(2-hidroksipropanoil)sinamamida (CAD-2)

Senyawa murni hasil amidasi telah dikarakterisasi menggunakan FTIR. Spektrum FTIR pada senyawa CAD-2 disajikan pada Gambar 27. Berdasarkan spektrum FTIR tersebut menunjukkan adanya pita serapan tunggal dan tajam pada

bilangan gelombang $3282,19\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan adanya gugus -NH. Hal ini diperkuat oleh adanya pita serapan pada gelombang $1450,36\text{ cm}^{-1}$ yang berasal dari vibrasi rentangan C-N. Spektrum pada bilangan gelombang $3365,97\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus O-H. Serapan pada bilangan gelombang $1691,00\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus C=O amida yang terkonjugasi. Spektrum pada bilangan gelombang $1337,83\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus CH_3 .



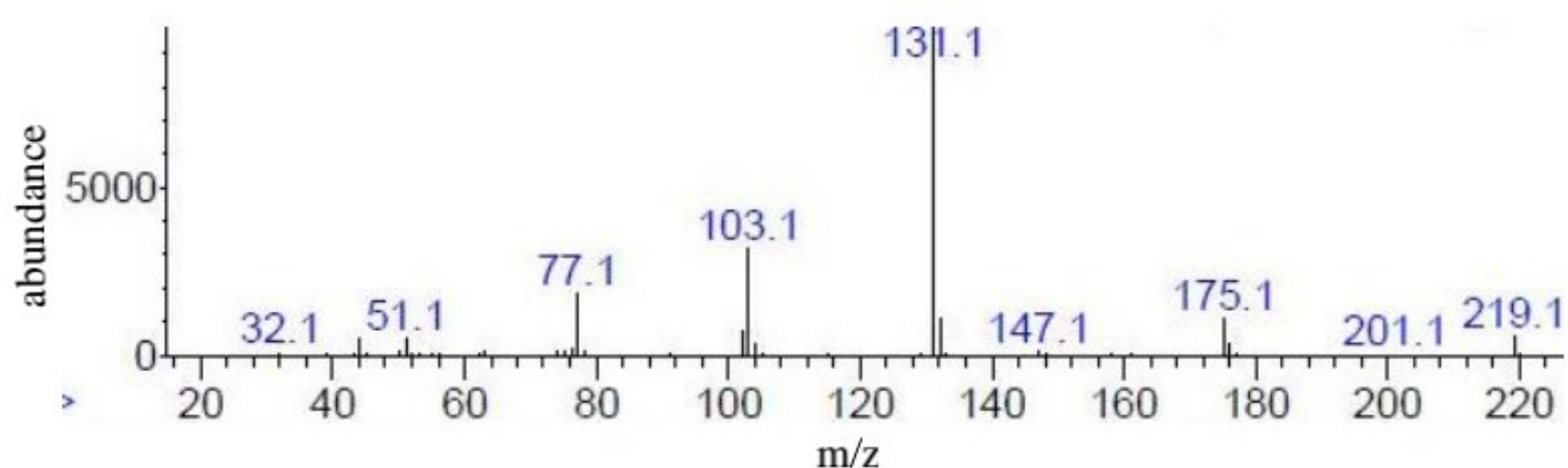
Gambar 27. Spektrum FTIR senyawa CAD-2

Keberadaan gugus C-H sp^2 stretching pada spektrum FTIR tersebut ditunjukkan pada bilangan gelombang $2955,69\text{ cm}^{-1}$ yang didukung oleh adanya pita serapan pada bilangan gelombang $1516,60\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan adanya gugus C=C aromatik. Gugus C=C olefin ditunjukkan oleh serapan pada bilangan gelombang $1612,41\text{ cm}^{-1}$. Pita serapan yang terdapat dalam spektrum FTIR senyawa CAD-2 pada Lampiran 8 secara singkat dipaparkan pada Tabel 3.

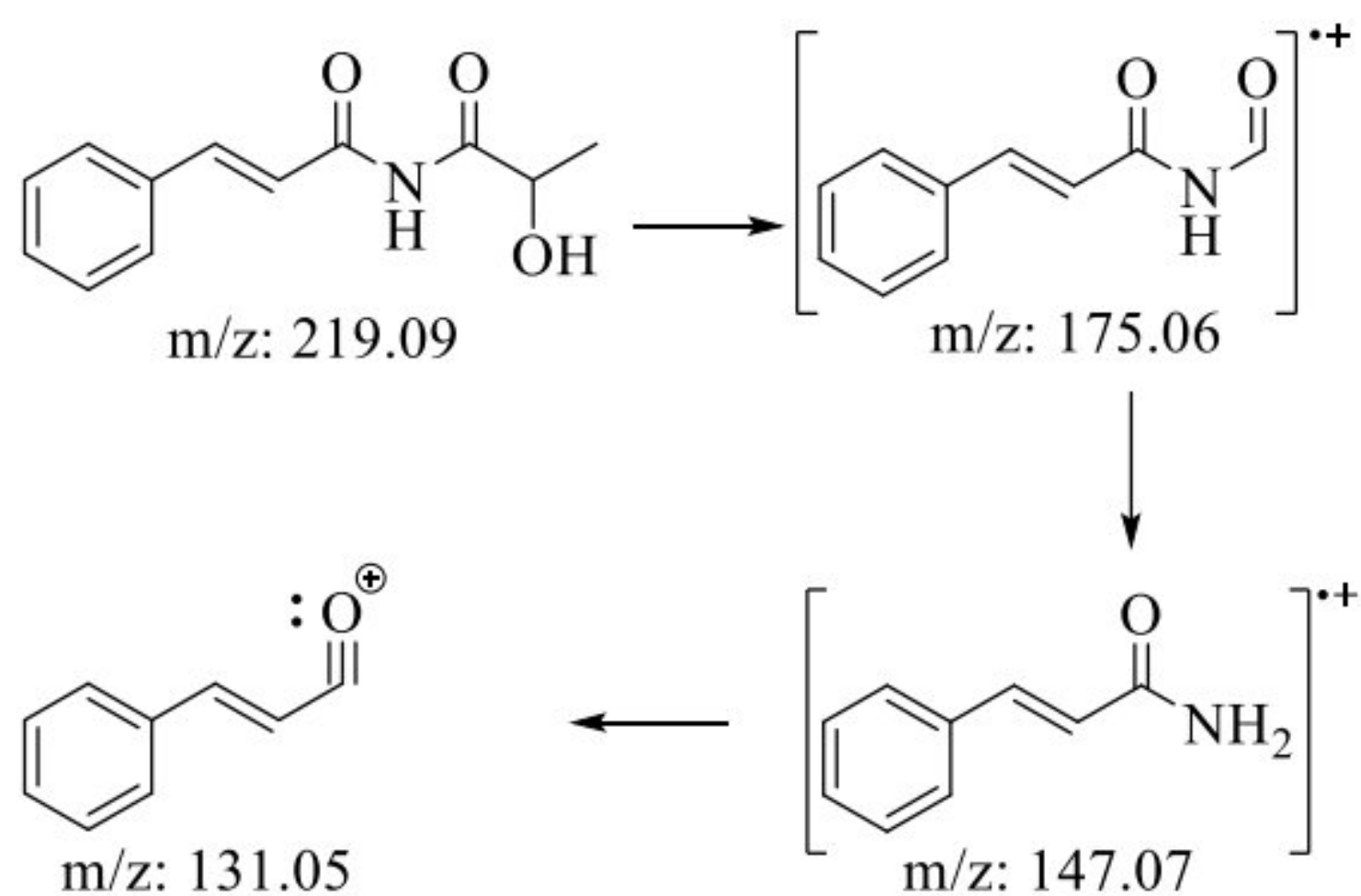
Tabel 3. Interpretasi Spektrum FTIR Senyawa CAD-2 (Pavia dkk., 2021)

Bilangan Gelombang (cm-1)	Bilangan Gelombang Teoritis (cm-1)	Vibrasi Ikatan
1516,60	1600 dan 1475	C=C aromatik
1612,41	1680-1600	C=C olefin
2955,69	3100-3000	C-H sp^2 stretching
1691,00	1725-1700	C=O
3282,19	3500-3100	N-H stretching
1450,36	1350-1000	C-N
1337,83	1450 dan 1375	CH ₃ bending
1204,42	1300-1000	C-O
3365,97	3400-2400	-OH karboksilat

Produk hasil reaksi amidasi juga dikarakterisasi dengan menggunakan GCMS-MS. Spektrum massa yang dihasilkan dari analisis senyawa CAD-2 menggunakan MS disajikan pada Lampiran 10. Data MS yang diperoleh menunjukkan adanya keberadaan senyawa dengan berat molekul atau m/z 219. Nilai m/z tersebut sesuai dengan berat molekul dari senyawa CAD-2 yaitu sebesar 219 g/mol. Hal tersebut menunjukkan telah terbentuknya senyawa CAD-2 seperti yang ditunjukkan pada Gambar 28.

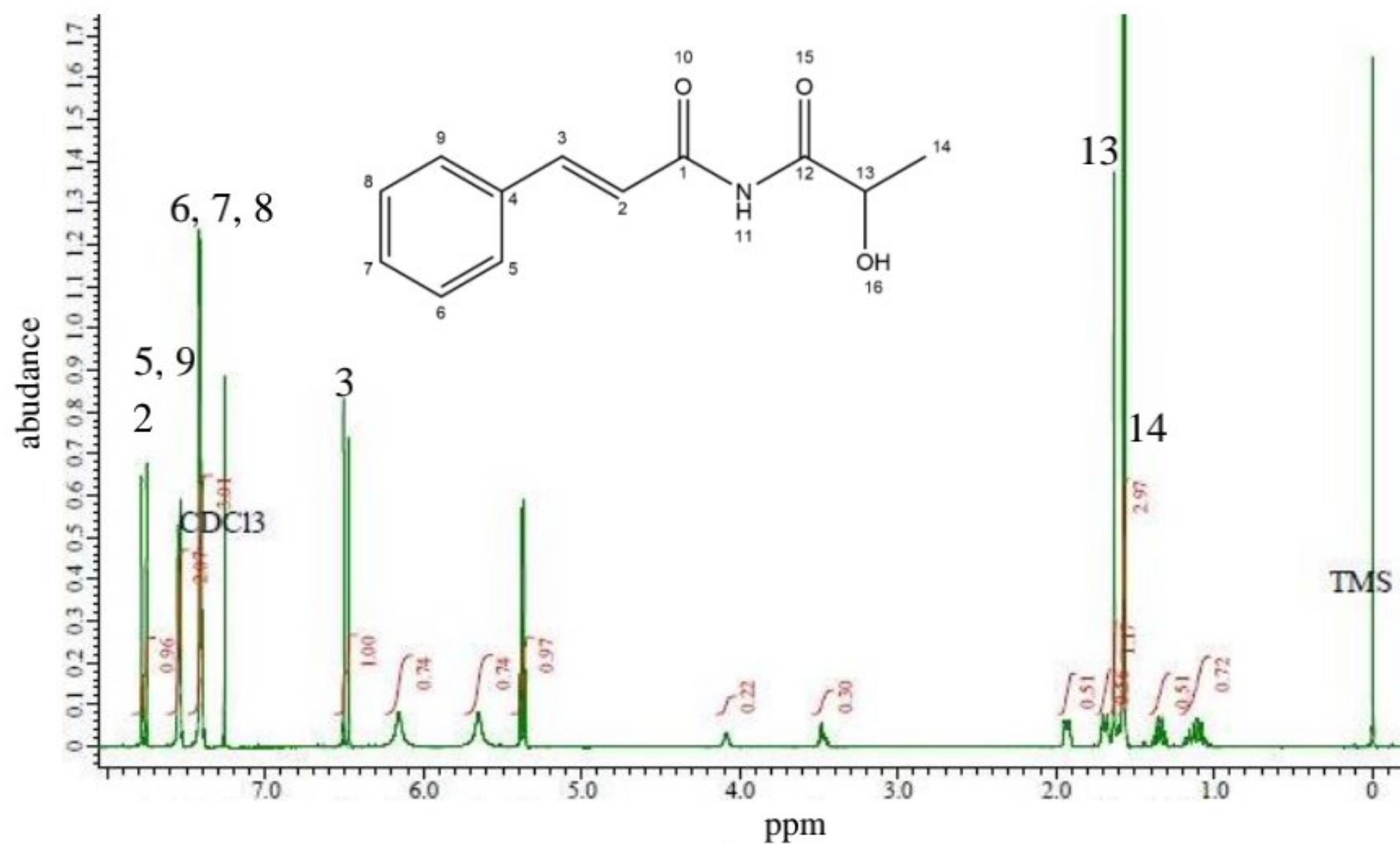
**Gambar 28.** Spektrum massa senyawa CAD-2

Pola fragmentasi senyawa CAD-2 ditunjukkan pada Gambar 29. Ion molekular m/z 219,1 mengalami fragmentasi melepaskan -CH₃, -CH, dan -OH membentuk fragmen m/z 175,1. Fragmen m/z 175,1 melepaskan -C=O membentuk fragmen m/z 147,1. Fragmen m/z 147,1 mengalami fragmentasi melepaskan -NH₂ membentuk fragmen m/z 131,1.



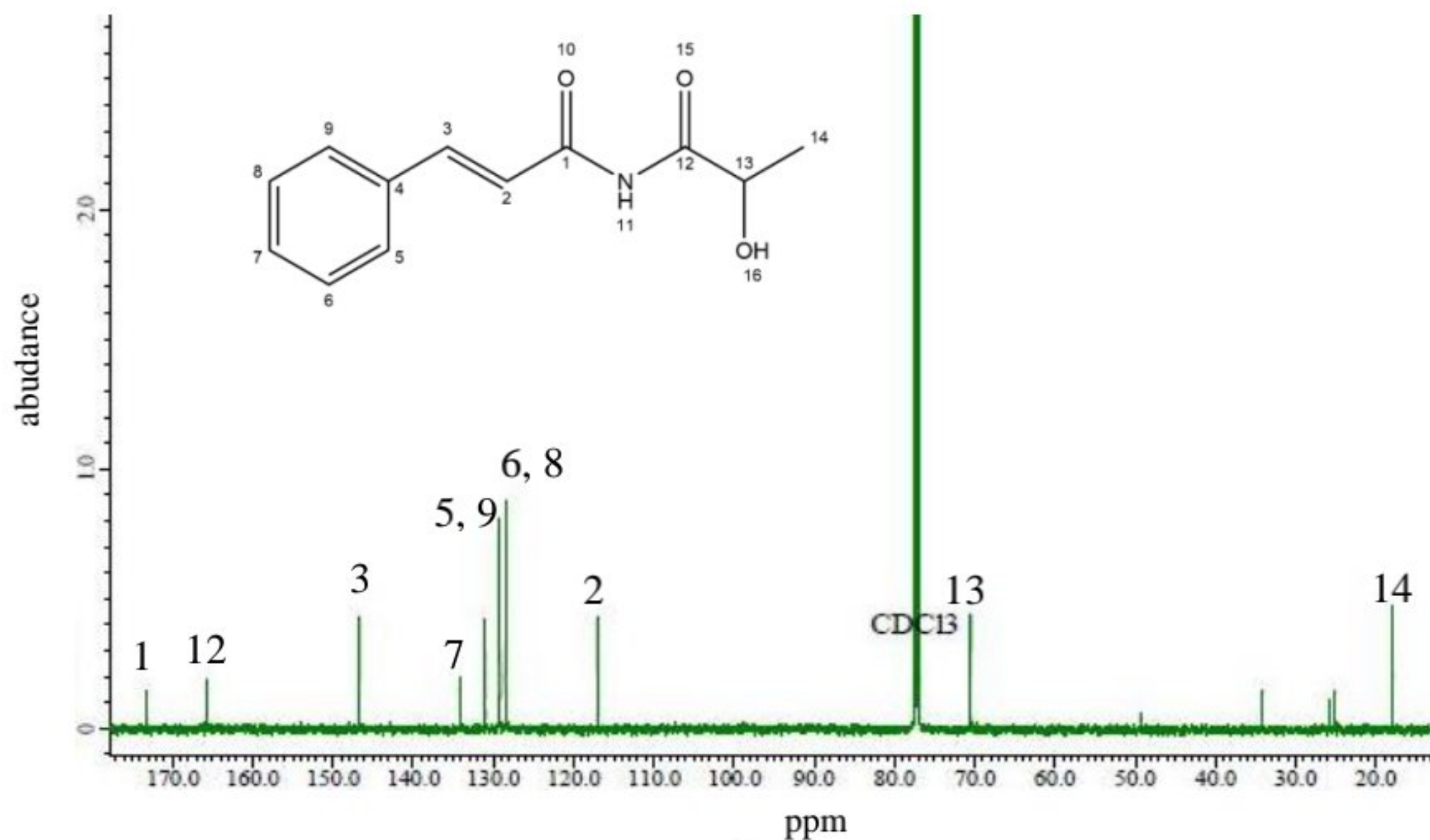
Gambar 29. Pola fragmentasi senyawa CAD-2

Analisis selanjutnya terhadap senyawa CAD-2 yaitu menggunakan spektroskopi ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR. Berdasarkan hasil spektrum ^1H -NMR yang ditunjukkan pada Gambar 30 terlihat adanya 11 puncak proton yang berbeda dimiliki oleh senyawa CAD-2. Keberadaan gugus *cis trans* pada nomor 2 dan 3 masing-masing muncul sebagai *doublet* ($J_2 = 16\text{ Hz}$ dan $J_3 = 15,5\text{ Hz}$) pada daerah serapan 7,783 dan 6,505 ppm. Proton pada atom karbon nomor 5 dan 9 muncul sebagai *multiplet* ($J_5 = 1,5\text{ Hz}$ dan $J_9 = 1,5\text{ Hz}$) pada daerah serapan 7,418 ppm. Proton pada atom karbon 6, 7, dan 8 muncul sebagai *multiplet* ($J_6 = 1,5\text{ Hz}$, $J_7 = 1,5\text{ Hz}$, dan $J_8 = 1,5\text{ Hz}$) pada 7,260 ppm. Proton pada gugus -CH yang ditunjukkan dengan nomor atom karbon 13 muncul sebagai *doublet* ($J_{13} = 7\text{ Hz}$) pada 1,633 ppm. Proton pada gugus metil -CH₃ atom karbon nomor 14 muncul sebagai *doublet* ($J_{14} = 7\text{ Hz}$) pada daerah 1,571 ppm.



Gambar 30. Spektrum ^1H -NMR senyawa CAD-2

Hasil spektrum ^{13}C -NMR senyawa CAD-2 ditunjukkan pada Gambar 31. Senyawa CAD-2 memiliki 12 atom karbon sesuai dengan strukturnya. Karbon-karbon pada senyawa produk CAD-2 yang diperoleh dari hasil reaksi sintesis asam sinamat dan reagen laktamid ditunjukkan oleh 3 sinyal yaitu pada δ 165,690 ppm, δ 70,500 ppm, dan δ 17,957 ppm.



Gambar 31. Spektrum ^{13}C -NMR senyawa CAD-2

Sinyal pada δ 165,690 berasal dari -C=O pada atom karbon C-12'. Sinyal pada δ 70,500 ppm berasal dari karbon C-13'. Sinyal pada δ 17,957 ppm berasal dari karbon C-14'. Berdasarkan data dari spektrum FTIR, GCMS-MS, ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR, senyawa hasil sintesis dapat dipastikan merupakan senyawa target yaitu CAD-2. Data interpretasi spektrum ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR pada senyawa CAD-2 disajikan dalam Tabel 4.

Tabel 4. Interpretasi spektrum ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR senyawa CAD-2

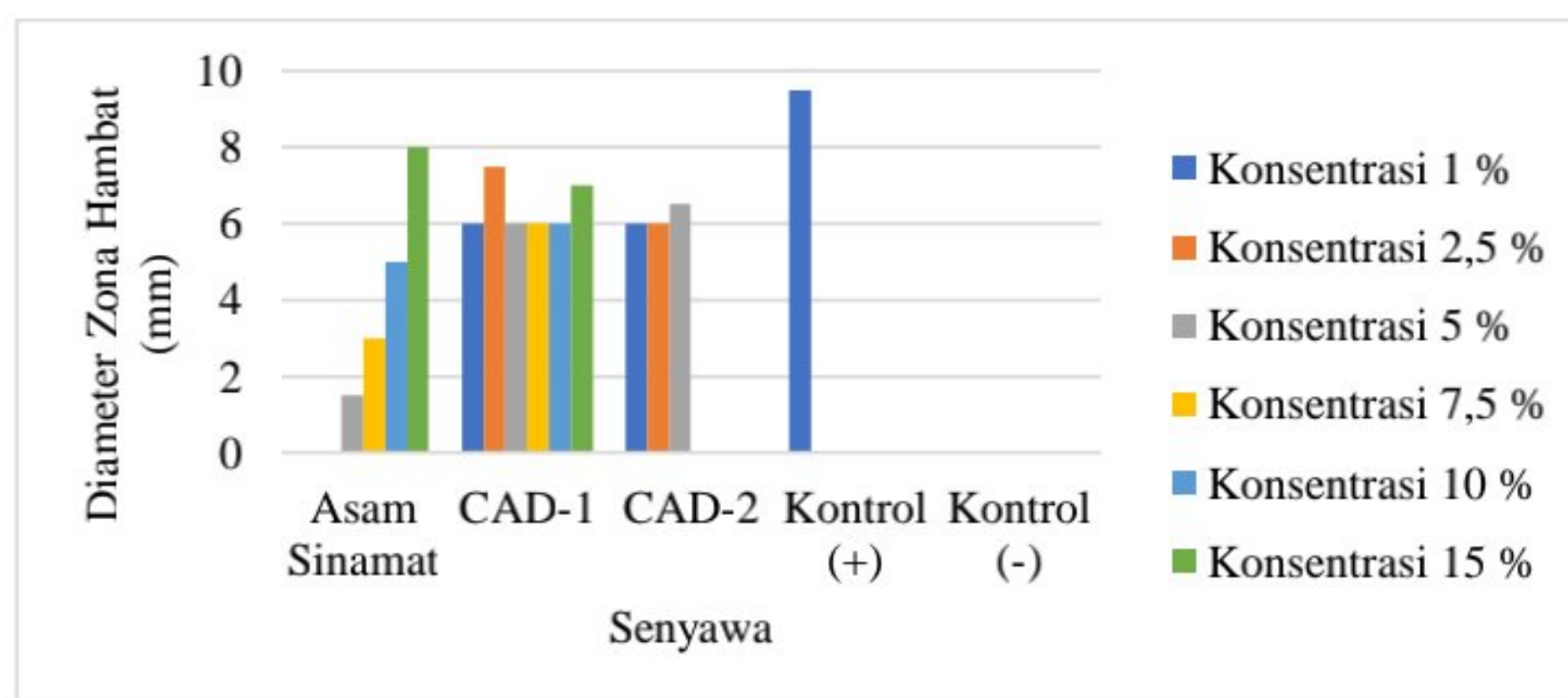
Posisi	δC (ppm)	δH (ppm) (Σ , j, m)
1	173,187	-
2	117,015	7,783 (1 H, 16 Hz, d)
3	146,675	6,505 (1 H, 16 Hz, d)
5, 9	129,206	7,418 (2 H, 1,5 Hz, m)
6, 8	128,438	7,260 (2 H, 1,5 Hz, m)
7	130,991	7,260 (1 H, 1,5 Hz, m)
12	165,690	-
13	70,500	1,633 (7 Hz, d)
14	17,957	1,571 (3 H, 7 Hz, d)

4.2 Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Turunan Asam Sinamat

Senyawa CAD-1 dan CAD-2 telah dianalisis aktivitas antibakterinya secara *in vitro* dengan metode difusi cakram. Proses pengujian aktivitas antibakteri dilakukan terhadap bakteri *metisilin-resisten S. aureus* (MRSA) dan *Escherichia coli*. Metode difusi cakram menjadi pilihan untuk tujuan klinis yang mempertimbangkan kesederhanaan teknik, ketelitian, metode serbaguna bagi semua bakteri patogen yang tumbuh cepat dan seringkali digunakan dalam uji kepekaan antibiotik dalam program pengendalian mutu (Manawan dkk., 2018).

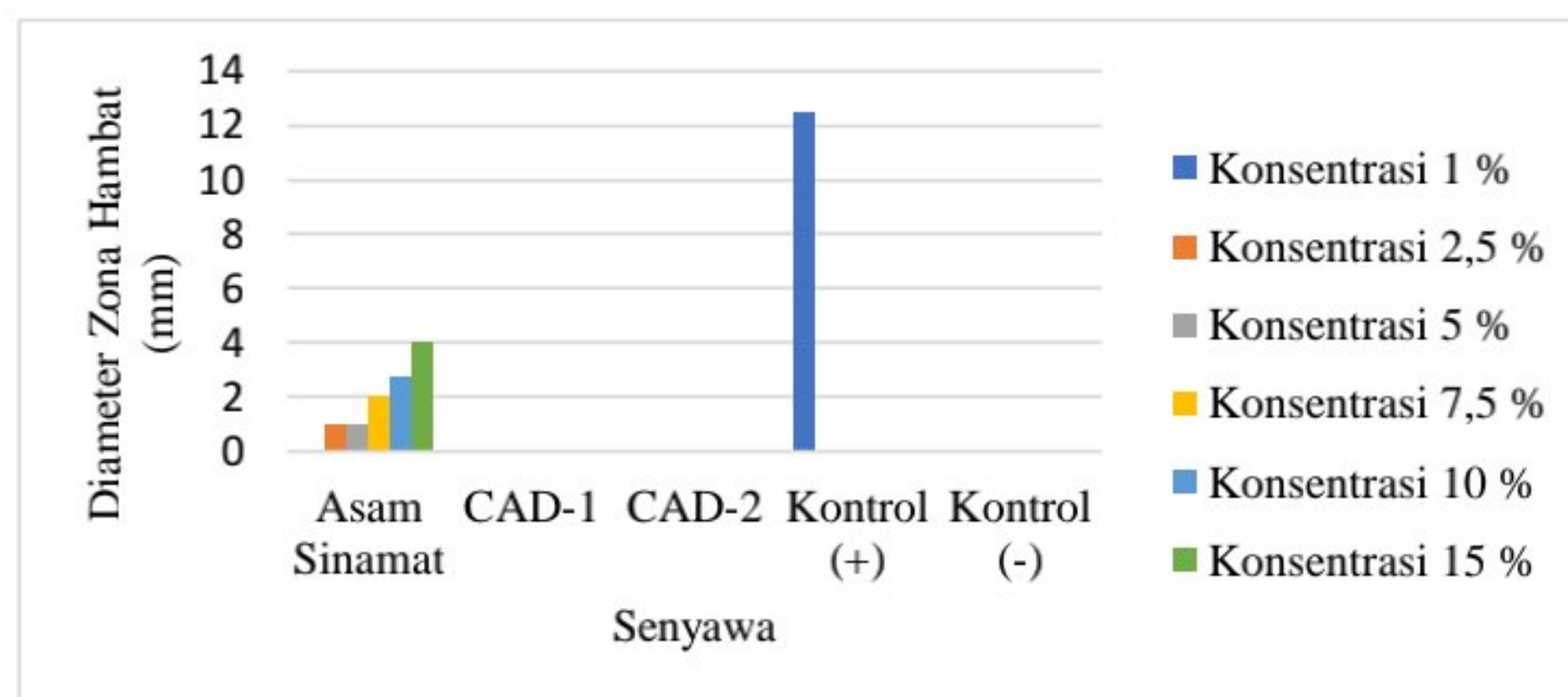
Uji aktivitas antibakteri dilakukan melalui pengamatan selama 1 x 24 jam masa inkubasi. Terbentuknya zona hambat disekililing cakram menunjukkan kepekaan atau sensitivitas bakteri terhadap bahan antibakteri maupun antibiotik *streptomycin* sebagai kontrol positif. Penggunaan *streptomycin* sebagai kontrol

positif didukung oleh penelitian yang telah dilakukan oleh Zajmi dkk. (2015) bahwa antibiotik tersebut memiliki potensi yang baik melawan infeksi dari *strain* *Staphylococcus* pada konsentrasi 3,9 ppm. Kontrol negatif metanol yang digunakan menunjukkan tidak adanya zona hambat terhadap bakteri MRSA dan *E. coli*. Penggunaan metanol sebagai kontrol negatif juga dilakukan oleh Rompas dkk. (2022) terhadap bakteri *E. coli* dan MRSA yang menunjukkan bahwa kontrol negatif metanol tidak memiliki daya hambat antibakteri terhadap kedua bakteri uji. Hasil uji aktivitas antibakteri ditunjukkan dari pengukuran diameter zona hambat senyawa CAD-1 dan CAD-2 terhadap bakteri MRSA disajikan pada Gambar 32.



Gambar 32. Diameter zona hambat senyawa turunan asam sinamat terhadap bakteri MRSA

Berdasarkan data hasil uji aktivitas antibakteri senyawa hasil sintesis yang disajikan pada Gambar 32, senyawa CAD-1 dan CAD-2 memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri MRSA. Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Tonari dkk., (2016) yang menemukan adanya fungsi dari penambahan gugus $-NH_2$ yang dapat memberikan aktivitas antibakteri. Namun, pada senyawa CAD-2 dengan konsentrasi 7,5%; 10%; dan 15% tidak terdapat aktivitas, sehingga penghambatan maksimal berada pada konsentrasi 5%. Tidak adanya zona hambat ini disebabkan oleh pelarut yang telah menguap sebelum sampel dikerjakan.



Gambar 33. Diameter zona hambat senyawa turunan asam sinamat terhadap bakteri *Escherichia coli*

Data hasil uji aktivitas antibakteri senyawa hasil sintesis terhadap bakteri *E. coli* disajikan pada Gambar 33. Berdasarkan data tersebut, senyawa CAD-1 dan CAD-2 tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli*. Hal ini diduga karena bakteri tersebut merupakan bakteri Gram negatif yang lebih kompleks yang memiliki struktur dinding sel yang tebal dan berlapis-lapis yang terdiri dari peptidoglikan, lipopolisakarida, dan lipoprotein. Berbeda dengan bakteri Gram positif yang hanya mempunyai lapisan tunggal pada dinding selnya. Sehingga struktur dinding sel bakteri Gram negatif menyebabkan senyawa CAD-1 dan CAD-2 lebih sukar masuk ke dalam sel (Lestari dkk., 2016).

4.3 Analisis *Molecular Docking*

Dalam penelitian ini, senyawa CAD-1 dan CAD-2 diindikasikan memiliki aktivitas melalui uji antibakteri secara *in vitro*. Senyawa CAD-1 dan CAD-2 selanjutnya dilakukan analisis secara *molecular docking* untuk mengetahui interaksi antara makromolekul berupa protein/DNA/RNA dengan molekul kecil (ligan) (Roy dkk., 2015). Proses *molecular docking* dilakukan menggunakan protein *penicillin-binding protein 2a* (PBP2a) dari bakteri MRSA. Pemilihan protein PBP2a (PDB ID: 1MWT) dari bakteri jenis *Staphylococcus aureus* yang

resisten terhadap antibiotik metisilin (MRSA) adalah karena PBP2a bertanggung jawab untuk mengkatalisis produksi peptidoglikan di dalam dinding sel bakteri dan memiliki ikatan energi yang mengandung β -laktam yang lebih rendah daripada PBP lainnya (Masumi dkk., 2022).

Pada penelitian ini dilakukan *docking* terhadap kontrol positif dan senyawa CAD-1 dan CAD-2 sebagai ligan terhadap protein PBP2a. Hal ini dilakukan untuk membandingkan interaksi protein PBP2a dengan kontrol positif *streptomycin* dan senyawa CAD-1 dan CAD-2. Data hasil penambatan molekul ligand kontrol positif dan senyawa hasil sintesis terhadap protein PBP2a secara singkat ditunjukkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil *docking* senyawa hasil sintesis terhadap protein PBP2a

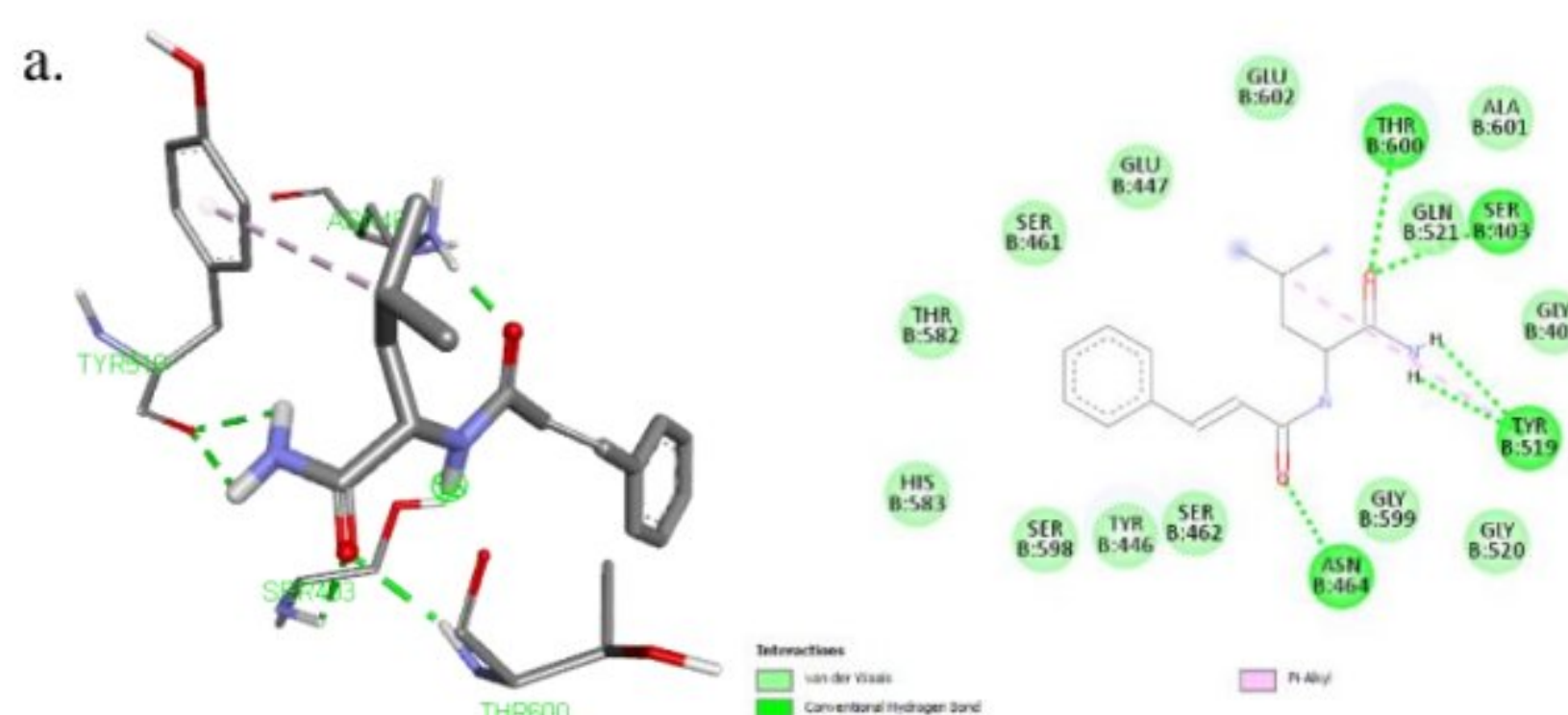
Senyawa	Ikatan Energi (kkal/mol)	Konstanta Inhibisi (mM)	Interaksi Ikatan Hidrogen
CAD-1	-7,33	4,25	ASN B:464; THR B:600; SER B:403; dan TYR B:519
CAD-2	-6,29	24,58	ASN B:464 dan THR B:600
<i>Streptomycin</i>	-6,14	2,00	ASN B:464 dan ARG B:445

Berdasarkan data tersebut, energi ikat yang terbentuk dari kompleks senyawa hasil sintesis CAD-1 dan CAD-2 dengan protein PBP2a lebih kecil dibanding kompleks ligand *streptomycin*. yaitu -7,33 dan -6,29 kkal/mol. Hal ini berarti bahwa kompleks senyawa hasil sintesis lebih stabil dan memiliki potensi inhibisi yang lebih kuat terhadap protein target dibanding antibiotik *streptomycin*. Pada umumnya, nilai energi ikat yang lebih rendah daripada -5,0 kkal/mol dapat dianggap sebagai interaksi yang optimal (Bahrin dan Soekanto, 2021). Semakin kecil energi ikat yang dihasilkan oleh suatu kompleks ligan dan protein, maka

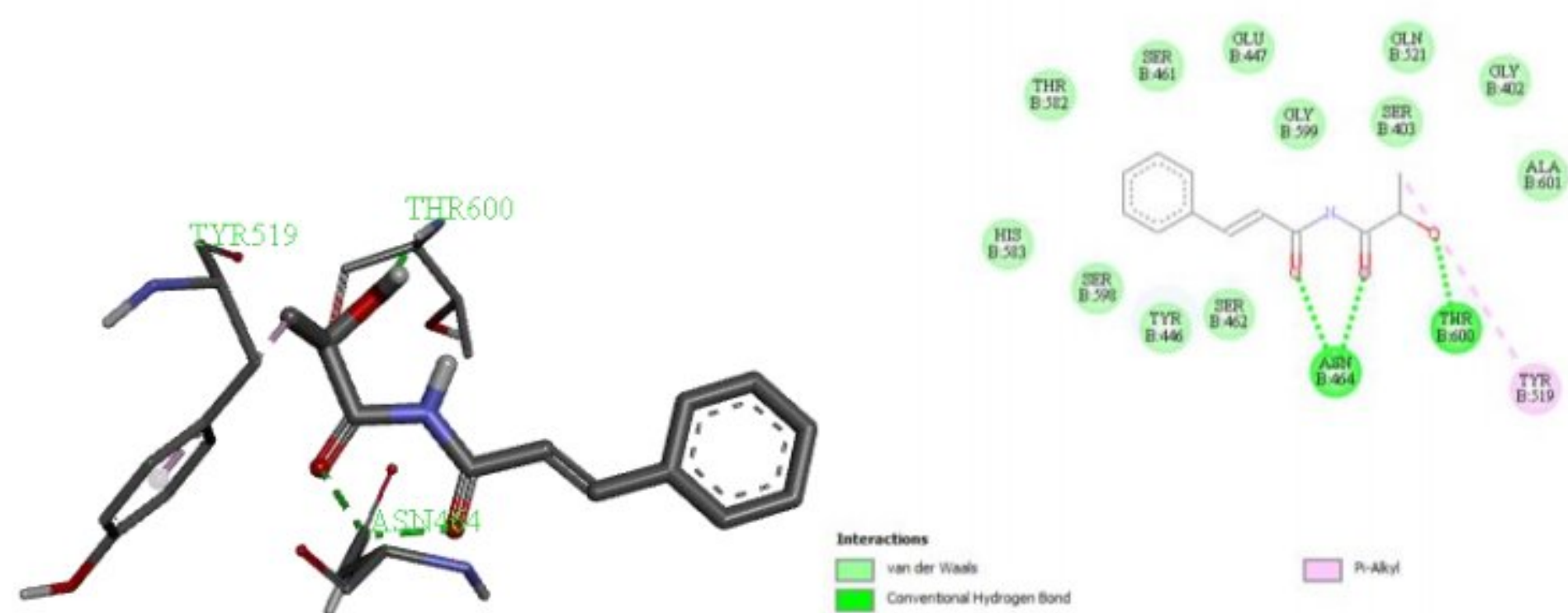
kemampuan inhibisi suatu senyawa obat tersebut akan semakin baik. Hal ini juga sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Sachdeva dkk., (2020), bahwa energi ikat yang lebih rendah dari -6 kkal/mol memiliki ikatan yang baik terhadap PBP2a dan dapat dianggap sebagai senyawa potensial untuk merancang obat antibakteri baru yang menargetkan MRSA.

Parameter lain yang perlu diperhatikan adalah konstanta inhibisi (K_i). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Arulanandam dkk (2021), semakin rendah nilai K_i , maka interaksi antar ligan dan protein target menunjukkan interaksi dan berkolerasi baik dengan uji *in vitro*. Tidak hanya itu, efektivitas suatu senyawa juga bergantung pada jenis residu dari protein yang berinteraksi dengan senyawa (ligan) tersebut. Hal ini disebabkan karena interaksi dengan residu protein yang berbeda memberikan mekanisme aksi yang berbeda pula (Ferreira dkk., 2015).

Kestabilan interaksi ligan ditunjukkan dengan nilai energi ikat dan konstanta inhibisi yang ditentukan oleh tipe ikatan dan nomor dari interaksi ligan terhadap asam amino pada sisi aktif protein target (Masumi dkk., 2022). Visualisasi hasil *docking* antara senyawa CAD-1 dan CAD-2 dan protein target PBP2a dapat dilihat pada Gambar 34.



b.



Gambar 34. Visualisasi interaksi antara reseptor protein PBP2a dengan (a) senyawa CAD-1 dan (b) senyawa CAD-2

Hasil *docking* yang diperoleh menunjukkan bahwa konformasi 10 pada ligan CAD-1 memiliki interaksi terhadap 2 ikatan hidrogen dengan residu asam amino tirosin (Tyr519), asam amino asparagin (Asn464), asam amino glutamin (Gln521), dan threonine (Thr600). Konformasi 6 pada ligan CAD-2 yang disajikan pada Gambar 28 menunjukkan bahwa terdapat interaksi ikatan antar ligan dengan residu asam amino asparagin (Asn464), threonine (Thr600) dan tirosin (Tyr519). Adanya interaksi ikatan berkontribusi terhadap kestabilan suatu interaksi senyawa dengan protein target. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa CAD-1 dan CAD-2 memiliki potensi sebagai antibakteri.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa senyawa hasil amidasi dari asam sinamat menggunakan reagen DCC/DMAP memperoleh rendemen sebesar 22,12% dan 25,20%. Hasil pengujian senyawa 2-sinamamido-4-metilpentanamida dan *N*-(2-hidroksipropanoil)-sinamamida sebagai antibakteri secara *in vitro* dengan metode difusi cakram menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki potensi sebagai antibakteri pada bakteri MRSA, namun tidak memiliki aktivitas terhadap bakteri *Escherichia coli*. Hasil pengujian kedua senyawa hasil sintesis amidasi secara *in silico* melalui *molecular docking* terhadap protein PBP2a menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki potensi sebagai antibakteri ditinjau dari nilai energi ikat, konstanta inhibisi, dan interaksi residu asam amino.

5.2 Saran

Penelitian ini memerlukan studi lebih lanjut terkait metode sintesis dengan perbandingan optimalisasi waktu, serta penggunaan reagen yang tepat. Pengujian bioaktivitas antibakteri dari senyawa hasil amidasi perlu dilakukan pengoptimalan dalam preparasi senyawa dan waktu mulai pengerjaan, sehingga ketika dalam pelaksanaannya pelarut tidak habis. Selain itu, dibutuhkan pula pengembangan lebih lanjut terkait uji bioaktivitasnya baik secara *in vivo* maupun *in silico*.

DAFTAR PUSTAKA

- Achanta, P.S., Raj, S., Horam, S., Arockiaraj, J., Bobbala, R.K., Akkinapally, R.R., Pasupuleti, M., dan Achanta, A.R.V.N., 2019, Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Piperic Acid Amides and Their Lower Homologues, *Drug Rev Res*, 1-8.
- Adisakwattana, S., 2017, Sinamat Acid and Its Derivatives: Mechanisms for Prevention and Management of Diabetes and Its Complications, *Nutrients*, **9**(163): 1-27.
- Alghamdi, A.H., Alam, M.M., dan Nazreen, S., 2020, In Silico ADME predictions and *In Vitro* Antibacterial Evaluation of 2-hydroxy benzothiazole-based 1,3,4-oxadiazole Derivatives, *Turk J Chem*, **44**(4): 1068-1084.
- Arifian, H., Maharani, R., Megantara, S., Gazzali, A.M., dan Muchtaridi, M., 2022, Amino-Acid-Conjugated Natural Compounds: Aims, Designs, and Results, *Molecules* 2022, **27**(7631): 1-34.
- Arshad, M., Rasool, N., Qamar, M.U., Shah, S.A.A., dan Zakaria, Z.A., 2022, Facile Synthesis of Functionalized Phenoxy Quinolines: Antibacterial Activities against ESBL Producing *Escherichia coli* and MRSA, Docking Studies, and Structural Features Determination through Computational Approach, *Molecules* 2022, **27**(3732): 1-20.
- Balouiri, M., Sadiki, M., dan Ibsouda, S.K., 2016, Methods for In Vitro Evaluating Antimicrobial activity: A review, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, **6**(2): 71-79.
- Bayram, G., Nzeyimana, A., Utku, S., Ulger, M., Aslan, G., dan Bercin, E., 2021, Study on Synthesis and Antimicrobial Activities of Some Michael-Type Addition Compounds, *J. Fac. Pharm. Ankara*, **45**(2): 182-193.
- Benitez-Chao, D.F., LeoN-Buitimea, A., Lerma-Escalera, J.A., dan Morones-Ramirez, J.R., 2021, Bacteriocins: An Overview of Antimicrobial, Toxicity, and Biosafety Assessment by in vivo Models, *Front. Microbiology*, **12**(630695): 1-18.
- Bharadwaj, A., Rastogi, A., Pandey, S., Gupta, S., dan Sohal, J.S, 2022, Multidrug-Resistant Bacteria: Their Mechanism of Action and Prophylaxis, *Hindawi Biomed Research International*, **2022**: 1-17.
- Bintari, Y.R., dan Risandiansyah, R., 2019, In Silico Study to Assess Antibacterial Activity from *Cladophora Sp.* on Peptide Deformylase: Molecular Docking Approach, *Borneo Journal of Pharmacy*, **2**(1): 20-23.

- Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., dan Piddock, L.J.V., 2015, Molecular Mechanism of Antibiotic Resistance, *Nat Rev Microbiol*, **13**(1): 42-51.
- Bonang, G., 1992, *Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan Edisi 16*, EGC. Jakarta.
- Brooks, G.G., Butel, J.S., Morse, S.A., 2008, Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, dan Adelberg Ed. 23, *EGC*, Jakarta.
- Çalışkan, E., 2022, New Amino Acid Chalcone Conjugates: Synthesis, Characterization and Dielectric Properties, *Tr. J., Nature Sci*, **11**(3): 155-159.
- Çalışkan, E., Ozturk, A.A., Koran, K., Tekin, S., Sandal, S., Erkan, S., Gorgulu, O.A., dan Cetin, A., 2022, Synthesis of New Cinnamoyl-Amino Acid Conjugates and in Vitro Cytotoxicity and Genotoxicity Studies, *Chem Biodiversity*, **19**(8): 1-10.
- Chandra, S., Roy, A., Jana, M., dan Pahan, K., Sinamat acid activates PPAR α to stimulate Lysosomal biogenesis and lower Amyloid plaque pathology in an Alzheimer's disease mouse model, *Neurobiology of Disease*, **124**: 379-395.
- Chockova, M., Stoykova, B., Petrova, P., Gyoshkova, N., Ivanova, G., Sticha, M., dan Milkova, T., 2017, Synthesis and radical scavenging activity of sinamat acid esters, *Bulgarian Chemical Communications*, **49**: 68-73.
- Coumar, M.S., 2022, Molecular Docking for Computer-Aided Drug Design Fundamentals, Techniques, Resources and Applications, *Academic Press Elsevier*.
- Cranwell, P.B., Harwood, L.M., dan Moody, C.J., 2017, *Experimental Organic Chemistry 3rd Edition*, Wiley dan Sons, United States of America.
- Dabhi, R.C., Patel, U.P., Rathod, V.B., Shah, S.N., dan Maru, J.J., 2023, Process Optimization for Acid-Amine Coupling: a Catalytic Approach, *Current Chemistry Letters*, **12**: 133-140.
- Dar, A.M., dan Mir, S., 2017, Molecular Docking: Approaches, Types, Applicatons and Basic Challenges, *Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques*, **8**(356): 1-3.
- De Morais, M.C., De Oliveira, E.L., Perez-Castillo, Y., dan De Dousa, D.P., 2023, Synthesis Cinnamides and Cinnamates: Antimicrobial Activity, Mechanism of Action, and In Silico Study, *Molecules*, **28**(1918): 1-23.
- Deng, X., dan Song, M., 2020, Synthesis, Antibacterial and Anticancer Activity, and Docking Study of Aminoguanidines Containing an Alkynyl Moiety, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **35**(1): 354-364.

- Dubnau, A.A., 1982, The Molecular Biology of the Bacilli Volume I: *Bacillus subtilis*, Academic Press, New York.
- Dunetz, J.R., Magano, J., dan Weisenburger, G.A., 2016, Large-Scale Applications of Amide Coupling Reagents for the Synthesis of Pharmaceuticals, *Organic Process Research and Development*, **20**: 140-177.
- El-Bashiti, T.A., Masad, A.A., Mosleh, F.N., dan Madi, Y.M.A., 2019, Antibacterial and Anti-Biofilm Activity of Selected Plant Extracts Against Some Human Pathogenic Microorganisms. *Pakistan Journal of Nutrition*, **18**(11): 1014-1020.
- Ernawati, T., Nurhalimah, N., dan Minarti, 2017, Sintesis *N*-Oktilsinamamid dan Aktivitasnya terhadap Sitotoksik Sel Kanker Leukemia P388, *Jurnal Kimia Valensi*, **3**(2): 127-133.
- Ernawati, T., Mun'im, A., Hanafi, M., dan Yanuar, A., 2020, Synthesis of Cinnamamide Derivatives and Their α -Glucosidase Inhibitory Activities, *Sains Malaysiana*, **49**(2): 315-322.
- Febriyanti, L., Hanafi, M., dan Hayun, 2018, Sintesis Analog UK-3A : 6-Hidroksi-*N*-Fenilnikotinamida dan 6-Hidroksi-*N*-Fenilpikolinamida dan Uji Sitotoksitas Secara *In Vitro* terhadap Sel Kanker Murine Leukemia P388, *Jurnal Farmasi Indonesia*, **10**(1): 378-386.
- Firdaus, Seniwati, Alamsyah, N., dan Paramita, S., 2019, Synthesis and activity of *N*-(*o*-tolyl)caffeamide and *N*-(*o*-tolyl)-*p*-coumaramide against P388 leukemia murine cells, *Journal of Physics: Conference Series*, **1341**(032005): 1-6.
- Firdaus, Soekamto, N.H., Seniwati, Firdausiah, S., Rasyid, H., Bahja, dan Islam, M.F., 2022, Phenetil *p*-coumarate and *N*-phenetil-*p*-coumaramide: Synthesis, Characterization, Docking Studies and Anticancer Activity through P388 Cell, *Sains Malaysiana*, **51**(4): 1085-1097.
- França, S.B., Correia, P.R.D.S., de Castro, I.B.D., Junior, E.F.D.S., Barros, M.E.D.S.B., dan Lima, D.J.D.P., 2021, Synthesis, Applications, and Structure-Activity Relationship (SAR) of Cinnamic Acid Derivatives: a Review, *Research, Society and Development*, **10**(1): 1-29.
- Forero-Doria, O., Araya-Maturana, R., Barrientos-Retamal, A., Morales-Quintana, L., dan Guzman, L., 2019, *N*-alkylimidazolium Salts Functionalized with *p*-Coumaric and Cinnamic Acid: A Study of Their Antimicrobial and Antibiofilm Effects, *Molecules*, **24**(3484): 1-13.
- Galindo-Mendez, M., 2018, Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr*, **6**: 6-14.

- Ganapathy, S., dan Karpagam, S., 2016, In vitro evaluation of antibacterial potential of *Andrographis paniculata* against resistant bacterial pathogens Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Multiple Drug Resistant *Escherichia coli* (MDR *E. coli*), *International Journal of Bioassays*, **5**(3): 4879-4881.
- Ghosh, A.K., dan Shahabi, D., 2021, Synthesis of Amide Derivatives for Electron Deficient Amines and Functionalized Carboxylic Acids Using EDC and DMAP and a Catalytic Amount of HOBt as the Coupling Reagents, *Tetrahedron Lett*, **63**: 1-12.
- Gomez-Sequeda, N., Caceres, M., Stashenko, E.E., Hidalgo, W., dan Ortiz, C., 2020, Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Essential Oils against *Escherichia coli* O157:H7 and Metisilin-resisten *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Journal Antibiotics*, **9**(730): 2-18.
- Guan, S., Zhong, L., Yu, H., Wang, L., Jin, Y., Liu, J., Xiang, H., Yu, H., Wang, L., dan Wang, D., 2022, Molecular Docking and Proteomics Reveals the Synergistic Antibacterial Mechanism of Theaflavin with β -lactam Antibiotics Against MRSA. *Front. Microbiol.* **13**: 993430.
- Gunia-Krzyzak, A., Sloczynska, K., Popiol, J., Koczurkiewicz, P., Marona, H., dan Pekala, E., 2018, Sinamat acid derivatives in cosmetics: current use and future prospects, *International Journal of Cosmetic Science*, **40**: 356-366.
- Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., dan Wang, Y., 2020, Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **10**(107): 1-11.
- Guzman, J.D., 2014, Natural Sinamat Acids, Synthetic Derivatives and Hybrids with Antimicrobial Activity, *Molecules*, **19**: 19292-19349.
- Hah-Deinstrop, E., 2007, *Applied Thin-Layer Chromatography: Best Practice and Avoidance of Mistakes 2nd Edition*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Handadyanaputri, E.S., Purwaningsih, Y., dan Indriyanti, E., 2022, Variasi Konsentrasi Asam Borat pada Reaksi Amidasi Asam Sinamat dan Potensinya Sebagai Antikolesterol, *Jurnal Ilmiah Sains*, **22**(1): 23-30.
- Hasanah, F., dan Wirman, A.P., 2018, Modifikasi Vanilin dengan Asam *p*-Hidroksi Benzoat dan Uji Aktivitasnya terhadap *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, dan *Candida albicans*, *Jurnal farmasi Indonesia*, **15**(2): 183-201.
- Hugo, W.B., dan Russell, A.D., 1998, Evaluation of nonantibiotic antimicrobial agents. In: *Pharmaceutical Microbiology* 6th Edition, Blackwell Science, Oxford.

- Indriyanti, E., dan Prahasiwi, M.S., 2020, Synthesis Of Sinamat Acid Based On Perkin Reaction Using Sonochemical Method And Its Potential As Photoprotective Agent, *Jurnal Kimia dan Pendidikan Kimia*, **5**(1): 54-61.
- Integrated Taxonomic Information System, 2012, *Escherichia coli*, (online), (https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=285#null, diakses 10 Desember 2022).
- Isac-Garcia, J., Dobado, J.A., Calvo-Flores, F.G., dan Martinez-Garcia, H., 2016, *Experimental Organic Chemistry: Laboratory Manual*, Elsevier, United States of America.
- Jawetz, Melnick, dan Adelberg, 2008, *Medical Microbiology 24th*, The McGraw-Hill Companies Inc, New York.
- Jubair, N., Rajagopal, M., Chinnappan, S., Abdullah, N.B., Fatima, A., 2021, Review on the Antibacterial Mechanism of Plant-Derived Compounds against Multidrug-Resistant Bacteria (MDR), *Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2021**: 1-30.
- Jubeh, B.Z., Breijyeh, dan Karaman, R., 2020, Resistance of grampositive bacteria to current antibacterial agents and overcoming approaches, *Molecules*, **25**(12): 2888.
- Julianus, J., dan Luckyvano, E., 2014, Sintesis Asam Sinamat Dari Benzaldehida dan Asam Malorat Dengan Katalis Dietilamina, *Jurnal Farmasi Sains dan Komunitas*, **11**(1): 1-6.
- Kadidae, L.O., Ruslin, R., Nurliana, L., Kadir, L.A., 2020, Sintesis Ester Sinamat Menggunakan Variasi Katalis Asam, *Jurnal Pijar Mipa*, **15**(3): 240-246.
- Karnati, S., Rajitha, G., Katari, S.K., dan Umamaheswari, A., 2018, Synthesis, Molecular Docking Studies and Antimicrobial Activity of Substituted Cinnamides, *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, **8**(3): 770-778.
- Kaur, N., Khan, J., Kaleemullah, M., Al-Dhalli, S., Budiasih, S., Florence, M., Faller, E., Asmani, F., Yusuf, E., Takao, K., dan Sugita, Y., 2018, Synthesis of Sinamat Acid Amide Derivatives and The Biological Evaluation of a-Glucosidase Inhibitory Activity, *International Journal of Medical Toxicology and Legal Medicine*, **21**(3 dan 4): 216-220.
- Kelly, B., dan Pearce, E.L., 2020, Amino Assets: How Amino Acids Support Immunity, *Cell Metabolism*, **32**: 154-175.
- Kumar, N., dan Parle, A., 2019, Sinamat Acid Derivatives: an ERA, *The Pharma Innovation Journal*, **8**(5): 580-595.

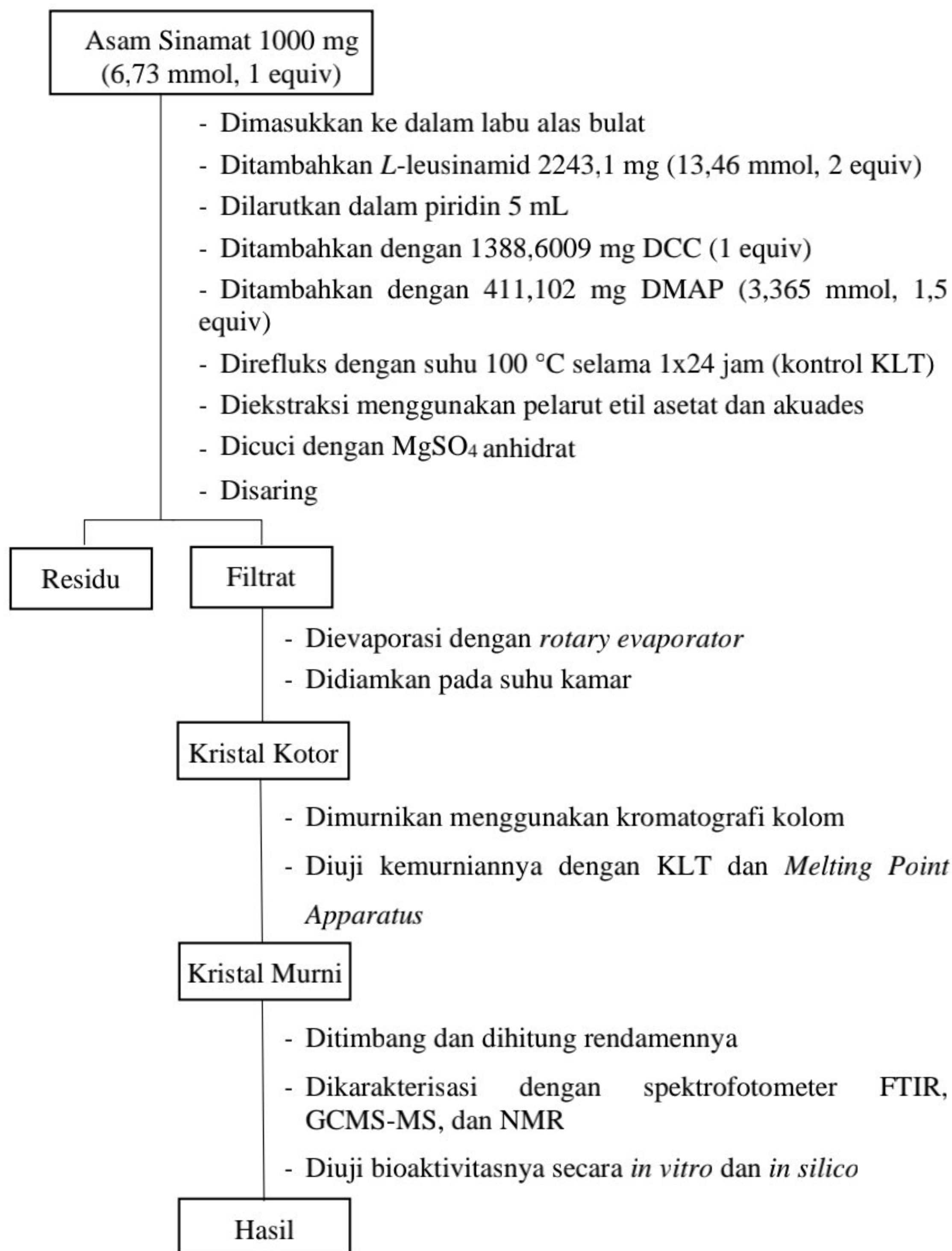
- Khanal, S., Boonyayatra, S., dan Awaiwanont, N., 2022, Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Dairy Farms: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Frontiers in Veterinary Science*, **9**(947154): 1-12.
- Kumar, S.S., Begum, A.S., Hira, K., Niazi, S., Kumar, B.R.P., Araya, H., Fujimoto, Y., 2019, Structure-Based Design and Synthesis of New 4-Metilcoumarin based Lignans as Pro-Inflammatory Cytokines (TNF- α , IL-6 and IL-1 β) Inhibitors, *Bioorganic Chemistry*, **89**: 102991.
- Lanigan, R.M., Karaluka, V., Sabatini, M.T., Starkov, P., Badland, M., Boulton, L., dan Sheppard, T.D., 2016, Direct Amidation of Unprotected Amino Acids Using B(OCH₂CF₃)₃, *Chem Commun*, **52**: 8846-8849.
- Leggio, A., Bagala, J., Belsito, E.L., Cornande, A., Greco, M., dan Liguori, A., 2017, Formation of Amides; One-pot Condensation of Carboxylic Acids and Amines Mediated by TiCl₄, *Chemistry Central Journal*, **11**(87): 1-12.
- Lestari, A.L.D., Noverita, dan Permana, A., 2020, Daya Hambat Propolis terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, *Jurnal Pro-Live*, **7**(3): 237-250.
- Lu, F., dan Ralph, J., 1998, Facile Synthesis of 4-Hydroxycinnamyl *p*-Coumarates, *J. Agric Food Chem*, **46**(8): 2911-2913.
- Martinez, M.D., Riva, D.A., Garcia, C., Duran, F.J., dan Burton, G., 2020, Synthesis and Antibacterial Activity of Difluorometil Cinnamoyl Amides, *Molecules*, **25**(789): 1-21.
- Masduqi, A.F., Indriyanti, E., dan Dinurrosifa, R.S., 2021, Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa APMS (Asam *p*-Metoksi Sinamat) Terhadap Bakteri *Escherichia coli*, *Jurnal Ilmiah Sains*, **21**(2): 155-160.
- Minarti, Budiana, A., dan Ernawati, T., 2016, Bioaktivitas Turunan Metil Sinamat terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aureugenosa* dan Jamur *Candida albicans*, *Jurnal Kimia Valensi: Jurnal Penelitian dan Pengembangan Ilmu Kimia*, **1**(1): 60-64.
- Mingoia, M., Conte, C., Di Rienzo, A., Dimmito, M.P., Marinucci, L., Magi, G., Turkez, H., Cufaro, M.C., Del Boccio, P., Di Stefano, A., Cacciatore, I., 2022, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Cinanmic Acid-Base Antimicrobials, *Pharmaceuticals*, **15**(228): 1-17.
- Mohammed, M.A., Ali, J.F., Saeed, Y.S., Yaseen, I.H., dan Ahmad, B.H., 2022, Biological Activity of Some Phenolic Compounds Extracted from *Agrimonia eupatoria* Against Several Pathogenic Bacteria Species, *Biodiversitas*, **23**(9): 4912-4917.

- Moradali, M.F., Ghods, S., dan Rehm, B.H.A., 2017, *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence, *Front. Cell. Infect. Microbiol*, **7**(39): 1-29.
- Mourad, T., dan Shuaibalahmad, 2022, A Computational Study of Ciprofloxacin Metabolites and Some Natural Compounds Against Resistant Methicillin *Staphylococcus aureus* (MRSA), *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **14**(8): 22-28.
- Narasimhan, B., Belsare, D., Pharande, D., Mourya, V., dan Dhake, A., 2004, Esters, Amides and Substituted Derivatives of Sinamat Acid: Synthesis Antimicrobial Activity and QSAR Investigations, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **39**: 827-834.
- Ness, B.D., dan Knight, J.A., 2004, Encyclopedia of Genetics Revised Edition, *Salem Press*, New Jersey.
- Nurhayati, L.S., Yahdiyani, N., dan Hidayatulloh, A., 2020, Perbandingan Pengujian Aktivitas Antibakteri Starter Yogurt dengan Metode Difusi Sumuran dan Metode Difusi Cakram, *Jurnal Teknologi Hasil Peternakan*, **1**(2): 41-46.
- Oliveira, D.M.P.D., Forde, B.M., Kidd, T.J., Harris, P.N.A., Schembri, M.A., Beatson, S.A., Paterson, D.L., Walker, M.J., Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens, *Clinical Microbiology Reviews*, **33**(3): 1-49.
- O'Neill, J., 2016. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. The Review on Antimicrobial Resistance.
- Othman, L., Sleiman, A., dan Abdel-Massih, R.M., 2019, Antimicrobial Activity of Polyphenols and Alkaloids in Middle Eastern Plants, *Front. Microbiol*, **10**(911): 1-28.
- Owusu, E, Ahorlu, M.M, Afutu, E, Akumwena, A, dan Asare, G.A., 2021, Antimicrobial Activity of Selected Medicinal Plants from a sub-Saharan African country against bacterial pathogens from post-operative wound infections, *Med Sci*, **9**(2): 23.
- Palczar, J.M dan Chan, E.C.S., 1988, *Dasar-dasar Mikrobiologi 2*, Penerbit UI Press, Jakarta.
- Parle, A., dan Arora, T., 2017, Docking, Synthesis and NDM-1 Inhibitory Activity of Some Novel Cinnamic Acid Derivatives, *The Pharma Innovation Journal*, **6**(6): 119-123.
- Pulle, J.S., 2020, Synthesis of Amides by Activation of Carboxylic Acids Phosphonitrilic Chloride, *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, **10**(1): 599-604.

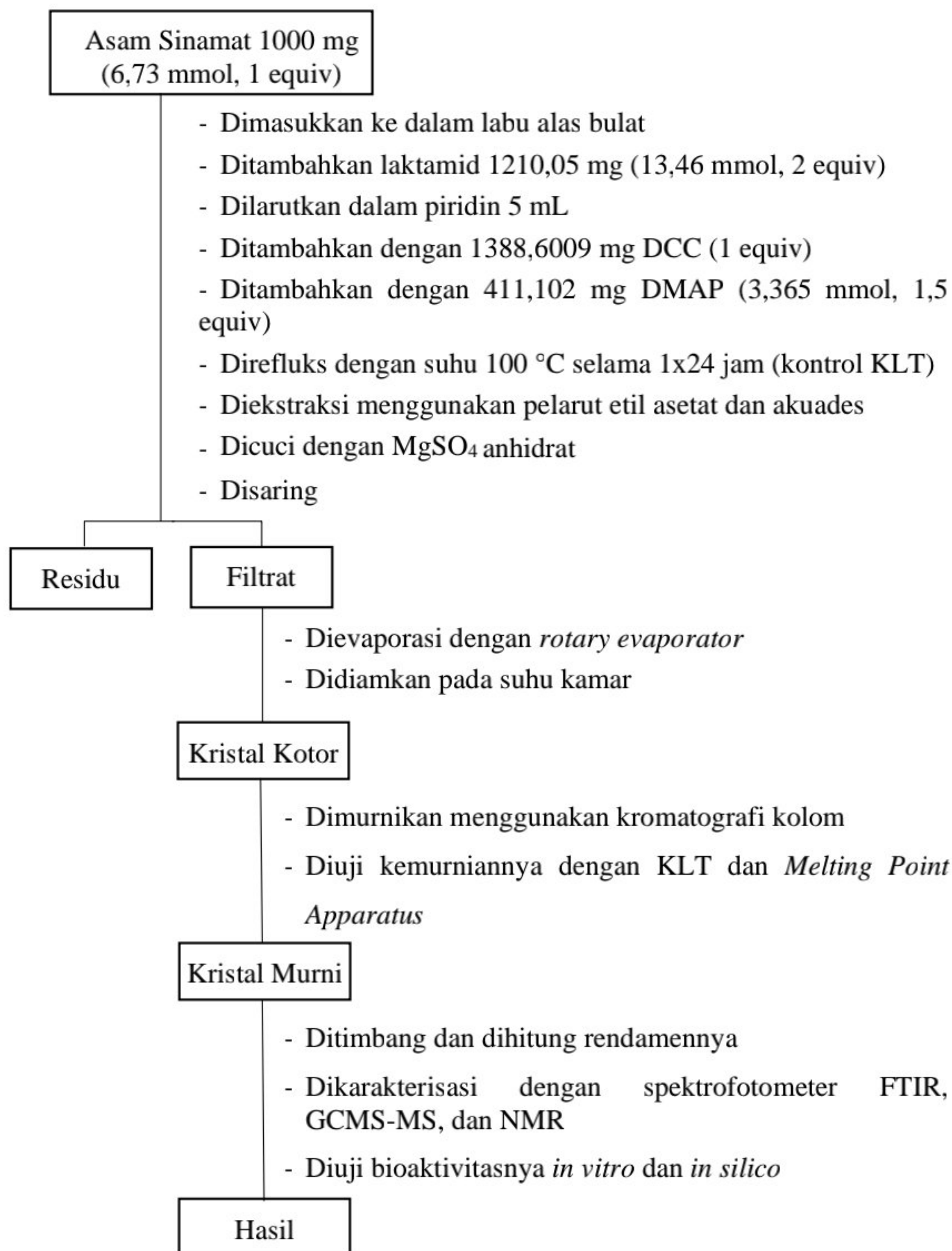
- Purwaningsih, Y., Hanhadyanaputri, E.S., Mutiara, E.V., Dewi, D.I., dan Muthohar, Y.A., 2022, Amidation Sinamat Acid by Dietilamine with Boric Acid as Catalyst Using Ultrasonic Irradiation, *Jurnal Kimia*, **16**(1): 60-65.
- Razzaghi-Asl, N., Garrido, J., Khazraei, H., Borges, F., dan Firuzi, O., Properti Antioksidan Asam Hidroksisinamat: Tinjauan Hubungan Struktur-Aktivitas, *Current Medicinal Chemistry*, **20**(36): 4436-4450.
- Rimac, H., Grishina, M., dan Potemkin, V., 2021, Use of Complementarity Principle in Docking Procedures: A New Approach for Evaluating the Correctness of Binding Poses, *Journal of Chemical Information and Modeling*, **61**: 1801-1813.
- Rodrigues, M.P., Tomaz, D.C., De Souza, L.A., Onofre, T.S., De Menezes, W.A., Almeida-Silva, J., Suarez-Fontez, A.M., De Almeida, M.R., Da Silva, A.M., Bressan, G.C., Vannier-Santos, M.A., Fietto, J.L.R., dan Teixeira, R.R., 2019, Synthesis of Cinnamic Acid Derivatives and Leishmanicidal Activity Against *Leishmania braziliensis*, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **183**(111688): 1-14.
- Seelolla, G., Cheera, P., dan Ponneri, V., 2014, Synthesis, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Novel Series of Cinnamamide Derivatives having Morpholine Moiety, *Medicinal Chemistry*, **4**(12): 776-763.
- Schmidt, T., 2019, Encyclopedia of Microbiology Fourth Edition, *Academic Press Elsevier*, Amsterdam.
- Silveira, G.R., Campelo, K.A., Lima, G.R.S., Carvalho, L.O., Samarao, S.S., Vieira-da-Motta, O., Mathias, L., Matos, C.R.R., Vieira, I.J.C., de Melo, E.J., dan Maria, E.J., 2018, In Vitro Anti-*Toxoplasma gondii* and Antimicrobial Activity of Amides Derived from Sinamat Acid, *Molecules*, **23**(774): 1-11.
- Siqueira, K.A.D., Liotti, R.G., Sousa J.R.D., Vendruscullo, S.J., Souza, G.B.D., Vasconcelos, L.G.D., Januario, A.H., Mendes, T.A.D.O., dan Soares, M.A., 2021, *Streptomyces griseocarneus* R132 expresses antimicrobial genes and produces metabolites that modulate *Galleria mellonella* immune system, *Journal of Biotech*, **11**(396): 1-17.
- Sova, M., 2012, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Cinanmic Acid Derivatives, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **12**: 749-767.
- Sutiknowati, L.I., 2016, Bioindikator Pencemar Bakteri *Escherichia coli*, *Oseana*, **41**(4): 63-71.
- Torres, P.H.M., Sodero, A.C.R, Jofily, P., dan Silva-Jr, F.P., 2019, Key Topics in Molecular Docking for Drug Design, *International Journal of Molecular Sciences*, **20**(4574): 1-29.

- Vale, J. A. do, Rodrigues, M. P., Lima, Â. M. A., Santiago, S. S., Lima, G. D. de A., Almeida, A. A., Oliveira, L. L. de, Bressan, G. C., Teixeira, R. R., dan Machado-Neves, M., 2022, Synthesis of cinnamic acid ester derivatives with antiproliferative and antimetastatic activities on murine melanoma cells, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **148**: 112689.
- Valeur, E., dan Bradley, M., 2008, Amide Bond Formation: Beyond the Myth of Coupling Reagents, *Chemical Society Reviews*, **38**: 606-631.
- Wahid, A.N.M., Yusoff, N.M., Asari, A., Addis, S.N.K., Yusoff, H.M., Mohamad, H., dan Abdullah, F., 2022, Synthesis, Characterization, and IN-Silico Studies of Cinanmic Acid Derivatives Towards Dengue Virus, *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, **26**(1): 47-57.
- Walsh, C., Wencewicz, T., 2016, *Antibiotics Challenges Mechanisms, Opportunities*, ASM Press, Washington.
- Wardatun, S., Alfiani, E.R., Rissani, D., 2017, Study Effect Type of Extraction Method and Type of Solvent to Cinnamaldehyde and Trans-Cinnamic Acid Dry Extract Cinnamon (*Cinnamomum burmanii*), *J Young Pharm*, **9**(1): 49-51.
- World Health Organization, 2017, Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL_hort_Summary_25_Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua_1, Accessed 2 Desember 2022.
- Yingxian, L., Wei, C., Linchun, Z., Ji-Quan, Z., Yonglong, Z., Chun, L., Bing, G., dan YuaN-Yong, Y., 2022, Catalytic *N*-metil Amidation of Carboxylic Acids Under Cooperative Conditions, *RSC Adv*, **12**: 20550-20554.
- Yu, W., D, Alexander, D., MacKerell, J.R., 2018, Computer-aided Drug Design Methods. *Methods Mol Biol*, **1**(1520): 85-106.
- Zeng, W., dan, Lai, L., 2017, Multiple-Physiological Benefits of Bird's Nest Fern (*Asplenium australasicum*) Frond Extract for Dermatological Applications, *Natural Product Research*, **33**(5): 736-741.

Lampiran 1. Bagan Kerja Sintesis 2-sinamamido-4-metilpentanamida

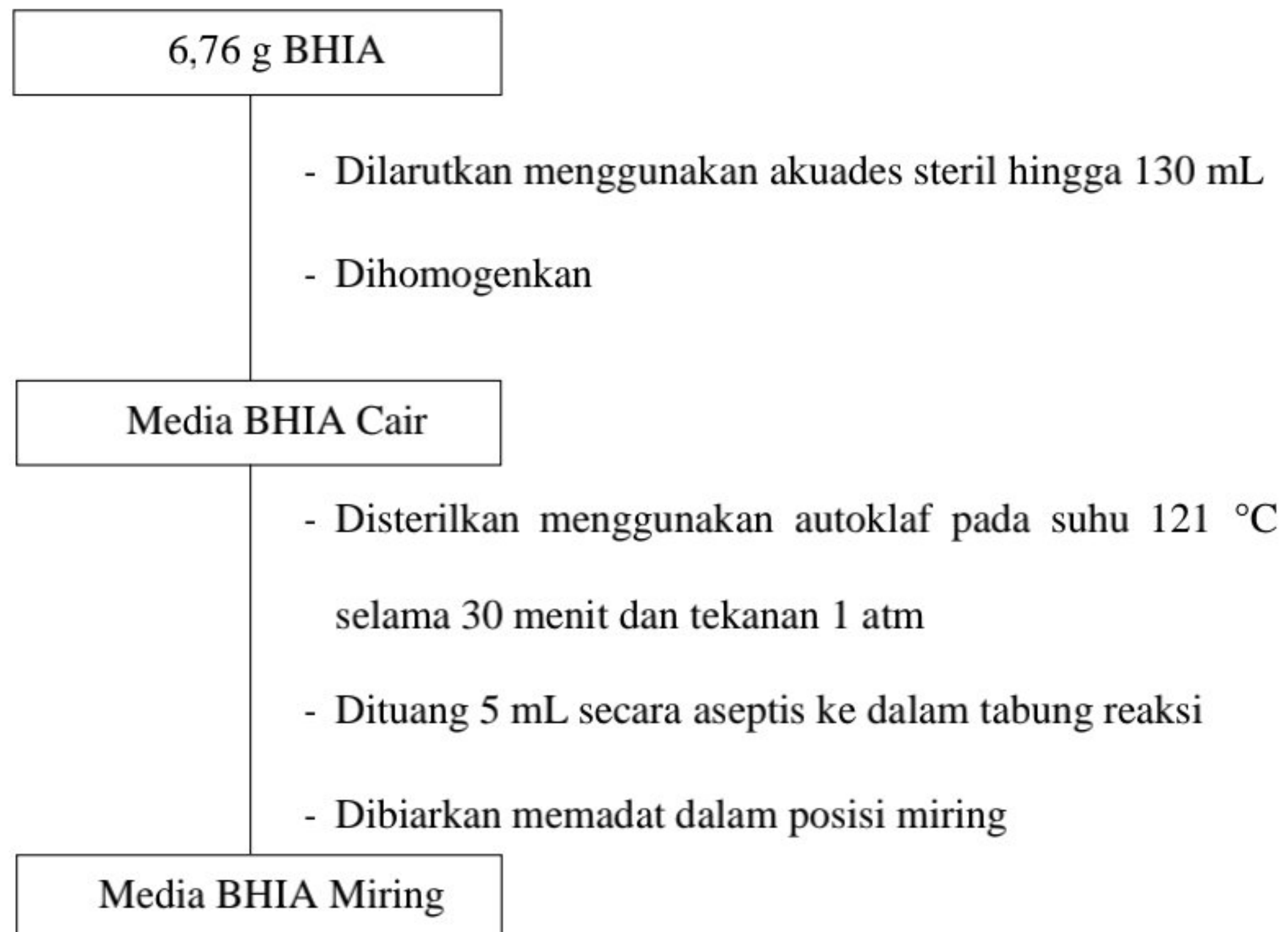


Lampiran 2. Bagan Kerja Sintesis *N*-(2-hidroksipropanoil)sinamamida

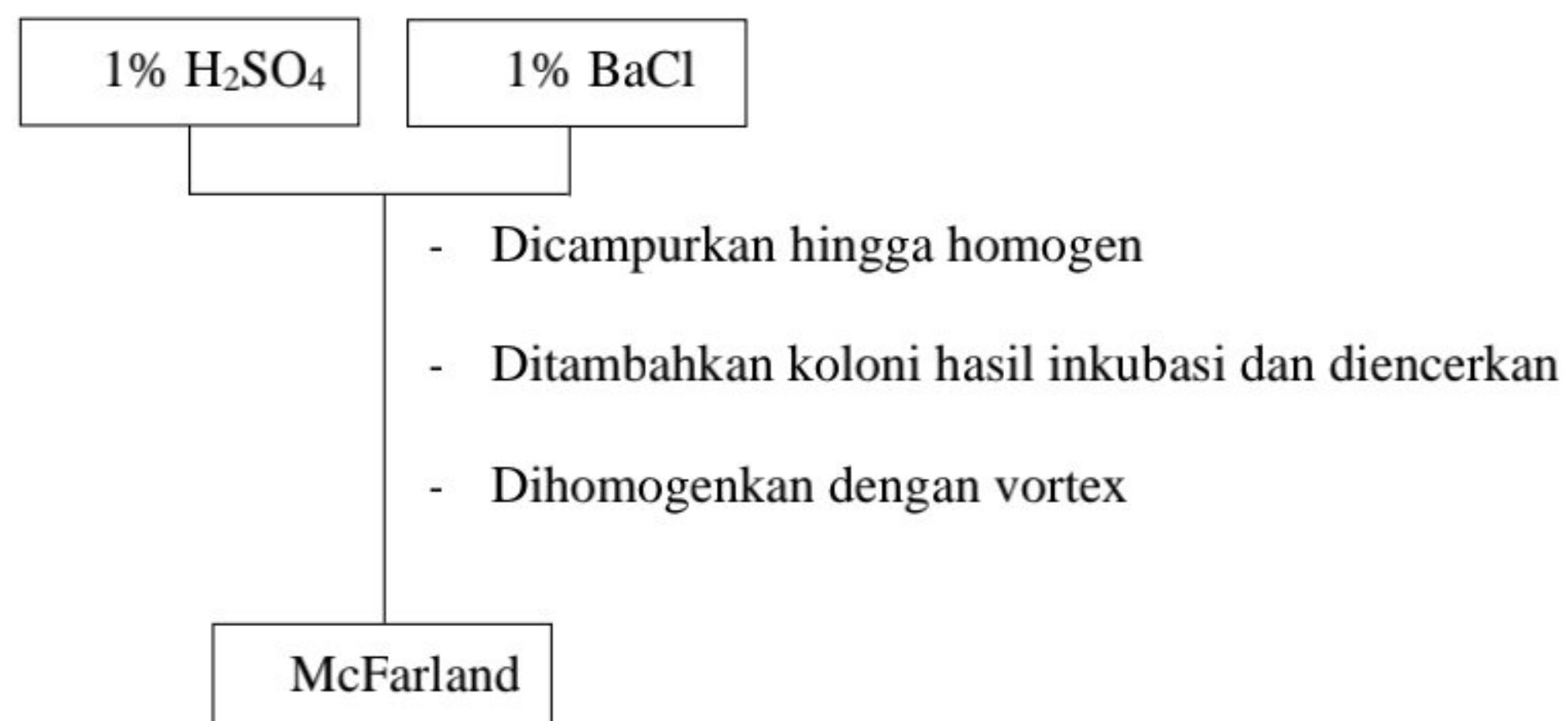


Lampiran 3. Bagan Kerja Pengujian Aktivitas Antibakteri

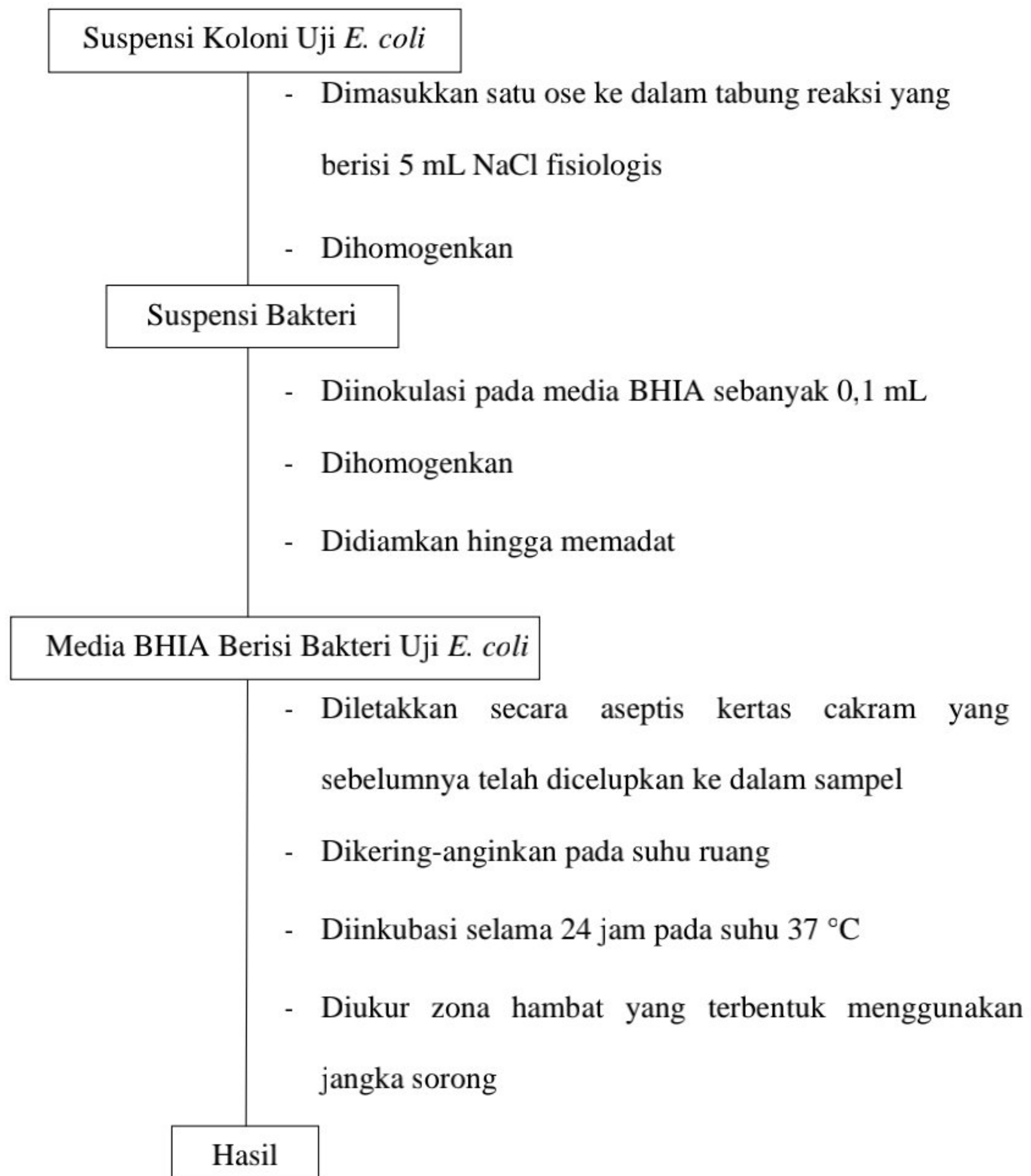
a. Pembuatan Media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA)



b. Pembuatan Standar McFarland 0.5

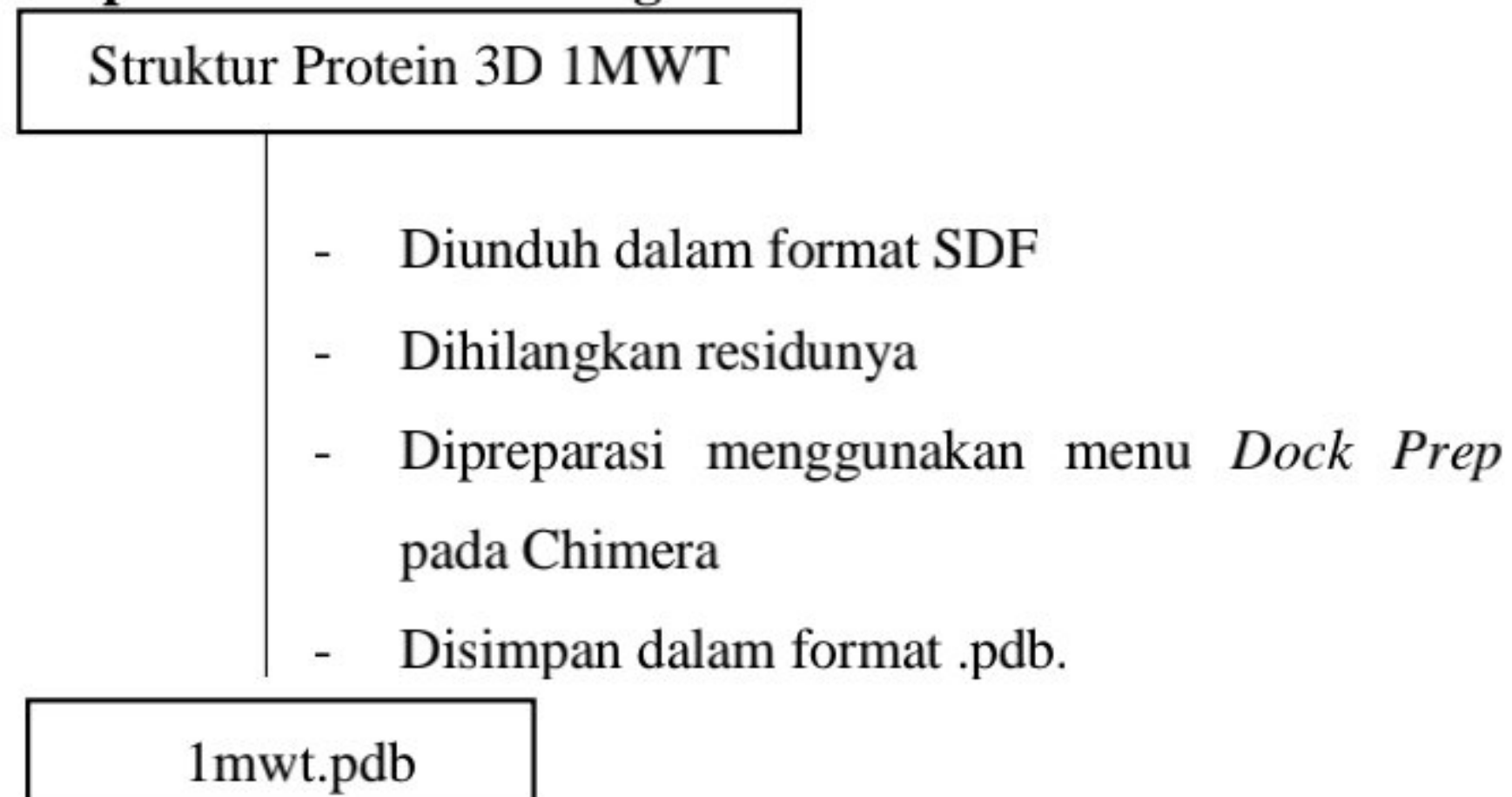


c. Pengujian Aktivitas Antibakteri

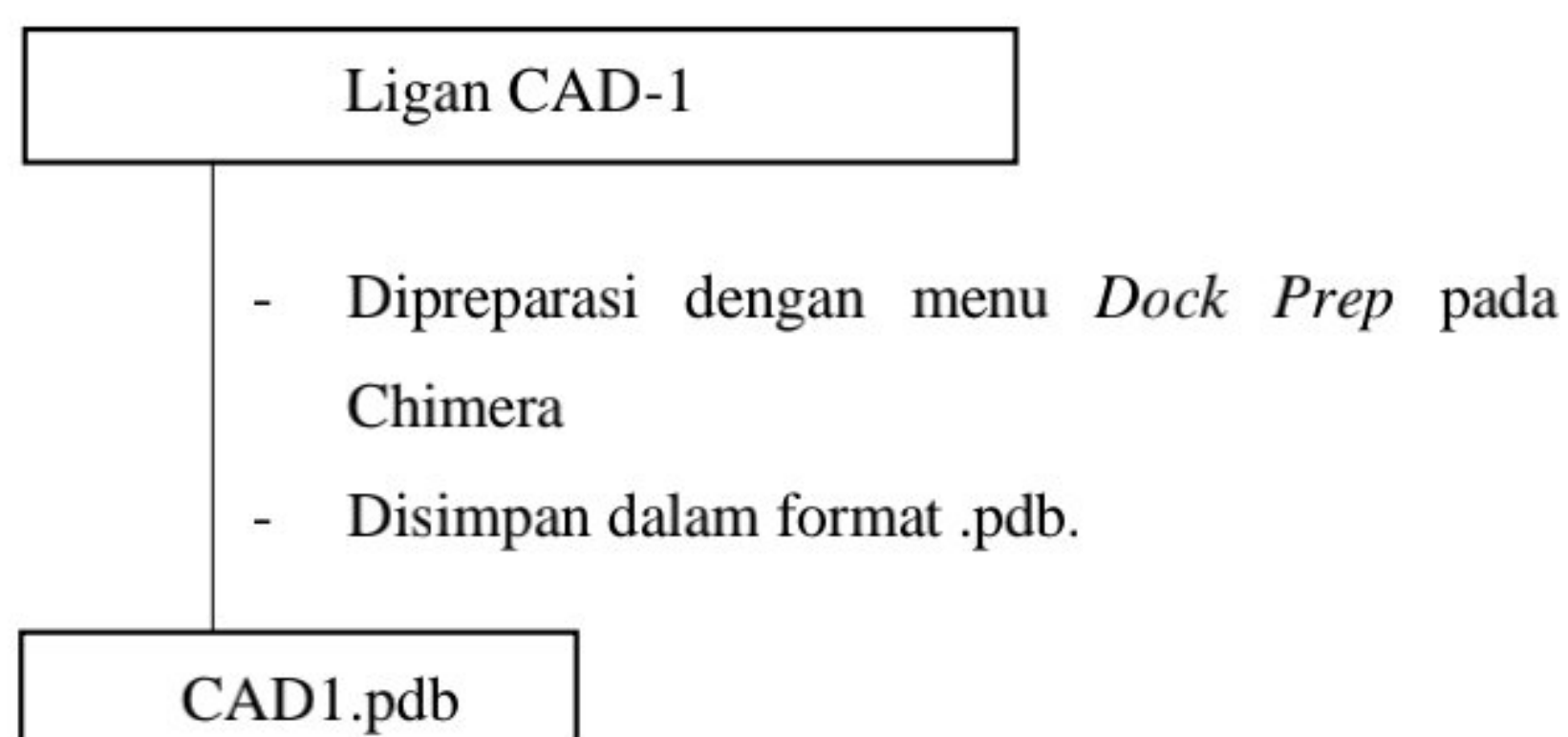


Lampiran 4. Bagan Kerja Analisis *Molecular Docking*

1. Preparasi Protein dan Ligan Standar



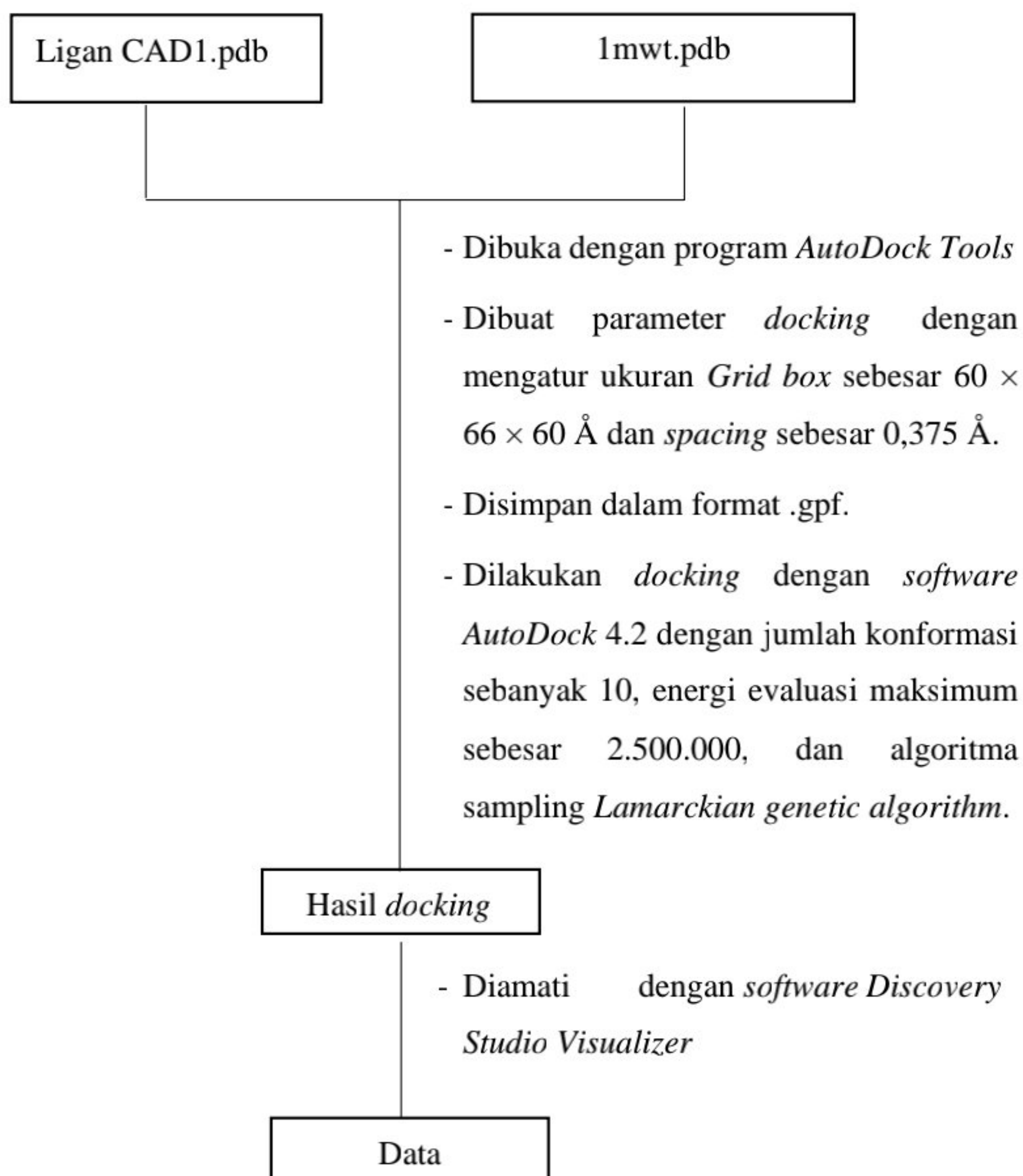
2. Preparasi Senyawa Turunan Asam Sinamat



Catatan :

- Dilakukan prosedur yang sama untuk ligan *N*-(2-hidroksipropanoil)sinamamida (CAD-2)

3. Proses *Molecular Docking*



Catatan :

- Dilakukan prosedur yang sama untuk ligan *N*-(2-hidroksipropanoil)sinamamida (CAD-2)

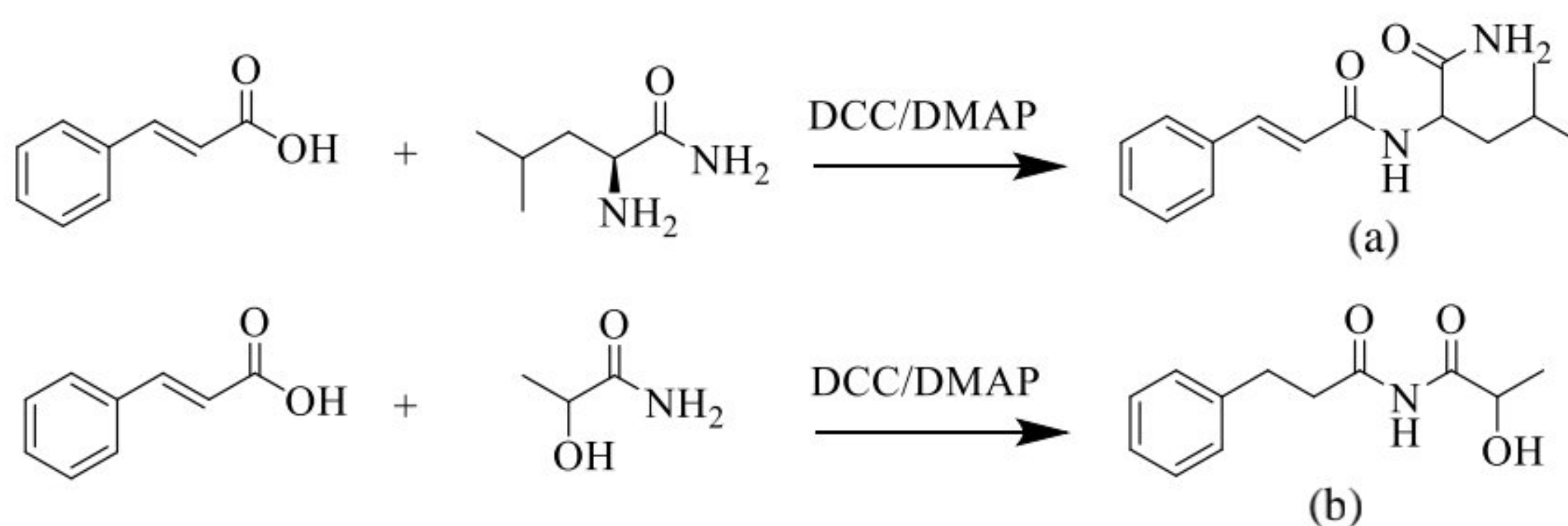
Lampiran 5. Perhitungan Data Penelitian

1. Sintesis Senyawa Asam Sinamat

$$\text{mol asam sinamat} = \frac{\text{massa asam sinamat}}{\text{Mr asam sinamat}}$$

$$\begin{aligned}\text{mol asam sinamat} &= \frac{1 \text{ g}}{148,586 \text{ g/mol}} = 0,00673 \text{ mol} \\ &= 6,73 \text{ mmol}\end{aligned}$$

2. Sintesis Senyawa Turunan Asam Sinamat



a. 2-sinamamido-4-metilpentanamida

$$\begin{aligned}2 \text{ equivalen dari asam sinamat} &= 2 \times 0,00673 \text{ mol} \\ &= 0,01346 \text{ mol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{massa } L\text{-leusinamid} &= \text{mol } L\text{-leusinamid} \times \text{Mr } L\text{-leusinamid} \\ &= 0,01346 \text{ mol} \times 166,65 \text{ g/mol} \\ &= 2,2431 \text{ g} \\ &= 2243,1 \text{ mg}\end{aligned}$$

b. N-(2-hidroksipropanoil)sinamamida

$$\begin{aligned}2 \text{ equivalen dari asam sinamat} &= 2 \times 0,00673 \text{ mol} \\ &= 0,01346 \text{ mol}\end{aligned}$$

$$\text{massa laktamid} = \text{mol laktamid} \times \text{Mr laktamid}$$

$$= 0,01346 \text{ mol} \times 89,9 \text{ g/mol}$$

$$= 1,21005 \text{ g}$$

$$= 1210,05 \text{ mg}$$

c. *N,N'*-disikloheksilkarbodiimida (DCC)

$$\text{massa DCC} = \text{mol asam sinamat} \times \text{Mr DCC}$$

$$= 6,73 \text{ mmol} \times 206,33 \text{ g/mol}$$

$$= 1388,6009 \text{ mg}$$

d. 4-dimetilaminopiridin (DMAP)

$$0,5 \text{ equivalen asam sinamat} = 0,5 \times 6,73 \text{ mmol}$$

$$= 3,365 \text{ mmol}$$

$$\text{massa DMAP} = \text{mmol DMAP} \times \text{Mr DMAP}$$

$$= 3,365 \text{ mmol} \times 122,17 \text{ g/mol}$$

$$= 411,102 \text{ mg}$$

e. Piridin

$$V \text{ Piridin} = 5 \text{ mL}$$

$$P \text{ Piridin} = 0,982 \text{ g/mL}$$

$$\text{Mol Piridin} = \frac{0,982 \text{ g/mL} \times 5 \text{ mL}}{79,1 \text{ g/mol}} = 0,06207 \text{ mol} = 62,07 \text{ mmol}$$

3. Konsentrasi Sampel Uji Antibakteri

$$1 \text{ ppm} = \frac{1 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}}$$

$$1 \text{ ppm} = 0,0001\%$$

Perhitungan Pengenceran

a. Konsentrasi 15%

$$\text{Sampel yang digunakan} = \frac{15 \text{ mg}}{100 \mu\text{l}}$$

b. Konsentrasi 10%

$$\begin{aligned}V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\V_1 \times 15\% &= 75 \mu\text{l} \times 10\% \\V_1 &= \frac{75 \mu\text{l} \times 10\%}{15\%} \\&= 15 \mu\text{l}\end{aligned}$$

c. Konsentrasi 7,5%

$$\begin{aligned}V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\V_1 \times 10\% &= 60 \mu\text{l} \times 7,5\% \\V_1 &= \frac{60 \mu\text{l} \times 7,5\%}{10\%} \\&= 45 \mu\text{l}\end{aligned}$$

d. Konsentrasi 5%

$$\begin{aligned}V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\V_1 \times 7,5\% &= 60 \mu\text{l} \times 5\% \\V_1 &= \frac{60 \mu\text{l} \times 5\%}{7,5\%} \\&= 40 \mu\text{l}\end{aligned}$$

e. Konsentrasi 2,5%

$$\begin{aligned}V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\V_1 \times 5\% &= 60 \mu\text{l} \times 2,5\% \\V_1 &= \frac{60 \mu\text{l} \times 2,5\%}{5\%} \\&= 30 \mu\text{l}\end{aligned}$$

f. Konsentrasi 1%

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 2,5\% = 60 \mu\text{l} \times 1\%$$

$$V_1 = \frac{60 \mu\text{l} \times 1\%}{2,5\%}$$

$$= 24 \mu\text{l}$$

Lampiran 6. Dokumentasi Penelitian



Proses refluks



Ekstraksi cair-cair



Proses evaporasi



Proses penimbangan *crued*



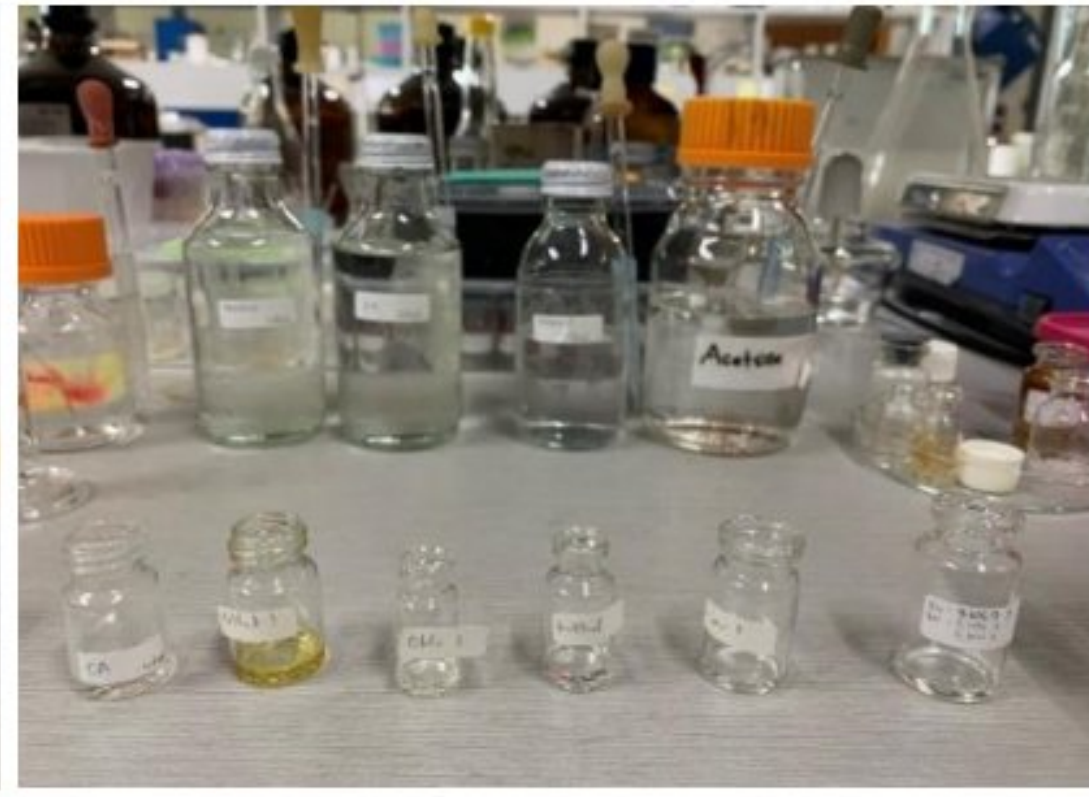
Proses pemisahan KKG



Penggerusan sampel



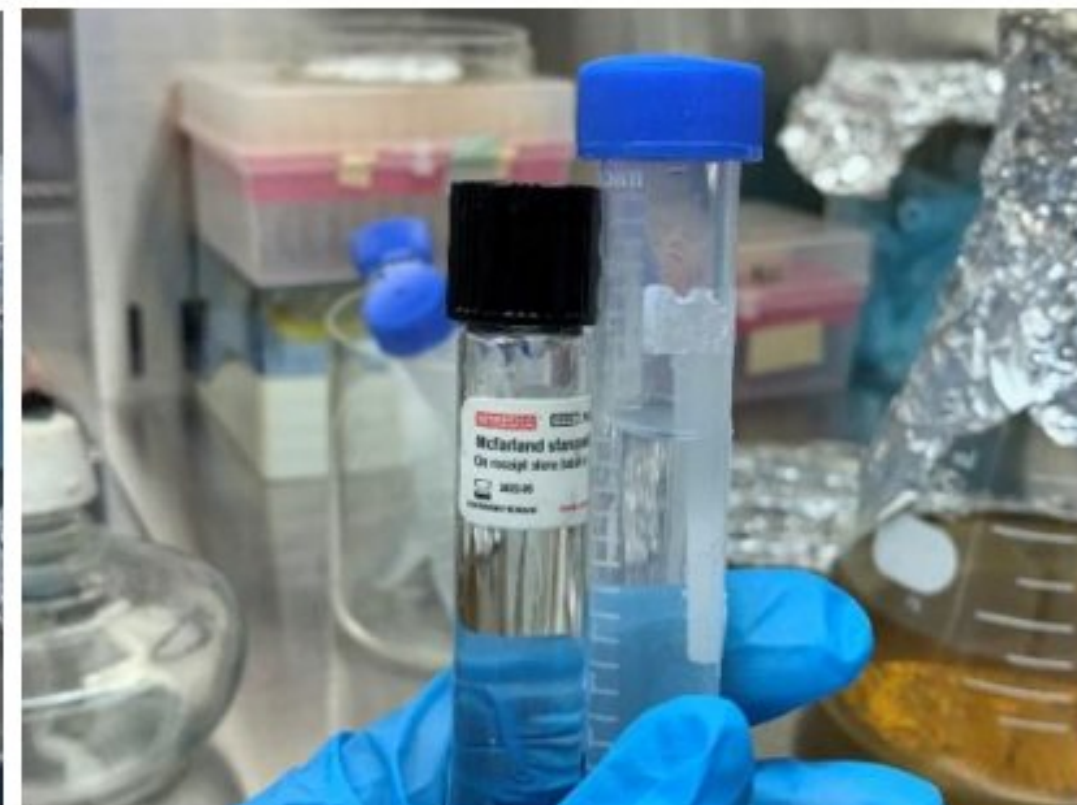
Sampel hasil reaksi



Uji kelarutan



Uji antibakteri



Standar Mc Farland 0.5

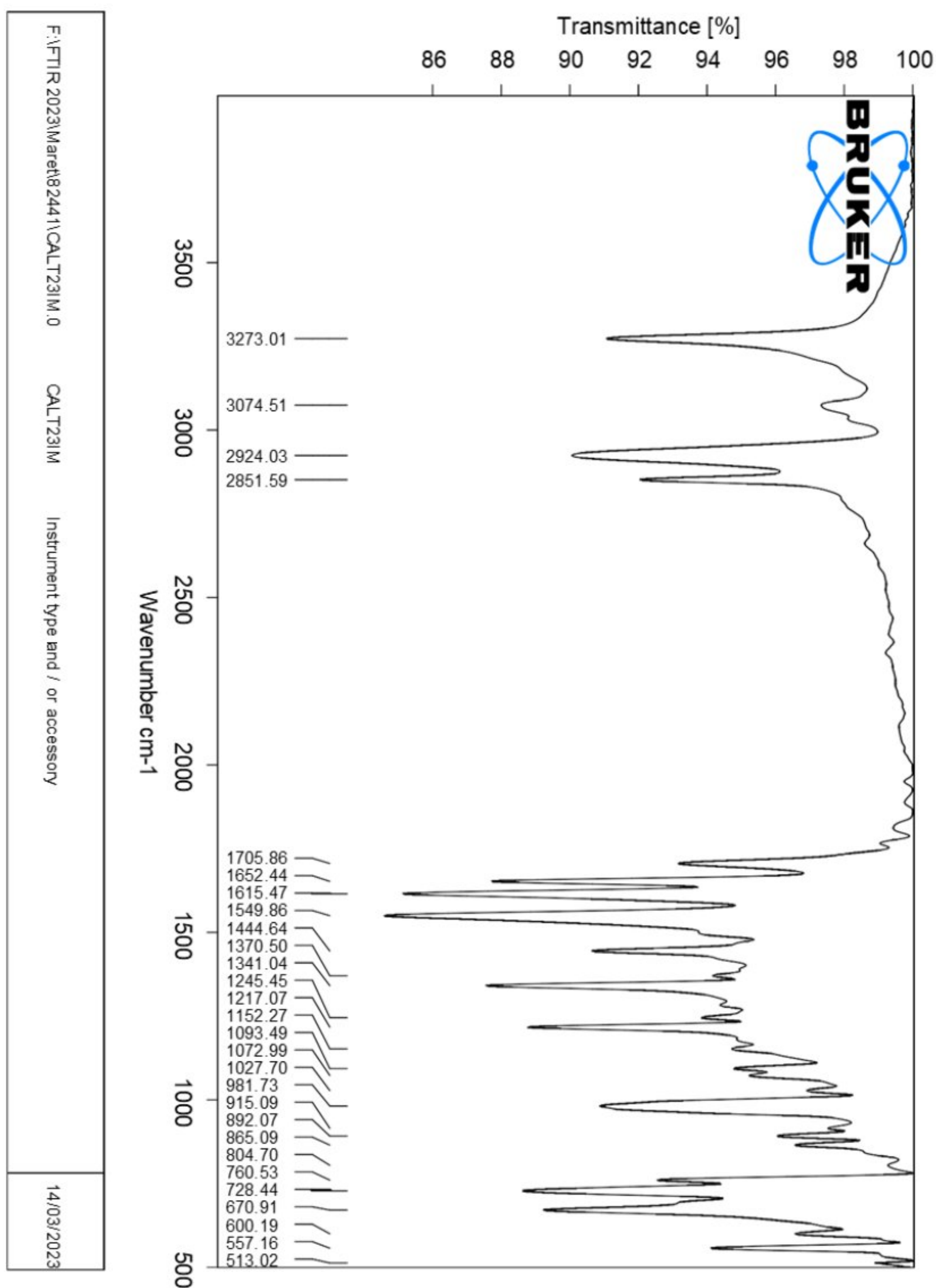


Instrumen GCMS-MS

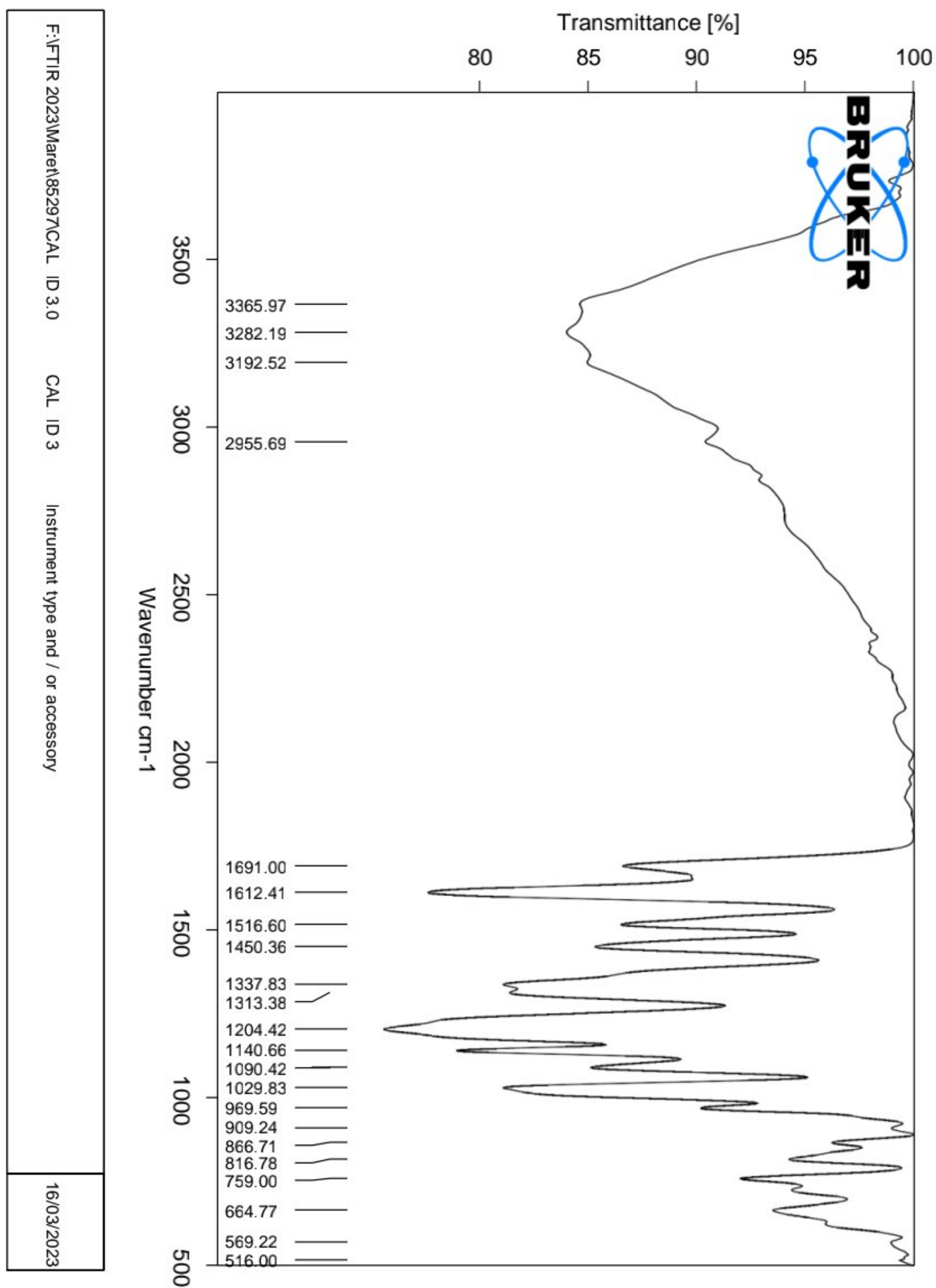


Instrumen NMR

Lampiran 7. Spektrum IR 2-sinamamido-4-metilpentanamida (CAD-1)



Lampiran 8. Spektrum IR *N*-(2-hidroksipropanoil)sinamamida (CAD-2)



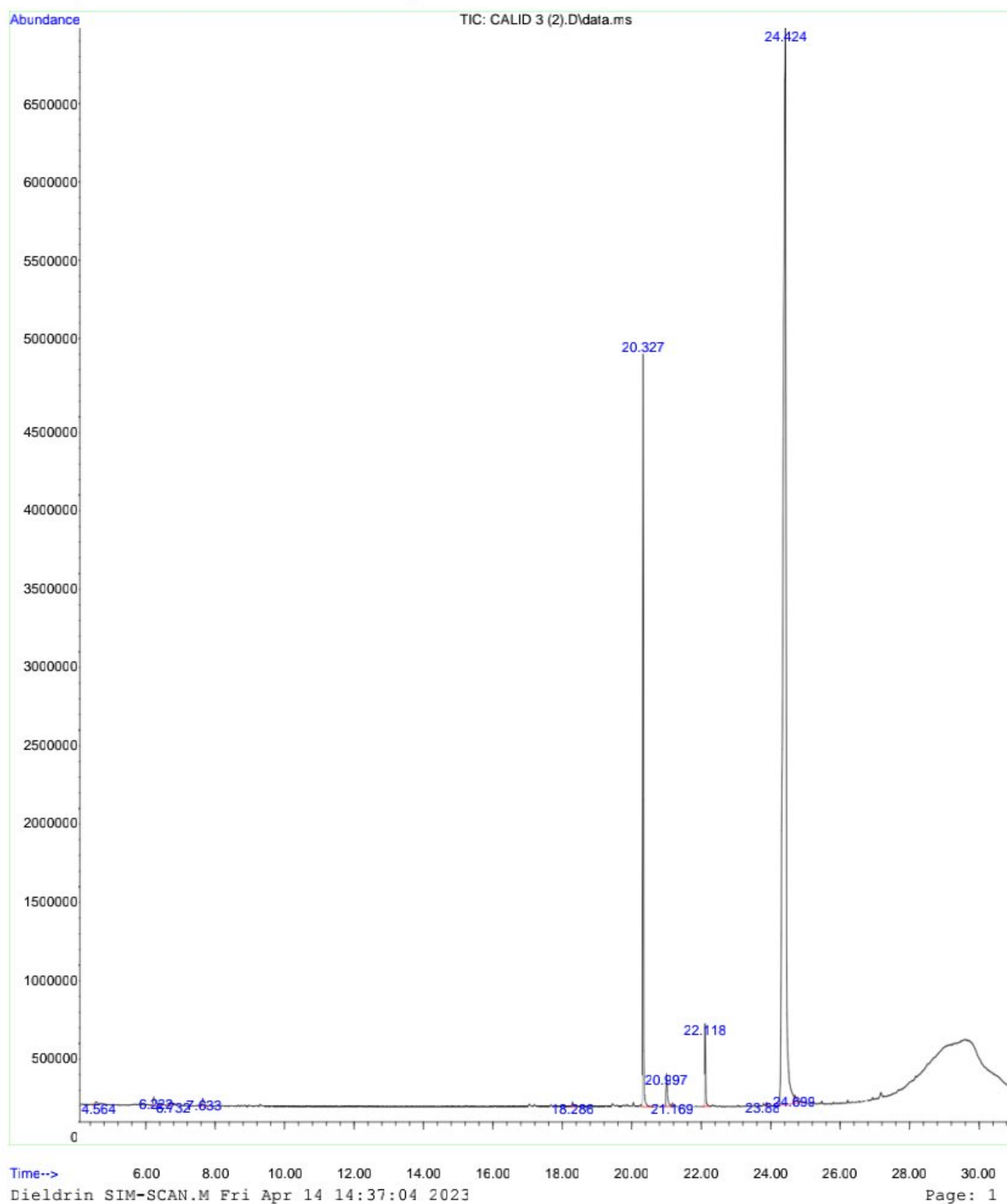
Lampiran 9. Spektrum massa 2-sinamamido-4-metilpentanamida (CAD-1)

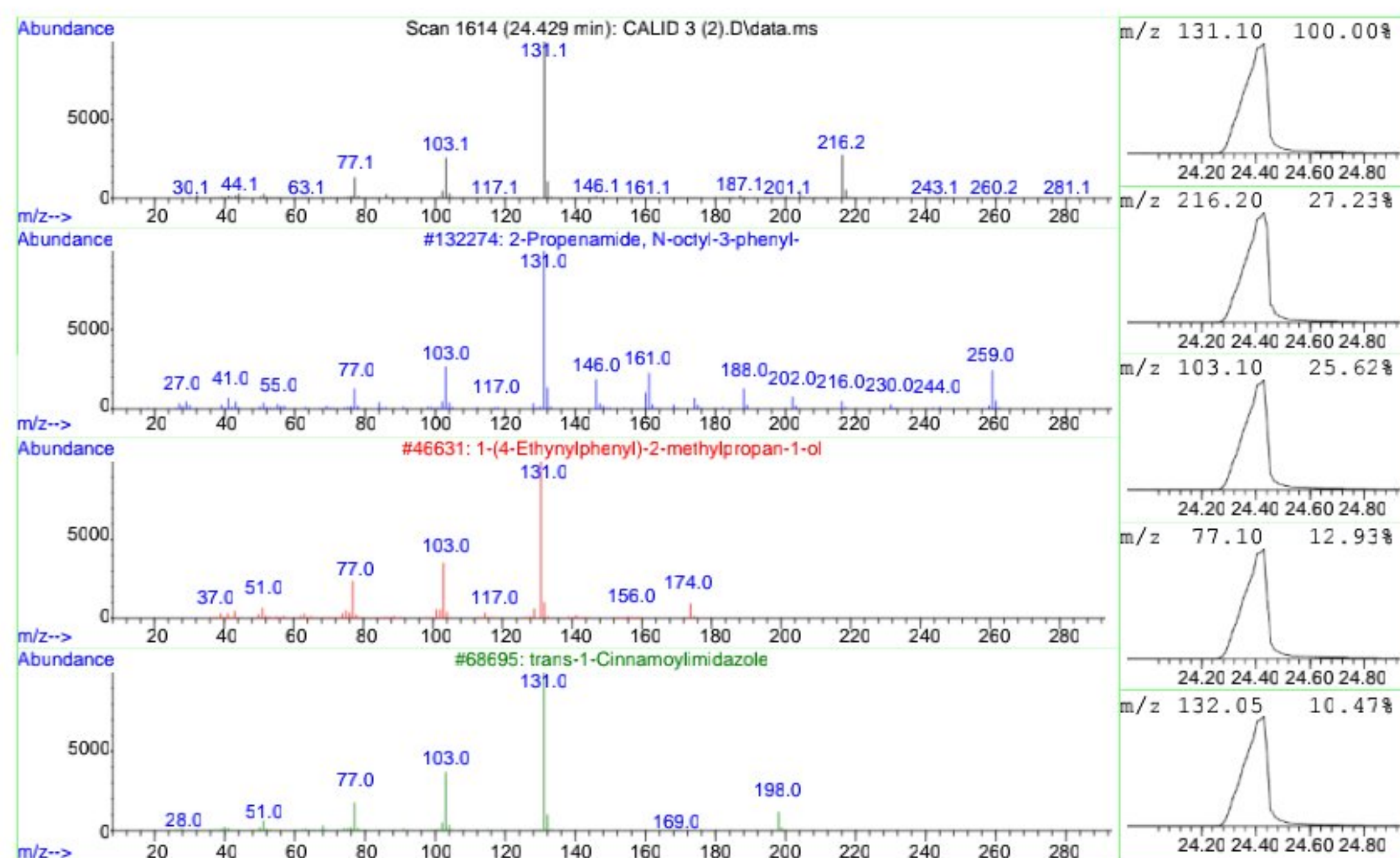
Library Search Report

Data Path : D:\MassHunter\GCMS\2023\3 Maret\27 Maret\
Data File : CALID 3 (2).D
Acq On : 27 Mar 2023 21:35
Operator : Andrean
Sample : CALID 3 (2)
Misc :
ALS Vial : 13 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: D:\MassHunter\Library\NIST17.L Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e





Data File: D:\MassHunter\GCMS\2023\3 Maret\27 Maret\CALID 3 (2).D
Sample : CALID 3 (2)

Peak Number: 11 at 24.429 min Area: 419326427 Area % 79.39

The 3 best hits from each library.			
	Ref\#	CAS\#	Qual
D:\MassHunter\Library\NIST17.L			
1 2-Propenamide, N-octyl-3-phenyl-	132274	055030-48-3	64
2 1-(4-Ethynylphenyl)-2-methylprop...	46631	1000466-39-4	64
3 trans-1-Cinnamoylimidazole	68695	001138-15-4	64

Lampiran 10. Spektrum massa *N*-(2-hidroksipropanoil)sinamamida (CAD-2)

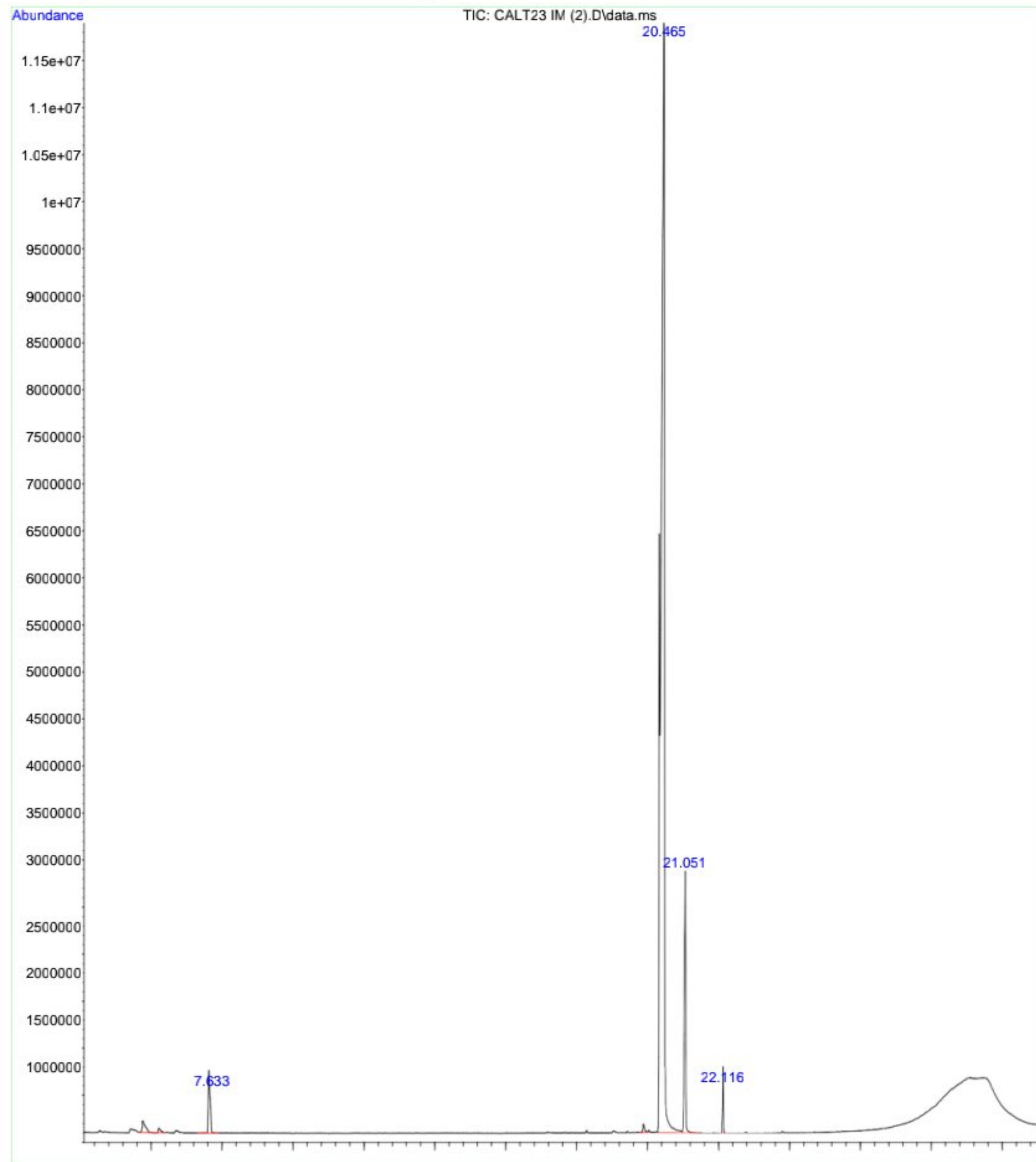
Library Search Report

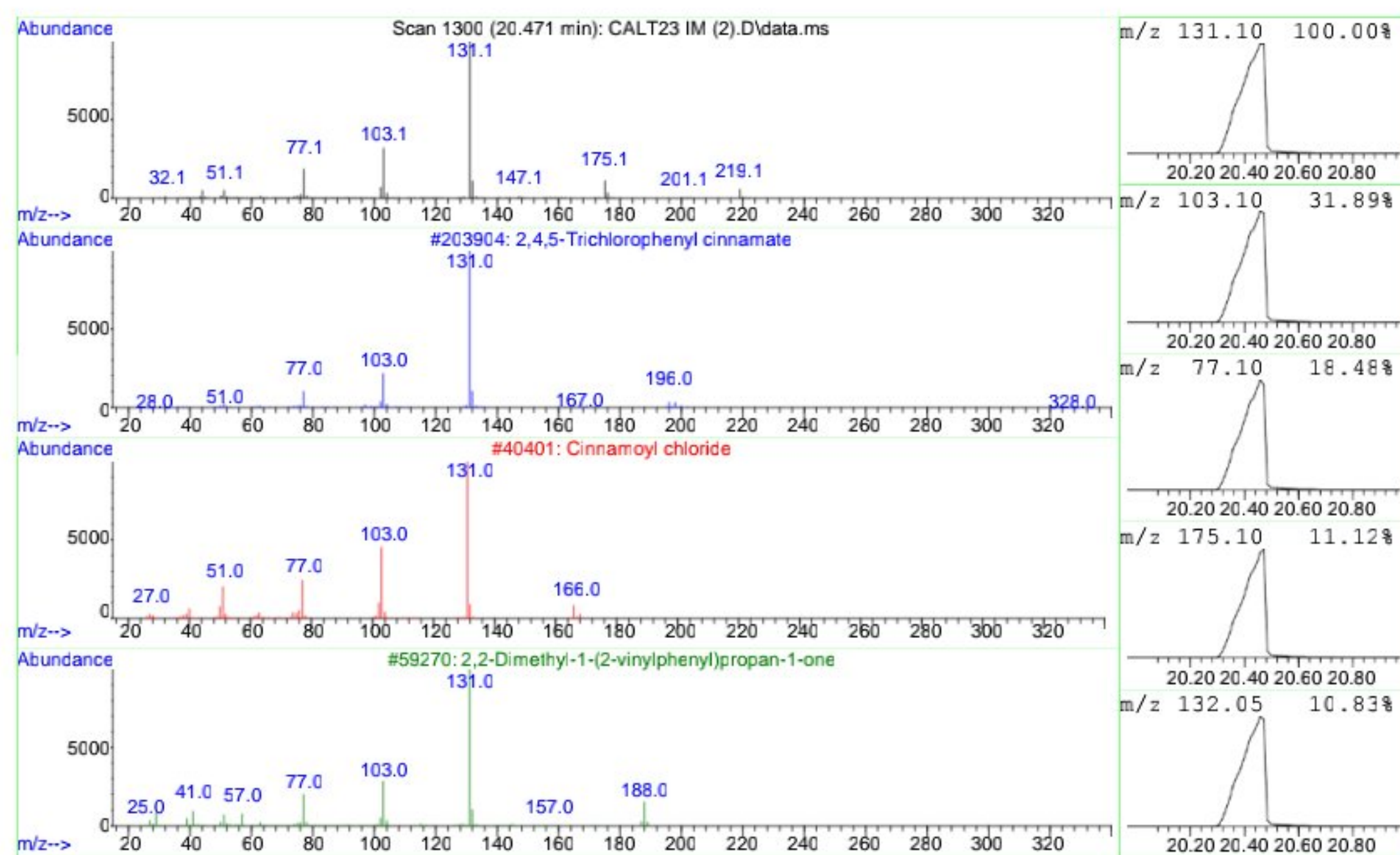
Data Path : D:\MassHunter\GCMS\2023\3 Maret\27 Maret\
Data File : CALT23 IM (2).D
Acq On : 27 Mar 2023 20:58
Operator : Andrean
Sample : CALT23 IM (2)
Misc :
ALS Vial : 12 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: D:\MassHunter\Library\NIST17.L Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex

Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e



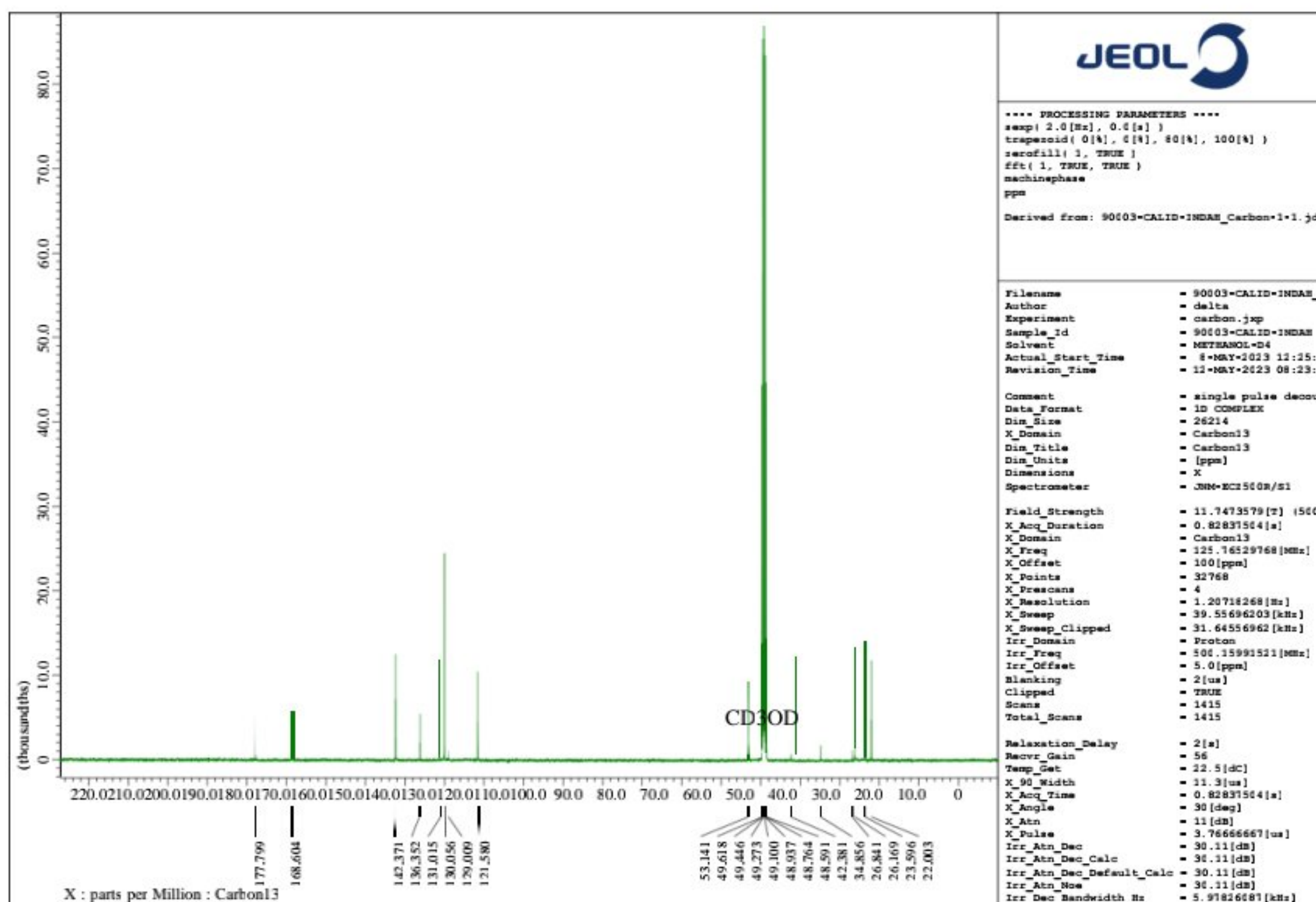
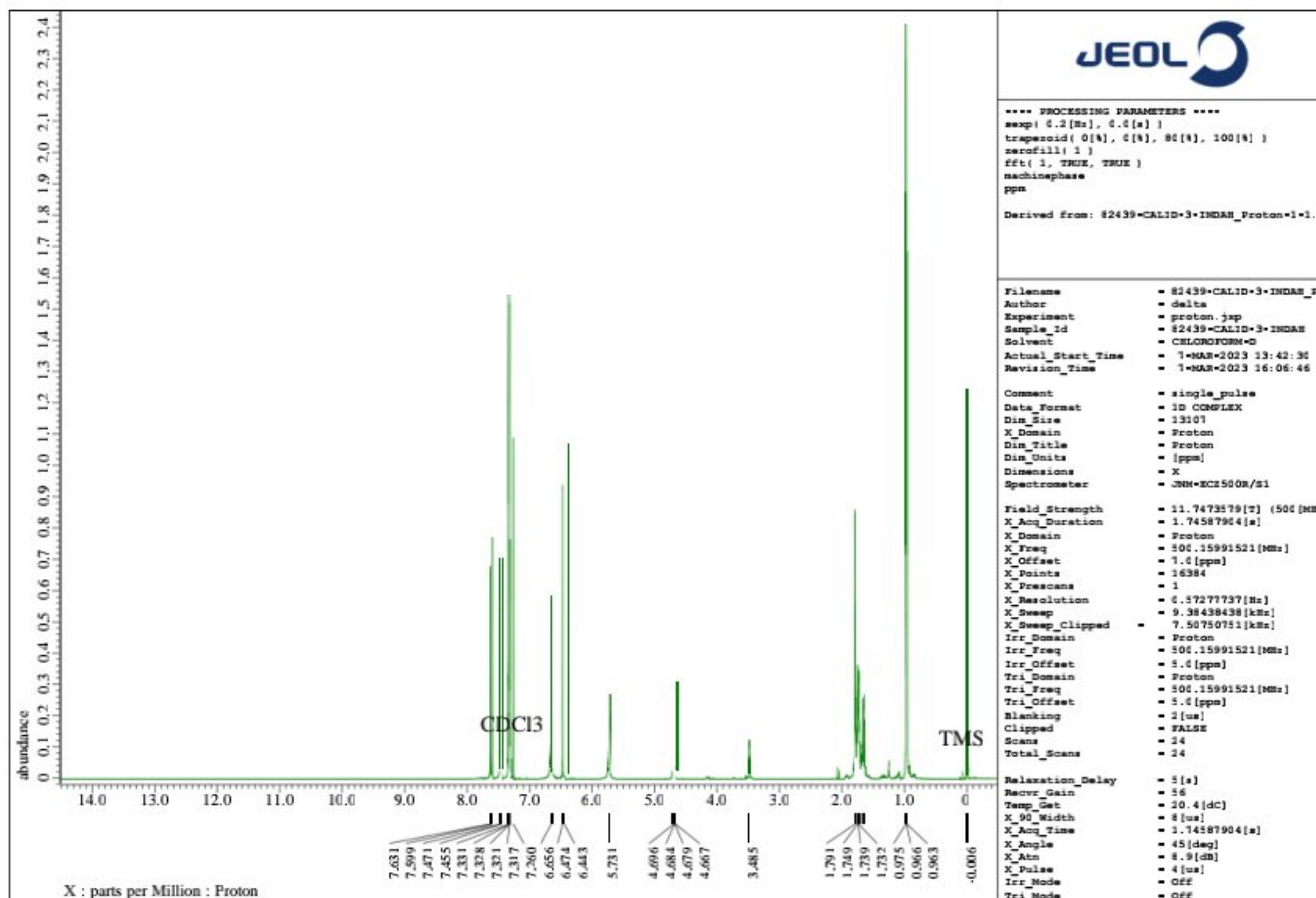


Data File: D:\MassHunter\GCMS\2023\3 Maret\27 Maret\CALT23 IM (2).D
Sample : CALT23 IM (2)

Peak Number: 5 at 20.471 min Area: 783405636 Area % 86.44

The 3 best hits from each library.			
	Ref\#	CAS\#	Qual
D:\MassHunter\Library\NIST17.L			
1 2,4,5-Trichlorophenyl cinnamate	203904	1000242-39-6	72
2 Cinnamoyl chloride	40401	000102-92-1	72
3 2,2-Dimethyl-1-(2-vinylphenyl)pr...	59270	1000210-99-9	72

Lampiran 11. Spektrum ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR 2-sinamamido-4-metil pentanamida(CAD-1)



Lampiran 12. Spektrum ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR *N*-(2-hidroksipropanoil)sinamamida (CAD-2)

