



UNIVERSITAS INDONESIA

**STUDI REAKSI KOPLING OKSIDATIF SENYAWA ISOLAT  
*Mesua kunstleri* DENGAN KATALIS ENZIM KASAR LAKASE  
DAN UJI AKTIVITAS BIOLOGIS PRODUK REAKSI**

**SKRIPSI**

**ATYKA YULIASTUTI  
0606068915**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI KIMIA  
DEPOK  
JUNI 2010**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**STUDI REAKSI KOPLING OKSIDATIF SENYAWA ISOLAT  
*Mesua kunstleri* DENGAN KATALIS ENZIM KASAR LAKASE  
DAN UJI AKTIVITAS BIOLOGIS PRODUK REAKSI**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
sarjana sains**

**ATYKA YULIASTUTI  
0606068915**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI KIMIA  
DEPOK  
JUNI 2010**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,  
dan semua sumber baik yang dikutip maupun  
dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.**

**Nama : Atyka Yuliasuti**

**NPM : 0606068915**

**Tanda Tangan :**

**Tanggal : Juni 2010**

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Atyka Yuliasuti  
NPM : 0606068915  
Program Studi : Kimia  
Judul Skripsi : Studi Reaksi Koping Oksidatif Senyawa Isolat  
*Mesua kunstleri* dengan Katalis Enzim Kasar  
Lakase dan Uji Aktivitas Biologis Senyawa  
Produk Reaksi

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan IPA, Universitas Indonesia

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing : ..... (.....)  
Penguji I : ..... (.....)  
Penguji II : ..... (.....)  
Penguji III : ..... (.....)

Ditetapkan di : .....

Tanggal : .....

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur dipanjatkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan anugerah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Shalawat dan salam semoga senantiasa tercurah untuk Nabi Muhammad saw dan keluarganya serta para pengikutnya hingga akhir zaman.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains di Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Pada kesempatan ini, penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

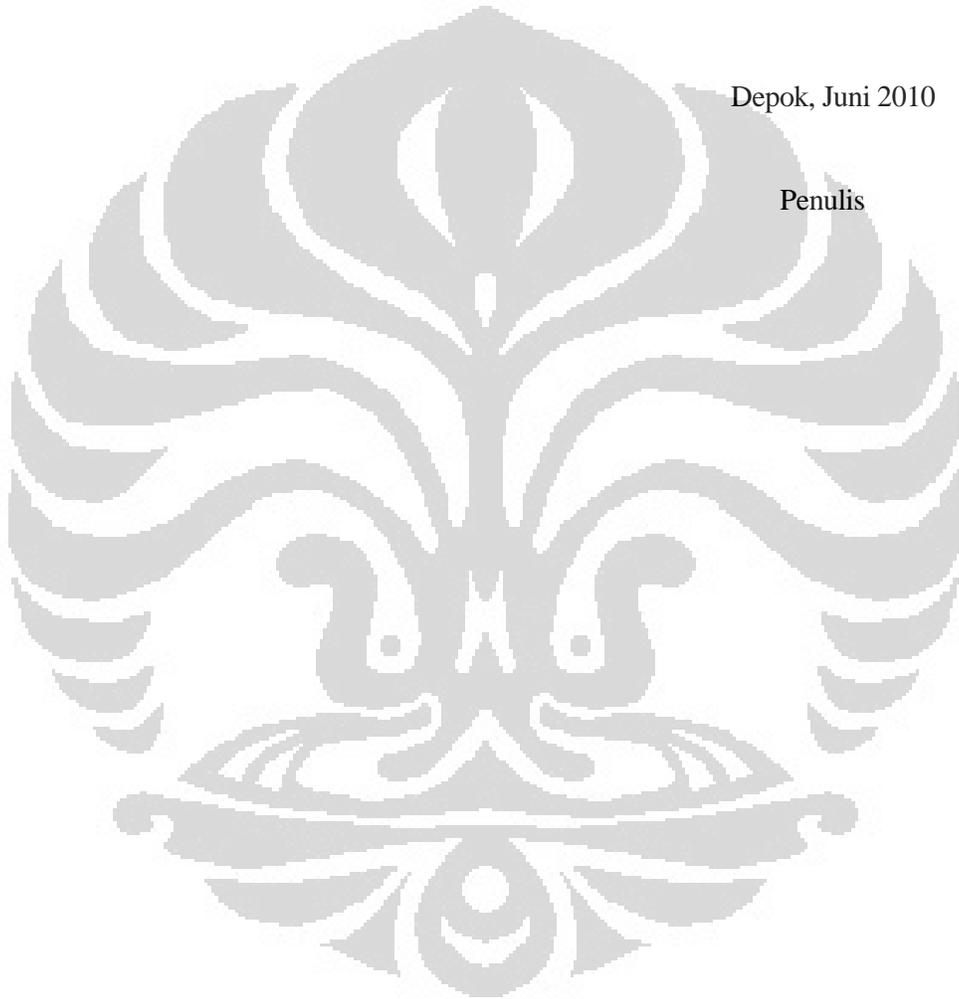
1. Dr. Ir. Antonius Herry Cahyana selaku Pembimbing yang telah memberikan nasihat, saran dan bantuan kepada penulis selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
2. Drs. Ridla Bakri, M.Phil selaku Ketua Departemen Kimia FMIPA UI.
3. Dra. Tresye Utari, M.Si selaku Ketua Koordinator Penelitian Departemen Kimia FMIPA UI.
4. Asep Saefumillah, M.Si., Ph.D selaku Pembimbing Akademis, dan seluruh staf dosen pengajar Departemen Kimia FMIPA UI yang telah memberikan bimbingan dan bekal ilmu pengetahuan kepada penulis.
5. Kedua orang tua tercinta, Alm. Bapak yang telah mengajarkan penulis mengenai banyak hal dan Ibu yang senantiasa membimbing, mendoakan, memberikan semangat dan perhatian yang luar biasa kepada penulis.
6. Kakak-kakak tercinta, Mas Anung, Mas Andri, dan Mas Arwan yang senantiasa memberikan dukungan moril maupun materil di setiap waktu.
7. Seluruh teman-teman penelitian lantai 3 dan 4, khususnya Lab Organik atas segala bantuannya kepada penulis selama penelitian.
8. Seluruh teman-teman kimia angkatan 2006 yang telah berjuang bersama-sama baik dalam suka maupun duka selama 4 tahun terakhir, terutama untuk Riry, Sopi dan Diana.

9. Pihak-pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah banyak membantu penulis selama penelitian berlangsung.

Akhir kata, penulis berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini dapat membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Depok, Juni 2010

Penulis



## HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Atyka Yuliasuti  
NPM : 0606068915  
Program Studi : Kimia  
Departemen : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA)  
Jenis karya : Skripsi

demikian demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Studi Reaksi Koping Oksidatif Senyawa Isolat *Mesua kunstleri* dengan Katalis Enzim Kasar Lakase dan Uji Aktivitas Biologis Produk Reaksi

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : Juni 2010

Yang menyatakan

( Atyka Yuliasuti )

## ABSTRAK

Nama : Atyka Yuliasuti  
Program Studi : Kimia  
Judul : Studi Reaksi Kopling Oksidatif Senyawa Isolat *Mesua kunstleri* dengan Katalis Enzim Kasar Lakase dan Uji Aktivitas Biologis Produk Reaksi

Pada penelitian ini, digunakan enzim lakase yang diisolasi dari jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*). Reaksi kopling oksidatif dilakukan terhadap senyawa isolat *Mesua kunstleri* dalam medium bifasa (etil asetat : buffer fosfat = 4:1) dengan hidrokuinon sebagai mediator. Pemurnian produk reaksi dengan KLT preparatif menghasilkan suatu isolat yang selanjutnya diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FT-IR dan LC-MS. Hasil analisis LC-MS menunjukkan telah terbentuk suatu senyawa baru yang diduga merupakan hasil penggabungan dari senyawa isolat *Mesua kunstleri* dengan nilai  $m/z = 803,549$  pada waktu retensi 4,102- 4,269 menit. Hasil dari uji antioksidan dan alelopati menunjukkan bahwa senyawa produk reaksi memiliki aktivitas yang lebih rendah dibandingkan dengan senyawa isolat *Mesua kunstleri*, disebabkan struktur dari senyawa produk reaksi yang lebih sterik.

Kata Kunci : kopling oksidatif, enzim lakase, *Mesua kunstleri*, antioksidan, alelopati  
xiii+68 halaman : 28 gambar; 5 tabel  
Daftar Pustaka : 26 (1963-2009)

## ABSTRACT

Name : Atyka Yuliasuti  
Program Study : Chemistry  
Title : Study of Oxidative Coupling Reaction from *Mesua kunstleri*'s Compound with Crude Laccase as Catalyst and Assay of Product's Biological Activity

Enzyme laccase that isolated from white oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) is used for oxidative coupling reaction from *Mesua kunstleri*'s compound. The reaction was done using biphasic medium (ethyl acetate : phosphate buffer = 4:1) and used hydroquinone as mediator. Product of reaction was purified by TLC preparative and then identified by UV-Vis spectrophotometer, FT-IR and LC-MS. The LC-MS analysis showed the new compound from coupling reaction *Mesua kunstleri*'s compound with m/z value = 803,549 at retention time 4,102- 4,269 minutes. The product reaction showed lower activity in assay of antioxidant and allelopathy compared with origin *Mesua kunstleri*'s compound, that presumed in relation with steric hindrance of phenolic functional groups.

Key Words : oxidative coupling, enzyme laccase, *Mesua kunstleri*, antioxidant, allelopathy  
xiii+68 pages : 28 pictures; 5 tables  
Bibliography : 26 (1963-2009)

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
LEMBAR PENGESAHAN .....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH .....	vi
ABSTRAK .....	vii
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
<b>1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	2
1.3 Rumusan Masalah.....	2
1.4 Hipotesis .....	2
1.5 Metode Penelitian .....	3
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
2.1 Jamur Tiram Putih .....	4
2.2 Enzim .....	5
2.2.1 Klasifikasi Enzim.....	6
2.2.2 Aktivitas Enzim.....	7
2.2.3 Enzim Lakase.....	8
2.3 Senyawa Fenolik .....	10
2.3.1 Senyawa Isolat <i>Mesua kunstleri</i> .....	11
2.4 Reaksi Oksidasi Kopleng Fenolik .....	13
2.5 Antioksidan .....	14
2.6 Alelopati.....	16
<b>2. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>18</b>
3.1 Alat.....	18
3.2 Bahan .....	18
3.3 Prosedur Kerja.....	19
3.3.1 Isolasi Enzim Lakase.....	19
3.3.2 Pemurnian Enzim dengan Aseton dan <i>Dry Ice</i> .....	19
3.3.3 Penentuan Aktivitas Enzim Lakase.....	19
3.3.4 Penentuan Kadar Protein Enzim (Metode Lowry).....	20
3.3.5 Reaksi Oksidasi Kopleng Sampel dengan Katalis Enzim Lakase.....	20
3.3.6 Isolasi Produk Reaksi.....	21
3.3.7 Uji KLT dan Pemisahan Komponen Campuran Produk.....	21
3.3.8 Uji Aktivitas Antioksidan.....	22
3.3.9 Uji Aktivitas Alelopati.....	22
3.4 Bagan Kerja .....	24

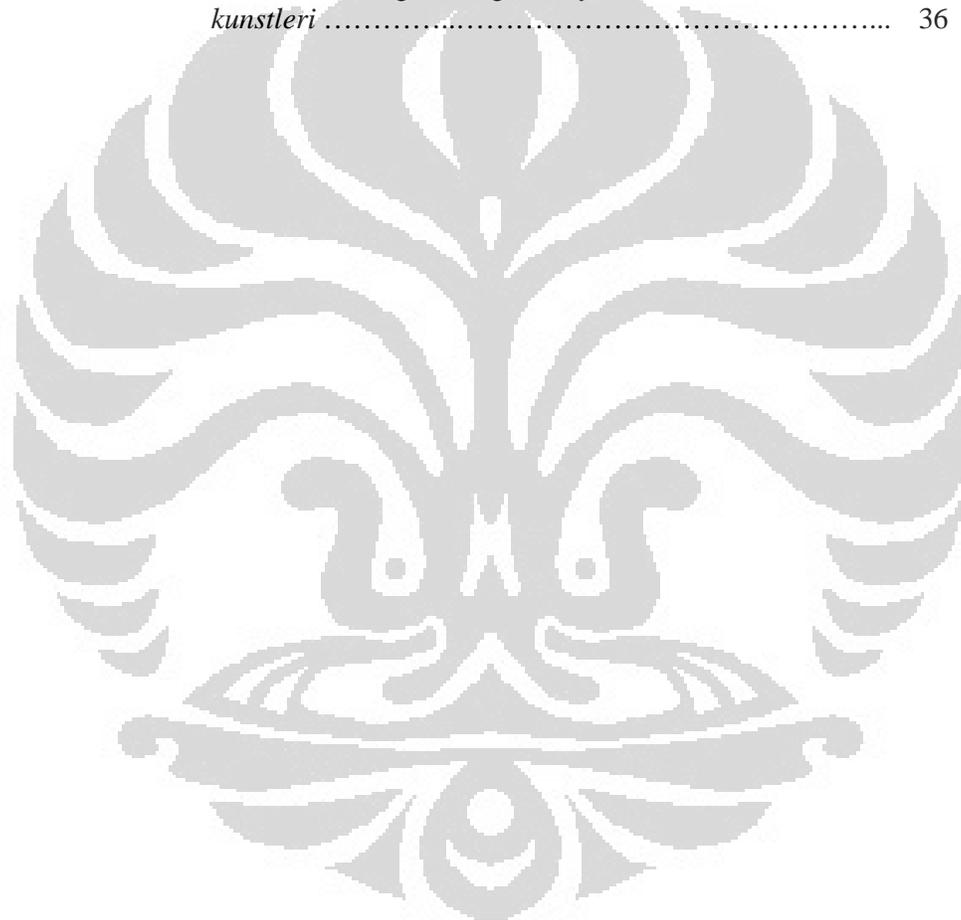
3.4.1	Isolasi, Pemurnian, dan Pengujian Enzim Lakase.....	24
3.4.2	Reaksi Kopling Oksidatif Senyawa Isolat <i>Mesua kunstleri</i> .....	25
3.4.3	Uji Aktivitas Antioksidan.....	26
3.4.4	Uji Aktivitas Alelopati.....	27
<b>4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>28</b>
4.1	Isolasi Enzim Lakase .....	28
4.2	Pembentukan Produk Kopling Oksidatif Senyawa Isolat <i>Mesua kunstleri</i> .....	30
4.3	Analisis Senyawa Produk Reaksi dengan Instrumentasi .....	33
4.3.1	Analisis dengan Spektrofotometer UV-Vis.....	33
4.3.2	Analisis dengan FT-IR.....	35
4.3.3	Analisis dengan LC-MS.....	36
4.4	Proposal Mekanisme Reaksi Penggabungan Senyawa Isolat <i>Mesua kunstleri</i> .....	38
4.5	Uji Aktivitas Biologis .....	40
4.5.1	Uji Aktivitas Antioksidan.....	40
4.5.2	Uji Aktivitas Alelopati.....	43
<b>5.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>46</b>
4.1	Kesimpulan .....	46
4.1	Saran .....	47
	<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>48</b>
	<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>51</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Jamur Tiram Putih ( <i>Pleurotus ostreatus</i> ).....	5
Gambar 2.2	Interaksi Enzim dengan Substrat .....	6
Gambar 2.3	Mekanisme Reaksi Oksidasi yang Dikatalisis oleh Enzim Lakase .....	9
Gambar 2.4	Struktur Beberapa Senyawa Fenolik .....	10
Gambar 2.5	Struktur Senyawa Isolat <i>Mesua kunstleri</i> .....	11
Gambar 2.6	Senyawa Isolat <i>Mesua kunstleri</i> .....	11
Gambar 2.7	Tumbuhan <i>Mesua kunstleri</i> .....	12
Gambar 2.8	Mekanisme Reaksi Oksidasi Koping Fenolik Secara Umum .....	13
Gambar 2.9	Tahapan Reaksi yang Melibatkan Radikal Bebas .....	14
Gambar 2.10	Pembentukan Lipid Peroksida .....	15
Gambar 2.11	Mekanisme Kerja Antioksidan .....	15
Gambar 2.12	Mekanisme Antioksidan Sebagai Prooksidan .....	16
Gambar 4.1	Tahap Pemurnian Enzim .....	29
Gambar 4.2	Mekanisme Reaksi Oksidasi yang Dikatalisis oleh Enzim Lakase .....	30
Gambar 4.3	Hasil Reaksi Senyawa Isolat <i>Mesua kunstleri</i> .....	31
Gambar 4.4	Endapan Produk (Produk Kasar).....	32
Gambar 4.5	Hasil KLT .....	33
Gambar 4.6	Spektrum UV-Vis Senyawa Isolat <i>Mesua kunstleri</i> dan Produk Reaksi .....	34
Gambar 4.7	Kromatogram LC Senyawa Produk Reaksi .....	37
Gambar 4.8	Spektrum Fragmentasi Senyawa Produk Reaksi Pada Waktu Retensi Antara 4,102-4,269 Menit.....	37
Gambar 4.9	Proposal Mekanisme Reaksi Penggabungan Senyawa Isolat <i>Mesua kunstleri</i> .....	38
Gambar 4.10	Mekanisme Senyawa Antioksidan Dengan DPPH .....	40
Gambar 4.11	Perubahan Warna Larutan DPPH .....	41
Gambar 4.12	Grafik Aktivitas Antioksidan Senyawa Isolat <i>Mesua kunstleri</i> .....	41
Gambar 4.13	Grafik Aktivitas Antioksidan Senyawa Produk Reaksi .....	42
Gambar 4.14	Grafik Perbandingan Nilai IC <sub>50</sub> Antara Senyawa Isolat <i>Mesua kunstleri</i> dan Produk Reaksi .....	43
Gambar 4.15	Uji Aktivitas Alelopati Terhadap Biji Sawi .....	44
Gambar 4.16	Grafik IC <sub>50</sub> Aktivitas Alelopati Senyawa Isolat <i>Mesua kunstleri</i> dan Produk Reaksi .....	45

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Klasifikasi Enzim .....	6
Tabel 4.1	Hasil Pengukuran dan Perhitungan Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik Enzim Lakase .....	30
Tabel 4.2	Hasil Pengukuran UV-Vis Senyawa Isolat <i>Mesua kunstleri</i> dan Produk Reaksi.....	34
Tabel 4.3	Identifikasi Gugus Fungsi Senyawa Isolat <i>Mesua kunstleri</i> .....	35
Tabel 4.4	Identifikasi Gugus Fungsi Senyawa Isolat <i>Mesua kunstleri</i> .....	36



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Penentuan Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik Enzim...	51
Lampiran 2.	Spektrum UV Senyawa Isolat <i>Mesua kunstleri</i> dan Produk Reaksi.....	53
Lampiran 3.	Kromatogram LC-MS Senyawa Produk Reaksi.....	54
Lampiran 4.	Kondisi alat LC-MS.....	55
Lampiran 5.	Pengukuran Aktivitas Antioksidan Senyawa Isolat <i>Mesua kunstleri</i> dan Produk Reaksi.....	56
Lampiran 6.	Grafik Aktivitas Antioksidan Senyawa Isolat <i>Mesua kunstleri</i> dan Produk Reaksi.....	57
Lampiran 7.	Perhitungan % Inhibisi Aktivitas Antioksidan Senyawa Isolat <i>Mesua kunstleri</i> dan Produk Reaksi.....	58
Lampiran 8.	Grafik % Inhibisi Aktivitas Antioksidan Senyawa Isolat <i>Mesua kunstleri</i> dan Produk Reaksi.....	59
Lampiran 9.	Perhitungan nilai IC <sub>50</sub> dari Aktivitas Antioksidan.....	60
Lampiran 10.	Grafik Perbandingan Nilai IC <sub>50</sub> dari Aktivitas Antioksidan Antara Senyawa Isolat <i>Mesua kunstleri</i> dan Produk Reaksi.....	61
Lampiran 11.	Pengukuran Aktivitas Alelopati Senyawa Isolat <i>Mesua kunstleri</i> dan Produk Reaksi Terhadap 30 Biji Sawi.....	62
Lampiran 12.	Perhitungan % Inhibisi Aktivitas Alelopati Senyawa Isolat <i>Mesua kunstleri</i> dan Produk Reaksi.....	63
Lampiran 13.	Grafik % Inhibisi Aktivitas Alelopati Senyawa Isolat <i>Mesua kunstleri</i> dan Produk Reaksi.....	64
Lampiran 14.	Perhitungan nilai IC <sub>50</sub> dari Aktivitas Alelopati.....	65
Lampiran 15.	Grafik Perbandingan Nilai IC <sub>50</sub> dari Aktivitas Alelopati Antara Senyawa Isolat <i>Mesua kunstleri</i> dan Produk Reaksi.....	66
Lampiran 16.	Spektrum IR Senyawa Isolat <i>Mesua kunstleri</i> .....	67
Lampiran 17.	Spektrum IR Senyawa Produk Reaksi.....	68

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Tumbuhan menghasilkan metabolit primer dan sekunder di dalam seluruh siklus kehidupannya. Metabolit primer berperan penting dalam kehidupan, seperti untuk pembentukan struktur, pertumbuhan dan kebutuhan energi. Metabolit sekunder dibuat oleh makhluk hidup sebagai respon atas berbagai ancaman yang datang dari luar, umumnya khas bagi organisme tertentu. Produksi metabolit sekunder seringkali dikaitkan dengan faktor eksternal, seperti musim, suhu dan perkawinan (Herbert, 1995).

Salah satu metabolit sekunder yang dihasilkan tumbuhan adalah senyawa fenolik. Senyawa fenolik merupakan senyawa bahan alam yang banyak dijumpai dalam tanaman. Senyawa ini telah banyak diteliti secara luas untuk dimanfaatkan kegunaannya bagi manusia. Dalam industri makanan dan kosmetik, senyawa fenolik berperan sebagai penghasil aroma yang khas, sedangkan dalam industri farmasi dan kesehatan banyak digunakan sebagai antioksidan, antikanker, antimikroba, dan lain-lain. Selain itu, senyawa fenolik juga banyak digunakan sebagai pestisida alami (herbisida, insektisida, dan fungisida) yang berguna untuk menghambat dan mengendalikan gulma atau patogen yang berasal dari tumbuhan atau mikroorganisme pada lahan pertanian (Harborne, 1987). Senyawa fenolik bioaktif dapat digunakan sebagai pestisida alami, karena memiliki aktivitas biologis sebagai alelopati.

Senyawa fenolik memiliki struktur yang khas, yaitu memiliki satu atau lebih gugus hidroksil yang terikat pada satu atau lebih cincin aromatik benzena (Fessenden, R.J. & Fessenden J.S., 1982), sehingga senyawa ini juga memiliki sifat yang khas, yaitu dapat teroksidasi. Adanya sifat ini memungkinkan suatu senyawa fenolik dapat membentuk senyawa baru yang lebih aktif yaitu dalam bentuk dimernya. Salah satu cara yang sering digunakan dalam mengoksidasi senyawa fenolik menjadi bentuk dimernya, yaitu dengan bantuan katalis enzim lakase. Enzim lakase memiliki kemampuan mentransfer elektron antara dua sistem redoks. Proses transfer elektron inilah yang menyebabkan terjadinya

oksidasi kopling pada senyawa fenolik. Penggunaan lakase sebagai katalis mempunyai keuntungan, yaitu lebih spesifik dan mudah terbiodegradasi sehingga lebih ramah lingkungan (Riva, 2006).

Pada penelitian sebelumnya telah berhasil disintesis senyawa bioaktif baru yaitu produk dimer dari eugenol dengan katalis enzim lakase yang berasal dari jamur tiram putih yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan (Arifin, 2008). Selain itu, telah berhasil pula disintesis produk dimer dari etil ferulat dengan katalis enzim peroksidase dari sawi hijau yang memiliki aktivitas sebagai alelopati (Haro, 2007). Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan reaksi kopling oksidatif dengan katalis enzim lakase dari jamur tiram putih untuk menghasilkan produk kopling dari senyawa isolat *Mesua kunstleri* dan akan diuji aktivitas biologisnya sebagai antioksidan dan alelopati.

## 1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi produk hasil reaksi kopling oksidatif dari senyawa isolat *Mesua kunstleri* yang dikatalisis oleh enzim lakase dari jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*) dan menguji aktivitas biologisnya sebagai antioksidan dan alelopati.

## 1.3 Rumusan Masalah

Pada penelitian ini akan dilakukan reaksi kopling oksidatif dengan katalis enzim lakase dari jamur tiram putih untuk menghasilkan produk kopling dari senyawa isolat *Mesua kunstleri*. Dari studi ini akan diidentifikasi senyawa produk reaksi yang terbentuk dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FT-IR dan LC-MS. Selain itu, dari penelitian ini juga dapat diketahui aktivitas biologis dari senyawa produk reaksi yang terbentuk sebagai antioksidan dan alelopati.

## 1.4 Hipotesis

- Enzim lakase dapat mengkatalisis reaksi kopling oksidatif dari senyawa isolat *Mesua kunstleri* membentuk dimernya.

- Produk kopling oksidatif senyawa isolat *Mesua kunstleri* yang terbentuk diduga memiliki aktivitas biologis yang lebih besar sebagai antioksidan dan alelopati dibandingkan dengan senyawa awalnya.

### 1.5 Metode Penelitian

Enzim lakase diisolasi dari jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*) dengan menggunakan larutan buffer K-fosfat pH 6,0. Ekstrak enzim kasar yang didapatkan kemudian dimurnikan dengan penambahan pelarut aseton dan *dry ice*. Endapan yang terbentuk lalu diukur aktivitas enzim dan kadar proteinnya. Selanjutnya, enzim lakase yang sudah dimurnikan tersebut digunakan untuk mengkatalisis reaksi kopling oksidatif senyawa isolat *Mesua kunstleri* dalam medium bifasa (etil asetat : buffer fosfat = 4:1) dengan mediator hidrokuinon. Produk hasil reaksi yang terbentuk dimurnikan dengan menggunakan KLT preparatif dengan eluen berupa n-heksana : etil asetat = 10:1 lalu diidentifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis, FT-IR dan LC-MS. Selanjutnya, produk hasil reaksi tersebut diuji aktivitas biologisnya sebagai antioksidan dan alelopati.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Jamur Tiram Putih

Jamur tiram merupakan jamur kayu yang tumbuh berderet menyamping pada permukaan batang pohon yang sudah melapuk atau pokok batang pohon yang sudah ditebang. Di alam bebas, jamur tiram dapat dijumpai hampir sepanjang tahun di daerah hutan pegunungan yang sejuk. Jamur ini memiliki tudung tubuh yang tumbuh mekar membentuk corong dangkal seperti kulit kerang (tiram) atau bentuknya menyerupai telinga. Hal ini sesuai dengan nama latinnya yaitu *Pleurotus*. Istilah *Pleurotus* berasal dari bahasa Yunani yang terdiri dari dua kata, yaitu *pleuoron* yang berarti menyamping dan *ous* yang berarti telinga.

Ditinjau dari segi morfologisnya, tubuh jamur tiram terdiri dari tudung (*pileus*) dan tangkai (*stipe* atau *stalk*). *Pileus* berbentuk mirip cangkang tiram atau telinga dengan ukuran diameter 5 – 15 cm dan permukaan bagian bawah berlapis-lapis seperti insang (*lamella* atau *giling*) berwarna putih dan lunak yang berisi basidiospora. Tangkainya dapat pendek atau panjang tergantung pada kondisi lingkungan dan iklim yang mempengaruhi pertumbuhannya. Tangkai ini yang menyangga tudung agak lateral (di bagian tepi) atau eksentris (agak ke tengah). Jamur tiram termasuk golongan jamur yang memiliki spora yang berwarna. Jejak sporanya menampilkan warna putih sampai kuning tiram. Nama-nama jamur tiram biasanya dibedakan menurut warna tudung tubuh atau sporanya, seperti jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*), jamur tiram merah jambu (*P. flabellatus*), jamur tiram abu-abu (*P. cytidiusus*) dan sebagainya (Widodo, 2007).

Jamur tiram termasuk tumbuhan hasil pertanian organik yang tidak mengandung kolesterol. Setiap 100 g jamur tiram mengandung protein 19-35%, dengan 9 macam asam amino dan mengandung lemak 1,7 – 2,2% terdiri dari 72% asam lemak tidak jenuh. Jamur tiram juga memiliki kandungan sejumlah vitamin penting yaitu vitamin B, C, dan provitamin D. Sementara kandungan mineral utamanya adalah kalium (K), fosfor (P), dan kalsium (Ca).

Taksonomi jamur tiram putih (*MEROPS the Peptidase Database*, 2010) :

Super kingdom : Eukaryota

Kingdom : Fungi

Divisi : Basidiomycota

Super kelas : Hymenomycetes

Kelas : Homobasidiomycetes

Ordo : Agaricales

Famili : Pleurotaceae

Genus : *Pleurotus*

Spesies : *Pleurotus ostreatus*



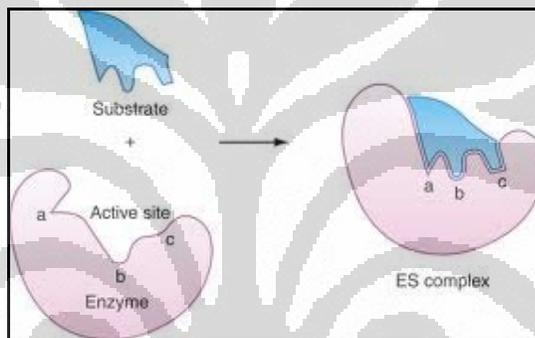
Gambar 2.1 Jamur Tiram Putih (*Pleurotus ostreatus*)

## 2.2 Enzim

Enzim adalah katalis biologis yang berfungsi untuk mempercepat dan mengarahkan reaksi-reaksi kimia (metabolisme) yang terjadi di dalam sistem hidup tanpa mempengaruhi kesetimbangan reaksi. Enzim dapat meningkatkan kecepatan reaksi kimia dengan cara menurunkan energi aktivasi yang diperlukan untuk menghasilkan suatu produk (Hudiyono, 1998).

Molekul enzim memiliki sisi aktif yang disebut juga pusat aktif (*active center*). Daerah pusat enzim ini mempunyai sisi ikatan dan sisi katalitik. Sisi

ikatan menghubungkan enzim dengan molekul substrat membentuk suatu kompleks enzim-substrat (ES). Interaksi ini memungkinkan enzim dan molekul substrat mempunyai orientasi yang tetap satu sama lain. Sementara sisi katalitik merupakan interaksi yang memungkinkan enzim untuk berikatan dengan gugus bereaksi (*reacting group*) dari molekul substrat. Enzim hanya dapat berikatan dengan substrat yang sesuai dan spesifik. Di akhir reaksi katalitik, enzim akan dilepaskan kembali, sehingga struktur enzim tidak berubah, baik sebelum maupun sesudah reaksi. Enzim yang dilepaskan akan berikatan lagi dengan substrat untuk menghasilkan produk dan begitu seterusnya.



Gambar 2.2 Interaksi Enzim dengan Substrat

### 2.2.1 Klasifikasi Enzim

Menurut *International Commission of Enzyme*, secara sistematis enzim digolongkan menjadi enam kelas utama yang dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Klasifikasi Enzim

	Kelas Enzim	Jenis reaksi yang dikatalisis	Contoh
1.	Oksidoreduktase	Pemindahan elektron antara dua sistem redoks (reaksi oksidasi/reduksi)	Lakase, Peroksidase, Laktat dehidrogenase
2.	Transferase	Transfer atom atau gugus antara	Kinase

		dua molekul	
3.	Hidrolase	Reaksi hidrolisis (pemindahan gugus fungsional ke air)	Protease, Lipase, Amilase
4.	Liase	Penambahan gugus fungsi pada ikatan rangkap (adisi) atau pembentukan ikatan rangkap dengan pelepasan gugus fungsi.	Fumarase, Histidin dekarboksilase
5.	Isomerase	Pemindahan gugus dalam suatu molekul yang menghasilkan bentuk isomer	Epimerase, Alanin rasemase
6.	Ligase	Pembentukan ikatan C-C, C-S, C-O, dan C-N diikuti dengan pemutusan isofosfat dari ATP	Tiokinase, Glutamin sintase

### 2.2.2 Aktivitas Enzim

Satuan standar yang digunakan untuk mengukur aktivitas enzim adalah unit aktivitas. Aktivitas kuantitatif enzim berhubungan dengan jumlah (unit) enzim yang dibutuhkan untuk mengkatalisis reaksi. Satu unit enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang mampu mengkatalisis perubahan setiap  $\mu\text{mol}$  substrat menjadi produk per menit pada kondisi tertentu. Sedangkan aktivitas spesifik enzim didefinisikan sebagai jumlah unit enzim yang terdapat dalam 1 mg protein enzim. Berdasarkan definisi tersebut maka nilai aktivitas spesifik enzim menunjukkan kemurnian suatu enzim, dimana semakin besar nilai aktivitas spesifiknya berarti kemurnian enzim tersebut semakin tinggi.

Aktivitas enzim dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain :

#### 1. Pengaruh konsentrasi substrat

Agar suatu reaksi enzimatik dapat berlangsung, harus terdapat kontak antara enzim dengan substrat. Oleh karena ukuran enzim lebih besar dari substrat maka tidak seluruh bagian enzim mengadakan kontak dengan substrat. Kontak antara substrat dengan enzim terjadi pada sisi aktif enzim. Kontak ini hanya mungkin terjadi apabila sisi aktif enzim mempunyai ruang yang tepat untuk menampung substrat yang sesuai. Penambahan substrat akan semakin meningkatkan kontak yang terjadi pada sisi aktif enzim sampai pada konsentrasi yang maksimum. Peningkatan konsentrasi substrat sampai melebihi konsentrasi optimumnya akan mengakibatkan aktivitas enzim menurun. Dalam hal ini, semua

enzim yang ada sudah terikat dengan substrat sehingga kelebihan substrat dapat menghambat enzim.

## 2. Pengaruh pH

Sebagian besar enzim adalah suatu protein sehingga perubahan pH akan langsung mempengaruhi sifat ionik dari gugus amino dan gugus karboksilat. Hal ini akan mempengaruhi sisi aktif dan konformasi enzim. Jika enzim berada pada pH yang lebih kecil dari pH optimum, maka aktivitas enzim mengkatalitik reaksi belum optimal. Sebaliknya pada pH di atas pH optimum, enzim akan terdenaturasi karena rantai polipeptida akan terputus sehingga enzim menjadi tidak aktif lagi. Oleh karena itu, perlu dicari pH optimum dari enzim tersebut.

## 3. Pengaruh suhu

Pada umumnya enzim adalah suatu protein, sehingga seperti halnya protein, enzim akan kehilangan fungsi kerjanya pada temperatur yang tinggi karena mengalami denaturasi.

## 4. Pengaruh aktivator

Pada umumnya enzim tidak akan berfungsi optimal atau tidak berfungsi sama sekali jika tidak ada zat aktivator yang biasanya berupa ion logam.

## 5. Pengaruh inhibitor

Inhibitor adalah suatu senyawa yang cenderung menurunkan laju suatu reaksi enzimatik. Secara umum, inhibitor terbagi menjadi dua yaitu inhibitor reversibel dan inhibitor irreversibel. Inhibitor reversibel terikat pada enzim secara reversibel dan dapat dilepas dari enzim dengan cara dialisis atau dengan menambah komponen lain. Inhibitor irreversibel terikat secara kuat dengan enzim dan derajat inhibisinya akan semakin kuat, sehingga tidak dapat dipisahkan dari enzim tanpa merusaknya.

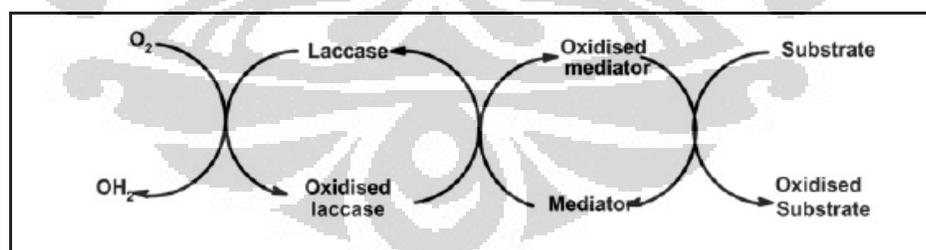
### 2.2.3 Enzim Lakase

Molekul enzim lakase (EC 1.10.3.2) terbentuk dari dimer atau tetramer glikoprotein, dimana pada masing-masing monomernya terdapat empat atom Cu yang terdistribusi pada tiga sisi redoksnya. Lakase banyak ditemukan pada jamur dan tanaman tingkat tinggi. Pada jamur, enzim lakase telah banyak diisolasi dari

jamur golongan Ascomycetes, Deuteromycetes dan Basidiomycetes (Adinarayana, K., *et al.*, 2007).

Lakase termasuk dalam golongan enzim oksidoreduktase yang dapat mengkatalisis reaksi reduksi-oksidasi. Reaksi oksidasi ini terjadi melalui mekanisme transfer elektron tunggal sehingga akan dihasilkan suatu radikal substrat yang reaktif. Kemudian, radikal tersebut dapat membentuk dimer, oligomer, maupun polimer. Sementara itu, secara bersamaan molekul  $O_2$  juga direduksi menjadi  $H_2O$ .

Sebagai katalis reaksi oksidasi, lakase mempunyai kespesifikan terhadap substrat untuk berbagai senyawa aromatik, terutama golongan fenolik. Kemampuan lakase untuk mengkatalisis reaksi oksidasi suatu substrat fenolik dapat ditingkatkan dengan adanya suatu mediator. Oksidasi enzimatik yang melibatkan lakase dan mediatornya disebut dengan *Laccase Mediated System* (LMS). Mediator di sini berperan sebagai elektron transfer yang akan dioksidasi oleh lakase dan selanjutnya mediator dalam bentuk teroksidasi ini dapat mengoksidasi substrat fenolik menjadi bentuk radikal yang reaktif melalui transfer elektron tunggal (Couto, 2006). Struktur mediator yang lebih kecil daripada substrat memungkinkan dapat dioksidasi oleh lakase. Skema mekanisme reaksi oksidasi yang dikatalisis oleh enzim lakase dapat dilihat pada gambar berikut ini :



Gambar 2.3 Mekanisme Reaksi Oksidasi yang Dikatalisis oleh Enzim Lakase

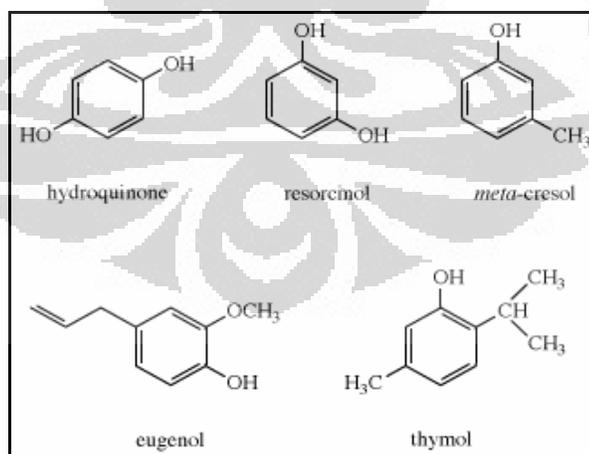
Teknik oksidasi enzimatik terutama yang menggunakan lakase telah banyak diaplikasikan pada berbagai bidang industri seperti tekstil, kertas dan *pulp*, industri makanan serta nanobioteknologi. Aplikasi lainnya adalah untuk

bioremediasi tanah dan kimia sintetik. Penggunaan lakase yang semakin berkembang luas ini terutama disebabkan karena tingkat spesifisitas yang tinggi terhadap produk yang dihasilkan. Selain itu, keuntungan lainnya yang didapat adalah reaksi yang dikatalisis oleh lakase termasuk ramah lingkungan karena hanya dihasilkan molekul air sebagai produk samping (Riva, 2006).

### 2.3 Senyawa Fenolik

Secara umum, senyawa fenolik didefinisikan sebagai senyawa yang memiliki kerangka dasar cincin aromatik yang mengikat satu atau lebih gugus hidroksil. Golongan senyawa fenolik ini mempunyai variasi struktur yang luas dan beragam serta mudah ditemukan sebagai metabolit sekunder di hampir semua bagian tanaman mulai dari daun, bunga sampai buah. Senyawa ini merupakan senyawa biologis aktif yang telah banyak dimanfaatkan oleh manusia dalam berbagai bidang industri. Komponen bioaktif senyawa fenolik berperan penting dalam memberikan efek kesehatan untuk pencegahan atau pengobatan penyakit.

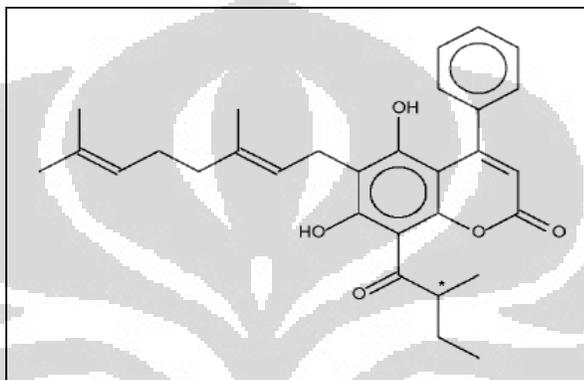
Senyawa fenolik biasanya terdapat dalam bentuk senyawa ester, eter, glikosida, dan sebagian besar termasuk ke dalam golongan flavonoid (Cahyana, 2004). Berikut adalah beberapa contoh senyawa fenolik :



Gambar 2.4 Struktur Beberapa Senyawa Fenolik

### 2.3.1 Senyawa Isolat *Mesua kunstleri*

Sampel yang akan diujikan pada penelitian ini adalah senyawa 6-[(E)-3,7-Dimethylocta-2,6-dienyl]-5,7-dihydroxy-8-(2-methylbutanoyl)-4-phenyl-2H-chromen-2-one. Senyawa ini diisolasi dari kulit kayu tumbuhan *Mesua kunstleri* (Gomathi, C., *et al.*, 2008).



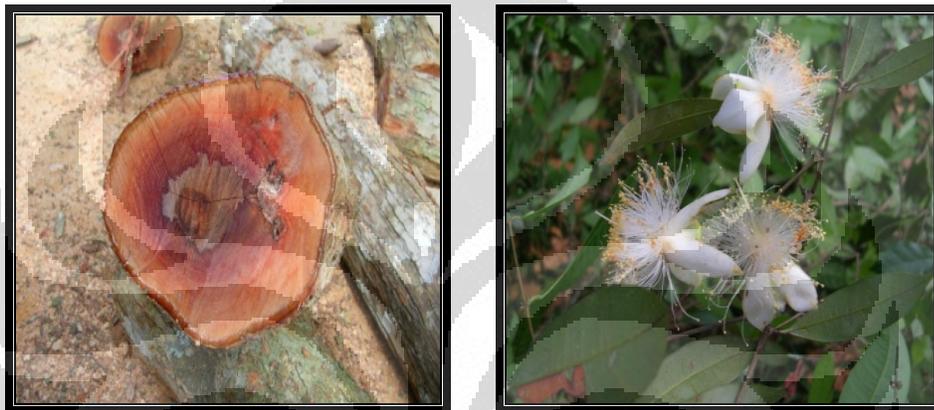
Gambar 2.5 Struktur Senyawa Isolat *Mesua kunstleri*



Gambar 2.6 Senyawa Isolat *Mesua kunstleri*

Tumbuhan *Mesua kunstleri* merupakan pohon yang besar dengan ketinggian hingga 8 meter, dan diameter mencapai 15 cm. Batangnya lurus, bulat torak dengan banir tipis dan lebar. Kayunya berwarna coklat kemerahan, buahnya hijau memanjang dan bunganya berwarna putih (Gomathi, 2009). *Mesua kunstleri* banyak tumbuh di hutan tropika di dataran rendah sampai ketinggian 1500 m dpl.

Seringkali tumbuhan ini didapati tumbuh di hutan-hutan yang berawa. Perkembangbiakan pohon ini dengan menggunakan biji, namun dapat juga diperbanyak dengan menggunakan stek. *Mesua kunstleri* tumbuh di Indonesia antara lain di Pulau Sumatra, Kalimantan, Jawa, Kepulauan Sunda Kecil, Sulawesi dan Maluku. Selain itu, juga terdapat di Thailand Selatan dan Malaysia. Di Indonesia, tumbuhan ini dikenal dengan nama Nagasari.



Gambar 2.7 Tumbuhan *Mesua kunstleri*

Taksonomi tumbuhan *Mesua kunstleri* :

Kingdom : Plantae

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Ordo : Theales

Famili : Clusiaceae

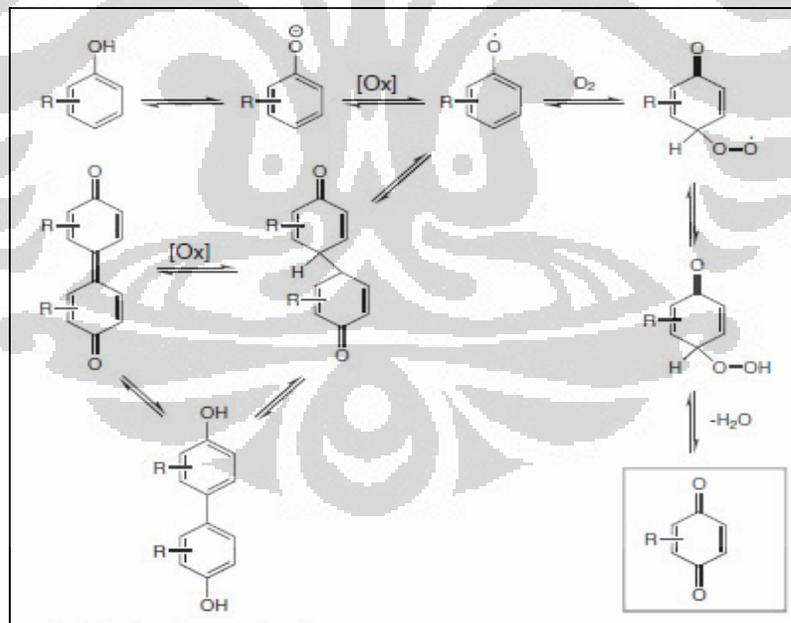
Genus : *Mesua*

Spesies : *Mesua kunstleri*

## 2.4 Reaksi Oksidasi Kopliling Fenolik

Reaksi oksidasi kopliling adalah reaksi penggabungan dua molekul melalui reaksi oksidasi membentuk ikatan C-C atau C-O. Mekanisme reaksi oksidasi kopliling dapat terjadi dengan bantuan katalis yang mengandung logam (Hull, 2006).

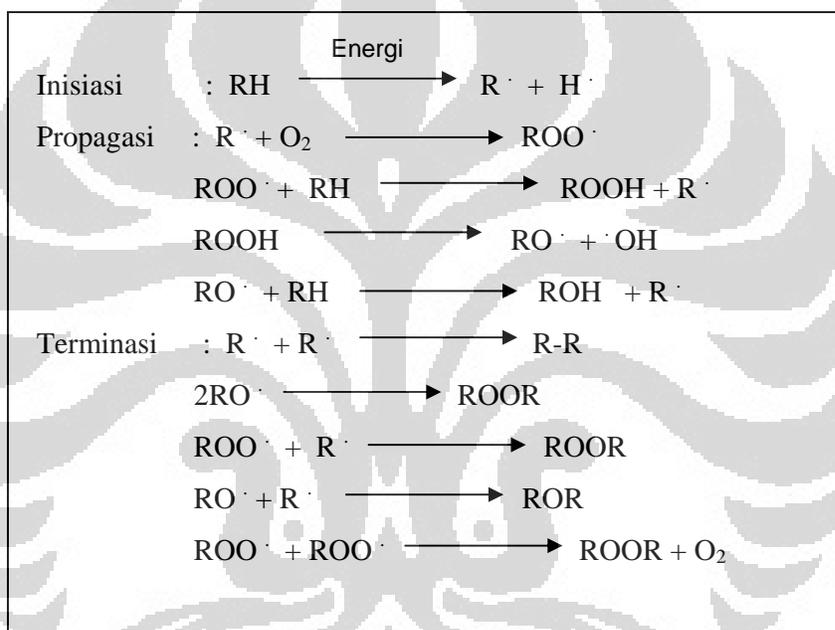
Secara umum, reaksi oksidasi kopliling dibagi menjadi dua yaitu heterokopliling dan homokopliling. Heterokopliling adalah penggabungan dua molekul yang berbeda membentuk suatu molekul baru. Sedangkan homokopliling adalah penggabungan dua molekul sejenis membentuk dimer atau oligomernya. Homokopliling ini terutama banyak terjadi pada pembentukan dimer atau oligomer dari senyawa fenolik yang sangat penting pada biosintesis bahan alam. Mekanisme oksidasi kopliling ini melibatkan suatu radikal sebagai intermediet. Radikal ini bersifat reaktif dan mampu menyerang atau bergabung dengan radikal lainnya (Kobayashi, 2001).



Gambar 2.8 Mekanisme Reaksi Oksidasi Kopliling Fenolik Secara Umum

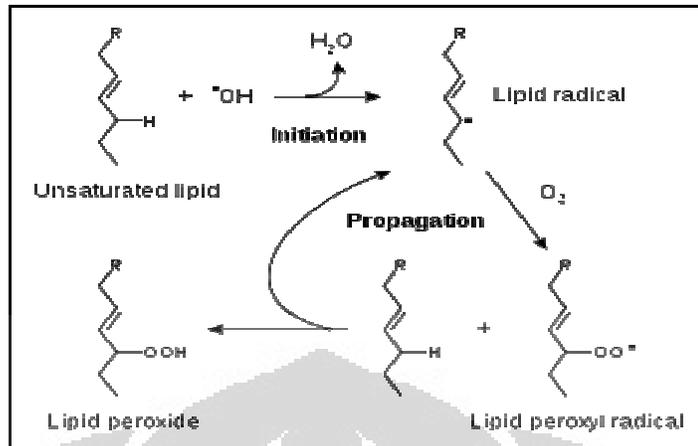
## 2.5 Antioksidan

Suatu reaksi oksidasi dimulai dari pembentukan hidroperoksida yang dilanjutkan dengan pembentukan radikal bebas. Radikal bebas adalah molekul yang kehilangan elektron sehingga menjadi tidak stabil dan berusaha mengambil elektron dari molekul lain. Radikal yang terbentuk tersebut dapat bersifat sebagai inisiator atau propagator yang akan memungkinkan reaksi oksidasi tersebut berkelanjutan.



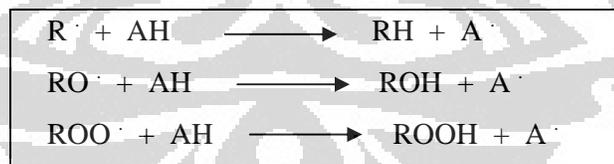
Gambar 2.9 Tahapan Reaksi yang Melibatkan Radikal Bebas

Pembentukan radikal bebas yang reaktif dapat terjadi pada proses oksidasi lipid baik di dalam maupun di luar tubuh kita. Oksidasi lipid menghasilkan hidroperoksida sebagai produk antara. Pembentukan hidroperoksida ini secara umum melalui radikal bebas hasil inisiasi energi luar seperti panas, sinar atau senyawa kimia seperti ion logam dan metaloprotein (Hudiyono, 1998).



Gambar 2.10 Pembentukan Lipid Peroksida

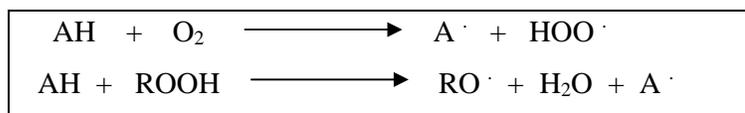
Secara umum, antioksidan didefinisikan sebagai suatu molekul atau senyawa yang mampu memperlambat atau mencegah oksidasi dari molekul atau senyawa lain. Antioksidan dapat bersifat sebagai *radical scavenger* dengan cara menangkap radikal bebas. Penangkapan atau inaktivasi radikal bebas yang terbentuk ini dapat menghentikan atau memutuskan rantai reaksi yang terjadi, terutama pada tahap awal oksidasi, sehingga dapat mencegah oksidasi berkelanjutan.



Gambar 2.11 Mekanisme Kerja Antioksidan

Radikal-radikal antioksidan ( $\text{A}^{\bullet}$ ) yang terbentuk pada reaksi tersebut relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipida lain membentuk radikal lipida baru (Frankel, 2005).

Besar konsentrasi antioksidan yang ditambahkan dapat berpengaruh pada laju oksidasi. Pada konsentrasi tinggi, aktivitas antioksidan grup fenolik sering lenyap bahkan antioksidan tersebut menjadi prooksidan.



Gambar 2.12 Mekanisme Antioksidan Sebagai Prooksidan

## 2.6 Alelopati

Alelopati didefinisikan sebagai suatu fenomena alam, dimana suatu organisme memproduksi dan mengeluarkan suatu senyawa biomolekul (disebut alelokimia) ke lingkungan dan senyawa tersebut mempengaruhi perkembangan dan pertumbuhan organisme lain di sekitarnya. Fenomena alelopati mencakup semua tipe interaksi kimia antar tumbuhan, antar mikroorganisme, atau antara tumbuhan dan mikroorganisme. Interaksi tersebut meliputi penghambatan dan pemacuan secara langsung atau tidak langsung suatu senyawa kimia yang dibentuk oleh suatu organisme (tumbuhan, hewan atau mikroba) terhadap pertumbuhan dan perkembangan organisme lain. Senyawa kimia yang berperan dalam mekanisme itu disebut alelokimia. Pengaruh alelokimia bersifat selektif, yaitu berpengaruh terhadap jenis organisme tertentu namun tidak terhadap organisme lain.

Alelokimia pada tumbuhan dibentuk di berbagai organ, mungkin di akar, batang, daun, bunga atau biji. Organ pembentuk dan jenis alelokimia bersifat spesifik pada setiap spesies. Pada umumnya alelokimia merupakan metabolit sekunder yang dikelompokkan menjadi 14 golongan, yaitu asam organik larut air, lakton, asam lemak rantai panjang, kuinon, terpenoid, flavonoid, tanin, asam sinamat dan derivatnya, asam benzoat dan derivatnya, kumarin, fenol dan asam fenolat, asam amino non protein, sulfida serta nukleosida.

Pelepasan alelokimia pada umumnya terjadi pada stadium perkembangan tertentu, dan kadarnya dipengaruhi oleh stres biotik maupun abiotik. Alelokimia pada tumbuhan dilepas ke lingkungan dan mencapai organisme sasaran melalui penguapan, eksudasi akar, pelindian, dan atau dekomposisi. Setiap jenis alelokimia dilepas dengan mekanisme tertentu tergantung pada organ pembentuknya dan bentuk atau sifat kimianya. Zat-zat kimia yang dilepaskan tersebut memiliki beberapa fungsi, di antaranya sebagai halangan dari predator dan patogen, pengaruh langsung dari kompetitor, autotoksitas, dan sebagainya (Fitter & Hay, 1981).

Mekanisme pengaruh alelokimia (khususnya yang menghambat) terhadap pertumbuhan dan perkembangan organisme (khususnya tumbuhan) sasaran melalui serangkaian proses yang cukup kompleks, namun proses tersebut diawali di membran plasma dengan terjadinya kekacauan struktur, modifikasi saluran membran, atau hilangnya fungsi enzim ATP-ase. Hal ini akan berpengaruh terhadap penyerapan dan konsentrasi ion dan air, yang kemudian mempengaruhi pembukaan stomata dan proses fotosintesis. Hambatan berikutnya mungkin terjadi dalam proses sintesis protein, pigmen dan senyawa karbon lain, serta aktivitas beberapa fitohormon. Sebagian atau seluruh hambatan tersebut kemudian bermuara pada terganggunya pembelahan dan pembesaran sel yang akhirnya menghambat pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan sasaran (Rahayu, 2003).

## BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1 Alat

- |                                |                                 |
|--------------------------------|---------------------------------|
| 1. Blender                     | 14. Pengaduk magnet dan stirrer |
| 2. Beaker glass                | 15. Penangas air                |
| 3. Gelas ukur                  | 16. Plat KLT                    |
| 4. Batang pengaduk             | 17. Cawan porselen              |
| 5. Neraca                      | 18. Kaca arloji                 |
| 6. Kain katun                  | 19. Botol vial                  |
| 7. Kertas saring               | 20. Labu ukur                   |
| 8. pH meter                    | 21. Cawan petri                 |
| 9. Lemari pendingin            | 22. Pipet kapiler               |
| 10. Termometer                 | 23. Spektrofotometer UV-Vis     |
| 11. Tabung reaksi              | 24. GC-MS                       |
| 12. Alat dan tabung sentrifuge | 25. FT-IR                       |
| 13. Pipet tetes                |                                 |

### 3.2 Bahan

- |   |  |
|---|--|
| 1. Jamur tiram putih                    | 12. K-Na Tartrat 1%                          |
| 2. Buffer K-fosfat 0,2 M pH 6,0         | 13. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>          |
| 3. Sampel isolat <i>Mesua kunstleri</i> | 14. CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O     |
| 4. Es batu                              | 15. Hidrokuinon                              |
| 5. Aseton                               | 16. Etil asetat                              |
| 6. <i>Dry Ice</i>                       | 17. <i>n</i> -heksana                        |
| 7. Aquades                              | 18. Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> anhidrat |
| 8. Katekol 0,2 M                        | 19. Metanol                                  |
| 9. BSA                                  | 20. DPPH                                     |
| 10. NaOH 0,1 N                          | 21. Biji sawi                                |
| 11. Folin Ciocalteu                     |  |

### 3.3 Prosedur Kerja

#### 3.3.1 Isolasi Enzim Lakase

Sebanyak 350 g jamur tiram putih dihancurkan dengan blender dalam larutan buffer K-fosfat 0,2 M pH 6,0 pada suhu 0-5 °C. Kemudian campuran tersebut disaring menggunakan kain katun, dan filtrat yang diperoleh disentrifugasi dengan kecepatan 3400 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh lalu dipisahkan dari endapannya. Supernatan ini merupakan ekstrak enzim kasar yang selanjutnya akan dimurnikan dengan aseton dan *dry ice*.

#### 3.3.2 Pemurnian Enzim dengan Aseton dan *Dry Ice*

Sejumlah *dry ice* ditambahkan ke dalam larutan aseton di beaker glass hingga suhunya di bawah 0 °C. Sementara itu, ekstrak enzim kasar yang telah diperoleh dicampurkan dengan larutan aseton ke dalam beaker glass lainnya yang lebih kecil dengan perbandingan aseton : enzim kasar (3:1). Larutan dibiarkan beberapa lama sampai terbentuk endapan. Setelah itu, campuran disentrifugasi dan endapan yang terbentuk dipisahkan dari filtratnya (Chandan, R. C., & Shahani, K. M., 1963). Endapan tersebut lalu disuspensikan dalam buffer K-fosfat pH 6,0 dan disebut larutan enzim fraksi I. Suspensi dari enzim fraksi I ini kemudian ditentukan aktivitas enzim dan kadar proteinnya.

#### 3.3.3 Penentuan Aktivitas Enzim Lakase

Penentuan aktivitas enzim lakase dilakukan dengan cara menambahkan 2 mL larutan buffer K-fosfat 0,2 M pH 6,0; 2,5 mL larutan katekol 0,2 M; 0,5 mL larutan enzim lakase; dan 0,5 mL aquades ke dalam tabung reaksi. Tabung tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 30 menit. Setelah itu, tabung direndam di dalam beaker berisi air mendidih selama 1 menit untuk menghentikan aktivitas enzim. Selanjutnya larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang,  $\lambda = 470 \text{ nm}$ .

Kontrol dibuat dengan menambahkan 2 mL larutan buffer K-fosfat 0,2 M pH 6,0; 2,5 mL larutan katekol 0,2 M; dan 0,5 mL aquades. Larutan ini juga diukur absorbansinya pada panjang gelombang 470 nm.

Aktivitas enzim lakase dinyatakan dengan unit aktivitas yang besarnya sebanding dengan peningkatan absorbansi sebesar 0,001 pada panjang gelombang 470 nm per menit. Aktivitas spesifik enzim lakase dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Unit / mg} = \frac{A_{470\text{nm}} / \text{menit}}{6,58 \times \text{kadar protein (mg/mL)}}$$

### 3.3.4 Penentuan Kadar Protein Enzim (Metode Lowry)

Penentuan kadar protein dari enzim dilakukan dengan menggunakan pereaksi Lowry yang terdiri dari :

- A. 2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dalam 100 mL  $\text{NaOH}$  0,1 N
- B. 0,25 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dalam 50 mL larutan K-Na Tartrat 1%
- C. Campuran 50 mL larutan A dan 1 mL larutan B (dibuat segar)
- D. Pereaksi Folin Ciocalteu 1N

Sebanyak 1 mL larutan enzim lakase dicampur dengan 5 mL pereaksi C, lalu diaduk hingga merata dan dibiarkan selama 10 menit. Selanjutnya ke dalam campuran tersebut ditambahkan 0,5 mL pereaksi D, lalu diaduk kembali hingga merata dan dibiarkan selama 30 menit.

Serapannya diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang,  $\lambda = 750$  nm. Sebagai larutan standar digunakan BSA dengan variasi konsentrasi 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; dan 1,00 mg/mL. Pada pengukuran blanko, larutan enzim diganti dengan aquades.

### 3.3.5 Reaksi Oksidasi Kopleng Sampel dengan Katalis Enzim Lakase

Disiapkan dua buah tabung reaksi yang berbeda, dimana masing-masing diisi dengan campuran etil asetat dan buffer fosfat sebagai medium bifasa dengan perbandingan etil asetat : buffer fosfat (4:1). Tabung pertama diisi dengan 1 mL hidrokuinon (0,5 mg/mL) dan 4 mL enzim lakase fraksi I. Selanjutnya, ke dalam masing-masing tabung, ditambahkan 1 mL larutan sampel isolat *Mesua kunstleri*. Reaksi yang terjadi diamati secara kualitatif.

### 3.3.6 Isolasi Produk Reaksi

Media bifasa dibuat dengan mencampurkan etil asetat dan buffer fosfat dengan perbandingan 4:1. Ke dalam campuran tersebut ditambahkan 20 mL enzim lakase fraksi I, 5 mL hidrokuinon (0,5 mg/ml) dan 5 mL larutan sampel isolat *Mesua kunstleri* lalu diaduk selama 60 menit dan dibiarkan selama 48 jam. Selanjutnya fasa organik (etil asetat) dipisahkan dari fasa air. Air yang masih tersisa dihilangkan dengan menambahkan  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan cara menguapkan pelarutnya pada suhu ruang. Senyawa produk reaksi dikeringkan dan ditimbang.

### 3.3.7 Uji KLT dan Pemisahan Komponen Campuran Produk

Teknik uji kromatografi lapis tipis (KLT) digunakan untuk mengidentifikasi secara kualitatif berapa banyak komponen dalam senyawa hasil reaksi. Pelarut pengembang yang digunakan berupa *n*-heksana : etil asetat dengan perbandingan yang paling optimum (10:1).

Komponen senyawa dalam produk reaksi, dapat dipisahkan dengan teknik KLT preparatif. Plat KLT preparatif dibuat dengan menggunakan kaca bersih dan kering. Kemudian pada kaca tersebut dituangkan campuran silika gel dengan air sampai merata dan dibiarkan mengering. Plat yang telah kering, selanjutnya dipakai untuk KLT dengan perbandingan etil asetat dan *n*-heksana yang optimum. Spot yang didapat lalu dikeruk, dilarutkan dalam etil asetat, dan disaring untuk

memisahkan produk dari silika gel. Kemudian cairan dibiarkan menguap pada suhu ruang. Hasil pemurnian produk secara preparatif selanjutnya dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis, FT-IR dan LC-MS.

### 3.3.8 Uji Aktivitas Antioksidan

Larutan sampel isolat *Mesua kunstleri* dalam metanol dibuat dengan variasi konsentrasi 0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL dan 1 mg/mL, sedangkan untuk larutan produk dalam metanol dibuat dengan variasi konsentrasi 0,1 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL. Kemudian ke dalam 1 mL larutan sampel isolat dan produk dengan masing-masing konsentrasi tersebut ditambahkan 2 mL larutan DPPH dan 1 mL metanol. Sebagai kontrol, ditambahkan ke dalam tabung reaksi 2 mL larutan DPPH dan 2 mL metanol. Semua larutan yang telah disiapkan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 515 nm setiap 5 menit sekali selama 30 menit. Aktivitas antioksidan diukur sebagai penurunan serapan larutan DPPH akibat adanya senyawa antioksidan dalam sampel.

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(A \text{ kontrol}) - (A \text{ sampel})}{A \text{ kontrol}} \times 100\%$$

dimana :

A kontrol = Absorbansi kontrol pada menit ke 0

A sampel = Absorbansi sampel pada menit ke 30

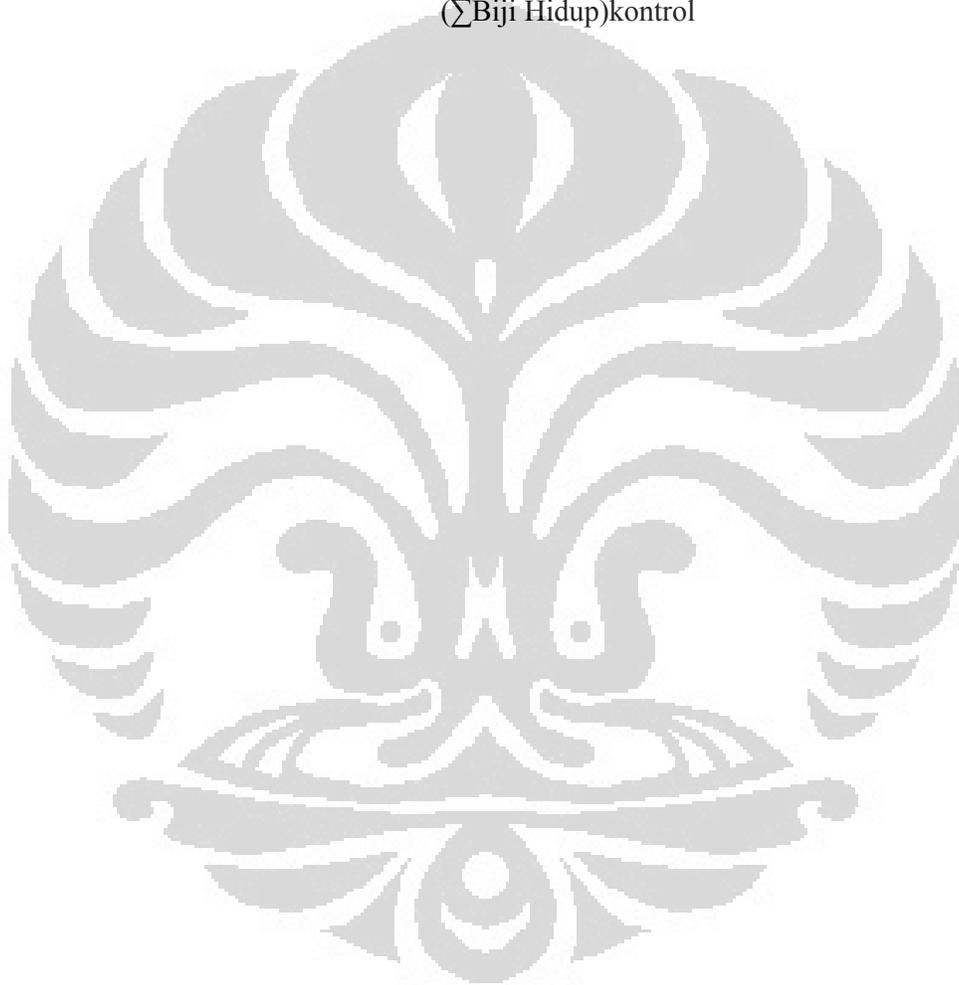
### 3.3.9 Uji Aktivitas Alelopati

Disiapkan tujuh buah cawan petri yang dilapisi oleh kertas saring. Kertas saring dalam cawan petri untuk kontrol dibasahi dengan aquades, sedangkan pada enam cawan petri lainnya masing-masing dibasahi dengan larutan senyawa isolat *Mesua kunstleri* dan produk dalam aquades dengan variasi konsentrasi antara lain 50, 100, 150, dan 200 µg/mL untuk senyawa isolat *Mesua kunstleri* dan 100, 200, 500, 1000 µg/mL untuk produk reaksi. Selanjutnya, setiap cawan petri diisi

dengan 30 biji sawi. Kemudian seluruh cawan petri tersebut diinkubasi pada suhu ruang selama 24-48 jam dengan intensitas cahaya yang cukup.

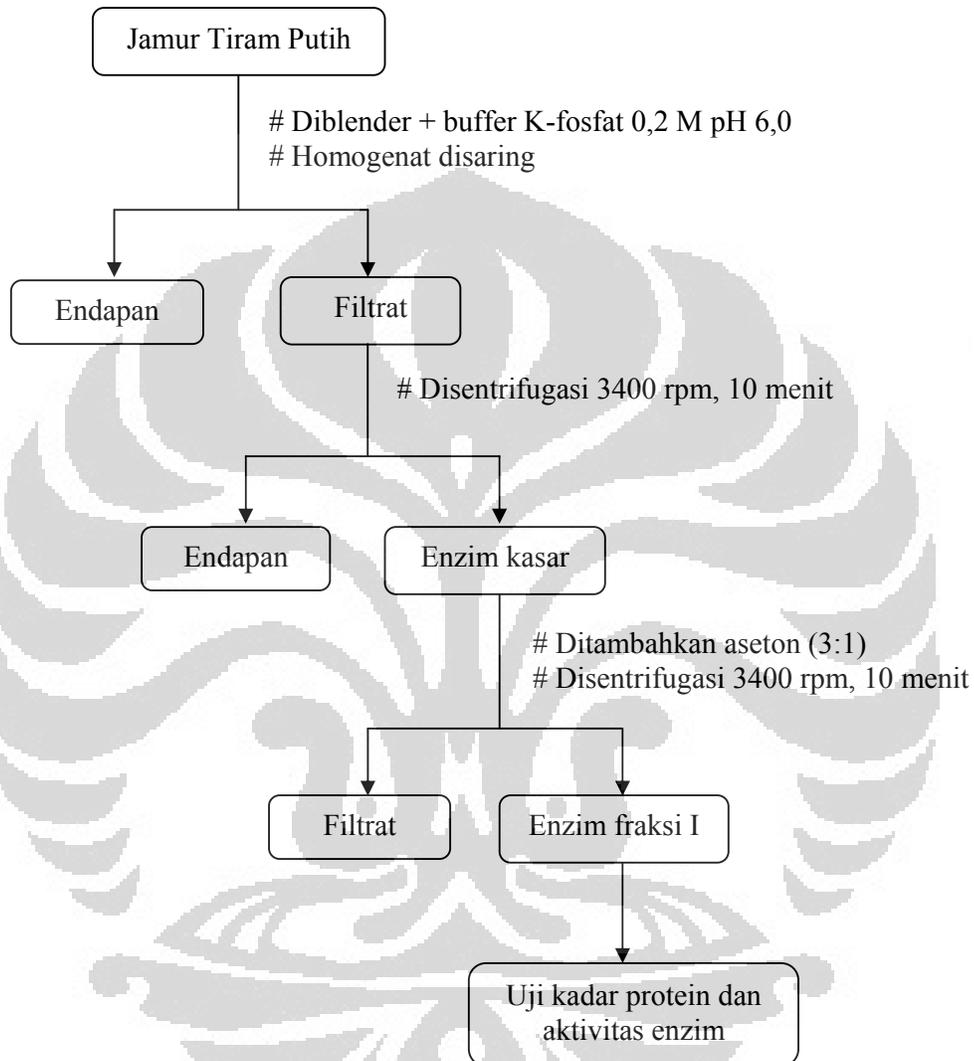
Nilai penghambatan senyawa isolat *Mesua kunstleri* dan dimernya terhadap pertumbuhan biji sawi dihitung sebagai % inhibisi dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(\sum \text{Biji Hidup})_{\text{kontrol}} - (\sum \text{Biji Hidup})_{\text{sampel}}}{(\sum \text{Biji Hidup})_{\text{kontrol}}} \times 100\%$$

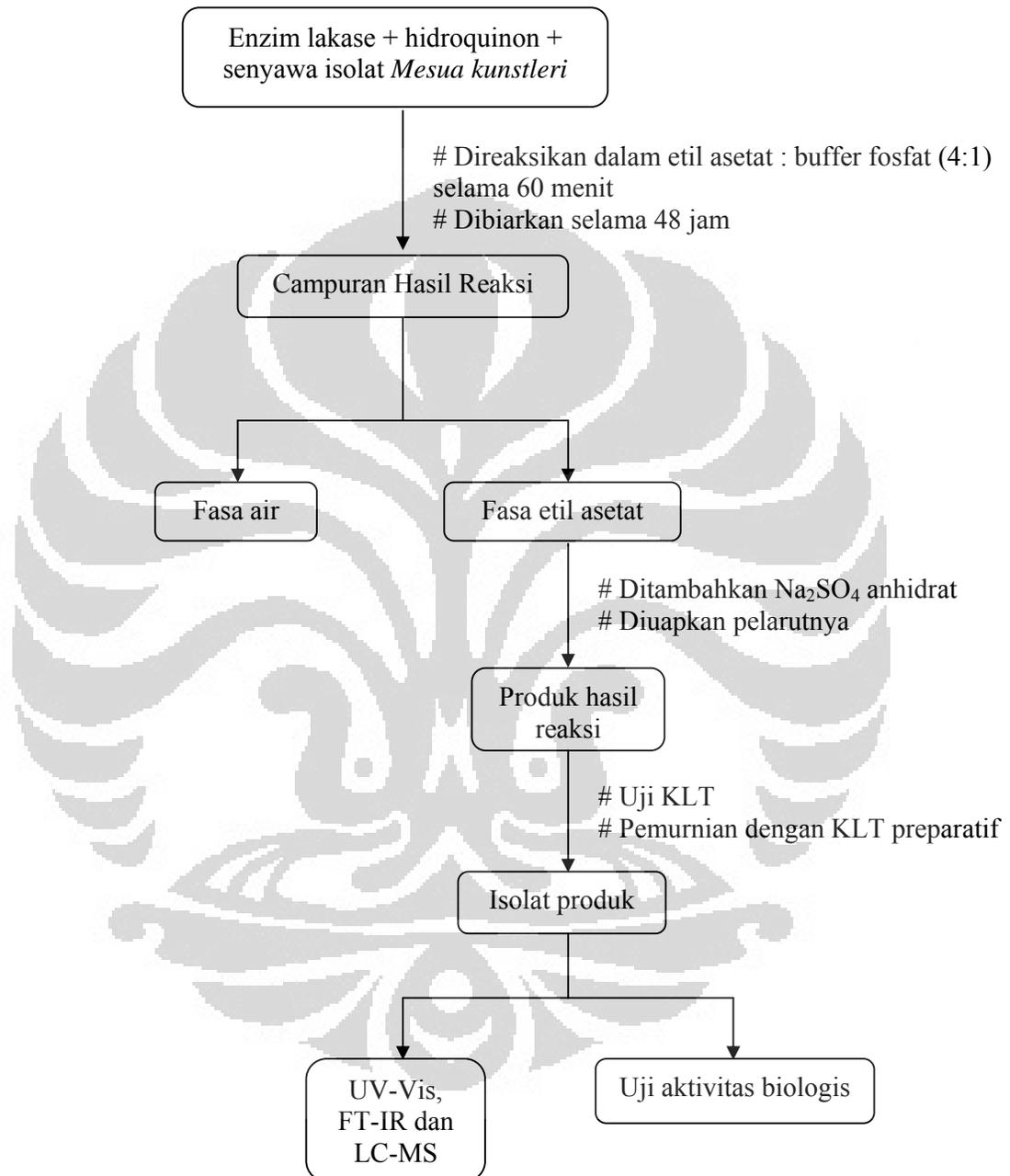


### 3.4 Bagan Kerja

#### 3.4.1 Isolasi, Pemurnian, dan Pengujian Enzim Lakase

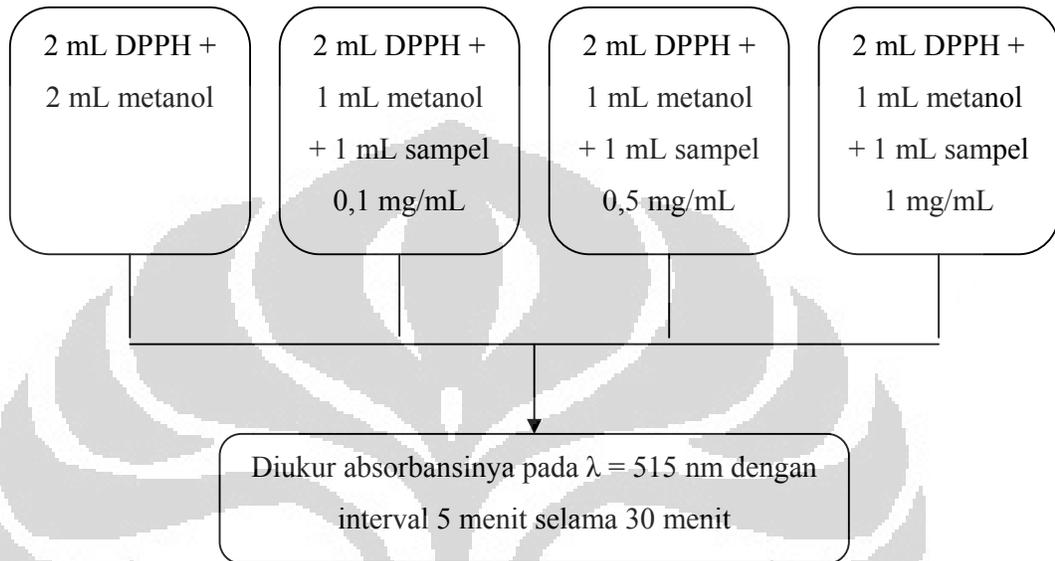


### 3.4.2 Reaksi Koping Oksidatif Senyawa Isolat *Mesua kunstleri*

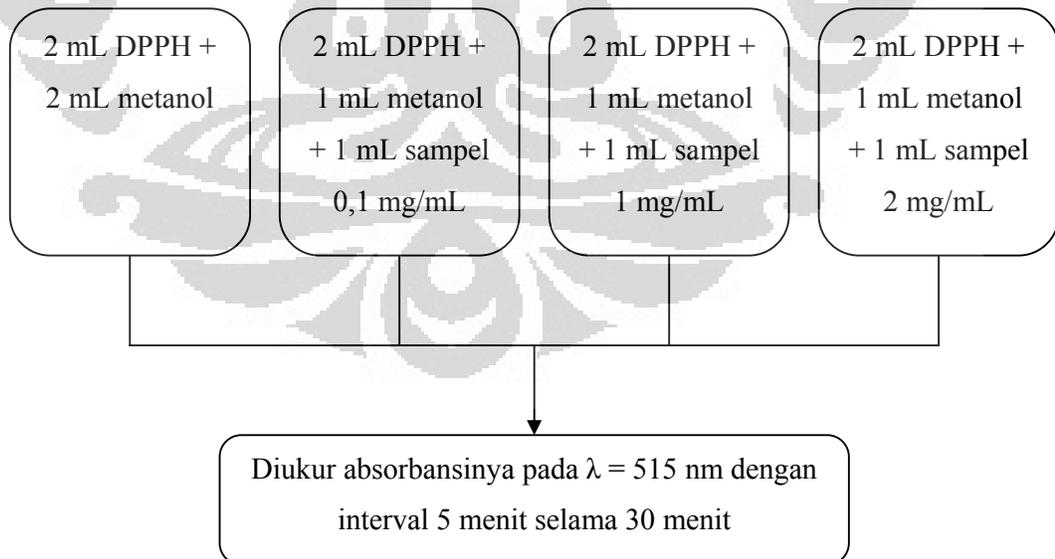


### 3.4.3 Uji Aktivitas Antioksidan

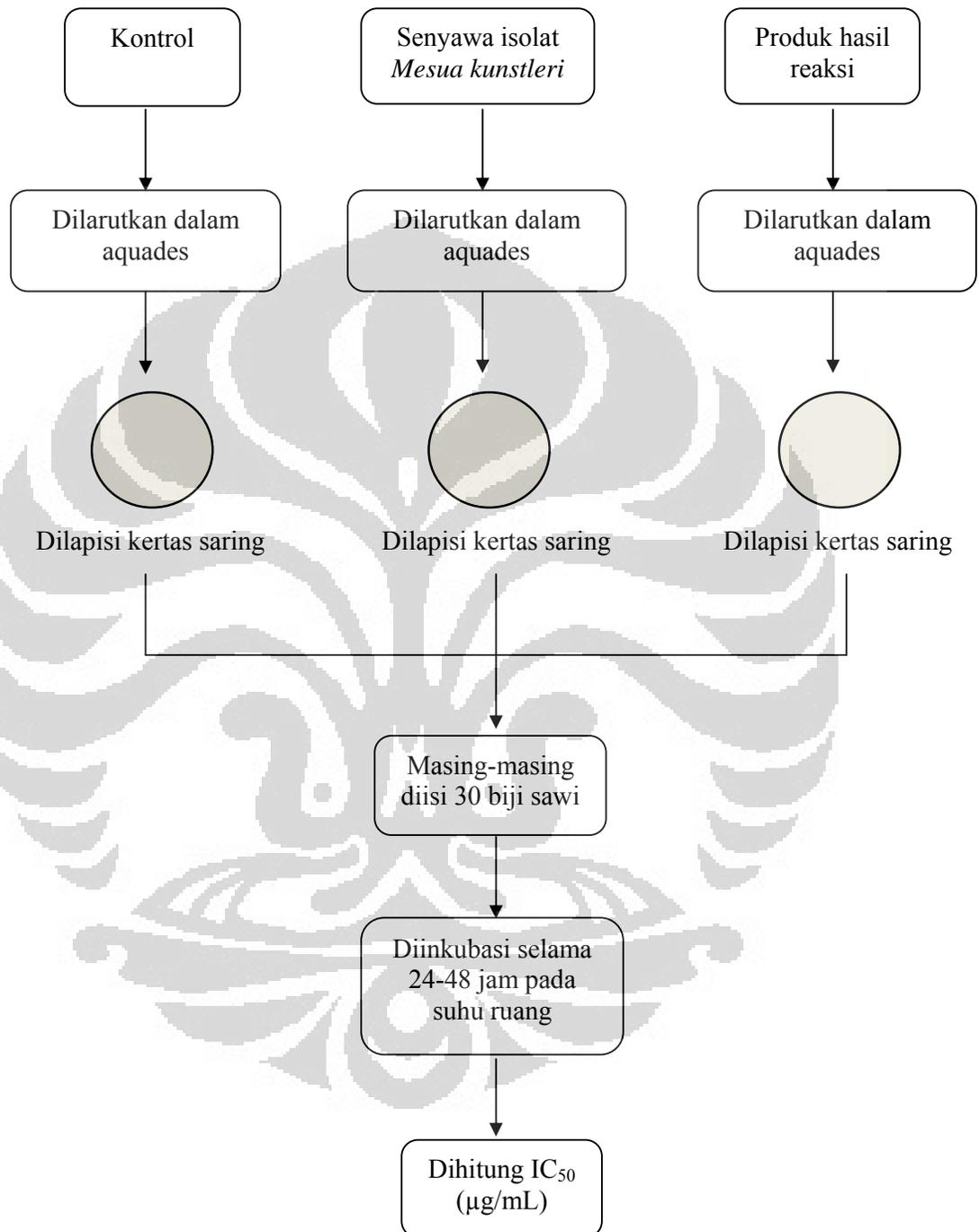
- **Senyawa isolat *Mesua kunstleri***



- **Produk hasil reaksi**



### 3.4.4 Uji Aktivitas Alelopati



## BAB 4

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Isolasi Enzim Lakase

Pada penelitian ini, sumber enzim lakase yang digunakan adalah jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*). Isolasi enzim dilakukan dengan cara menghaluskan jamur tiram putih dalam larutan buffer K-fosfat pH 6,0 dengan menggunakan blender. Fungsi dari penambahan buffer K-fosfat pH 6,0 adalah untuk mempertahankan aktivitas enzim karena pH 6,0 merupakan pH optimum dari enzim lakase (Hublik, G., & Schinner, Franz., 2000). Suhu selama isolasi dijaga antara 0-5°C, hal ini dilakukan untuk mencegah terjadinya degradasi proteolitik oleh aktivitas enzim protease yang dapat mendegradasi protein enzim lakase yang akan diisolasi. Homogenat yang diperoleh kemudian disaring dan disentrifugasi agar enzim lakase terpisah dari sel debrisnya. Supernatan yang diperoleh berupa larutan berwarna kuning yang selanjutnya disebut sebagai ekstrak enzim kasar.

Setelah ekstrak enzim kasar diperoleh, dilakukan proses pemurnian enzim dengan menggunakan aseton dan *dry ice*. Prinsip dari pemurnian ini adalah pengendapan protein menggunakan pelarut organik berdasarkan pada pengurangan kelarutan protein dan konstanta dielektrik. Ketika sejumlah besar pelarut organik seperti aseton ditambahkan ke dalam larutan protein, maka protein akan mengendap. Hal ini disebabkan, aseton berasosiasi dengan molekul air lebih kuat dibandingkan protein, sehingga mengakibatkan protein menjadi kurang terhidrasi, yang membuat interaksi antara gugus bermuatan pada permukaan protein menjadi lebih kuat dan protein pun mengendap (Proteins and Enzymes, 2004). Pengendapan dilakukan pada suhu dingin (mencapai suhu -30°C) agar tidak terjadi peningkatan suhu karena pembebasan energi selama penambahan aseton, mencegah agar aseton tidak cepat menguap, dan mencegah terjadinya denaturasi protein. Molekul enzim yang telah mengendap kemudian dipisahkan dari larutan dengan cara disentrifugasi. Enzim yang telah dimurnikan tersebut berupa endapan berwarna putih kecoklatan. Endapan tersebut lalu disuspensikan

dalam buffer K-fosfat pH 6,0 dan selanjutnya disebut sebagai enzim lakase fraksi I.



Gambar 4.1 Tahap Pemurnian Enzim

Enzim lakase fraksi I yang diperoleh kemudian ditentukan kadar protein dan aktivitas spesifiknya. Kadar protein enzim ditentukan dengan menggunakan metode Lowry. Metode Lowry digunakan karena memiliki beberapa kelebihan, yaitu dapat digunakan untuk mendeteksi protein pada konsentrasi yang kecil sehingga lebih sensitif dan dapat dikerjakan pada suhu ruang. Metode Lowry bekerja pada dua reaksi yang berbeda, reaksi pertama adalah pembentukan Biuret yaitu reduksi ion  $\text{Cu}^{2+}$  menjadi  $\text{Cu}^+$  dan kedua adalah reduksi pereaksi Folin Ciocalteu oleh gugus tirosin dan triptofan dari protein enzim menghasilkan warna biru yang lebih sensitif. Kemudian nilai absorbansinya ditentukan dengan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda = 750 \text{ nm}$ . Sebagai standar digunakan larutan *Bovine Serum Albumin* (BSA) dengan variasi konsentrasi sehingga didapatkan kurva standar dengan mengalurkan nilai absorbansi terhadap konsentrasi BSA.

Aktivitas enzim lakase ditentukan dengan menggunakan katekol sebagai substrat dari golongan senyawa fenolik. Enzim lakase mengoksidasi katekol sehingga membentuk intermediet radikal katekol yang selanjutnya akan bereaksi membentuk senyawa baru, seperti bentuk dimernya. Setelah diinkubasi, larutan katekol dan enzim lakase lalu direndam dalam air mendidih untuk menghentikan aktivitas enzim. Kemudian nilai absorbansinya diukur pada panjang gelombang

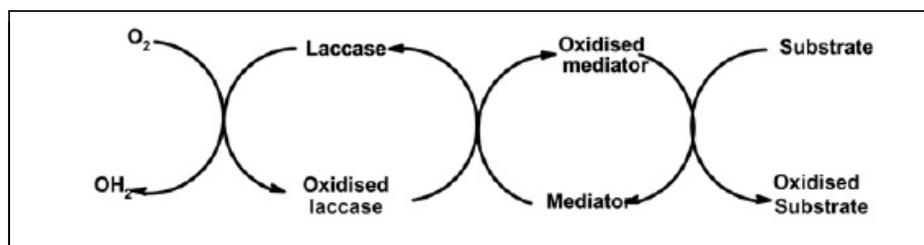
470 nm. Perhitungan kadar protei dan aktivitas spesifik enzim lakase dapat dilihat pada Lampiran 1. Sementara itu, hasil pengukuran dan perhitungan kadar protein dan aktivitas spesifik enzim lakase dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil Pengukuran dan Perhitungan Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik Enzim Lakase

Absorbansi pada $\lambda = 750 \text{ nm}$	Kadar protein	Absorbansi pada $\lambda = 470 \text{ nm}$	Aktivitas spesifik
0,89900	0,40037 mg/mL	1,585	0,60164 Unit/mg protein

#### 4.2 Pembentukan Produk Kopling Oksidatif Senyawa Isolat *Mesua kunstleri*

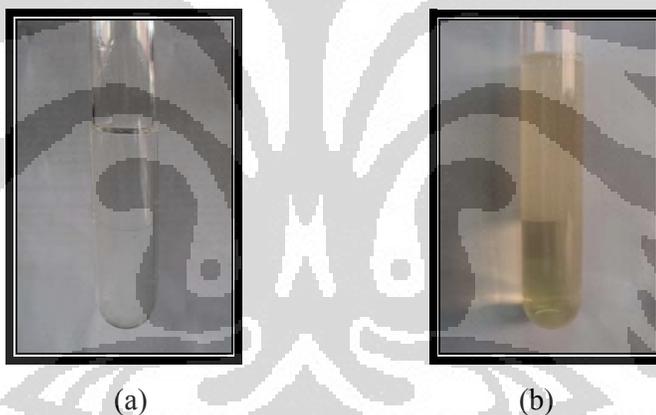
Pada penelitian ini digunakan sampel isolat *Mesua kunstleri* sebagai substrat golongan fenolik dan hidroquinon sebagai mediator. Hidroquinon berperan dalam *electron transfer* dimana ketika berinteraksi dengan enzim lakase akan teroksidasi lebih dahulu menjadi bentuk radikalnya. Kemudian radikal hidroquinon yang reaktif akan mengoksidasi substrat fenolik menjadi bentuk radikal sementara hidroquinon kembali ke bentuk awalnya. Molekul hidroquinon yang kecil memungkinkannya untuk berinteraksi lebih dulu dengan enzim lakase dibandingkan substrat. Jika tidak digunakan mediator, substrat fenolik akan sulit bereaksi dengan enzim lakase karena molekul keduanya sama-sama besar. Sementara itu,  $\text{O}_2$  yang berperan sebagai akseptor hidrogen akan tereduksi menjadi  $\text{H}_2\text{O}$ .



Gambar 4.2 Mekanisme Reaksi Oksidasi yang Dikatalisis oleh Enzim Lakase

Reaksi kopling oksidatif dilakukan dalam medium bifasa, yaitu campuran antara etil asetat dengan buffer fosfat (4:1). Hal ini dilakukan untuk meningkatkan kestabilan produk kopling oksidatif. Karena sifatnya yang cenderung non polar, maka produk yang terbentuk langsung menuju fasa organik sehingga diharapkan produk yang terekstrak menjadi lebih banyak.

Untuk menguji kemampuan enzim lakase dalam mengkatalisis reaksi maka dilakukan uji kualitatif dengan menggunakan dua buah tabung reaksi. Tabung yang pertama hanya berisi senyawa isolat *Mesua kunstleri* sedangkan tabung yang kedua berisi senyawa isolat *Mesua kunstleri*, enzim lakase dan hidroquinon. Masing-masing reaksi dilakukan dalam medium bifasa. Indikator terjadinya reaksi diamati berdasarkan ada tidaknya perubahan warna secara visual.



Gambar 4.3 Hasil Reaksi Senyawa Isolat *Mesua kunstleri*

(a) Tanpa Penambahan Enzim Lakase (b) Dengan Penambahan Enzim Lakase

Pada tabung (a) yang tidak ditambahkan enzim lakase tidak terjadi perubahan warna, sementara pada tabung (b) yang ditambahkan enzim lakase terjadi perubahan warna menjadi kuning pada bagian bawah dan sedikit keruh pada bagian atas. Hal ini menandakan bahwa enzim lakase telah mengkatalisis reaksi kopling oksidatif senyawa isolat *Mesua kunstleri* membentuk senyawa baru yang berbeda dari senyawa awalnya.

Berdasarkan hasil tersebut, kemudian dilakukan pengulangan reaksi kopling oksidatif dalam skala besar dengan tujuan untuk memperbanyak produk reaksi yang terbentuk sehingga memudahkan tahap pemurniannya. Dari hasil reaksi tersebut, diperoleh produk berupa endapan berwarna putih seberat 236,6 mg.

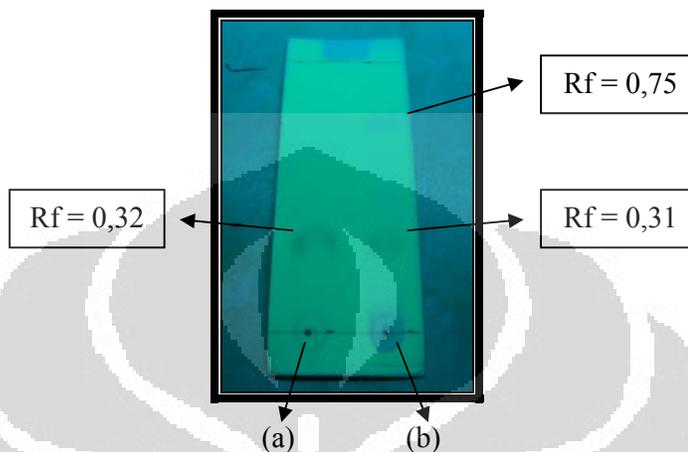


Gambar 4.4 Endapan Produk (Produk Kasar)

Selanjutnya, untuk mengetahui jumlah komponen senyawa yang terdapat dalam produk kasar tersebut, dilakukan uji dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Teknik pemisahan pada kromatografi berdasarkan pada perbedaan kecepatan distribusi komponen yang akan dipisahkan antara dua buah fasa yaitu fasa diam dan fasa gerak. Fasa diam akan menahan komponen campuran sedangkan fasa gerak akan mengalir melalui fasa diam dan membawa komponen-komponen yang terdapat dalam campuran (Haqiqi, 2008). KLT terdiri dari fasa diam yang biasanya berupa silika gel atau alumina dan fasa gerak yang berupa pelarut atau campuran pelarut yang sesuai. Jarak yang ditempuh komponen per jarak yang ditempuh pelarut dikenal dengan nilai  $R_f$ . Nilai  $R_f$  berbeda untuk masing-masing komponen, sehingga dapat digunakan untuk uji kualitatif komponen dalam suatu senyawa.

Pada penelitian ini, sebagai fasa gerak digunakan campuran *n*-heksana dan etil asetat dengan perbandingan yang paling optimum yaitu 10:1. Berdasarkan hasil KLT dari produk kasar, terlihat adanya satu spot yang dihasilkan pada senyawa isolat *Mesua kunstleri* dan dua spot yang dihasilkan pada produk kasar.

Dari hasil tersebut, diduga spot dengan  $R_f = 0,75$  merupakan spot dari senyawa produk hasil reaksi.



Gambar 4.5 Hasil KLT (a) Senyawa Isolat *Mesua kunstleri* (b) Produk Kasar

Kemudian, untuk memisahkan senyawa produk yang diinginkan dilakukan KLT preparatif. Proses pemurnian dilakukan dengan mengeruk spot yang diduga produk, lalu hasilnya ditampung dan dilarutkan dengan etil asetat. Hasil larutan kemudian disaring untuk memisahkan silika gel dan produk isolat. Lalu produk isolat dipekatkan dengan menguapkan pelarut etil asetat dan didapatkan endapan berwarna kuning seberat 4,8 mg dengan rendemen sebesar 2,0287%. Untuk mengetahui struktur kimiawi dari produk isolat yang diperoleh, dilakukan identifikasi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FT-IR dan LC-MS.

### 4.3 Analisis Senyawa Produk Reaksi dengan Instrumentasi

#### 4.3.1 Analisis dengan Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk mendeteksi terbentuknya senyawa baru yang memiliki panjang gelombang maksimum yang berbeda dengan senyawa awalnya.

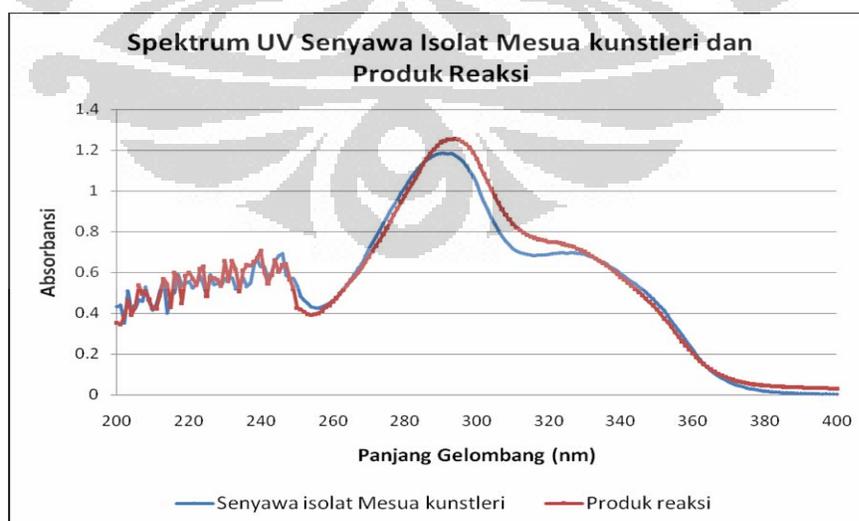
Berdasarkan spektrum UV-Vis yang diperoleh dari hasil pengukuran, didapatkan spektrum yang berbeda antara senyawa isolat *Mesua kunstleri* dan

senyawa produk reaksi. Senyawa isolat *Mesua kunstleri* memiliki  $\lambda_{\text{maks}}$  sebesar 291 nm sedangkan senyawa produk reaksi memiliki  $\lambda_{\text{maks}}$  sebesar 294 nm. Dari hasil tersebut, terlihat adanya pergeseran panjang gelombang maksimum antara senyawa produk reaksi dengan senyawa awalnya.

Pergeseran serapan maksimum ke panjang gelombang yang lebih besar disebut efek batokromik. Hal ini terjadi karena bertambahnya ikatan rangkap terkonjugasi pada senyawa produk reaksi sehingga menyebabkan elektron terdelokalisasi. Bertambahnya ikatan rangkap terkonjugasi juga mengakibatkan energi yang dibutuhkan untuk mengeksitasi elektron dalam ikatan tersebut menjadi lebih kecil dan menyebabkan panjang gelombang bergeser ke arah yang lebih besar. Dengan kata lain, panjang gelombang berbanding terbalik dengan energi eksitasi.

Tabel 4.2 Hasil Pengukuran UV-Vis Senyawa Isolat *Mesua kunstleri* dan Produk Reaksi

Senyawa	$\lambda_{\text{maks}}$	Absorbansi
Senyawa isolat <i>Mesua kunstleri</i>	291 nm	1,184
Produk reaksi	294 nm	1,256



Gambar 4.6 Spektrum UV-Vis Senyawa Isolat *Mesua kunstleri* dan Produk Reaksi

### 4.3.2 Analisis dengan FT-IR

Analisis dengan FT-IR dilakukan untuk mengidentifikasi gugus fungsi yang terdapat dalam suatu senyawa berdasarkan spektrum inframerah yang dihasilkan. Spektrum inframerah yang biasanya digunakan berada pada rentang antara  $4000\text{ cm}^{-1}$  sampai  $625\text{ cm}^{-1}$ . Nilai ini bergantung pada massa relatif dan geometri suatu atom. Spektrum inframerah senyawa organik bersifat khas, dimana tidak ada satupun dari dua senyawa yang berbeda memiliki spektrum inframerah yang sama, kecuali senyawa isomer optik (Silverstein, Bassler & Morrill, 1974).

Pada dasarnya, spektroskopi inframerah memiliki prinsip yang hampir sama dengan spektroskopi UV-Vis. Perbedaannya hanya terletak pada interval energi daerah inframerah yang sesuai dengan besarnya energi yang diperlukan untuk eksitasi vibrasi ikatan-ikatan dalam molekul. Jenis eksitasi ikatan yang dapat terjadi adalah peregangan (stretching) yang memerlukan energi tinggi, dan pembengkokan (bending) dengan energi yang lebih rendah (Joni, 2007). Hasil spektrum IR untuk senyawa isolat *Mesua kunstleri* dan produk reaksi dapat dilihat pada Lampiran 16 dan 17.

Berdasarkan hasil spektrum IR tersebut, dapat dilakukan identifikasi gugus fungsi yang terdapat dalam masing-masing senyawa. Hasil identifikasi dapat dilihat pada Tabel 4.3 dan 4.4.

Tabel 4.3 Identifikasi Gugus Fungsi Senyawa Isolat *Mesua kunstleri*

No.	Bilangan gelombang senyawa isolat <i>Mesua kunstleri</i>	Identifikasi gugus fungsi
1.	3688,92 dan 3615,63	-OH
2.	3020,58	C-H stretching aromatik
3.	1741,75	C=O
4.	1513,18	-CH <sub>3</sub>
5.	1425,42	-CH <sub>2</sub> -
6.	1221,93	C-H bending aromatik
7.	777,33	R-CH=CR <sub>2</sub>

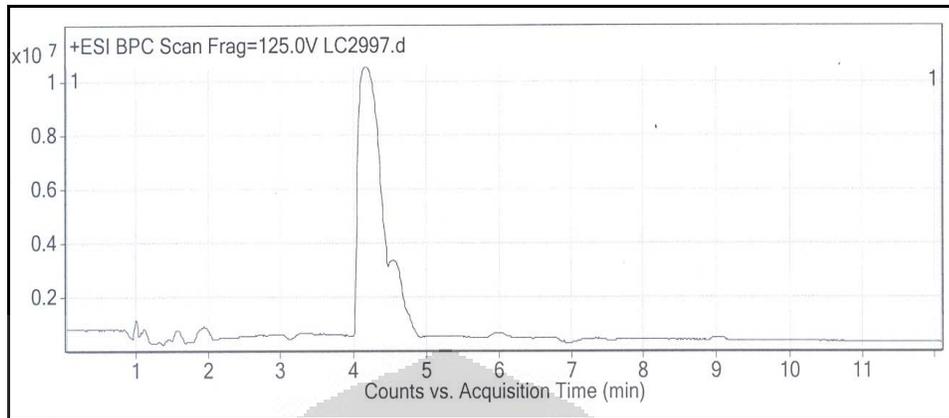
Tabel 4.4 Identifikasi Gugus Fungsi Senyawa Produk Reaksi

No.	Bilangan gelombang senyawa produk reaksi	Identifikasi gugus fungsi
1.	3019,61	C-H stretching aromatik
2.	1216,14	C-H bending aromatik
3.	771,54	R-CH=CR <sub>2</sub>

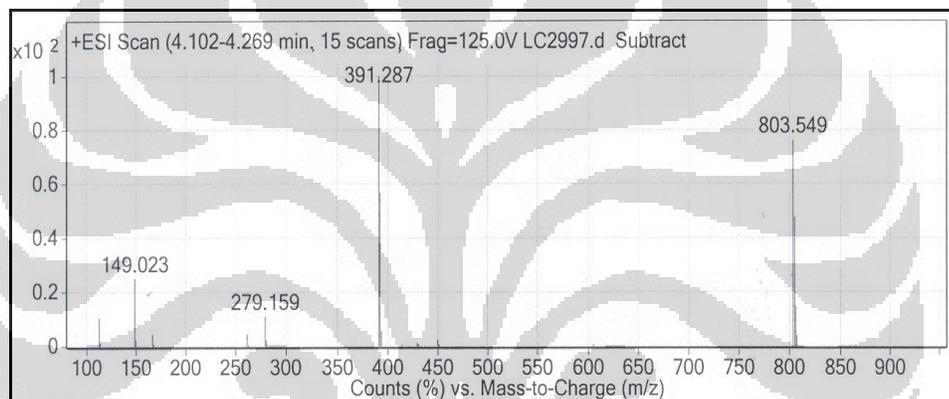
Dari hasil identifikasi di atas, dapat diketahui bahwa ada gugus yang hilang pada senyawa produk reaksi dibandingkan dengan senyawa awalnya yaitu gugus C=O, -CH<sub>3</sub>, dan -CH<sub>2</sub>- yang merupakan bagian dari gugus asil. Dari hasil tersebut, maka diduga reaksi kopling oksidatif terjadi melalui pelepasan gugus asil dan akhirnya membentuk kopling dari senyawa isolat *Mesua kunstleri*.

#### 4.3.3 Analisis dengan LC-MS

Analisis dengan LC-MS dilakukan untuk mengetahui berat molekul atau massa relatif yang disertai dengan pola fragmentasi dari komponen senyawa produk reaksi yang akan diidentifikasi sehingga dapat ditentukan struktur dari senyawa tersebut. LC-MS pada prinsipnya hampir sama dengan GC-MS. Keduanya mempunyai keunggulan yang berupa sensitivitas, selektivitas dan kecepatan analisis yang tinggi. Keduanya juga dapat dihubungkan langsung dengan spektrometer massa, sehingga dapat diperoleh pola spektrum massa dari masing-masing komponen campuran yang sangat penting untuk elusidasi struktur kimianya. Perbedaannya, LC-MS dapat digunakan untuk mengidentifikasi senyawa yang tidak mudah menguap dan tidak stabil pada suhu tinggi. Hasil pengukuran LC-MS senyawa produk reaksi dapat dilihat pada Gambar 4.7.



Gambar 4.7 Kromatogram LC Senyawa Produk Reaksi

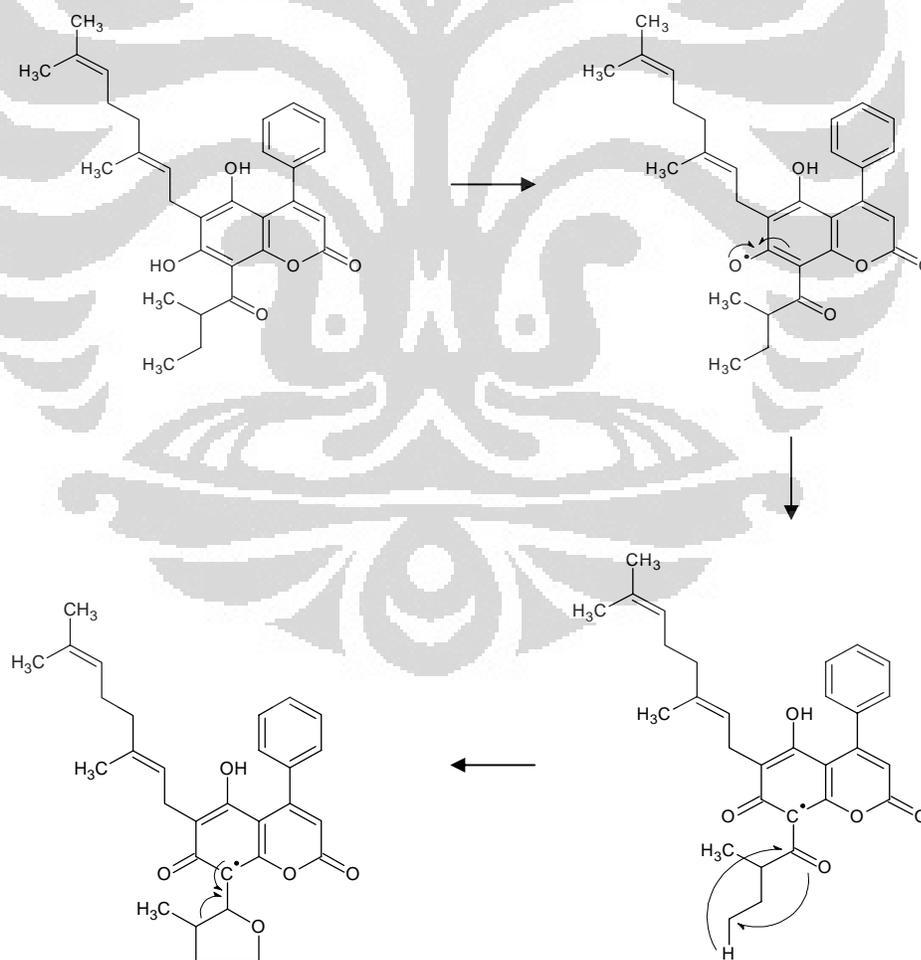


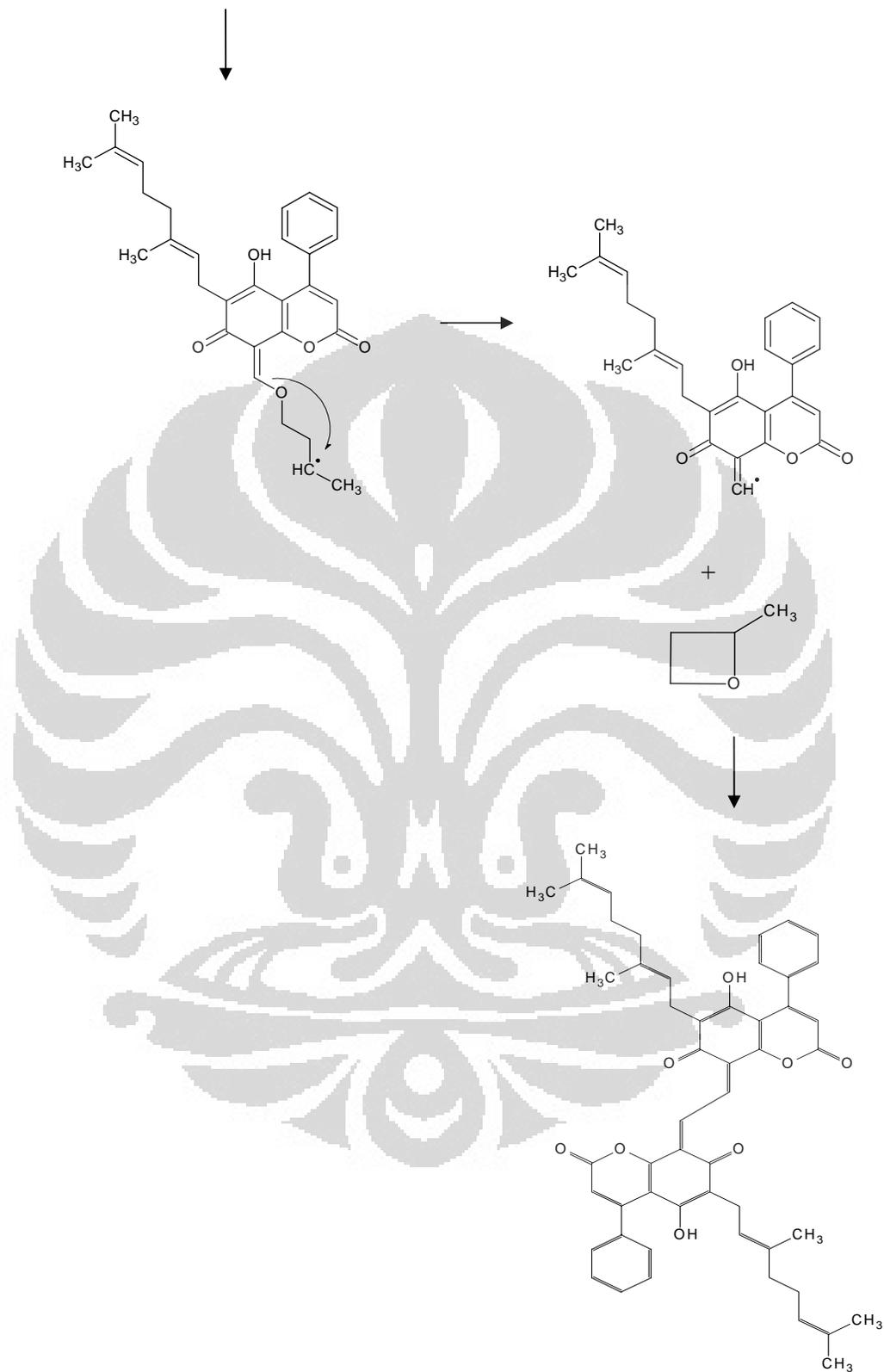
Gambar 4.8 Spektrum Fragmentasi Senyawa Produk Reaksi Pada Waktu Retensi Antara 4,102-4,269 Menit

Berdasarkan hasil kromatogram LC tersebut, dihasilkan puncak tertinggi pada waktu retensi antara 4,102-4,269 menit. Selanjutnya kromatogram LC dianalisis lebih lanjut dengan menggunakan MS, sehingga diperoleh spektrum fragmentasi seperti pada Gambar 4.8. Berdasarkan spektrum fragmentasi tersebut, diperoleh nilai  $m/z = 803,549$ . Dari hasil ini, diduga berat molekul tersebut merupakan berat molekul dari dua senyawa isolat *Mesua kunstleri* yang saling berikatan satu sama lain tetapi telah mengalami *rearrangement*, atau dengan kata lain merupakan kopleng dari senyawa isolat *Mesua kunstleri*.

#### 4.4 Proposal Mekanisme Reaksi Kopling Senyawa Isolat *Mesua kunstleri*

Pembentukan kopling senyawa isolat *Mesua kunstleri* pada penelitian ini terjadi melalui reaksi kopling oksidatif yaitu reaksi penggabungan antara dua senyawa isolat *Mesua kunstleri*. Enzim lakase dengan adanya  $O_2$  akan mengalami oksidasi sementara  $O_2$  akan mengalami reduksi menjadi  $H_2O$ . Selanjutnya enzim lakase yang telah teroksidasi, dengan bantuan mediator hidroquinon secara tidak langsung akan mengoksidasi senyawa isolat *Mesua kunstleri* sehingga menjadi bentuk radikalnya. Radikal yang terbentuk kemudian akan mengalami resonansi baik pada cincin benzena maupun pada gugus lainnya. Pada akhirnya, radikal tersebut akan mengalami penggabungan satu dengan yang lain sehingga terbentuk suatu kopling dari senyawa isolat *Mesua kunstleri*.



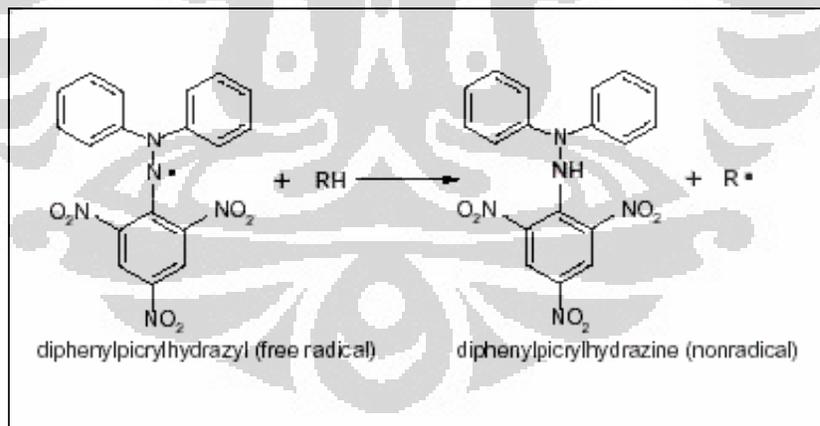


Gambar 4.9 Proposal Mekanisme Reaksi Koplign Senyawa Isolat *Mesua kunstleri*

## 4.5 Uji Aktivitas Biologis

### 4.5.1 Uji Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan pada penelitian ini diuji dengan metode *radical scavenger* yang berdasarkan pada kemampuan suatu senyawa untuk menangkap radikal dari larutan DPPH (1,1-difenil-2-pikril hidrazil). Larutan DPPH menghasilkan warna ungu karena adanya radikal bebas pada atom N yang dapat membentuk diazo, dimana absorbansi maksimumnya pada panjang gelombang 515 nm. Senyawa DPPH akan bereaksi bila ada senyawa yang bersifat sebagai donor hidrogen (senyawa antioksidan) dimana radikal bebas yang berasal dari senyawa DPPH akan ditangkap oleh senyawa antioksidan tersebut sehingga terbentuk senyawa DPPH yang tereduksi. Terbentuknya senyawa DPPH yang tereduksi ini menyebabkan terjadinya perubahan warna pada larutan yang semula berwarna ungu berubah menjadi kuning. Perubahan warna tersebut selaras dengan aktivitas suatu senyawa sebagai *radical scavenger*. Secara umum, mekanisme yang terjadi adalah sebagai berikut :

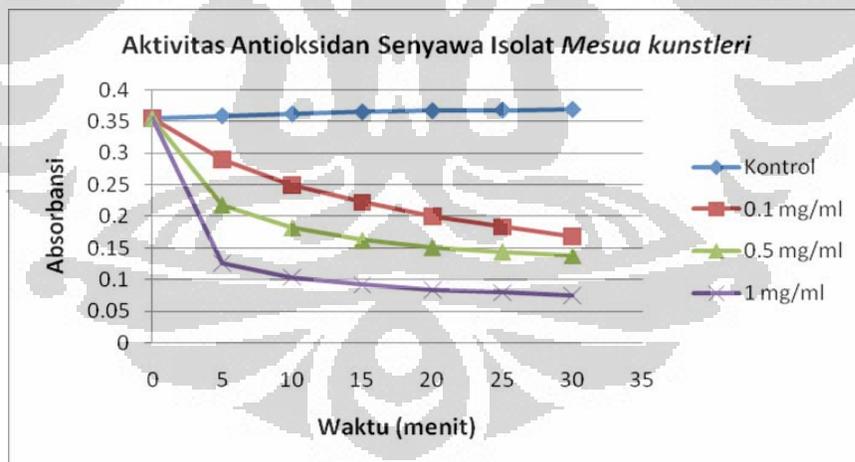


Gambar 4.10 Mekanisme Senyawa Antioksidan Dengan DPPH

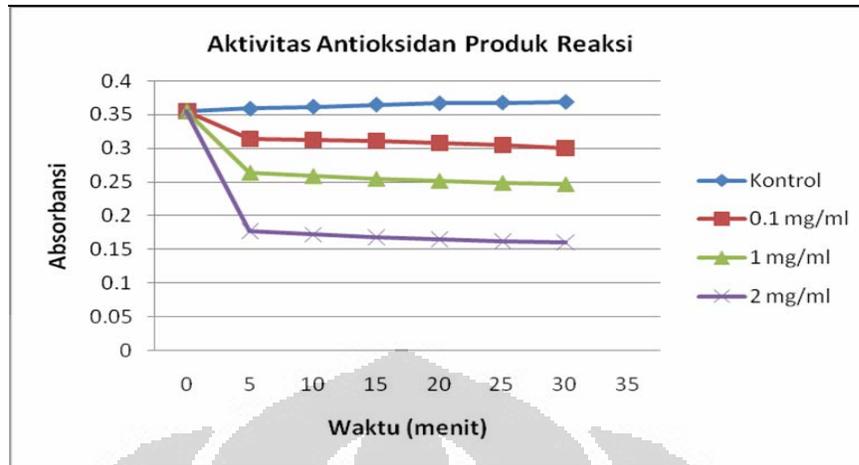


Gambar 4.11 Perubahan Warna Larutan DPPH  
(a) DPPH Tanpa Sampel (b) DPPH Dengan Sampel

Pada penelitian ini dilakukan pengujian aktivitas antioksidan terhadap senyawa isolat *Mesua kunstleri* dan produk reaksi dengan variasi konsentrasi yang diamati setiap selang waktu 5 menit selama 30 menit. Hasil pengukuran absorbansi dari masing-masing senyawa dapat dilihat pada Lampiran 5 dan grafik dari hasil pengukuran tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.12 dan Gambar 4.13.



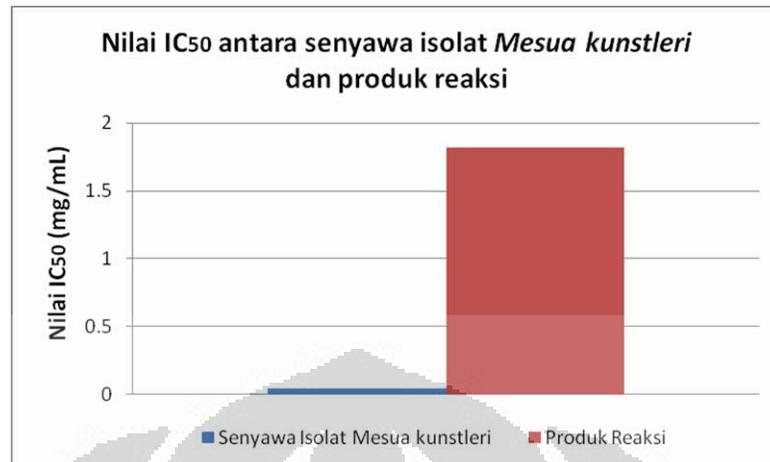
Gambar 4.12 Grafik Aktivitas Antioksidan Senyawa Isolat *Mesua kunstleri*



Gambar 4.13 Grafik Aktivitas Antioksidan Senyawa Produk Reaksi

Berdasarkan grafik di atas, dapat diketahui bahwa senyawa isolat *Mesua kunstleri* dan produk reaksi mempunyai aktivitas antioksidan, hal ini ditunjukkan dengan semakin berkurangnya absorbansi yang dihasilkan. Nilai absorbansi yang didapat selanjutnya digunakan untuk menghitung % inhibisi radikal dari kedua senyawa. *Inhibitor Concentration 50%* ( $IC_{50}$ ) didefinisikan sebagai konsentrasi senyawa yang mampu menginhibisi sebanyak 50% radikal. Suatu senyawa dikatakan memiliki aktivitas antioksidan yang besar jika pada konsentrasi sekecil-kecilnya dapat menginhibisi 50% dari jumlah radikal. Jadi, semakin kecil nilai  $IC_{50}$  menunjukkan semakin besar aktivitas senyawa tersebut sebagai antioksidan.

Dari uji aktivitas antioksidan yang dilakukan, senyawa produk reaksi memiliki  $IC_{50}$  yang lebih besar dibandingkan senyawa isolat *Mesua kunstleri* yaitu sebesar 1,820845 mg/mL sedangkan  $IC_{50}$  untuk senyawa isolat *Mesua kunstleri* sebesar 0,04903 mg/mL.



Gambar 4.14 Grafik Perbandingan Nilai IC<sub>50</sub> Antara Senyawa Isolat *Mesua kunstleri* dan Produk Reaksi

Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa senyawa produk reaksi mengalami penurunan aktivitas antioksidan dibandingkan dengan senyawa isolat *Mesua kunstleri*. Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas antioksidan pada suatu senyawa kimia antara lain banyaknya gugus OH bebas yang terikat pada senyawa tersebut, kemampuan untuk memberikan atom hidrogen kepada suatu radikal yang reaktif, dan kestabilan resonansi radikal pada suatu molekul. Dalam hal ini, diperkirakan senyawa produk reaksi memiliki struktur yang lebih besar dan lebih sterik dibandingkan dengan senyawa isolat *Mesua kunstleri*, sehingga menyebabkan berkurangnya kemampuan senyawa tersebut dalam mendonorkan atom hidrogen yang berakibat pada berkurangnya aktivitas antioksidan dari senyawa produk reaksi.

#### 4.5.2 Uji Aktivitas Alelopati

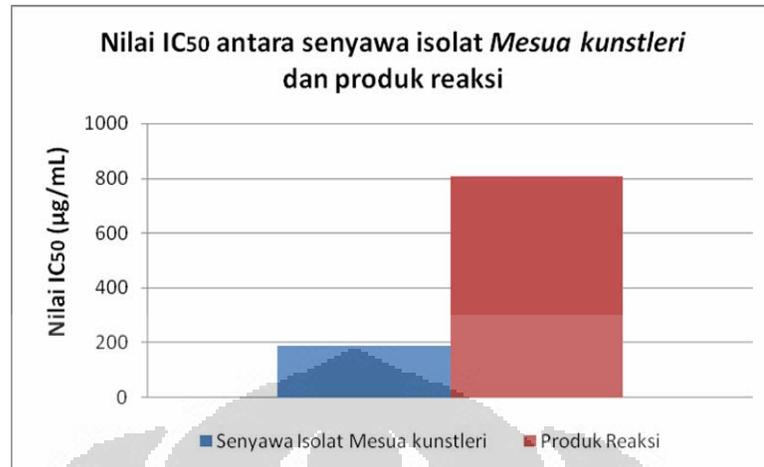
Senyawa produk reaksi yang diduga mengandung dimer senyawa isolat *Mesua kunstleri* memiliki banyak potensi sebagai senyawa bioaktif, di antaranya aktivitas sebagai alelopati. Pada penelitian ini, aktivitas alelopati dilakukan dengan menggunakan biji sawi, yang kemudian ditambahkan dengan senyawa yang akan diujikan pada kondisi perlakuan tertentu. Pada saat pengujian akan terlihat adanya pertumbuhan biji sawi yang terhambat akibat efek dari penambahan senyawa yang diduga memiliki aktivitas alelopati.

Senyawa yang diujikan dibuat dalam beberapa variasi konsentrasi kemudian hasilnya diamati dalam waktu 24-48 jam. Hasil dari pengujian tersebut dapat dilihat pada Lampiran 11.



(a) (b)  
Gambar 4.15 Uji Aktivitas Alelopati Terhadap Biji Sawi  
(a) Kontrol (b) Senyawa Produk Reaksi

Berdasarkan hasil yang didapatkan tersebut, selanjutnya dihitung nilai % inhibisi dari masing-masing konsentrasi senyawa yang diujikan untuk memperoleh nilai  $IC_{50}$  (selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 12 dan 14). Kenaikan dari aktivitas alelopati suatu senyawa dinyatakan dengan nilai  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ), yaitu kemampuan suatu senyawa untuk menghambat pertumbuhan biji sawi sebanyak 50% dalam satuan  $\mu\text{g/mL}$ . Berikut ini adalah grafik nilai  $IC_{50}$  antara senyawa isolat *Mesua kunstleri* dan produk reaksi.



Gambar 4.16 Grafik IC<sub>50</sub> Aktivitas Alelopati Senyawa Isolat *Mesua kunstleri* dan Produk Reaksi

Dari grafik tersebut, terlihat bahwa senyawa isolat *Mesua kunstleri* dan produk reaksi memiliki aktivitas alelopati, yang ditunjukkan dengan semakin berkurangnya jumlah biji sawi yang hidup dengan semakin meningkatnya konsentrasi. Namun, aktivitas alelopati pada senyawa isolat *Mesua kunstleri* lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa produk reaksi. Hal ini dapat dilihat dari nilai IC<sub>50</sub> yang diperoleh untuk senyawa isolat *Mesua kunstleri* yaitu sebesar 187,7133 µg/mL, sedangkan untuk senyawa produk reaksi sebesar 807,1017 µg/mL. Penurunan aktivitas alelopati pada senyawa produk reaksi kemungkinan disebabkan oleh struktur dari senyawa tersebut yang cukup besar dan lebih sterik dibandingkan dengan senyawa awalnya, sehingga kemampuan untuk menghambat pertumbuhan biji sawi menjadi semakin berkurang.

## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

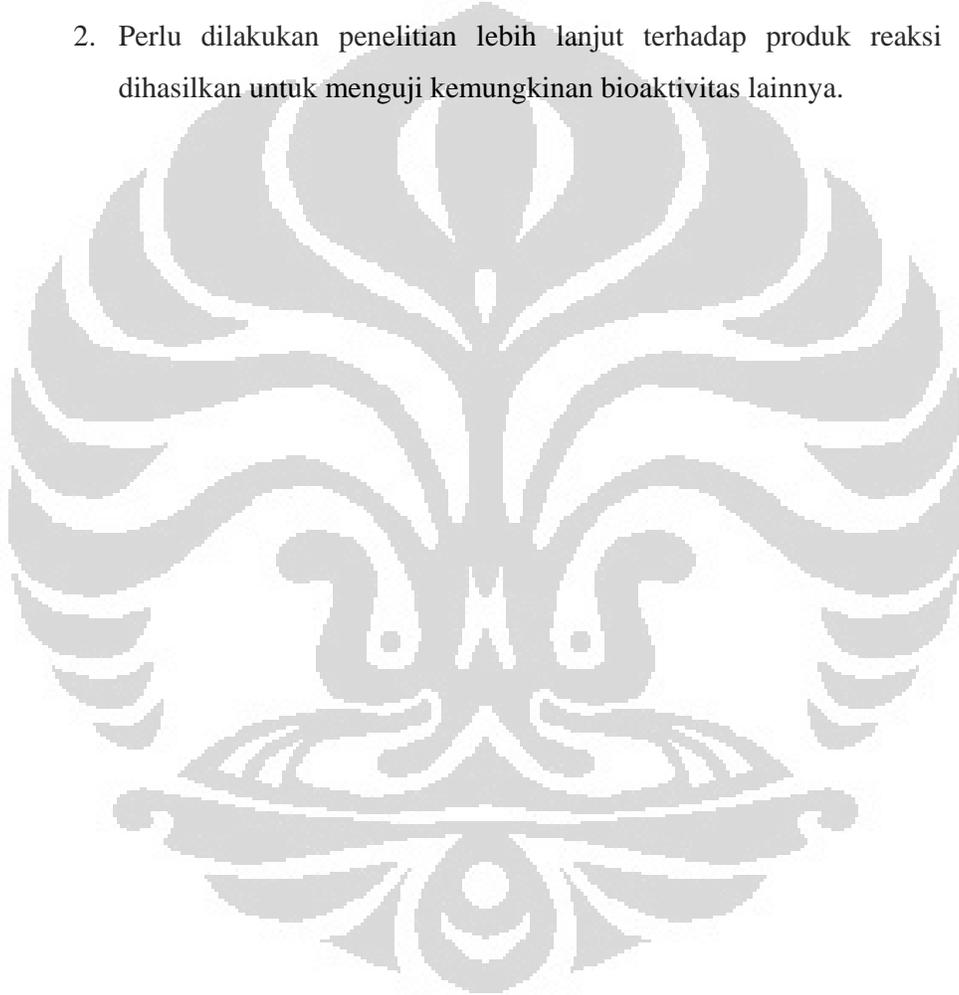
Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Enzim lakase (fraksi I) yang diisolasi dari jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*) mempunyai kadar protein sebesar 0,40037 mg/mL dan aktivitas spesifik sebesar 0,60164 Unit/mg protein.
2. Reaksi kopling oksidatif senyawa isolat *Mesua kunstleri* yang dikatalisis oleh enzim lakase dengan mediator hidrokuinon menghasilkan produk berupa endapan berwarna putih seberat 236,6 mg.
3. Pemurnian produk dengan KLT preparatif menghasilkan produk berupa endapan berwarna kuning seberat 4,8 mg dengan rendemen sebesar 2,0287%.
4. Pada identifikasi dengan LC-MS, terdapat puncak pada waktu retensi antara 4,102-4,269 menit dengan nilai  $m/z = 803,549$  yang diduga merupakan massa relatif dari hasil penggabungan dua senyawa isolat *Mesua kunstleri* yang telah mengalami *rearrangement*.
5. Pada pengujian aktivitas antioksidan dan alelopati, diketahui bahwa senyawa produk reaksi mengalami penurunan aktivitas dibandingkan dengan senyawa isolat *Mesua kunstleri* dikarenakan struktur dari senyawa tersebut yang lebih besar dan lebih sterik.

## 5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian dan kesimpulan yang diperoleh, disarankan hal-hal sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan pemurnian enzim lebih lanjut untuk mendapatkan hasil reaksi yang maksimal.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap produk reaksi yang dihasilkan untuk menguji kemungkinan bioaktivitas lainnya.

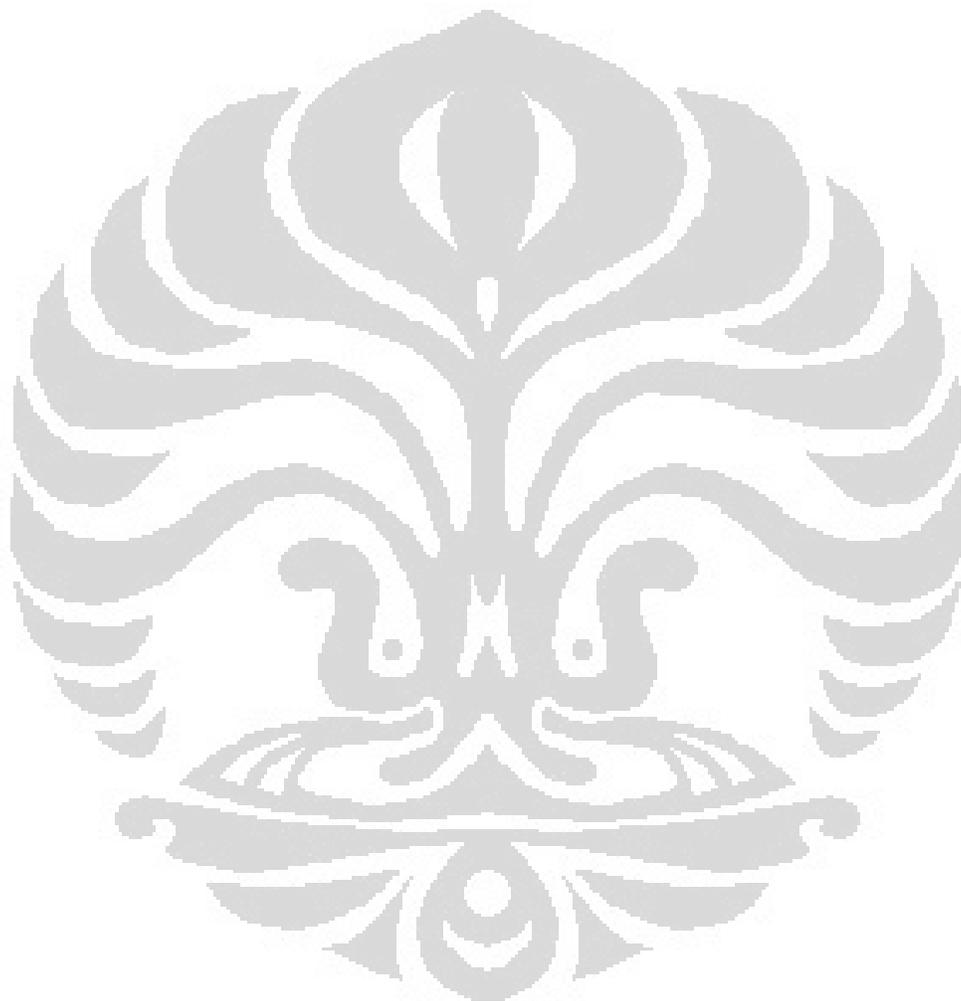


## DAFTAR PUSTAKA

- Adinarayana, K., *et al.* (2007). *Fungal laccase - a versatile enzyme for biotechnological applications*. J. Trends in App. Microbiol. 4 : 233-245.
- Arifin, Z. M. (2008). *Pembentukan dimer eugenol dengan katalis enzim lakase dan uji aktivitasnya sebagai antioksidan*. Karya Utama Sarjana. Departemen Kimia FMIPA UI Depok.
- Cahyana, H. (2004). *Kimia bahan alam*. Depok: Departemen Kimia FMIPA UI.
- Chandan, R. C., & Shahani, K. M. (1963, Januari 17). *Purification and characterization of milk lipase*. <http://jds.fass.org/cgi/reprint/46/4/275.pdf>
- Couto, S. R. (2006). *Industrial and biotechnological applications of laccases : A Review*. Biotechnology Advances. 24 : 500-513.
- Fessenden, R.J., & Fessenden, J.S. (1982). *Kimia organik* (A. Hadyana Pudjaatmaka, Penerjemah.), Ed. ke-3. Jakarta: Erlangga.
- Fitter, A.H., & Hay, R.K.M. (1981). *Fisiologi lingkungan tanaman* (Sri Andani dan E.D. Purbayanti, Penerjemah.). Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Frankel, E. N. (2005). *Lipid oxidation*, Ed. ke-2. UK: The Oily Press.
- Gomathi, C., *et al.* (2008, May 23). *6-[(E)-3,7-Dimethylocta-2,6-dienyl]-5,7-dihydroxy-8-(2-methylbutanoyl)-4-phenyl-2H-chromen-2-one from Mesua kunstleri King (Kosterm)*. <http://journals.iucr.org/e/issues/2008/07/00/ci2600/ci2600.pdf>
- Gomathi, C. (2009). *Bioassay guided isolation of acetyl cholinesterase inhibitors from Mesua elegans (King) Kosterm*. Kuala Lumpur: Department of Chemistry, University of Malaya.
- Harborne, J.B. (1987). *Metode fitokimia* (Kosasih, P & Iwang, Penerjemah.). Bandung: ITB.
- Haro, A. (2007). *Identifikasi produk oxidative coupling etil ferulat oleh enzim peroksidase dan uji aktivitas biologis*. Karya Utama Sarjana. Departemen Kimia FMIPA UI Depok.

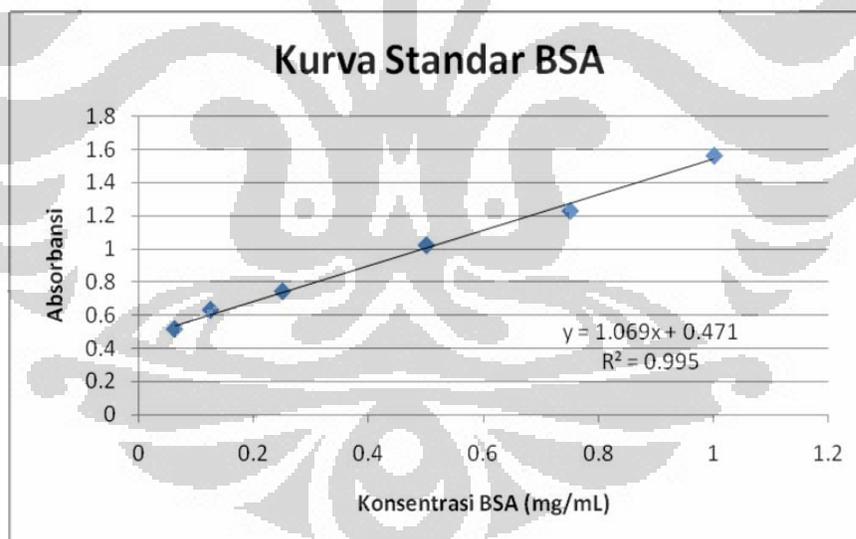
- Haqiqi, S. H. (2008). *Kromatografi lapis tipis*. Juni 6, 2010.  
<http://d4him.files.wordpress.com/2009/02/paper-kromatografi-lapis-tipis.pdf>
- Herbert, R. B. (1995). *Biosintesis metabolit sekunder* (Srigandono B., Penerjemah.), Ed. ke-2. IKIP Press Semarang.
- Hublik, G., & Schinner, Franz. (2000). *Characterization and immobilization of the laccase from Pleurotus ostreatus and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants*. *Enzyme and Microbial Technology*. 27: 330-336
- Hudiyono, S. (1998). *Lipid : Kimia, biokimia dan pangan*. Depok: Departemen Kimia FMIPA UI.
- Hudiyono, S. (1998). *Teori Dasar Enzim*. Depok: Dept. Kimia FMIPA UI.
- Hull, K. L. (2006). *Highly regioselective catalytic oxidative coupling reactions : Synthetic and mechanistic investigation*. *J. Am. Chem. Soc.* 128 : 14047-14049.
- Joni, I M. (2007). *Diktat mata kuliah pengantar biospektroskopi*. Bandung: Jurusan Fisika FMIPA UNPAD.
- Kobayashi, S. H., et al. (2001). *Enzymatic polymerization*. *Chem. Rev*, 101, 3793-3818.
- MEROPS the Peptidase Database*. (2010, April 30). *Pleurotus ostreatus*. Juni 10, 2010. <http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/speccards?sp=sp000800&type=peptidase>
- Proteins and Enzymes. (2004). *Protein Purification: Precipitation*.  
<http://www.cook.rutgers.edu/~dbm/precipitations04.pdf>. 115:412/508
- Rahayu, E. S. (2003, November). *Peranan penelitian alelopati dalam pelaksanaan Low External Input and Sustainable Agriculture (LEISA)*. Juni 5, 2010. Institut Pertanian Bogor.
- Riva, S. (2006). *Laccases: Blue enzyme for green chemistry*. *Trends Biotechnol.* 24: 219-226.
- Silverstein, R. M., Bassler, C. G., & Morrill, T. C. (1974). *Spectrometric identification of organic compounds*, 3<sup>rd</sup> ed. New York: John Willey and Sons.

Widodo, N. (2007). *Isolasi dan karakterisasi senyawa alkaloid yang terkandung dalam jamur tiram putih (Pleurotus ostreatus)*. Semarang: Dept. Kimia FMIPA UNNES.



**Lampiran 1. Penentuan Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik Enzim**

Konsentrasi BSA (mg/mL)	Absorbansi ( $\lambda = 750 \text{ nm}$ )
0,0625	0,51434
0,125	0,63029
0,25	0,74215
0,5	1,02121
0,75	1,22896
1	1,56255
Enzim fraksi I	0,89900



(Lanjutan)

- **Perhitungan kadar protein enzim lakase**

Persamaan garis linier :

$$Y = 1,069x + 0,471$$

$$0,89900 = 1,069x + 0,471$$

$$x = 0,40037 \text{ mg/mL}$$

Jadi, kadar protein enzim lakase sebesar 0,40037 mg/mL

- **Perhitungan aktivitas spesifik enzim lakase**

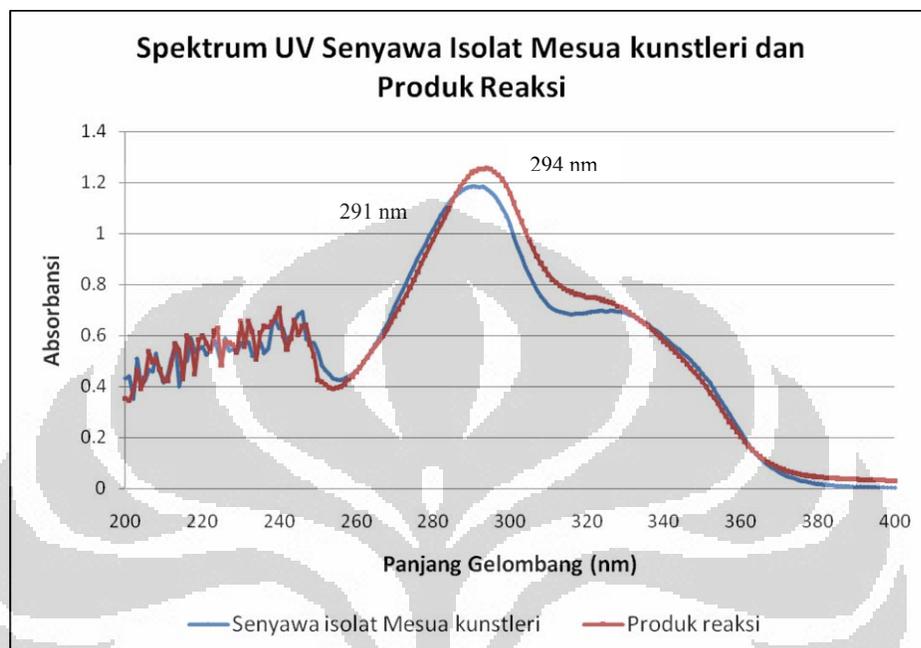
Absorbansi maksimum pada panjang gelombang 470 nm = 1,5858

$$\text{Aktivitas spesifik} = \frac{A_{470\text{nm}} / \text{menit}}{6,58 \times \text{kadar protein (mg/mL)}}$$

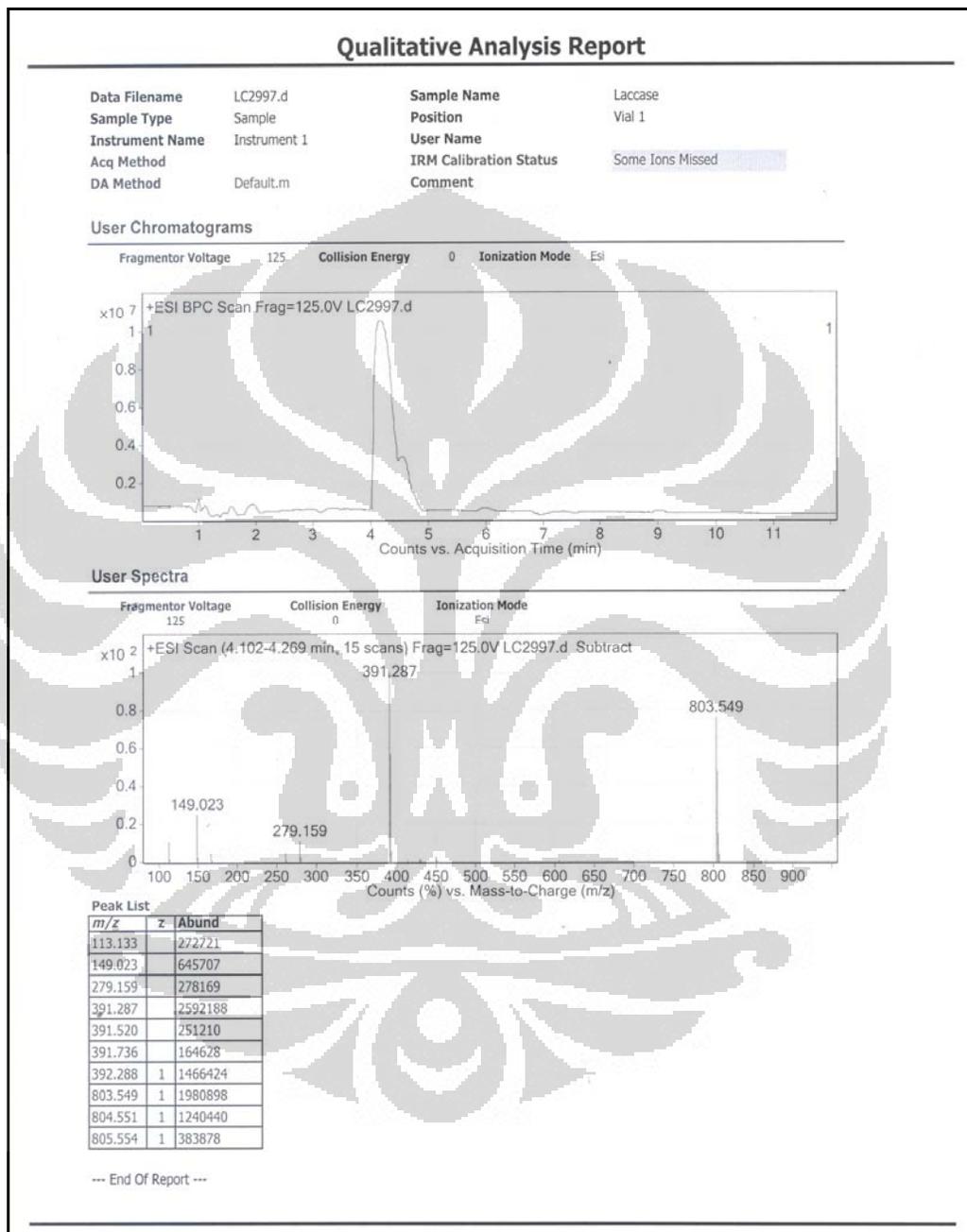
$$= 0,60164 \text{ Unit/mg protein}$$

Jadi, aktivitas spesifik enzim lakase sebesar 0,60164 Unit/mg protein

Lampiran 2. Spektrum UV Senyawa Isolat *Mesua kunstleri* dan Produk Reaksi

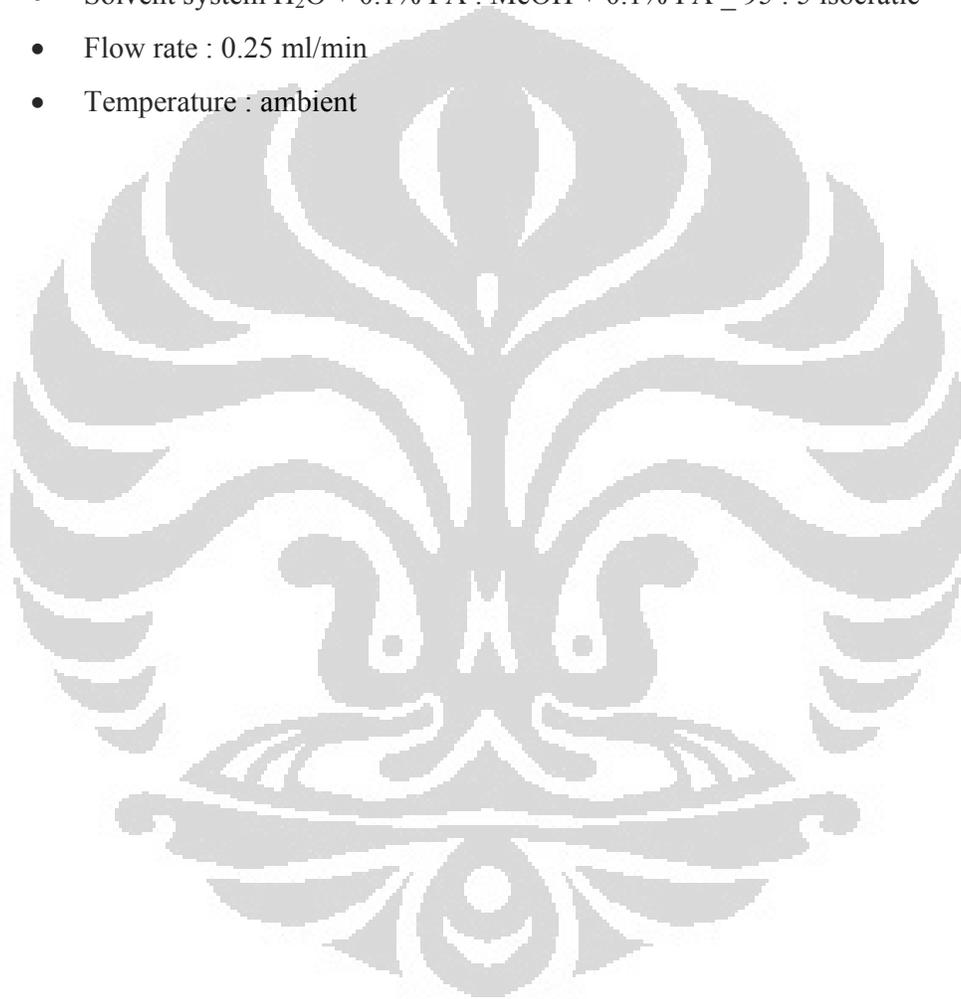


### Lampiran 3. Kromatogram LC-MS Senyawa Produk Reaksi



**Lampiran 4. Kondisi alat LC-MS**

- Mass spectra was carried out on Agilent Technologies 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC-MS, with ZORBAX Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution HT 2.1 mm i.d x 100 mm x 1.8  $\mu$ m column
- Solvent system H<sub>2</sub>O + 0.1% FA : MeOH + 0.1% FA \_ 95 : 5 isocratic
- Flow rate : 0.25 ml/min
- Temperature : ambient



**Lampiran 5.** Pengukuran Aktivitas Antioksidan Senyawa Isolat *Mesua kunstleri* dan Produk Reaksi

a. Senyawa isolat *Mesua kunstleri*

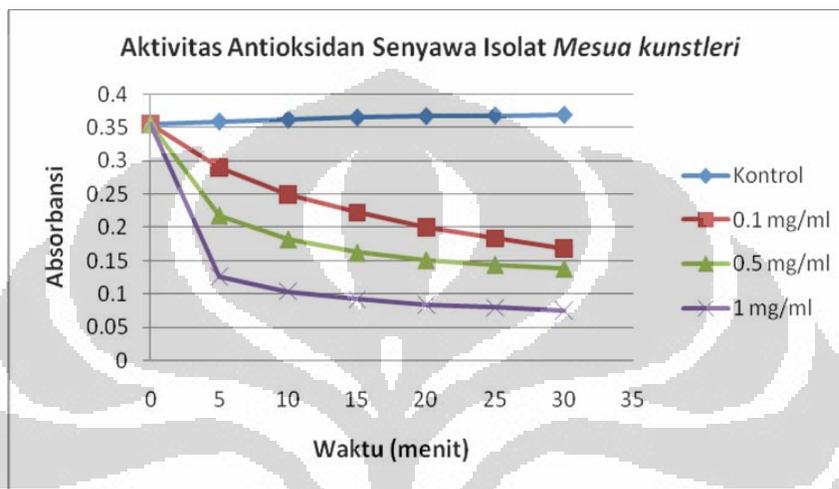
Waktu (menit)	Absorbansi pada $\lambda = 515 \text{ nm}$			
	Konsentrasi (mg/mL)			
	Kontrol	0,1	0,5	1
0	0,355	0,355	0,355	0,355
5	0,359	0,290	0,218	0,126
10	0,362	0,249	0,182	0,104
15	0,365	0,222	0,162	0,092
20	0,367	0,200	0,151	0,084
25	0,368	0,183	0,144	0,080
30	0,369	0,168	0,138	0,075

b. Produk reaksi

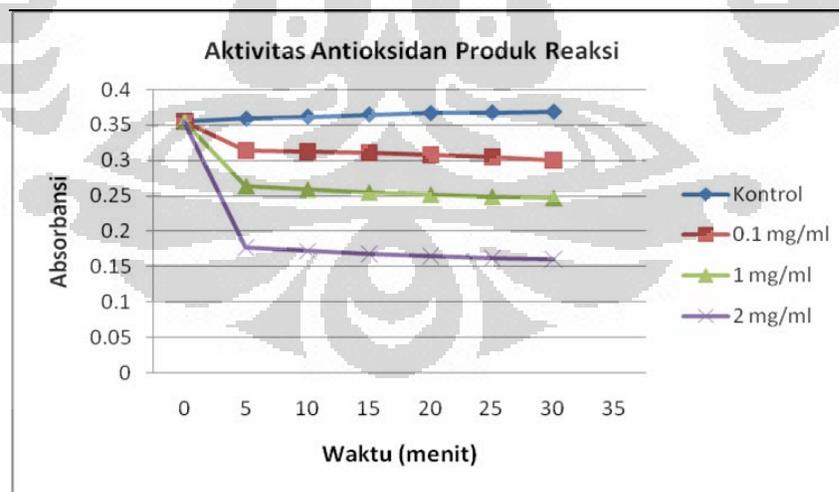
Waktu (menit)	Absorbansi pada $\lambda = 515 \text{ nm}$			
	Konsentrasi (mg/mL)			
	Kontrol	0,1	1	2
0	0,355	0,355	0,355	0,355
5	0,359	0,314	0,264	0,177
10	0,362	0,312	0,259	0,172
15	0,365	0,311	0,255	0,168
20	0,367	0,308	0,252	0,165
25	0,368	0,305	0,249	0,162
30	0,369	0,300	0,247	0,16

**Lampiran 6.** Grafik Aktivitas Antioksidan Senyawa Isolat *Mesua kunstleri* dan Produk Reaksi

a. Senyawa isolat *Mesua kunstleri*



b. Produk reaksi



**Lampiran 7.** Perhitungan % Inhibisi Aktivitas Antioksidan Senyawa Isolat *Mesua kunstleri* dan Produk Reaksi

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(A \text{ kontrol}) - (A \text{ sampel})}{A \text{ kontrol}} \times 100\%$$

dimana :

A kontrol = Absorbansi kontrol pada menit ke 0

A sampel = Absorbansi sampel pada menit ke 30

a. Senyawa isolat *Mesua kunstleri*

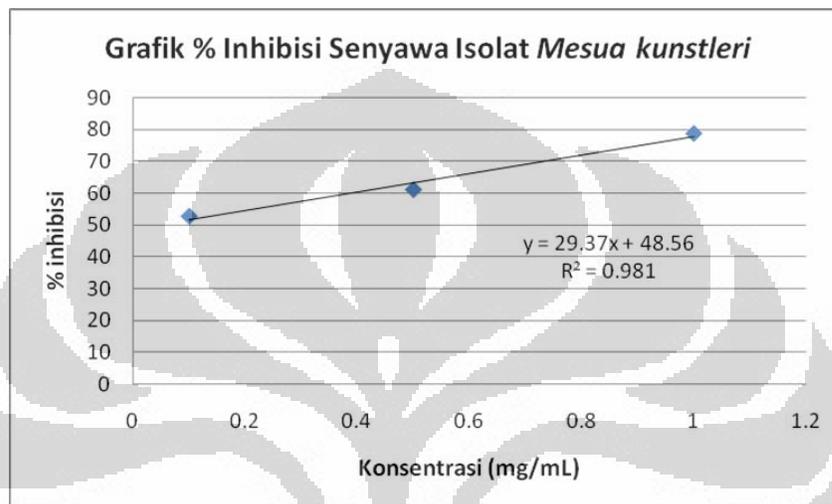
Konsentrasi (mg/mL)	% Inhibisi
0,1	52,676
0.5	61,1268
1	78,8732

b. Produk reaksi

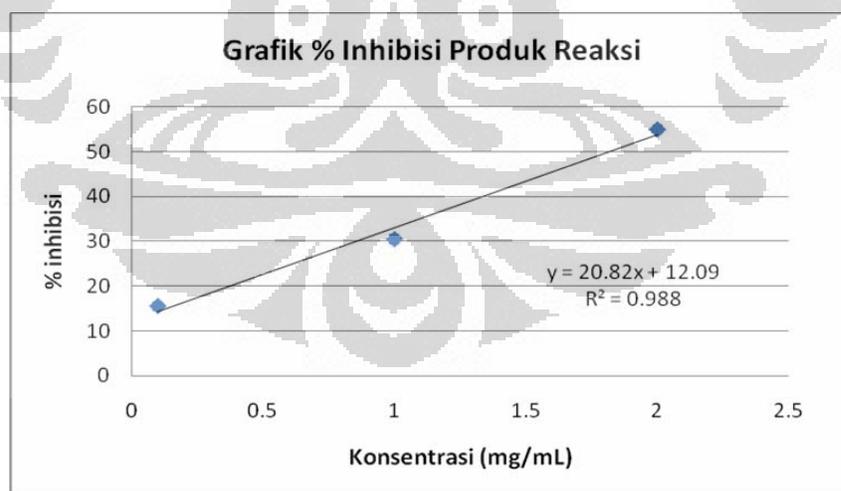
Konsentrasi (mg/mL)	% Inhibisi
0,1	15,4929
1	30,4225
2	54,9296

**Lampiran 8.** Grafik % Inhibisi Aktivitas Antioksidan Senyawa Isolat *Mesua kunstleri* dan Produk Reaksi

a. Senyawa isolat *Mesua kunstleri*



b. Produk reaksi



**Lampiran 9.** Perhitungan nilai  $IC_{50}$  dari Aktivitas Antioksidan

- a. Senyawa isolat *Mesua kunstleri*

$$\text{Persamaan garis linier : } y = 29,37x + 48,56$$

$$50 = 29,37x + 48,56$$

$$x = 0,04903 \text{ mg/mL}$$

Jadi, nilai  $IC_{50}$  dari senyawa isolat *Mesua kunstleri* adalah 0,04903 mg/mL

- b. Produk reaksi

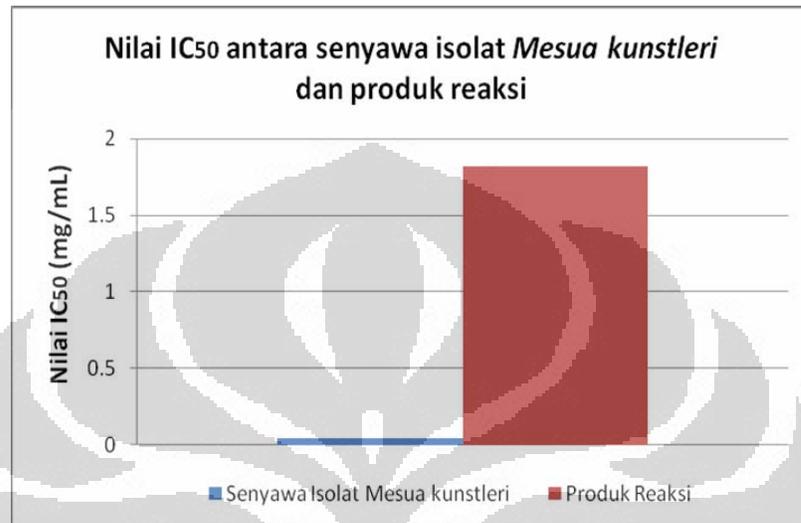
$$\text{Persamaan garis linier : } y = 20,82x + 12,09$$

$$50 = 20,82x + 12,09$$

$$x = 1,820845 \text{ mg/mL}$$

Jadi, nilai  $IC_{50}$  dari produk reaksi adalah 1,820845 mg/mL

**Lampiran 10.** Grafik Perbandingan Nilai  $IC_{50}$  dari Aktivitas Antioksidan Antara Senyawa Isolat *Mesua kunstleri* dan Produk Reaksi



Nilai  $IC_{50}$  dari senyawa isolat *Mesua kunstleri* adalah 0,04903 mg/mL

Nilai  $IC_{50}$  dari produk reaksi adalah 1,820845 mg/mL

**Lampiran 11.** Pengukuran Aktivitas Alelopati Senyawa Isolat *Mesua kunstleri* dan Produk Reaksi Terhadap 30 Biji Sawi

a. Senyawa isolat *Mesua kunstleri*

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Jumlah pertumbuhan biji sawi (hidup)				Rerata
	Kontrol		Senyawa isolat <i>Mesua kunstleri</i>		
	Percobaan 1	Percobaan 2	Percobaan 1	Percobaan 2	
0	30	30	-	-	30
50	-	-	27	27	27
100	-	-	24	22	23
150	-	-	18	18	18
200	-	-	15	13	14

b. Produk reaksi

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Jumlah pertumbuhan biji sawi (hidup)				Rerata
	Kontrol		Senyawa produk reaksi		
	Percobaan 1	Percobaan 2	Percobaan 1	Percobaan 2	
0	30	30	-	-	30
100	-	-	28	28	28
200	-	-	26	26	26
500	-	-	18	20	19
1000	-	-	11	13	12

**Lampiran 12.** Perhitungan % Inhibisi Aktivitas Alelopati Senyawa Isolat *Mesua kunstleri* dan Produk Reaksi

Contoh perhitungan :

- Kontrol hidup :  $30/30 = 1$
- Konsentrasi 50  $\mu\text{g/mL}$  senyawa isolat *Mesua kunstleri* :  $27/30 = 0,9$

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(\sum \text{Biji Hidup})_{\text{kontrol}} - (\sum \text{Biji Hidup})_{\text{sampel}}}{(\sum \text{Biji Hidup})_{\text{kontrol}}} \times 100\%$$

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{1 - 0,9}{1} \times 100\% = 10\%$$

a. Senyawa isolat *Mesua kunstleri*

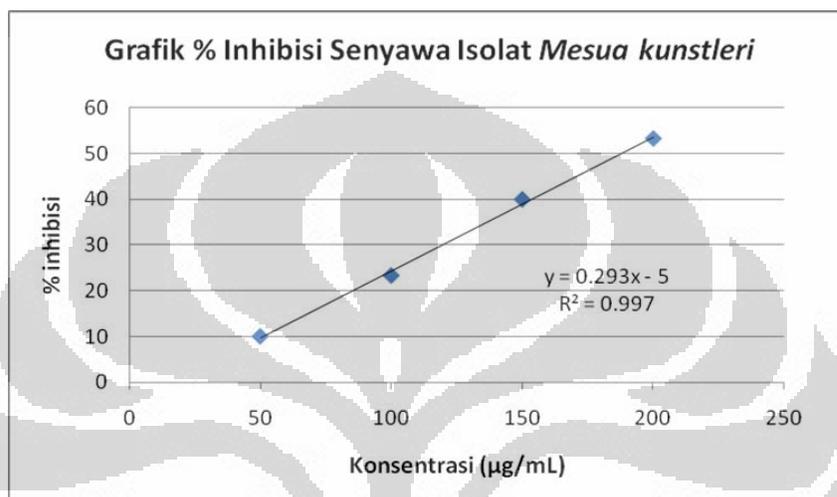
Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Inhibisi
50	10
100	23,33
150	40
200	53,33

b. Produk reaksi

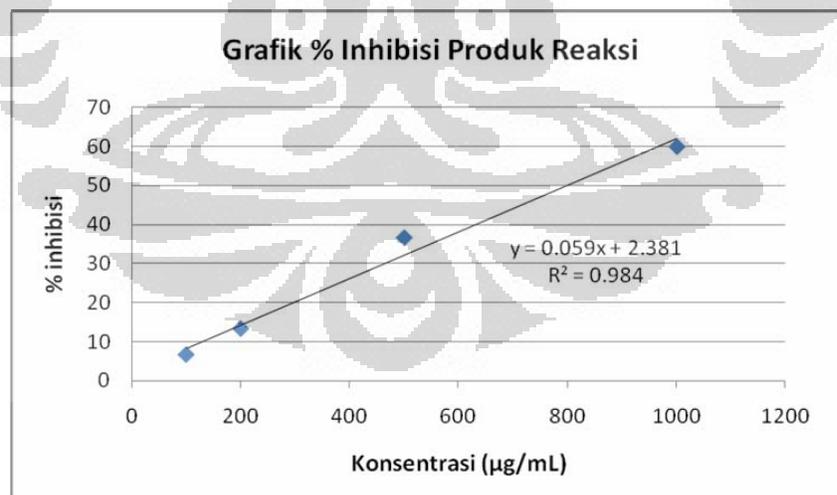
Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Inhibisi
100	6,67
200	13,33
500	36,67
1000	60

**Lampiran 13.** Grafik % Inhibisi Aktivitas Alelopati Senyawa Isolat *Mesua kunstleri* dan Produk Reaksi

a. Senyawa isolat *Mesua kunstleri*



b. Produk reaksi



**Lampiran 14.** Perhitungan nilai  $IC_{50}$  dari Aktivitas Alelopati

c. Senyawa isolat *Mesua kunstleri*

Persamaan garis linier :  $y = 0,293x - 5$

$$50 = 0,293x - 5$$

$$x = 187,7133 \mu\text{g/mL}$$

Jadi, nilai  $IC_{50}$  dari senyawa isolat *Mesua kunstleri* adalah 187,7133  $\mu\text{g/mL}$

d. Produk reaksi

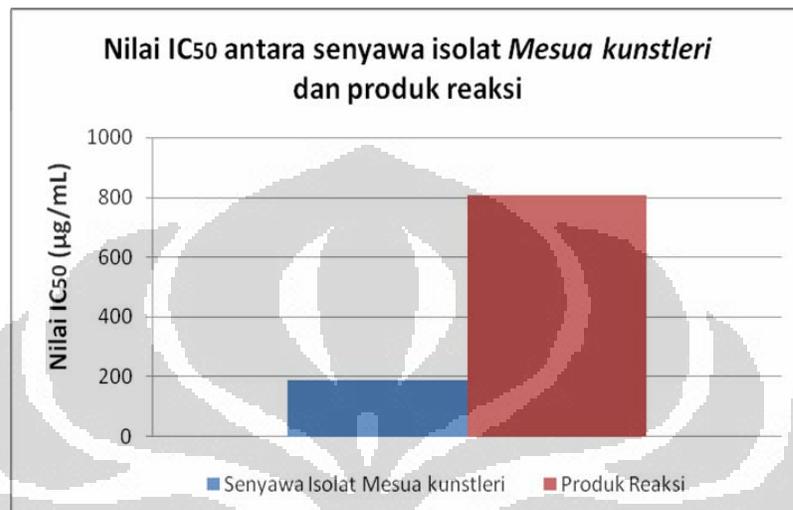
Persamaan garis linier :  $y = 0,059x + 2,381$

$$50 = 0,059x + 2,381$$

$$x = 807,1017 \mu\text{g/mL}$$

Jadi, nilai  $IC_{50}$  dari produk reaksi adalah 807,1017  $\mu\text{g/mL}$

**Lampiran 15.** Grafik Perbandingan Nilai  $IC_{50}$  dari Aktivitas Alelopati Antara Senyawa Isolat *Mesua kunstleri* dan Produk Reaksi



Nilai  $IC_{50}$  dari senyawa isolat *Mesua kunstleri* adalah 187,7133  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Nilai  $IC_{50}$  dari produk reaksi adalah 807,1017  $\mu\text{g}/\text{mL}$