



UNIVERSITAS INDONESIA

**STUDI IDENTIFIKASI PRODUK REAKSI OKSIDASI
KOPLING CIS-ISOEUGENOL DAN TRANS-ISOEUGENOL
DENGAN KATALIS PEROKSIDASE DARI *Raphanus sativus* L.**

SKRIPSI

**KUSNANINGSIH
0606069110**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN
ALAM
PROGRAM STUDI SARJANA ILMU KIMIA
DEPOK
JANUARI, 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**STUDI IDENTIFIKASI PRODUK REAKSI OKSIDASI
KOPLING CIS-ISOEUGENOL DAN TRANS-ISOEUGENOL
DENGAN KATALIS PEROKSIDASE DARI *Raphanus sativus* L.**

SKRIPSI

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

**KUSNANINGSIH
0606069110**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN
ALAM
PROGRAM STUDI STUDI SARJANA ILMU KIMIA
DEPOK
JANUARI, 2011**

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Kusnaningsih
NPM : 0606069110
Program Studi : Kimia
Judul Skripsi : Studi Identifikasi Produk Reaksi Oksidasi Kopling
Cis- isoeugenol dan Trans-isoeugenol dengan
Katalis Peroksidase dari *Raphanus sativus* L.

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 Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing 1 : Dr. Ir. A. Herry Cahyana (.....)

Pembimbing 2 : Drs. Siswati Setiasih, M.Si, Apt. (.....)

Penguji : Drs. Riswiyanto, M.Si (.....)

Penguji : Dra. Susilowati Hs., M.Sc (.....)

Penguji : Drs. Sultan Badjri, M.Si (.....)

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 5 Januari 2011

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT atas segala rahmat dan keberkahan-Nya dalam setiap langkah kehidupan penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini dengan sangat baik. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat ujian kelulusan Sarjana Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Penulis mempersembahkan skripsi ini untuk Allah SWT dan keluarga tersayang. Terima kasih kepada Papa, Mama (alm.) dan Endy yang selalu memberikan dorongan semangat dan mendoakan yang terbaik kepada penulis dalam keadaan apapun. Terima kasih juga untuk kasih sayang, kepercayaan, pengertian, kesabaran, dan cinta yang telah diberikan sejak penulis kecil hingga bisa mencapai jenjang ini. Penulis juga ingin mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu dan terus mendampingi penulis hingga saat ini:

1. Dr. Riwandi S., Ph.D., selaku pembimbing akademis yang telah memberikan saran, nasihat, dan arahan kepada penulis sehingga penulis selalu terdorong untuk berusaha lebih baik lagi selama perkuliahan.
2. Dr. Ir. A. Herry C. selaku pembimbing 1 yang telah memberikan kepercayaan kepada penulis selama penelitian.
3. Drs. Siswati S., M.Si, Apt., selaku pembimbing 2 yang telah bersabar, bersedia meluangkan waktu untuk berdiskusi, memberikan bimbingan, arahan, saran, dan ilmunya yang sangat bermanfaat bagi penulis.
4. Dr. Amarila malik dan Prof. Atik dari Laboratorium Mikrobiologi Departemen Farmasi, FMIPA UI yang telah berkenan meminjamkan alat *Refrigerated High Speed Micro Sentrifuge* sehingga penulis dapat melakukan isolasi peroksidase dengan baik, “Terima kasih atas budi baik dan bantuan yang telah Ibu berikan”. Mba Catur dan mas Tri yang telah bersedia mengajarkan penulis cara mengoperasikan alat tersebut.
5. Bu Tuti, bu Wid, bu Tresye, bu Susi, bu Yani, bu Ivan, bu Nana, bu Yuni, pa Ismunaryo, pa Bowo, pa Asep, pa Sunardi, pa Badjri, pa Riswi, pa Jarnuzi, pa Budi, pa Emil, pa Endang, Prof. Soleh, Prof. Usman, Prof.

Endang, Prof. Sumi, dan Prof. Wahyudi yang telah bersedia memberikan ilmunya yang tak ternilai harganya.

6. Ko feri dan ci cing-cing, atas bantuan dan kebaikan hati kalian yang telah bersedia menolong penulis untuk bisa mendapatkan jurnal-jurnal yang sangat bermanfaat bagi penulis. Berkat bantuan kalian, penulis dapat melakukan penelitian dengan sangat baik.
7. Teman-teman seperjuangan penulis di lab. penelitian lantai 4: Diana, Nadiroh, Sophi, Yudha, dan Desbet. Di lab. penelitian lantai 3: Wiwit, Nadia, Linda, Nita, ka Simas, Helen, ka Andri, Dante, dan Intan. Di lantai 1: Noval, Didit, Kanti, dan Ka Irwan. Teman-teman yang melakukan penelitian di luar: Feri, Putu, dan Dewe serta S2 kimia. Terima kasih atas kebersamaan, dorongan semangat, canda tawa, bantuan, dan pengertian kalian selama masa-masa penelitian, “Semangat semuanya!”.
8. Steffany, Egi, Yuli, Mbrit, Eby dan Arief (sahabat dan rekan satu penelitianku). Terima kasih telah menjadi sahabat yang selalu mendukungku dalam segala hal dan bersedia mendengarkan segala keluh kesahku.
9. Stevanus, Cunlay, Pan-pan, Firman, Nanik, Winda, Faiza, Novi, Narita, Mima, ko Alex’04, ka Wury, Ayu, Tere, Raima, Nissia, Anissa, Rindu, Adi, Zico, Ardie, Indra, Wisnu, Sonia, dan Feni yang selalu hadir membawa tawa dan membantu penulis selama ini.
10. Teman-teman dari MBUI, kimia 2007 dan 2008 yang telah berkenan memberikan semangat kepada penulis; dan
11. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Akan tetapi penulis tetap berharap semoga skripsi ini dapat berguna untuk semua pihak.

Penulis
2011

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Kusnaningsih

NPM : 0606069110

Tanda Tangan :

Tanggal : 5 Januari 2011

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Kusnaningsih
NPM : 0606069110
Program Studi : Kimia
Departemen : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

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 Identifikasi Produk Reaksi Oksidasi Kopleng Cis-iso Eugenol Dan Trans-iso Eugenol Dengan Katalis Peroksidase Dari *Raphanus sativus* L.

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 mempublikasikan 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: 5 Januari 2011

Yang menyatakan,

(Kusnaningsih)

ABSTRAK

Nama : Kusnaningsih
Program studi : Kimia
Judul : Studi Identifikasi Produk Reaksi Oksidasi Kopling Cis- isoeugenol dan Trans-isoeugenol dengan Katalis Peroksidase dari *Raphanus sativus* L.

Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi produk reaksi oksidasi kopling dari senyawa cis-isoeugenol 78% dan trans-isoeugenol 94% dengan katalis peroksidase dari *Raphanus sativus* L. Peroksidase hasil isolasi dari *Raphanus sativus* L. yang digunakan memiliki aktivitas sebesar 33,3063 U/mg protein. Identifikasi terbentuknya produk dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Hasil analisa menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis, FTIR, dan GC-MS menunjukkan bahwa produk reaksi oksidasi kopling dari trans-isoeugenol dan cis-isoeugenol yang terbentuk merupakan senyawa dimer dengan posisi penggabungan 8-5'. Senyawa dimer ini lebih dikenal dengan nama dehidrodiisoeugenol.

Kata kunci : cis-isoeugenol, trans-isoeugenol, *Raphanus sativus* L., peroksidase, reaksi oksidasi kopling
xiii + 54 hal. ; 29 gambar; 10 tabel; dan 7 lampiran
Daftar pustaka : 45 (1980-2010)

ABSTRACT

Name : Kusnaningsih
Program study: Chemistry
Title : Identification of Product Reaction of Coupling Oxidation
Trans/Cis-Isoeugenol Catalized by Peroxidase from *Raphanus Sativus L.*

The aim of this study was to identify the product reaction of coupling oxidation from 94% trans-isoeugenol and 78% cis-isoeugenol which catalized by peroxidase from *Raphanus Sativus L.* Spesific activity of peroxidase isolated from *Raphanus Sativus L.* was 33,3063 U/mg protein. Thin Layer Chromatography (TLC) used to identify the product formation qualitatively. The measurement results using instrument UV-Vis spectrophotometer, FTIR, and GC-MS showed that oxidative coupling reaction products of cis-isoeugenol and trans-isoeugenol are dimer formed by coupling the position 8-5'. The dimer known as dehidrodiisoeugenol.

Key words : cis-isoeugenol, trans-isoeugenol, *Raphanus sativus L.*, peroxidase, coupling oxidation reaction
xiii+54 pages ; 29 pictures; 10 tables; and 7 appendix
Bibliography : 45 (1980-2010)

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS.....	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Hipotesis.....	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Klasifikasi Lobak (<i>Raphanus sativus L.</i>).....	4
2.2 Enzim.....	5
2.3 Sistem Klasifikasi Enzim.....	7
2.4 Aktivitas Enzim.....	8
2.5 Peroksidase (I.U.B.: 1.11.1.7).....	9
2.6 Teknik Pemisahan dan Pemurnian Enzim.....	11
2.6.1 Isolasi dan Ekstraksi Enzim.....	11
2.6.2 Sentrifugasi.....	11
2.6.3 Pemekatan/Fraksionasi.....	12
2.6.4 Dialisis.....	12
2.7 Isoeugenol.....	13
2.8 Reaksi Oksidasi Kopling Senyawa Fenolik.....	14
BAB 3 METODE PENELITIAN.....	17
3.1 Bahan.....	17
3.2 Alat.....	17
3.3 Prosedur Kerja.....	17
3.3.1 Isolasi Enzim Ekstrak Kasar.....	17
3.3.2 Penentuan Aktivitas Peroksidase.....	17
3.3.3 Penentuan Kadar Protein (Metode Lowry).....	18
3.3.4 Fraksionasi Dengan Menggunakan (NH ₄) ₂ SO ₄	19
3.3.5 Penentuan Aktivitas Peroksidase dan Penentuan Kadar Protein Dari Tiap Fraksi.....	19
3.3.6 Dialisa.....	20
3.3.7 Penentuan Jumlah Substrat Dan pH Reaksi Oksidasi Kopling Cis/trans-isoegenol.....	20

	Halaman
3.3.8 Isolasi Hasil Reaksi Oksidasi Kopling Cis/Trans-isoegenol..	21
3.3.9 Uji KLT Dan Pemisahan Komponen Pada Ekstrak.....	22
BAB 4 PEMBAHASAN	23
4.1 Isolasi Enzim Ekstrak Kasar.....	23
4.2 Fraksinasi Menggunakan (NH ₄) ₂ SO ₄	24
4.3 Dialisa.....	26
4.4 Penentuan Jumlah Substrat Dan pH Reaksi Oksidasi Kopling.....	29
4.4.1 Trans-isoegenol.....	30
4.4.2 Cis-isoegenol.....	32
4.5 Isolasi Hasil Reaksi Oksidasi Kopling Cis/Trans-isoegenol.....	37
4.6 Analisa Senyawa Hasil Reaksi Dengan Instrumen.....	38
4.6.1 Analisa Dengan Spektrofotometer UV-Vis.....	38
4.6.2 Analisa Dengan FTIR.....	40
4.6.3 Analisa Dengan GC-MS.....	43
4.7 Mekanisme Reaksi Pembentukan Senyawa Hasil Reaksi Oksidasi Kopling.....	47
BAB 5 KESIMPULAN	50
5.1 Kesimpulan.....	50
5.2 Saran.....	50
DAFTAR PUSTAKA	51

DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 2.1	Bunga dari <i>Raphanus sativus</i> var. <i>hortensis</i> L.....	4
Gambar 2.2	<i>Raphanus sativus</i> var. <i>hortensis</i> L.....	5
Gambar 2.3	Interaksi enzim dengan substrat.....	6
Gambar 2.4	Klasifikasi enzim.....	8
Gambar 2.5	Mekanisme kerja inhibitor.....	9
Gambar 2.6	Siklus katalitik peroksidase.....	10
Gambar 2.7	Sistem dialisa.....	13
Gambar 2.8	Struktur a) cis-isoeugenol dan b) trans-isoeugenol.....	14
Gambar 2.9	Resonansi radikal isoeugenol.....	15
Gambar 2.10	Reaksi oksidasi kopleng isoeugenol.....	15
Gambar 4.1	Enzim ekstrak kasar.....	24
Gambar 4.2	a) Endapan hasil fraksinasi dan b) Hasil fraksinasi menggunakan (NH ₄) ₂ SO ₄	25
Gambar 4.3	Reaksi pembentukan quinoneimine.....	25
Gambar 4.4	a) Sistem dialisa yang digunakan dan b) Larutan enzim hasil dialisa.....	27
Gambar 4.5	Grafik kestabilan peroksidase.....	29
Gambar 4.6	a) Campuran reaksi setelah ditambahkan peroksidase/H ₂ O ₂ dan b) Hasil ekstraksi menggunakan etil asetat.....	30
Gambar 4.7	Hasil uji trans-isoeugenol KLT a) pH 3,00 ; b) pH 4,00 ; c) pH 5,00 ; d) pH 6,00 ; dan e) pH 7.....	30
Gambar 4.8	a) Campuran reaksi setelah ditambahkan peroksidase/H ₂ O ₂ , b) Hasil ekstraksi menggunakan etil asetat.....	33
Gambar 4.9	Hasil uji cis-isoeugenol KLT a) pH 3,00 ; b) pH 4,00 ; c) pH 5,00 ; d) pH 6,00 ; dan e) pH 7,00.....	33
Gambar 4.10	Grafik pengaruh pH pada perbandingan jumlah substrat cis/trans-isoeugenol : H ₂ O ₂ 5% = 1,5:1 (mol).....	36
Gambar 4.11	a) Ekstrak etil asetat hasil reaksi trans-isoeugenol dan b) ekstrak etil asetat yang telah diuapkan pelarutnya.....	37
Gambar 4.12	a) Ekstrak etil asetat hasil reaksi cis-isoeugenol dan b) ekstrak etil asetat yang telah diuapkan pelarutnya.....	38
Gambar 4.13	Spektra UV-Vis a) Trans-isoeugenol dan senyawa hasil reaksinya, b) Cis-isoeugenol dan senyawa hasil reaksinya.....	39
Gambar 4.14	Spektra IR trans-isoeugenol dan senyawa hasil reaksinya...	41
Gambar 4.15	Spektra IR cis-isoeugenol dan senyawa hasil reaksinya.....	42
Gambar 4.16	Kromatogram GC senyawa hasil reaksi trans-isoeugenol...	44
Gambar 4.17	a) Spektrum massa dan b) Struktur molekul senyawa hasil reaksi trans-isoeugenol.....	44
Gambar 4.18	a) Kromatogram GC, b) Spektrum massa, dan c) Struktur molekul senyawa hasil reaksi cis-isoeugenol.....	46
Gambar 4.19	Kemungkinan mekanisme reaksi pembentukan dimer a) Trans-isoeugenol dan b) Cis-isoeugenol.....	48

DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 4.1	Aktivitas peroksidase pada berbagai tingkat kejenuhan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	26
Tabel 4.2	Tahapan pemurnian enzim peroksidase dari <i>Raphanus sativus</i> L.....	28
Tabel 4.3	Data kestabilan peroksidase hasil isolasi.....	28
Tabel 4.4	Data absorbansi produk oksidasi kopling trans-iso Eugenol.....	32
Tabel 4.5	Data absorbansi produk oksidasi kopling cis-iso Eugenol....	35
Tabel 4.6	Data absorbansi produk oksidasi kopling trans-iso Eugenol dan cis-iso Eugenol dengan perbandingan jumlah mol substrat cis/trans-iso Eugenol : H_2O_2 5% (1,5 : 1).....	36
Tabel 4.7	Identifikasi gugus fungsi trans-iso Eugenol.....	41
Tabel 4.8	Identifikasi gugus fungsi senyawa hasil reaksi trans-iso Eugenol.....	42
Tabel 4.9	Identifikasi gugus fungsi cis-iso Eugenol.....	43
Tabel 4.10	Identifikasi gugus fungsi senyawa hasil reaksi cis-iso Eugenol.....	43

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1** Pengukuran kadar protein dengan metode Lowry, dengan menggunakan standar BSA (Bovine Serum Albumin)
- Lampiran 2** Spektra UV-Vis dan data absorbansi optimasi jumlah substrat dan pH reaksi oksidasi kopliling
- pH 3
 - pH 4
 - pH 5
 - pH 6
 - pH 7
- Lampiran 3** Spektra IR trans-isoegenol dan senyawa hasil reaksinya
- Lampiran 4** Spektra IR cis-isoegenol dan senyawa hasil reaksinya
- Lampiran 5** Kromatogram GC-MS senyawa hasil reaksi trans-isoegenol
- Lampiran 6** Kromatogram GC-MS senyawa hasil reaksi cis-isoegenol
- Lampiran 7** Bagan kerja isolasi enzim dari *Raphanus sativus* L.

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Senyawa fenolik pada umumnya merupakan senyawa bahan alam yang banyak dijumpai dalam tanaman. Senyawa ini telah banyak diteliti secara luas untuk dimanfaatkan dalam kehidupan manusia. Dalam industri makanan dan kosmetik, senyawa fenolik digunakan sebagai pemberi aroma yang khas. Sedangkan dalam industri farmasi dan kesehatan, senyawa ini banyak dimanfaatkan sebagai antioksidan, antikanker, antimikroba, dan lain-lain (Croteau et al., 2000). Beberapa contoh senyawa fenolik yang sering dijumpai antara lain eugenol, isoeugenol, cinnamaldehyd, katekin, dan menthol.

Senyawa fenolik mudah teroksidasi karena strukturnya yang khas yaitu memiliki satu atau lebih gugus hidoksi yang terikat pada satu atau lebih cincin aromatik benzen (Fessenden dan Fessenden, 1982). Reaksi oksidasi kopling senyawa fenolik dengan menggunakan enzim sering dilakukan untuk mendapatkan produk berupa polimer fenolik yang bersifat bioaktif dan relatif aman terhadap lingkungan. Pada tahun 1998, Kobayashi membuktikan bahwa senyawa fenolik dapat diubah menjadi senyawa bioaktif yang dapat menghambat reaksi patogen dan serangga dengan bantuan peroksidase. Yuda pada tahun 2006 juga melakukan hal yang sama dengan menggunakan isoeugenol sebagai substrat dan peroksidase sebagai katalis reaksi pembentukan dimer. Senyawa fenolik lainnya yang digunakan, antara lain: guaiakol (Sulaksono, 2007), eugenol, dan isoeugenol (Lindiyah, 2008 dan Elvi, 2010).

Keuntungan penggunaan enzim sebagai katalis pada reaksi ini, antara lain karena ketersediaannya yang berlimpah di alam dan sifatnya yang ramah lingkungan karena berasal dari makhluk hidup. Akan tetapi, penggunaan enzim dalam suatu reaksi harus mengikuti kondisi optimum enzim tersebut dan reaksi yang dikatalisanya bersifat spesifik atau hanya dapat bekerja pada substrat tertentu, bahkan dengan stereokimia tertentu sehingga penggunaannya di dalam industri menjadi terbatas.

Salah satu enzim yang sering digunakan sebagai katalis reaksi oksidasi kopling senyawa fenolik adalah peroksidase. Peroksidase merupakan enzim yang mengandung gugus heme yang dapat mengkatalisis suatu reaksi oksidasi dengan menggunakan hidrogen peroksida sebagai akseptor elektron (<http://www.worthington-biochem.com/HPO/default.html>). Enzim ini umumnya terdapat dalam sel hewan dan tumbuhan. Pada tumbuhan, peroksidase yang paling sering ditemukan adalah yang berasal dari akar tanaman *Horseradish* sehingga sering disebut sebagai *Horseradish*-Peroksidase (HRP).

Reaksi oksidasi senyawa fenolik yang dikatalisa oleh peroksidase akan membentuk suatu radikal fenoksi. Radikal fenoksi ini mampu melakukan resonansi pada cincin aromatiknya dan selanjutnya akan bergabung dengan radikal fenoksi lainnya membentuk dimer senyawa fenolik. Produk dimer yang dihasilkan telah diteliti memiliki aktivitas sebagai antioksidan (Elvi, 2010), alelopati (Anita, 2004), dan antimikroba (Wulandari, 2005).

1.2 Perumusan Masalah

Yuda pada tahun 2006, menggunakan peroksidase hasil isolasi dari brokoli sebagai katalis reaksi oksidasi kopling isoeugenol untuk membentuk produk dimernya. Lindiyah pada tahun 2008 dan Elvi pada awal tahun 2010, melakukan percobaan yang sama, namun peroksidase yang digunakan berasal dari tanaman *Horseradish*. Pada penelitian ini, akan digunakan peroksidase yang diisolasi dari tanaman lobak putih (*Raphanus sativus* L.) yang masih termasuk dalam famili *Brassicaceae*. Tanaman ini dipilih karena diduga mengandung peroksidase yang cukup potensial dan relatif mudah diperoleh walaupun di negara yang beriklim tropis seperti Indonesia.

Pada penelitian terdahulu, metode yang digunakan oleh Lindiyah (2008) untuk pembentukan dimer isoeugenol adalah dengan mencampurkan semua pereaksi ke dalam reaktor tanpa memperhatikan kenaikan suhu yang terjadi. Penelitian tersebut kemudian dilanjutkan oleh Elvi (2010) dengan melakukan pengaturan suhu untuk optimasi reaksi, dan sebagai substratnya digunakan senyawa isoeugenol dalam bentuk campuran antara cis-isoeugenol dan trans-isoeugenol yang tidak diketahui konsentrasinya.

Pada penelitian ini akan digunakan senyawa isoeugenol yang mengandung cis-isoeugenol dan trans-isoeugenol dengan kadar tertentu yang telah diketahui. Hal ini dilakukan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap reaksi oksidasi kopling dan produk yang terbentuk. Selain itu, pada penelitian ini juga dilakukan optimasi kondisi terhadap variasi jumlah substrat dan pH reaksi oksidasi kopling senyawa tersebut.

1.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk

- a. Mengetahui aktivitas spesifik peroksidase hasil isolasi dari *Raphanus sativus* L.
- b. Mengetahui terjadinya reaksi oksidasi kopling cis-isoeugenol dan trans-isoeugenol dengan katalis peroksidase hasil isolasi dari *Raphanus sativus* L. secara kualitatif.
- c. Mengidentifikasi produk reaksi oksidasi kopling yang terbentuk.

1.4 Hipotesis

Peroksidase yang diisolasi dari tanaman lobak putih dapat mengkatalisis reaksi oksidasi kopling isoeugenol. Produk yang terbentuk merupakan dimer isoeugenol dengan penggabungan 8-5'.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klasifikasi Lobak (*Raphanus sativus L.*)

Lobak (*Raphanus sativus L.*) merupakan sayuran berumbi yang berasal dari Cina dan Jepang, tetapi telah banyak dibudidayakan di Indonesia (Astuti, 2007). Tanaman lobak memiliki tinggi ± 1 m. Daunnya tunggal, lonjong, bergerigi, ujung dan pangkal romping, pertulangan menyirip, berbulu, tangkai pipih, dan berwarna hijau. Bunganya merupakan bunga majemuk, berbentuk tandan, berada di ujung batang, memiliki tangkai bulat dengan panjang 0,75-2 cm, kelopak bunga bulat dengan panjang 6-10 mm dan berwarna hijau, benang sari memiliki panjang 13-22 mm berwarna kuning kehijauan, kepala sari berbentuk silindris berwarna kuning, dan mahkota bunganya berbentuk lonjong dan berwarna putih (http://opensource.telkomspeedy.com/repo/abba/v12/artikel/ttg_tanaman_obat/depkes/buku3/3-117.pdf).



Gambar 2.1. Bunga dari *Raphanus sativus* var. *hortensis* L.

[Sumber: [http://hanagoyomi-satellite.blog.so-](http://hanagoyomi-satellite.blog.so-net.ne.jp/upload/detail/E38380E382A4E382B3E383B3.jpg.html)

[net.ne.jp/upload/detail/E38380E382A4E382B3E383B3.jpg.html](http://hanagoyomi-satellite.blog.so-net.ne.jp/upload/detail/E38380E382A4E382B3E383B3.jpg.html)]

Lobak biasanya dimanfaatkan sebagai sayuran, tetapi di beberapa negara lobak dimanfaatkan sebagai obat tradisional (Shoeb, 2006). Terdapat tiga spesies lobak yang tumbuh di pulau Jawa, yaitu var. *hortensis*, var. *niger*, dan var. *radicula*. Lobak var. *hortensis* memiliki umbi yang berwarna putih dan berbentuk silinder. Lobak var. *niger* memiliki umbi yang berwarna hitam, sedangkan lobak var. *radicula* memiliki warna merah atau putih secara keseluruhan (Backer dan

Bakhuizen, 1968). Pada penelitian kali ini, jenis lobak yang akan digunakan adalah lobak var. *hortensis*.



Gambar 2.2. *Raphanus sativus* var. *hortensis* L.

Taksonomi tanaman lobak (<http://www.plantamor.com/index.php?plant=1074>):

Kingdom : *Plantae*
 Subkingdom : *Tracheobionta*
 Divisi : *Spermatophyta*
 Subdivisi : *Angiospermae*
 Kelas : *Dicotyledonae*
 Subkelas : *Diilleniidae*
 Ordo : *Capparales*
 Famili : *Brassicaceae*
 Genus : *Raphanus*
 Spesies : *Raphanus sativus* var. *hortensis* L.

2.2 Enzim

Enzim berasal dari bahasa Yunani, yaitu *enzyme* yang berarti *in yeast*. Hal ini diusulkan pertama kali oleh Kuhne pada tahun 1878. Enzim adalah katalis biologi yang berfungsi untuk mempercepat reaksi dengan cara menurunkan energi aktivasinya dan mengarahkan reaksi yang terjadi dalam sel hidup tanpa dirinya mengalami perubahan apapun (Hudiyono, 1998). Berdasarkan jumlah rantai polipeptida yang membentuknya, enzim dibagi menjadi enzim monomerik dan oligomer.

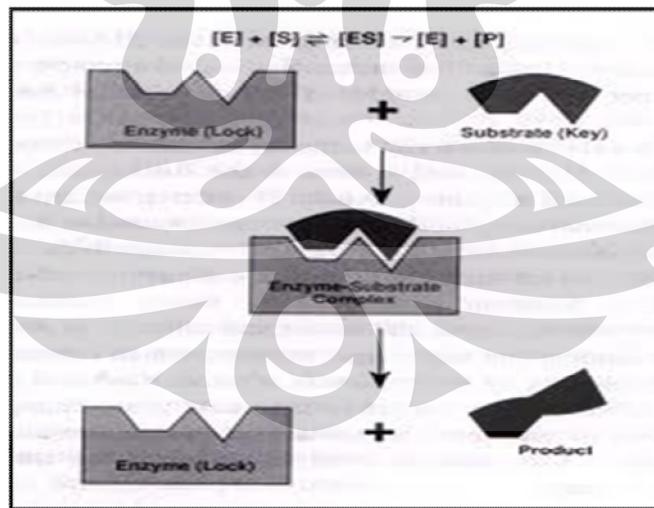
Sebagian besar enzim merupakan protein dengan kisaran berat molekul 12.000-1.000.000 Dalton (Lehninger, 2004). Dalam aktivitas katalitiknya,

Universitas Indonesia

beberapa enzim memerlukan komponen non-protein yang disebut sebagai kofaktor. Kofaktor ini dapat berupa molekul organik (koenzim) ataupun molekul anorganik, seperti ion logam.

Pada tahun 1948, Orgston mengemukakan bahwa adanya aktivitas stereospesifik dari enzim dapat diterangkan dengan, sedikitnya, ada tiga buah interaksi berbeda antara enzim dengan substrat. Molekul enzim memiliki sisi ikatan dan sisi katalitik yang dikenal sebagai sisi aktif atau pusat aktif enzim. 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. Sedangkan, sisi katalitik memungkinkan enzim untuk berikatan dengan gugus bereaksi (*reacting group*) dari molekul substrat. Hal ini menyebabkan enzim hanya dapat berikatan dengan substrat yang sesuai dan spesifik.

Pada akhir reaksi katalitiknya, 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. Reaksi secara keseluruhannya dapat digambarkan sebagai berikut:



Gambar 2.3 Interaksi enzim dengan substrat

[Sumber: http://suharjawanasuria.tripod.com/teknologi_pakan_enzyme.htm]

Dengan E = enzim, S = substrat, P = produk, dan ES = kompleks transisi enzim dengan substrat. Kerja enzim ini dipengaruhi oleh kondisi reaksi, seperti konsentrasi substrat, pH, temperatur, dan adanya inhibitor.

2.3 Sistem Klasifikasi Enzim

Menurut sistem *International Union of Biochemistry* (IUB), enzim diklasifikasikan menjadi enam kelas utama berdasarkan jenis reaksi yang dikatalisisnya (Murray *et al*, 2003). Enam kelas utama enzim antara lain (Koolman dan Klaus-Heinrich, 2005):

1. Oksidoreduktase, mengkatalisis reaksi perpindahan elektron antara dua sistem redoks
2. Transferase, mengkatalisis reaksi perpindahan atom atau gugus- gugus lainnya dari satu molekul ke molekul lainnya
3. Hidrolase, mengkatalisis reaksi hidrolisis
4. Liase, mengkatalisis reaksi penambahan gugus fungsi pada ikatan rangkap atau pembentukan ikatan rangkap dengan pelepasan gugus fungsi
5. Isomerase, mengkatalisis reaksi perpindahan posisi gugus-gugus di dalam satu molekul tanpa mengubah rumus kimia substrat (isomer)
6. Ligase, mengkatalisis reaksi pembentukan ikatan C-C, C-S, C-N, dan C-O yang diikuti dengan pemutusan isofosfat dari ATP

Class	Reaction type	Important subclasses
1 Oxidoreductases	<p>O = Reduction equivalent</p> <p>Ared + B_{ox} ⇌ A_{ox} + Bred</p>	Dehydrogenases Oxidases, peroxidases Reductases Monooxygenases Dioxygenases
2 Transferases	<p>A-B + C ⇌ A + B-C</p>	C ₁ -Transferases Glycosyltransferases Aminotransferases Phosphotransferases
3 Hydrolases	<p>A-B + H₂O ⇌ A-H + B-OH</p>	Esterases Glycosidases Peptidases Amidases
4 Lyases ("synthases")	<p>A + B ⇌ A-B</p>	C-C-Lyases C-O-Lyases C-N-Lyases C-S-Lyases
5 Isomerases	<p>A ⇌ Iso-A</p>	Epimerases cis trans Isomerases Intramolecular transferases
6 Ligases ("synthetases")	<p>A + B + XTP ⇌ A-B + XDP + Pi</p> <p>X = A, G, U, C</p>	C-C-Ligases C-O-Ligases C-N-Ligases C-S-Ligases

Gambar 2.4 Klasifikasi enzim

[Sumber: Koolman dan Klaus-Heinrich, 2005. *Color Atlas of Biochemistry*, 2nd ed.]

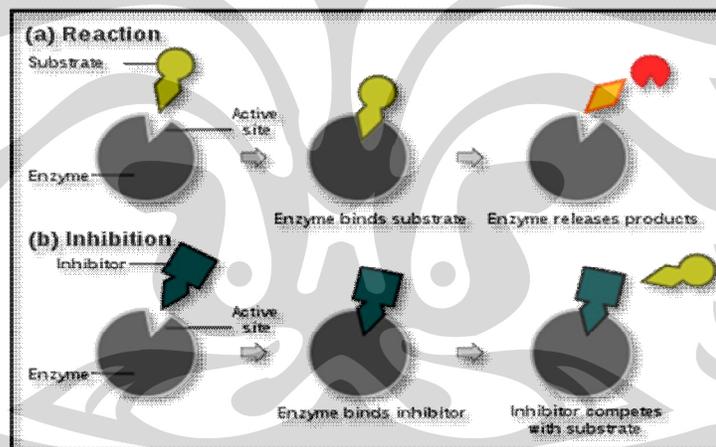
2.4 Aktivitas Enzim

Aktivitas suatu enzim dapat ditentukan secara kualitatif maupun kuantitatif. Aktivitas kualitatif ditentukan berdasarkan reaksi kimia yang terjadi, sedangkan aktivitas kuantitatif ditentukan dengan mengukur laju reaksi yang dikatalisis oleh enzim tersebut. Aktivitas kuantitatif ini, berhubungan dengan jumlah unit enzim yang mengkatalisis suatu reaksi.

Satu unit enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang mampu mengkatalisis 1 μmol substrat per menit pada kondisi tertentu. Bila kita telah mengetahui jumlah unit enzim pada suatu reaksi, selanjutnya kita juga dapat menentukan aktivitas spesifik dari enzim. Aktivitas spesifik enzim adalah banyaknya unit enzim yang terdapat dalam satu mg protein. Berdasarkan definisi ini, maka dapat dikatakan bahwa aktivitas spesifik enzim menunjukkan kemurnian

suatu enzim. Dengan demikian, semakin besar aktivitas spesifik suatu enzim maka kemurnian enzim tersebut semakin tinggi (Hudiyono, 1998).

Konsentrasi substrat, temperatur, pH, dan inhibitor merupakan faktor-faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas suatu enzim. Peningkatan temperatur dapat meningkatkan laju reaksi, akan tetapi struktur enzim yang merupakan protein memiliki batas temperatur yang memungkinkan struktur enzim tetap terjaga, hal ini disebut sebagai temperatur optimal enzim. Diatas temperatur optimum, struktur enzim akan terganggu atau bahkan terdenaturasi yang mengakibatkan aktivitasnya menurun. Demikian halnya dengan pH, enzim memiliki pH optimum, pH diatas maupun dibawah pH tersebut aktivitas enzim akan lebih rendah. Adanya inhibitor menyebabkan laju reaksi enzimatik cenderung menurun karena inhibitor dapat menyerang enzim maupun kofaktornya.



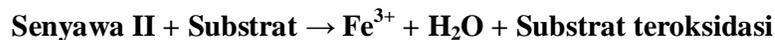
Gambar 2.5 Mekanisme kerja inhibitor

[Sumber: <http://www.sebelasduabelas.ipa.co.cc/>]

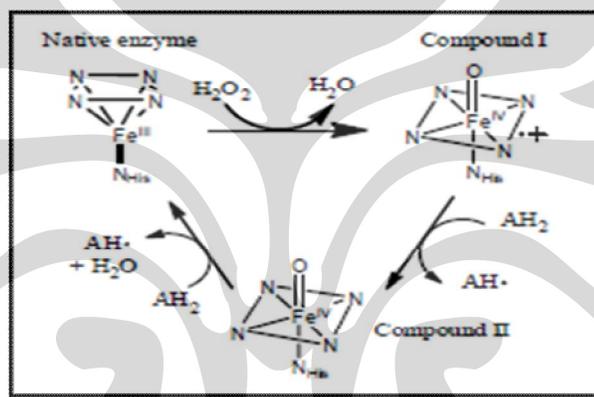
2.5 Peroksidase (I.U.B.: 1.11.1.7)

Peroksidase merupakan enzim yang mengandung gugus heme yang dapat mengkatalisis suatu reaksi oksidasi dengan menggunakan hidrogen peroksida sebagai akseptor elektron (<http://www.worthington-biochem.com/HPO/default.html>). Persamaan reaksi peroksidase dapat dituliskan sebagai berikut:

Universitas Indonesia



Reaksi ini diawali dengan pembentukan Senyawa I yang merupakan bentuk dari enzim yang teraktivasi/teroksidasi, sedangkan H_2O_2 akan tereduksi menjadi air. Selanjutnya, Senyawa I mengoksidasi substrat sehingga dihasilkan senyawa radikal dan seterusnya sehingga akan diperoleh kembali enzim seperti keadaan semula (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR000823>).



Gambar 2.6 Siklus katalitik peroksidase

[Sumber: Setala, 2008. *Regio- and stereoselectivity of oxidative coupling reactions of phenols*]

Reaksi yang terjadi antara peroksidase, H_2O_2 , dan substrat ini dapat diaplikasikan pada reaksi polimerisasi secara radikal dan reaksi kopling untuk membentuk senyawa polifenol (Huixian dan Taylor, 1994).

Peroksidase dapat ditemukan pada bakteri, jamur, tumbuhan, dan hewan. Pada tumbuhan, peroksidase dibagi menjadi 2 kelas (Takahama, 2004), yaitu:

- Peroksidase kelas I. Terdapat pada kloroplas, sitosol, dan peroksisom. Donor elektron peroksidase kelas ini adalah asam askorbat.
- Peroksidase kelas III. Terdapat pada vakuola dan apoplas. Donor elektron peroksidase kelas ini adalah senyawa-senyawa fenolik.

Fungsi peroksidase pada sel tumbuhan antara lain: pembentukan dinding sel (Passardi *et al*, 2004), mereduksi H_2O_2 yang berasal dari kloroplas dan sitosol, mengoksidasi senyawa beracun, mengoksidasi senyawa fenolik yang terdapat pada vakuola dan apoplas (Takahama, 2004), pembentukan lignan pada dinding sel sekunder (McDougall, 1991) dan lain sebagainya.

2.6 Teknik Pemisahan dan Pemurnian Enzim

2.6.1 Isolasi dan Ekstraksi Enzim

Isolasi enzim merupakan suatu proses pemisahan molekul enzim yang diinginkan dari molekul non-protein maupun protein lainnya (Dennison, 2002). Untuk dapat mengisolasi enzim, perlu dilakukan pemecahan dinding sel dari sel penghasil enzim tersebut. Oleh karena itu, diperlukan berbagai cara baik fisik maupun kimia, untuk memecahkan dinding sel dan mengekstrak enzim yang ada di dalamnya. Pemecahan dinding sel secara fisik dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- a. Kejut osmotik
- b. Alat *homogenizer*
- c. Sonikasi
- d. Pembekuan dan pencairan
- e. Agitasi dengan abrasi

Sedangkan, pemecahan dinding sel secara kimia dapat dilakukan dengan cara penambahan deterjen, enzim litik, dan alkali.

2.6.2 Sentrifugasi

Cara ini sering digunakan untuk memisahkan molekul-molekul enzim dari zat-zat yang lebih besar seperti sisa-sisa jaringan, sel-sel mati atau serpihan sel. Sentrifugasi sangat luas penggunaannya untuk memisahkan endapan atau material tidak larut dalam proses isolasi, seperti untuk memisahkan serpihan sel setelah homogenasi.

Pengaturan kecepatan putaran sentrifugasi harus diatur secara tepat agar dihasilkan pemisahan campuran protein yang optimal. Kecepatan putaran yang

rendah hanya akan mengendapkan molekul protein dengan berat molekul yang besar (Hudiyono, 1998).

2.6.3 Pemekatan/Fraksionasi

Pemekatan enzim dapat dilakukan dengan berbagai metode, antara lain dengan pengendapan, adsorpsi, ultrafiltrasi, penguapan, pembekuan (Saepudin dan Setiasih, 2009), dan *freeze drying* (Dennison, 2002). Metode pemekatan yang umum dilakukan adalah pengendapan dengan menggunakan garam amonium sulfat atau yang lebih dikenal dengan teknik *salting-out*.

Molekul-molekul dengan berat molekul yang besar, seperti protein, umumnya sukar larut dalam air karena kekuatan ionnya rendah. Penambahan garam pada konsentrasi rendah dapat melemahkan ikatan ionik intramolekular protein sehingga kelarutannya meningkat. Sedangkan penambahan garam pada konsentrasi tinggi dapat menyebabkan protein mengendap (*salting-out*). Hal ini terjadi karena pada konsentrasi garam yang tinggi, akan terjadi persaingan antara solvasi pelarut-molekul protein yang terlarut dengan molekul garam yang jauh lebih mudah larut (Dennison, 2002).

Efektivitas garam dalam proses *salting-out* tergantung dari valensi anion. Efektivitas relatif anion berdasarkan deret Hofmeister adalah sebagai berikut: sitrat > sulfat > fosfat > klorida > nitrat > tiosianat. Idealnya, garam yang digunakan pada proses pengendapan adalah garam yang memiliki anion polivalen dan kation univalen (Dennison, 2002). Garam yang paling umum digunakan pada proses ini adalah amonium sulfat. Garam ini sering dipilih karena memiliki beberapa keuntungan seperti, murah, mudah larut, '*self-cooling*' pada pelarutannya dalam air, dan kebanyakan enzim tidak rusak oleh adanya garam ini (Saepudin dan Setiasih, 2009).

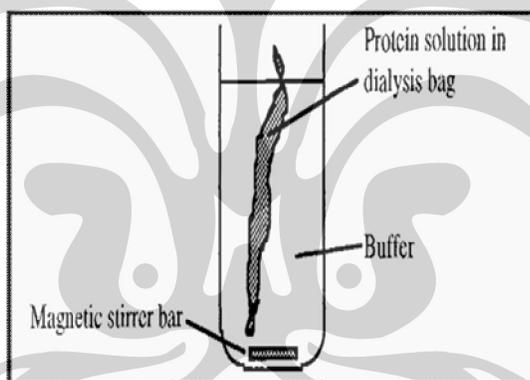
2.6.4 Dialisa

Metode pemekatan larutan dan dialisis mempunyai hubungan erat. Salah satu cara konvensional yang digunakan adalah memakai kantung dialisis untuk membuang molekul-molekul yang mempunyai berat molekul rendah yang tidak

dikehendaki dari sampel (Scopes, 1994). Metode ini didasarkan pada sifat membran semipermeabel yang mampu memisahkan protein dari buffer dialisa.

Dialisa digunakan untuk membuang zat terlarut dengan berat molekul rendah yang berlebihan dan secara simultan memasukkan larutan buffer yang baru ke dalam kantung sampel. Seluruh molekul yang memiliki berat molekul yang rendah akan berdifusi melewati pori-pori membran, sedangkan molekul yang ukurannya lebih besar dari 15.000-20.000 Dalton tidak dapat melewati tabung dialisa (Boyer, 2000). Proses ini akan terus berlangsung sampai komposisi buffer pada kedua sisi seimbang. Hal ini dapat dicapai dengan penggantian larutan buffer, sedikitnya, satu kali dan biasanya disertai dengan pengadukan untuk mempercepat proses tersebut (Scopes, 1994).

Membran dialisa yang digunakan biasanya terbuat dari *collodion*, selofan, dan selulosa. Pada studi kali ini, membran dialisa yang digunakan terbuat dari selofan.

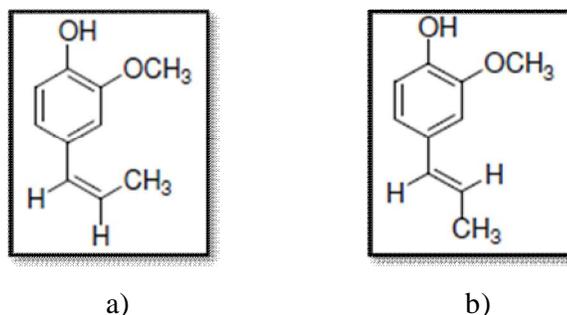


Gambar 2.7 Sistem dialisa

[Sumber: Dennison, 2002. *A Guide to Protein Isolation*]

2.7 Isoeugenol

Pada tanaman, isoeugenol berasal dari senyawa turunan fenilpropanoid (C_6C_3) dan merupakan isomer dari eugenol. Berikut ini struktur, sifat fisik, dan sifat kimia dari isoeugenol secara umum (<http://chemicaland21.com/specialtychem/perchem/97-54-1.gif>):



Gambar 2.8 Struktur a) cis-isoeugenol dan b) trans-isoeugenol

[Sumber: Elvi, 2010]

Nama trivial	: Isoeugenol
Nama IUPAC	: 4-propenil-2-metoksifenol
Rumus molekul	: $C_{10}H_{12}O_2$
Berat molekul	: 164,20
Penampilan fisik	: Cairan tidak berwarna hingga kekuningan
Titik leleh	: $-10^{\circ}C$
Titik didih	: $266-268^{\circ}C$
Titik nyala	: $112^{\circ}C$
Indeks bias	: 1,5760
Kelarutan	: Sedikit larut dalam air dan sangat larut dalam pelarut organik

Isoeugenol banyak digunakan pada minyak esensial dan sabun (Bergonzelli et al., 2003), *wine* (Cullere et al., 2004), kopi (Variyar et al., 2003), dan sebagai pemberi rasa, aroma, dan sebagai pengawet (Atsumi et al., 2005). Selain itu, isoeugenol dan senyawa dimernya juga memiliki aktivitas sebagai antioksidan (Elvi, 2010 dan Yuda, 2007).

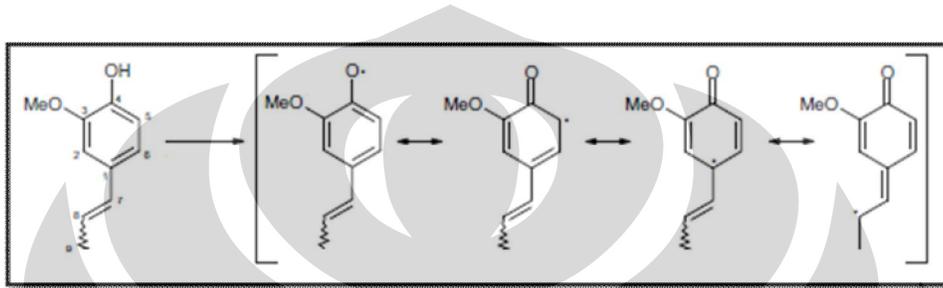
2.8 Reaksi Oksidasi Kopliling Senyawa Fenolik

Reaksi oksidasi kopliling senyawa fenolik adalah suatu reaksi penggabungan dua buah molekul fenolik atau lebih melalui reaksi oksidasi, membentuk ikatan C-C dan C-O (Setala, 2008). Reaksi ini dapat dikatalisa oleh enzim, seperti peroksidase dengan akseptor elektron H_2O_2 , menghasilkan suatu radikal fenoksi yang kemudian akan bergabung dengan senyawa lainnya yang

Universitas Indonesia

memiliki radikal dan membentuk senyawa dimer. Oleh karena itu, reaksi oksidasi kopling dapat terjadi secara inter- dan intra-molekular.

Aplikasi dari reaksi oksidasi kopling senyawa fenolik, salah satunya, diterapkan oleh Erdtman pada tahun 1933 yang menggunakan senyawa isoeugenol untuk reaksi pembentukan dimer melalui reaksi oksidasi kopling. Reaksi pembentukan radikal dari isoeugenol adalah sebagai berikut,

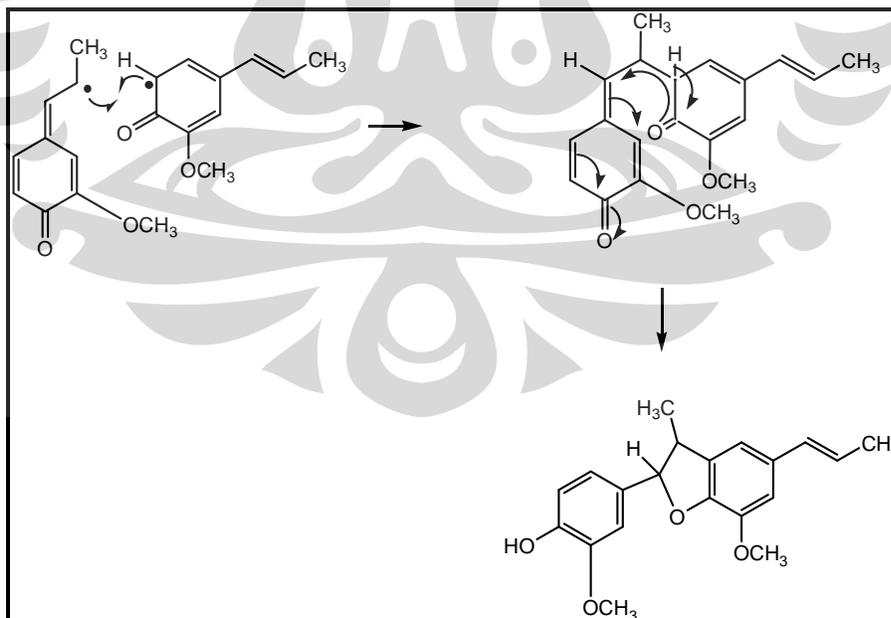


Gambar 2.9 Resonansi radikal isoeugenol

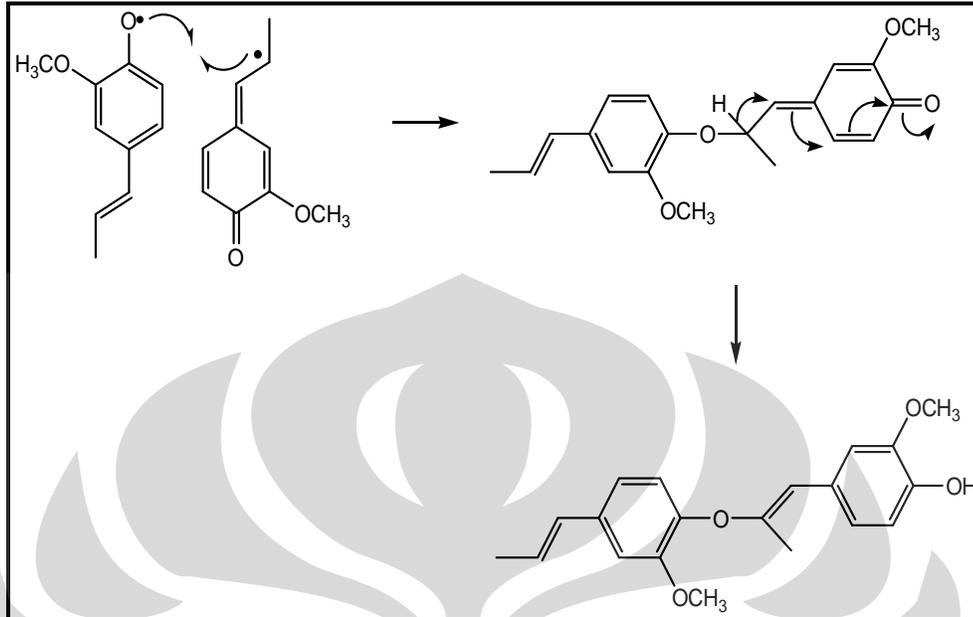
[Sumber: Setala, 2008]

Kemungkinan-kemungkinan struktur dimer yang terbentuk dari reaksi oksidasi kopling isoeugenol, antara lain:

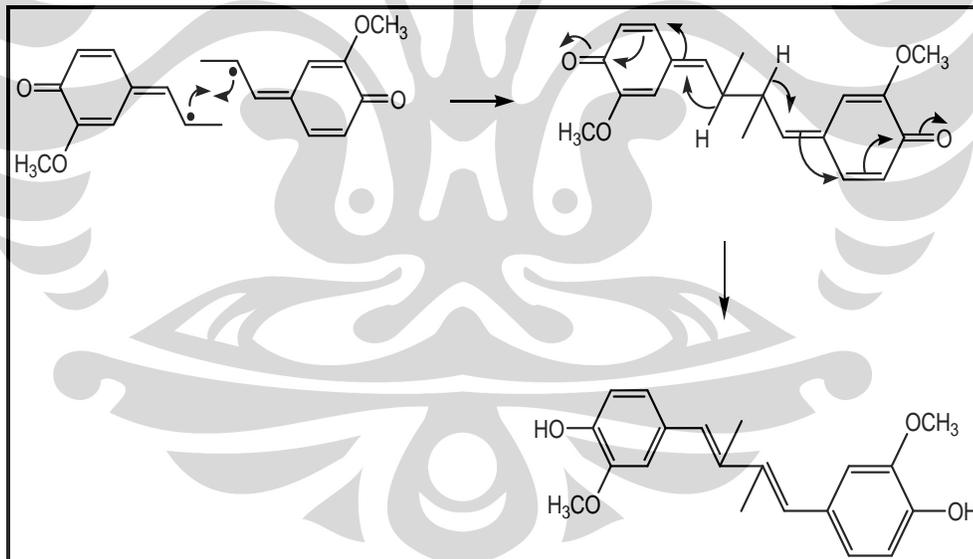
a. Penggabungan 8-5'



b. Penggabungan 8-O-4'



c. Penggabungan 8-8'



Gambar 2.10 Reaksi oksidasi kopling isoeugenol

[Sumber: Setala, 2008 dan Elvi, 2010]

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain: lobak putih, 4-aminoantipyrine, fenol, aquademin, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, H_2O_2 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, K-Na Tartarat, pereaksi Folin Ciocalteu, Na_2CO_3 , NaOH, Bovin Serum Albumin (BSA), buffer K-Fosfat, trans-isoeugenol 94%, cis-isoeugenol 78%, etil asetat, n-heksana, metanol, dan Na_2SO_4 anhidrat.

3.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: blender, kain kasa, alat-alat gelas laboratorium, lemari pendingin, pH meter, membran selofan, *ice salt bath*, kertas saring, lempeng KLT, pengaduk magnet dan *stirrer bar*, neraca analitik, spektrofotometer UV-Vis, *refrigerated micro sentrifuge* dan tabung sentrifuganya, FTIR, dan GC-MS.

3.3 Prosedur Kerja

3.3.1 Isolasi Enzim Ekstrak Kasar

Sebanyak 140 gram potongan lobak putih ditambahkan 200 mL larutan buffer K-fosfat 0,2 M pH 6,0 dalam keadaan dingin ($0-5^{\circ}\text{C}$), kemudian dihancurkan dengan menggunakan blender dan disaring dengan menggunakan kain kasa. Filtrat yang diperoleh disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit untuk memisahkan serpihan sel (*debris*) dari enzim ekstrak kasar. Supernatan, enzim ekstrak kasar, yang didapat ditentukan aktivitas peroksidanya kemudian difraksionasi secara bertahap dengan menggunakan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

3.3.2 Penentuan Aktivitas Spesifik Peroksidase

Pada penentuan aktivitas spesifik peroksidase, reagen-reagen yang digunakan, antara lain H_2O_2 1,7 mM dan 4-aminoantipyrine dalam fenol. Campuran akan mengalami perubahan warna dari bening menjadi merah, oleh

karena itu pengukuran dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada λ 510 nm. Cara pembuatan reagensinya (<http://www.worthington-biochem.com/HPO/default.html>), yaitu:

- a. H_2O_2 1,7 mM (larutan harus dibuat segar)

Sebanyak 1 mL larutan H_2O_2 30% dilarutkan dengan aquademin hingga volumenya 100 mL. Kemudian, 1 mL dari larutan ini dilarutkan dengan buffer K-fosfat 0,2 M pH 7,0 hingga volumenya 50 mL.

- b. Larutan 4-aminoantipyrine 2,5 mM dalam fenol 0,17 M

Sebanyak 810 mg fenol dilarutkan dalam 40 mL aquademin. Kemudian, sebanyak 25 mg 4-aminoantipyrine ditambahkan kedalam larutan tersebut. Campuran dilarutkan dengan aquademin hingga volumenya 50 mL.

Sebanyak 1,4 mL 4-aminoantipyrine/fenol dan 1,5 mL H_2O_2 1,7 mM dimasukkan ke dalam kuvet, kemudian ditambahkan 0,1 mL enzim. Larutan diukur kenaikan absorbansinya pada λ 510 nm selama 4-5 menit. Kemudian, aktivitas spesifik peroksidasinya dapat dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas spesifik (U/mg)} = \frac{\Delta A_{510}/\text{menit}}{6,58 \times \text{kadar protein (mg/mL)}} \quad (3.2)$$

Larutan blanko yang digunakan berisi campuran 1,4 mL 4-aminoantipyrine/fenol dan 1,5 mL H_2O_2 1,7 mM. Larutan enzim diganti dengan larutan buffer K-fosfat 0,2 M.

3.3.3 Penentuan Kadar Protein (Metode Lowry)

Reagen yang digunakan:

- a. Sebanyak 2 g Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N
- b. Sebanyak 0,25 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam 50 mL K-Na tartarat 1%
- c. Campuran 50 mL larutan A dan 1 mL larutan B (larutan harus dibuat segar)
- d. Pereaksi folin ciocalteu 1 N (1:1)

Sebanyak 0,1 mL enzim dicampurkan dengan 5 mL larutan C, kemudian diaduk dan didiamkan selama 10 menit. Selanjutnya, ke dalam campuran tadi ditambahkan 0,5 mL larutan D, diaduk kembali dan didiamkan selama 30 menit.

Absorbansi larutan diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ 700 nm.

Larutan standar yang digunakan adalah larutan BSA dengan variasi konsentrasi sebagai berikut: 0,0625; 0,125; 0,2; 0,25; 0,5; 0,75; 1 (mg/mL). Pada pengukuran blanko, larutan enzim diganti dengan larutan buffer K-fosfat 0,2 M.

3.3.4 Fraksionasi Dengan Menggunakan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Enzim ekstrak kasar yang telah ditentukan aktivitas peroksidasinya, difraksionasi melalui penambahan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dengan tingkat kejenuhan sebagai berikut: 0-30%, 30-60%, 60-90%. Penambahan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dilakukan sedikit demi sedikit dalam keadaan dingin ($0-5^\circ\text{C}$) sambil diaduk dengan pengaduk magnet (yang dilengkapi dengan *ice salt bath*). Hal ini dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi garam yang merata diseluruh bagian larutan. Pengadukan dilakukan selama 20 menit pada kecepatan yang rendah. Setelah itu, larutan didiamkan selama semalam di dalam lemari pendingin.

Endapan yang diperoleh dipisahkan dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit. Setiap endapan yang diperoleh diresuspensikan dalam buffer K-fosfat 0,2 M pH 6,0 dan ditentukan aktivitas peroksidasinya.

Jumlah $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang ditambahkan dalam 1 L larutan dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Scopes, 1994):

$$g = \frac{533 (S_2 - S_1)}{100 - 0,3 S_2} \quad (3.1)$$

Dengan S_1 = persen kejenuhan garam mula-mula dan S_2 = persen kejenuhan garam yang diinginkan.

3.3.5 Penentuan Aktivitas Spesifik Peroksidase dan Penentuan Kadar Protein dari Tiap Fraksi

Prosedur yang digunakan sama seperti pada penentuan aktivitas peroksidase dan kadar protein enzim ekstrak kasar (subbab 3.3.2 dan 3.3.3). Fraksi dengan persen kejenuhan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60-90% yang memiliki aktivitas peroksidase tertinggi selanjutnya dimurnikan dengan cara dialisis.

3.3.6 Dialisis

Sebelum digunakan untuk proses dialisis, membran selofan yang sudah dipotong sesuai dengan kebutuhan direndam dalam aquademin selama 2-3 jam untuk membersihkan gliserin yang ada pada membran. Setelah itu, membran direbus dengan air panas (70°C) selama 30 menit dan direndam dalam campuran larutan EDTA 0,001 M dengan Na_2CO_3 1% selama 1 jam. Membran ini selanjutnya dibilas dengan aquademin hingga bersih dan dipanaskan sampai 70°C .

Membran selofan sebaiknya disimpan dalam aquademin yang dicampur dengan beberapa tetes kloroform pada suhu 4°C (Boyer, 2000).

Proses dialisis:

Fraksi enzim dengan aktivitas peroksidase tertinggi, yaitu fraksi III (60-90%) dimasukkan ke dalam membran selofan, kemudian ujung membrannya diikat. Membran selofan yang telah berisi enzim dicelupkan ke dalam *beaker glass* yang berisi larutan buffer K-fosfat 0,01 M pH 6,0. Dialisis dilakukan selama 9 jam pada suhu dingin ($0-5^{\circ}\text{C}$). Selama proses dialisis, larutan buffer diganti setiap 2 jam dan dilakukan pengadukan menggunakan pengaduk magnet dengan kecepatan yang paling rendah.

3.3.7 Penentuan Jumlah Substrat dan pH Reaksi Oksidasi Kopling Cis/trans-*isoeugenol*

- Variasi jumlah substrat yang digunakan antara lain 1:1; 1,5:1; 2:1; dan 2,5:1. Perbandingan ini merupakan perbandingan mol antara cis/trans-*isoeugenol* dengan H_2O_2 5%.

Ke dalam *beaker glass*, trans-*isoeugenol* yang sudah ditimbang dicampurkan dengan 3 mL metanol dan 27 mL larutan buffer K-fosfat 0,02 M. Campuran kemudian diaduk dengan pengaduk magnet selama 10 menit. Selanjutnya, sebanyak 1 mL peroksidase hasil isolasi dan $32\ \mu\text{L}$ H_2O_2 5% dimasukkan ke dalam campuran tersebut kemudian diaduk kembali selama 10 menit. Seluruh perlakuan dilakukan pada suhu ruang. Hasil reaksi diamati secara kualitatif yang ditandai dengan terjadinya perubahan warna campuran reaksi menjadi kekuningan. Campuran reaksi

selanjutnya diekstrak menggunakan 10 mL etil asetat. Fasa etil asetatnya dipisahkan, kemudian diukur absorbansinya pada λ maksimum dan dilakukan uji KLT. Perlakuan untuk sampel cis-isoeugenol sama dengan perlakuan untuk sampel trans-isoeugenol.

- Variasi pH yang digunakan antara lain 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; dan 7,0.

Ke dalam *beaker glass*, trans-isoeugenol yang sudah ditimbang (dengan menggunakan perbandingan jumlah mol substrat 1,5:1) dicampurkan dengan 3 mL metanol dan 27 mL larutan buffer K-fosfat 0,02 M dengan variasi pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; dan 7,0. Campuran kemudian diaduk dengan pengaduk magnet selama 10 menit. Selanjutnya, sebanyak 1 mL peroksidase hasil isolasi dan 32 μ L H₂O₂ 5% dimasukkan ke dalam campuran tersebut kemudian diaduk kembali selama 10 menit. Seluruh perlakuan dilakukan pada suhu ruang. Hasil reaksi diamati secara kualitatif yang ditandai dengan terjadinya perubahan warna campuran reaksi menjadi kekuningan. Campuran reaksi selanjutnya diekstrak menggunakan 10 mL etil asetat. Fasa etil asetatnya dipisahkan, kemudian diukur absorbansinya pada λ maksimum dan dilakukan uji KLT. Perlakuan untuk sampel cis-isoeugenol sama dengan perlakuan untuk sampel trans-isoeugenol.

3.3.8 Isolasi Hasil Reaksi Oksidasi Kopleng Cis/Trans-isoeugenol

Trans-isoeugenol (dengan perbandingan jumlah mol substrat 1,5:1) dicampurkan dengan 15 mL metanol dan 135 mL larutan buffer K-fosfat 0,02 M pH 5,0. Campuran tersebut diaduk dengan menggunakan pengaduk magnet selama 10 menit. Selanjutnya, ke dalam campuran tersebut ditambahkan 1 mL peroksidase hasil isolasi dan 160 μ L H₂O₂ 5% kemudian diaduk kembali selama 10 menit. Seluruh perlakuan dilakukan pada suhu ruang. Hasil reaksi diamati secara kualitatif yang ditandai dengan terjadinya perubahan warna campuran reaksi dari bening menjadi kekuningan.

Campuran reaksi selanjutnya diekstrak dengan menggunakan larutan etil asetat. Fasa etil asetat yang didapat dipisahkan dari fasa air dan sisa air yang

masih ada dihilangkan dengan cara menambahkan Na_2SO_4 anhidrat. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan cara menguapkan pelarutnya.

Untuk sampel cis-isoeugenol, tahapan yang dilakukan sama saja, yang membedakan adalah larutan buffer yang digunakan adalah buffer K-fosfat pH 6,0.

3.3.9 Uji KLT Dan Pemisahan Komponen Pada Ekstrak

Uji KLT dilakukan dengan cara menotolkan ekstrak ke lempeng KLT. Lempeng KLT kemudian dimasukkan ke dalam bejana yang berisi larutan pengembang. Larutan pengembang yang dipakai merupakan campuran larutan n-heksana : etil asetat (4:1). Hasil uji KLT digunakan untuk mengetahui banyaknya komponen yang terdapat dalam senyawa hasil reaksi.

Pemisahan komponen hasil reaksi dilakukan dengan metode KLT preparatif, lalu spot utama yang terbentuk dikerok. Silika gel yang didapat dikumpulkan, dilarutkan dengan etil asetat, dan disaring. Hasil yang didapat kemudian dianalisa dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FTIR dan GC-MS.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi Enzim Ekstrak Kasar

Pada penelitian ini, tanaman yang digunakan sebagai sumber peroksidase adalah *Raphanus sativus* L. (lobak putih). Tanaman ini dipilih karena masih berkerabat dekat dengan tanaman *Horseradish* (famili *Brassicaceae*) yang merupakan penghasil utama peroksidase yang beredar di pasaran (Aruna dan Lali, 2001).

Bagian tanaman lobak yang digunakan sebagai sumber peroksidase adalah bagian akar/umbi yang masih muda. Hal ini didasarkan pada penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa aktivitas peroksidase mempunyai peranan penting dalam inisiasi pertumbuhan akar (Fekete, 2008). Penggunaan jaringan yang masih muda dapat membantu mempercepat proses pemecahan sel sehingga pengaruh oksidasi oksigen dan pemanasan yang dapat menurunkan aktivitas enzim dapat dikurangi.

Tahap pertama yang dilakukan pada isolasi enzim ekstrak kasar adalah menghancurkan potongan lobak yang ditambahkan larutan buffer K-fosfat 0,2 M pH 6,0 dingin, dengan menggunakan blender. Hal ini dilakukan untuk memecah dinding sel lobak dan mengekstrak peroksidase yang ada di dalamnya. Penggunaan larutan buffer K-fosfat 0,2 M pH 6,0 dalam keadaan dingin dimaksudkan untuk mencegah terjadinya degradasi proteolitik. Homogenat yang diperoleh disaring dan disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm pada suhu 4⁰C selama 20 menit. Supernatan (Gambar 4.1) yang diperoleh disebut sebagai enzim ekstrak kasar.



Gambar 4.1 Enzim ekstrak kasar

4.2 Fraksinasi Menggunakan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Pemekatan enzim ekstrak kasar dilakukan dengan cara fraksinasi menggunakan garam $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Garam ini dipilih karena memiliki beberapa keuntungan, yaitu sangat mudah larut, murah, dapat mencegah pertumbuhan bakteri, dan yang terpenting adalah kebanyakan enzim tidak rusak oleh adanya garam ini. Selain untuk memekatkan enzim yang terdapat dalam enzim ekstrak kasar, fraksinasi menggunakan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dengan persen kejenuhan tertentu juga bertujuan untuk memisahkan dan mengendapkan enzim berdasarkan berat molekulnya. Protein enzim dengan berat molekul yang lebih besar akan terendapkan lebih dahulu, yang kemudian akan diikuti oleh protein enzim dengan berat molekul yang lebih rendah pada fraksi-fraksi berikutnya. Pada tahap ini, protein-protein yang memiliki aktivitas peroksidase diharapkan dapat terpisahkan dan terkumpul dalam suatu fraksi yang memiliki berat molekul sama maupun mendekati sama.

Setelah proses penambahan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, larutan enzim disimpan di dalam lemari pendingin selama semalam. Endapan yang diperoleh dipisahkan dengan cara sentrifugasi (8.000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit). Endapan tiap fraksi yang didapat diresuspensikan menggunakan larutan buffer K-fosfat 0,2 M pH 6,0 (seperti yang terlihat pada Gambar 4.2 b).

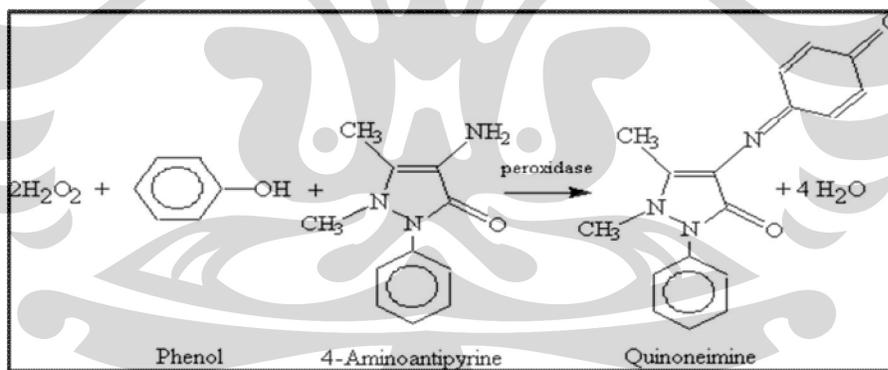


a)

b)

Gambar 4.2 a) Endapan hasil fraksionasi dan b) Hasil fraksionasi menggunakan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Ketiga fraksi yang didapat kemudian diuji aktivitas peroksidasinya dengan menggunakan H_2O_2 1,7 mM dan 4-aminoantipyrine/fenol yang akan menghasilkan perubahan warna dari bening menjadi merah. Hal ini diakibatkan oleh terbentuknya senyawa quinoneimine.



Gambar 4.3 Reaksi pembentukan quinoneimine

[Sumber: <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enzyme/images/practi24.gif>]

Hasil pengukuran menunjukkan bahwa fraksi III (60-90%) memiliki aktivitas peroksidase tertinggi dengan nilai aktivitas spesifik sebesar 14,7434 U/mg protein atau dengan tingkat kemurnian sebesar 10,5 kali dibandingkan dengan aktivitas spesifik enzim ekstrak kasar seperti yang terlihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Aktivitas spesifik peroksidase pada berbagai tingkat kejenuhan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Tahap	Sampel	Kadar protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Tingkat kemurnian
Ekstraksi	Ekstrak kasar	1,0805	1,3995	1
Fraksionasi dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Fraksi I (0-30%)	5,46775	0,7737	0,6
	Fraksi II (30-60%)	4,86925	5,9065	4,2
	Fraksi III (60-90%)	1,627	14,7434	10,5
	90% supernatan	0,61575	1,7385	1,2

Kadar protein setiap fraksi ditentukan dengan menggunakan metode Lowry. Pengukuran ini didasarkan pada pembentukan warna biru pada larutan uji. Warna biru ini terjadi akibat adanya reaksi antara gugus-gugus aromatik yang terkandung dalam protein, seperti tirosin dan triptofan, dengan campuran pereaksi CuSO_4 dengan Folin Ciocalteu. Larutan standar yang digunakan adalah larutan BSA (Bovine Serum Albumin) dengan berbagai konsentrasi. Dengan mengalurkan nilai absorbansi pada λ 700 nm dengan konsentrasi larutan standar, maka akan diperoleh kurva larutan standar yang dapat dilihat pada lampiran.

4.3 Dialisis

Proses dialisa diawali dengan preparasi membran selofan sebagai tempat dialisat. Membran selofan yang telah dipotong sesuai kebutuhan, direndam dalam aquademin selama 2-3 jam untuk menghilangkan gliserin yang ada. Kemudian direbus dengan air panas (70°C) dan direndam dalam larutan EDTA untuk membuka pori dan menghilangkan ion-ion logam yang dapat mengganggu proses dialisa. Membran dibilas kembali dengan aquademin untuk menghilangkan sisa larutan EDTA. Membran yang telah dipreparasi sebaiknya tidak dipegang menggunakan tangan terbuka untuk menghindari terkontaminasinya membran oleh protease.

Membran selofan yang siap digunakan, diisi dengan fraksi enzim yang memiliki nilai aktivitas spesifik peroksidase tertinggi, yaitu fraksi III (60-90%).

Selanjutnya, membran tersebut dimasukkan ke dalam sistem dialisis seperti yang terlihat pada Gambar 4.4 a). Proses dialisis dilakukan dengan menggunakan pengaduk magnet dan dalam keadaan dingin. Hal ini bertujuan untuk mempercepat proses difusi garam dan mencegah terjadinya degradasi proteolitik selama proses dialisis.



a)

b)

Gambar 4.4 a) Sistem dialisis yang digunakan dan b) Larutan enzim hasil dialisis

Setelah didialisis, larutan enzim yang diperoleh diuji kembali aktivitas peroksidasinya. Dari hasil pengujian didapat data aktivitas spesifik sebesar 33,3063 U/mg protein dengan tingkat kemurnian sebesar 23,8 kali dibandingkan dengan aktivitas spesifik enzim ekstrak kasar.

Pada Tabel 4.2 dapat dilihat bahwa langkah pemurnian peroksidase dari *Raphanus sativus* L. melalui fraksinasi menggunakan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang dilanjutkan dengan dialisis mampu meningkatkan aktivitas spesifik dan tingkat kemurnian enzim.

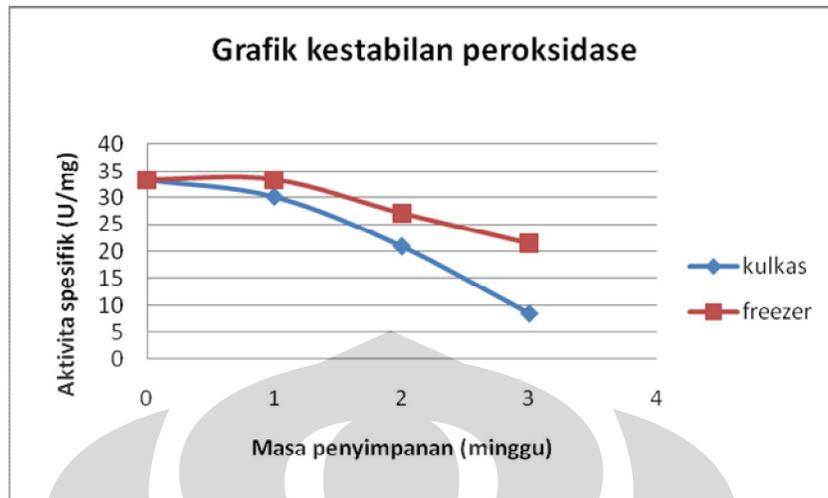
Tabel 4.2 Tahapan pemurnian enzim peroksidase dari *Raphanus sativus* L.

Tahap	Kadar protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Tingkat kemurnian
Ekstraksi	1,0805	1,3995	1
Fraksionasi dengan (NH ₄) ₂ SO ₄ 60-90%	1,627	14,7434	10,5
Dialisis	1,60275	33,3063	23,8

Enzim hasil dialisis dapat langsung digunakan, jika tidak maka enzim tersebut dapat disimpan di dalam *freezer*. Selama masa penyimpanan tersebut, aktivitas spesifik enzim dapat mengalami penurunan. Oleh karena itu, perlu dilakukan uji kestabilan enzim. Pengujian ini dilakukan dengan cara menyimpan enzim di dalam lemari pendingin/kulkas dan *freezer*, kemudian aktivitas spesifiknya diuji secara berkala setiap 1 minggu.

Tabel 4.3 Data kestabilan peroksidase hasil isolasi

Masa penyimpanan (minggu)	Aktivitas spesifik (U/mg)	
	Lemari pendingin	Freezer
0	33,3063	33,3063
1	30,1656	33,3063
2	20,9701	27,0802
3	8,63473	21,5203



Gambar 4.5 Grafik kestabilan peroksidase

Dari data tersebut, terlihat bahwa penyimpanan enzim di dalam lemari pendingin/kulkas mengalami penurunan aktivitas spesifik yang cukup besar dibandingkan dengan penyimpanan di dalam *freezer*. Hal ini kemungkinan besar disebabkan oleh adanya aktivitas proteolitik dari mikroba yang tumbuh dalam larutan protein enzim.

4.4 Penentuan Jumlah Substrat dan pH Reaksi Oksidasi Kopleng

Pembentukan produk reaksi oksidasi kopleng cis/trans-iso Eugenol dengan bantuan peroksidase sebagai katalis, dipengaruhi oleh beberapa faktor lingkungan. Oleh karena itu, perlu dilakukan optimasi kondisi reaksi agar didapatkan produk yang optimal. Pada penelitian ini, optimasi kondisi reaksi lebih ditekankan pada penentuan jumlah substrat dan pH reaksi.

Senyawa trans-iso Eugenol dan cis-iso Eugenol yang digunakan berupa minyak kental berwarna kekuningan, keduanya memiliki aroma khas cengkeh. Jumlah cis/trans-iso Eugenol yang direaksikan merupakan perbandingan mol antara cis/trans-iso Eugenol dengan H_2O_2 5%. Variasi perbandingan mol ini didasarkan pada siklus katalitik peroksidase, dimana peroksidase yang teraktivasi oleh 1 mol H_2O_2 akan kembali ke bentuk peroksidase awal setelah bereaksi dengan 2 mol substrat. Oleh karena itu, variasi jumlah substrat yang digunakan, antara lain 1:1; 1,5:1; 2:1; dan 2,5:1 (Setala, 2008).

4.4.1 Trans-iso Eugenol

Trans-iso Eugenol yang telah ditimbang, dicampurkan dengan metanol dan larutan buffer K-fosfat 0,02 M dengan variasi pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; dan 7,0 kemudian diaduk selama 10 menit. Setelah ditambahkan peroksidase dan H_2O_2 5% , campuran reaksi mengalami perubahan warna dari bening menjadi kuning keruh. Campuran hasil reaksi kemudian diekstrak menggunakan etil asetat (lihat Gambar 4.6 b).



a)



b)

Gambar 4.6 a) Campuran reaksi setelah ditambahkan peroksidase/ H_2O_2 dan b) Hasil ekstraksi menggunakan etil asetat

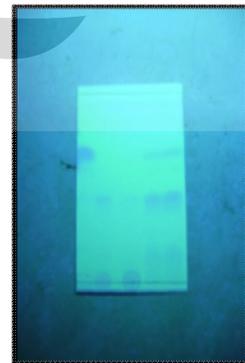
Fasa etil asetat yang didapat, kemudian dipisahkan untuk diukur absorbansinya dan dilakukan uji KLT. Hasil uji KLT senyawa hasil reaksi trans-iso Eugenol dapat dilihat pada Gambar 4.7.



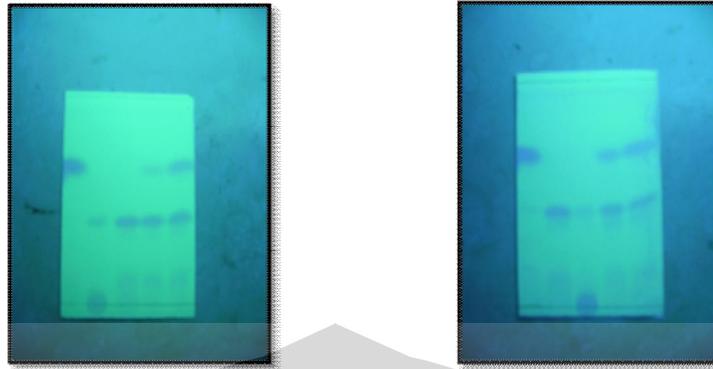
a)



b)



c)



d)

e)

Gambar 4.7** Hasil uji trans-isoeugenol KLT a) pH 3,0; b) pH 4,0; c) pH 5,0; d) pH 6,0; dan e) pH 7,0

**Keterangan: Urutan spot pada masing-masing lempeng KLT dari kiri ke kanan: kontrol (tanpa enzim), 1:1; 1,5:1; 2:1; dan 2,5:1.

Hasil uji KLT pada trans-isoeugenol menghasilkan 1 spot dengan nilai Rf sebesar 0,67. Hasil uji KLT pada pH 3,0 menunjukkan bahwa spot utama yang terbentuk mempunyai nilai Rf yang sama dengan nilai Rf trans-isoeugenol, yaitu 0,67. Spot dengan nilai Rf 0,13 dan 0,42 yang diduga sebagai senyawa hasil reaksi, terlihat sangat tipis. Hal ini diduga terjadi karena pada pH 3,0, aktivitas peroksidase hasil isolasi dari *Raphanus sativus* L. tidak optimal.

Pada pH 4,0, hasil uji KLT senyawa hasil reaksi dengan jumlah substrat 1:1 dan 1,5:1 menghasilkan 1 spot dengan nilai Rf 0,42. Sedangkan, pada jumlah substrat 2:1 dan 2,5:1 terbentuk 3 spot dengan nilai Rf 0,13; 0,42; dan 0,67. Hasil uji KLT pada pH 5,0 juga memberikan hasil yang sama. Spot utama yang diduga sebagai senyawa hasil reaksi adalah spot dengan nilai Rf 0,42, selebihnya dianggap sebagai produk samping.

Pada pH 6,0 dan 7,0, hasil uji KLT senyawa hasil reaksi dengan jumlah substrat 1:1 menghasilkan 1 spot dengan nilai Rf 0,42 dan pada jumlah substrat 1,5:1 terbentuk 2 spot dengan nilai Rf 0,13 dan 0,42. Sedangkan, pada jumlah substrat 2:1; dan 2,5:1 terbentuk 3 spot dengan nilai Rf 0,13; 0,42; dan 0,67. Sama seperti hasil uji KLT pada pH 4,0 dan 5,0, spot utama yang diduga sebagai senyawa hasil reaksi adalah spot dengan nilai Rf 0,42, selebihnya dianggap sebagai produk samping.

Sebelum dilakukan uji KLT, fasa etil asetat yang ada diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Tabel 4.4 menunjukkan hasil pengukuran yang didapat.

Tabel 4.4** Data absorbansi produk oksidasi kopling trans-isoegenol

Jumlah substrat	Absorbansi pada λ maksimum masing-masing spektrum				
	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0
1:1	3,392	3,765	3,785	3,552	3,506
1,5:1	3,697	3,906	3,906	3,678	3,506
2:1	3,445	3,661	3,630	3,603	3,455
2,5:1	3,375	3,564	3,576	3,576	3,409

**Keterangan : λ maksimum masing-masing spektrum dapat dilihat pada Lampiran 2.

Pada Tabel 4.4 terlihat bahwa nilai absorbansi maksimum terdapat pada perbandingan jumlah substrat trans-isoegenol 1,5:1 pada masing-masing pH kecuali pada pH 7,0. Dengan perbandingan jumlah substrat tersebut, maka nilai absorbansi tertinggi terdapat pada pH 4,0 dan 5,0 dengan nilai absorbansi sebesar 3,906 seperti yang terlihat pada Gambar 4.10.

4.4.2 Cis-isoegenol

Cis-isoegenol yang telah ditimbang, dicampurkan dengan metanol dan larutan buffer K-fosfat 0,02 M dengan variasi pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; dan 7,0 kemudian diaduk selama 10 menit. Setelah ditambahkan peroksidase dan H₂O₂ 5% , campuran reaksi mengalami perubahan warna dari bening menjadi kuning keruh. Campuran hasil reaksi kemudian diekstrak menggunakan etil asetat seperti yang terlihat pada Gambar 4.8 b).



a)

b)

Gambar 4.8 a) Campuran reaksi setelah ditambahkan peroksidase/H₂O₂, b) Hasil ekstraksi menggunakan etil asetat

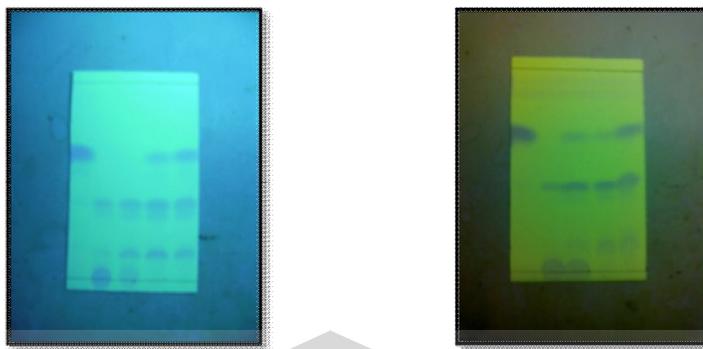
Fasa etil asetat yang didapat, kemudian dipisahkan untuk diukur absorbansinya dan dilakukan uji KLT. Hasil uji KLT senyawa hasil reaksi *cis*-isoeugenol dapat dilihat pada Gambar 4.9.



a)

b)

c)



d)

e)

Gambar 4.9** Hasil uji cis-isoeugenol KLT a) pH 3,0; b) pH 4,0; c) pH 5,0; d) pH 6,0; dan e) pH 7,0

**Keterangan: Urutan spot pada masing-masing KLT dari kiri ke kanan: kontrol (tanpa enzim), 1:1; 1,5:1; 2:1; dan 2,5:1.

Hasil uji KLT pada cis-isoeugenol menghasilkan 1 spot dengan nilai Rf sebesar 0,67. Hasil uji KLT pada pH 3,0 menunjukkan bahwa spot utama yang terbentuk mempunyai nilai Rf yang sama dengan nilai Rf cis-isoeugenol, yaitu 0,67. Spot dengan nilai Rf 0,13 dan 0,42 yang diduga sebagai senyawa hasil reaksi, terlihat sangat tipis. Hal ini diduga terjadi karena, pada pH 3,0 aktivitas peroksidase hasil isolasi dari *Raphanus sativus* L. tidak optimal.

Hasil uji KLT pada pH 4,0 dan 6,0 untuk senyawa hasil reaksi dengan jumlah substrat 1:1 dan 1,5: 1 menghasilkan 2 spot dengan nilai Rf 0,13 dan 0,42. Sedangkan, pada jumlah substrat 2:1 dan 2,5:1 terbentuk 3 spot dengan nilai Rf 0,13; 0,42; dan 0,67. Spot utama yang diduga sebagai senyawa hasil reaksi adalah spot dengan nilai Rf 0,42, selebihnya dianggap sebagai produk samping.

Hasil uji KLT pada pH 5,0 dan 7,0 untuk senyawa hasil reaksi dengan jumlah substrat 1:1 menghasilkan 2 spot dengan nilai Rf 0,13 dan 0,42. Sedangkan, pada jumlah substrat 1,5:1; 2:1; dan 2,5:1 terbentuk 3 spot dengan nilai Rf 0,13; 0,42; dan 0,67. Spot utama yang diduga sebagai senyawa hasil reaksi adalah spot dengan nilai Rf 0,42, selebihnya dianggap sebagai produk samping.

Sebelum dilakukan uji KLT, fasa etil asetat yang ada diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Tabel 4.5 menunjukkan hasil pengukuran yang didapat.

Tabel 4.5** Data absorbansi produk oksidasi kopleng cis-isoegenol

Jumlah substrat	Absorbansi pada λ maksimum masing-masing spektrum				
	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0
1:1	3,339	3,692	3,630	3,603	3,659
1,5:1	3,445	3,528	3,808	3,826	3,765
2:1	3,344	3,576	3,576	3,728	3,485
2,5:1	3,334	3,445	3,485	3,465	3,455

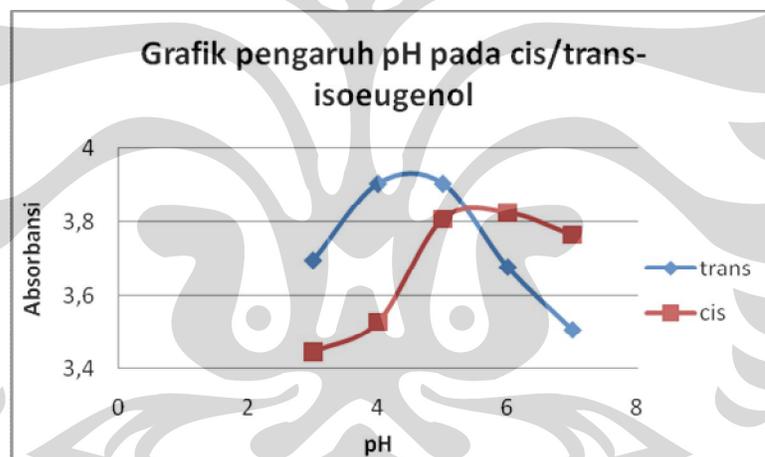
**Keterangan : λ maksimum masing-masing spektrum dapat dilihat pada Lampiran 2.

Pada Tabel 4.5 terlihat bahwa perbandingan jumlah substrat cis-isoegenol yang memberikan absorbansi maksimum diperoleh pada perbandingan 1,5: 1, kecuali pada pH 4,0. Nilai absorbansi tertinggi terdapat pada pH 6,0 dengan perbandingan jumlah substrat 1,5:1 seperti yang terlihat pada Gambar 4.10.

Pada perbandingan jumlah substrat melebihi 1,5:1, nilai absorbansi produk oksidasi kopleng trans-isoegenol maupun cis-isoegenol cenderung mengalami penurunan. Dari data ini, maka diketahui bahwa aktivitas enzim dipengaruhi oleh jumlah substratnya. Hal ini dikarenakan oleh adanya batas tertentu konsentrasi substrat yang dapat bereaksi dengan enzim membentuk kompleks enzim-substrat. Jika konsentrasi substrat cukup besar, maka enzim akan menjadi jenuh dan segera membentuk kompleks enzim-substrat. Pada kondisi ini, tidak ada enzim bebas dan konsentrasi kompleks enzim-substrat sebanding dengan konsentrasi enzim mula-mula, sehingga peningkatan susbtrat tidak akan meningkatkan laju reaksi.

Tabel 4.6 Data absorbansi produk oksidasi kopling trans-isoegenol dan cis-isoegenol dengan perbandingan jumlah mol substrat cis/trans-isoegenol : H₂O₂ 5% (1,5 : 1)

pH	Trans-isoegenol		Cis-isoegenol	
	λ maksimum	Absorbansi	λ maksimum	Absorbansi
3,0	317	3,697	305	3,445
4,0	305	3,906	304	3,528
5,0	305	3,906	305	3,808
6,0	305	3,678	305	3,826
7,0	306	3,506	307	3,765



Gambar 4.10 Grafik pengaruh pH pada perbandingan jumlah substrat cis/trans-isoegenol : H₂O₂ 5% = 1,5:1 (mol)

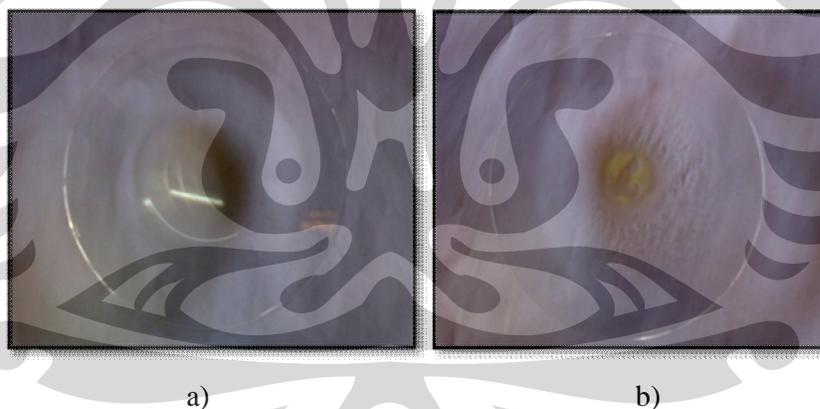
Dari Gambar 4.10 dapat dilihat bahwa pada perbandingan jumlah substrat trans-isoegenol 1,5:1, nilai absorbansi mengalami kenaikan dimulai pada pH 3,0 dan mencapai puncaknya pada pH 4,0 dan 5,0. Sedangkan untuk substrat cis-isoegenol, absorbansi mengalami kenaikan dimulai pada pH 3,0 dan mencapai puncaknya pada pH 6,0. Pertambahan pH berikutnya, baik pada substrat cis-isoegenol maupun trans-isoegenol, tidak lagi menyebabkan kenaikan absorbansi, tetapi menyebabkan penurunan.

Pada pH 4,0 dan 5,0, absorbansi produk reaksi trans-isoegenol mencapai puncaknya. Hal ini disebabkan karena pada pH 5,0, bentuk konformasi pusat aktif enzim lebih cocok untuk substrat trans-isoegenol dibandingkan dengan cis-isoegenol. Hal serupa juga terjadi pada pH 6,0, dimana absorbansi produk reaksi cis-isoegenol mencapai puncaknya dan absorbansi produk reaksi trans-isoegenol mengalami penurunan.

4.5 Isolasi Hasil Reaksi Oksidasi Kopling Cis/Trans-isoegenol

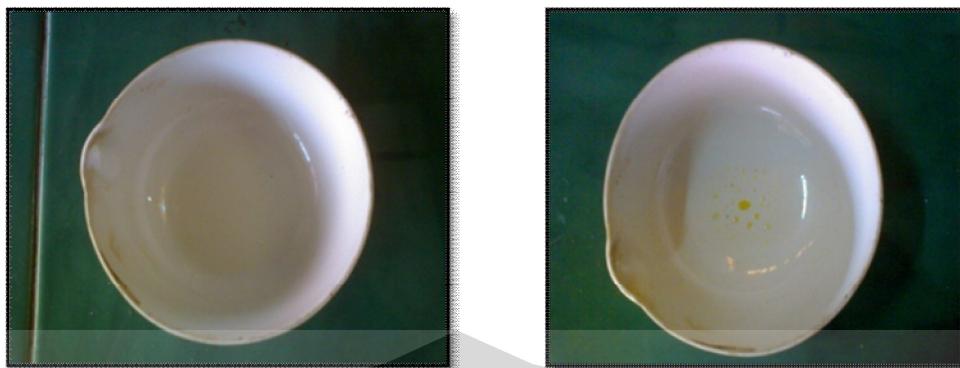
Berdasarkan data absorbansi maksimum yang didapat, maka dilakukan pengulangan reaksi dalam skala yang lebih besar dengan tujuan mengisolasi senyawa hasil reaksi sehingga dapat digunakan untuk analisa dengan menggunakan instrumen.

Hasil reaksi yang diperoleh, diekstrak menggunakan etil asetat kemudian dipisahkan dengan cara menguapkan pelarutnya. Hasil yang diperoleh dari reaksi oksidasi kopling trans-isoegenol berupa minyak kuning kental seberat 0,20 g.



Gambar 4.11 a) Ekstrak etil asetat hasil reaksi trans-isoegenol dan b) ekstrak etil asetat yang telah diuapkan pelarutnya

Sedangkan, hasil yang diperoleh dari reaksi oksidasi kopling cis-isoegenol adalah berupa minyak kuning kental seberat 0,13 g seperti yang terlihat pada Gambar 4.12.



a)

b)

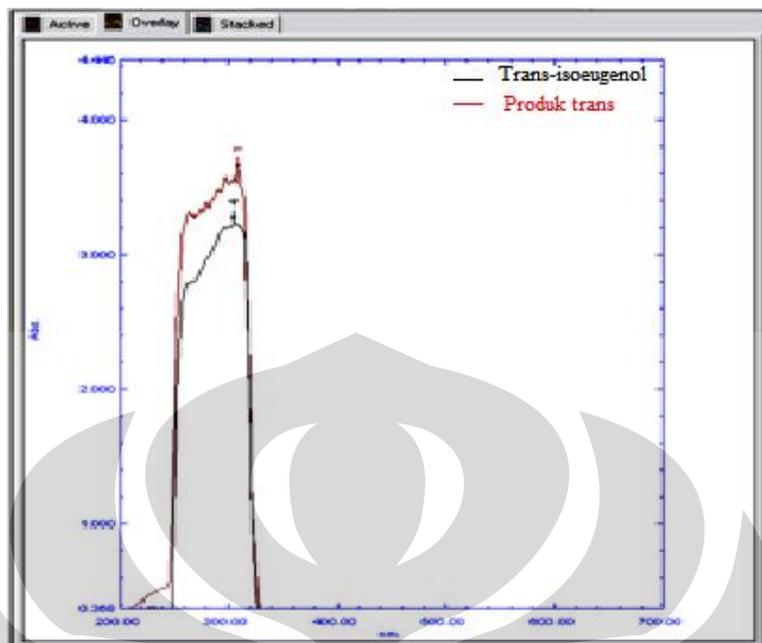
Gambar 4.12 a) Ekstrak etil asetat hasil reaksi cis-isoeugenol dan b) ekstrak etil asetat yang telah diuapkan pelarutnya

Selanjutnya, untuk memisahkan senyawa-senyawa hasil reaksi maka perlu dilakukan KLT preparatif dengan menggunakan lempeng KLT yang berukuran 4X7 cm. Minyak kental kuning yang didapat, ditotolkan ke lempeng KLT dan dielusikan dengan larutan pengembang n-heksana : etil asetat = 4 : 1. Setelah dielus sampai semuanya terurai dengan baik, spot yang diduga sebagai produk kemudian dikerok dan dilarutkan dengan etil asetat. Selanjutnya, produk tampungan disaring untuk memisahkan silika yang berasal dari lempeng KLT dengan senyawa hasil reaksi. Setelah disaring, filtrat dipekatkan dengan cara menguapkan pelarutnya. Hasil KLT preparatif dari produk reaksi oksidasi kopling trans-isoeugenol yang didapat merupakan minyak kuning kental seberat 0,0735 g, sedangkan untuk cis-isoeugenol diperoleh minyak kuning kental seberat 0,0402 g. Untuk mengidentifikasi senyawa hasil reaksi yang terbentuk, diperlukan analisa menggunakan instrumen UV-Vis, FTIR, dan GC-MS.

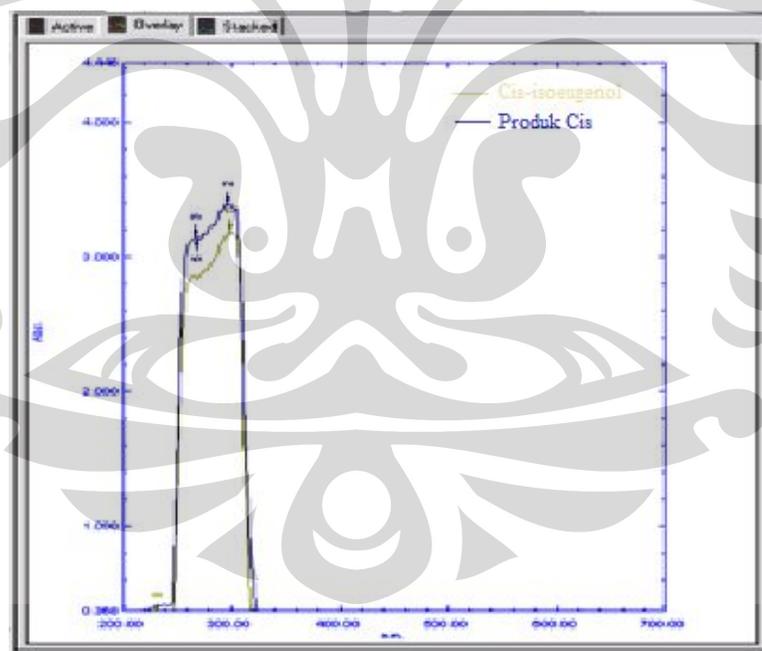
4.6 Analisa Senyawa Hasil Reaksi Dengan Instrumen

4.6.1 Analisa Dengan Spektrofotometer UV-Vis

Senyawa hasil reaksi yang didapat, diidentifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis dan dibandingkan dengan spektra cis/trans-isoeugenol. Berikut ini gambar spektra untuk UV-Vis untuk senyawa trans-isoeugenol, cis-isoeugenol, dan senyawa hasil reaksi dari masing-masing senyawa.



a)



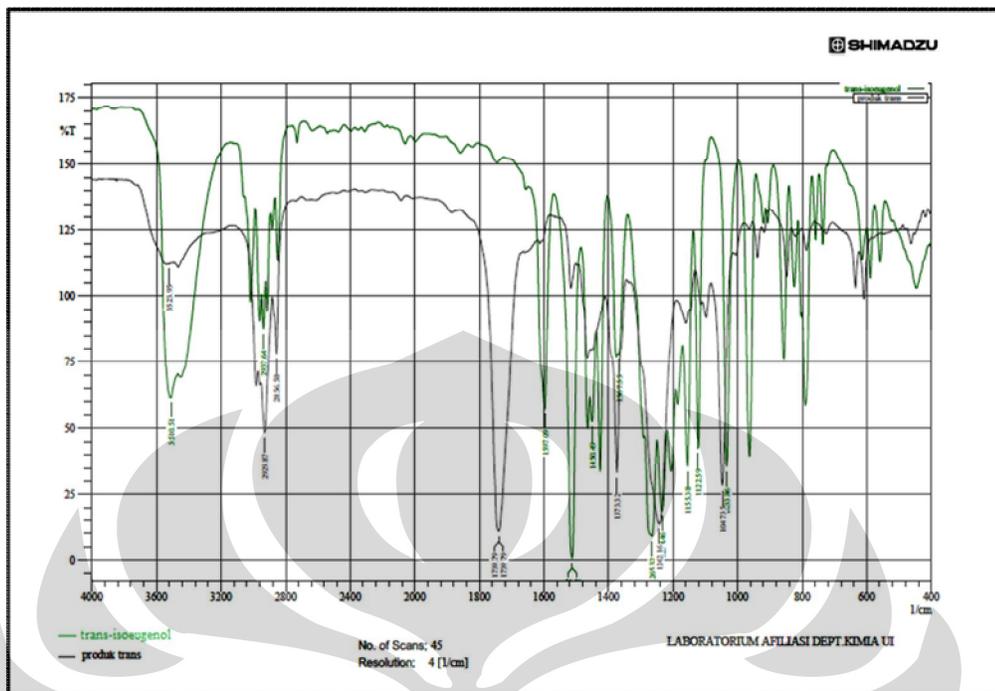
b)

Gambar 4.13 Spektra UV-Vis a) Trans-iso Eugenol dan senyawa hasil reaksinya,
b) Cis-iso Eugenol dan senyawa hasil reaksinya

Dari hasil pengukuran, didapatkan panjang gelombang maksimum untuk trans-isoeugenol adalah 305 nm dengan nilai absorbansi sebesar 3,240. Sedangkan, panjang gelombang maksimum untuk senyawa hasil reaksinya adalah 308 nm dengan nilai absorbansi sebesar 3,627. Hasil pengukuran cis-isougenol diperoleh panjang gelombang maksimum cis-isoeugenol adalah 296 nm dengan nilai absorbansi sebesar 3,190. Sedangkan, panjang gelombang untuk senyawa hasil reaksinya adalah 298 dengan nilai absorbansi sebesar 3,392. Dari hasil ini terlihat bahwa antara panjang gelombang senyawa awal dengan senyawa produk reaksi mengalami pergeseran. Senyawa hasil reaksi mengalami pergeseran ke arah panjang gelombang yang lebih besar. Adanya pergeseran panjang gelombang ini disebabkan oleh adanya pembentukan gugus kromofor baru pada senyawa hasil reaksi.

4.6.2 Analisa Dengan FTIR

Analisa menggunakan FTIR dilakukan untuk mengidentifikasi gugus fungsi yang terdapat dalam suatu senyawa berdasarkan spektrum inframerah yang dihasilkan. Gambar 4.14 menunjukkan spektra IR untuk trans-isoeugenol dan senyawa hasil reaksinya.



Gambar 4.14 Spektra IR trans-isoegenol dan senyawa hasil reaksinya

Berdasarkan hasil spektra yang didapat, maka identifikasi terhadap gugus fungsi yang ada pada tiap spektrum dapat dilakukan. Tabel 4.6 dan Tabel 4.7 menunjukkan identifikasi gugus fungsi dari masing-masing spektrum.

Tabel 4.7 Identifikasi gugus fungsi trans-isoegenol

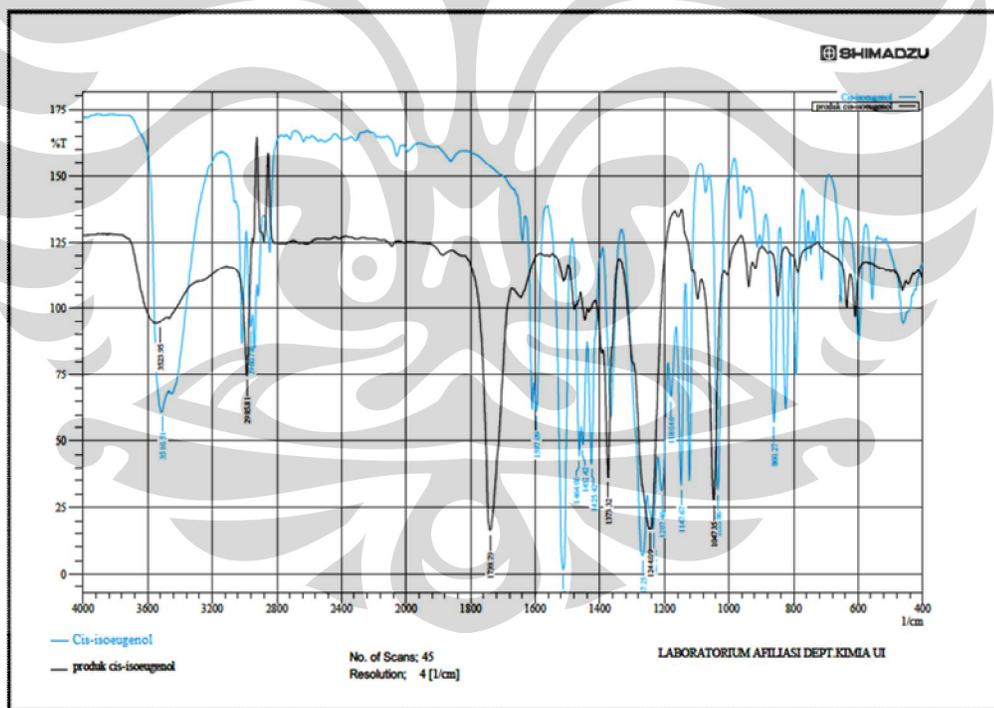
Bilangan gelombang (cm^{-1})	Identifikasi gugus fungsi
3510,51	Regangan O-H
2929,87	Regangan C-H aromatik
1539,79 ; 1512,22	Regangan C=C
1265,32 ; 1234,46 ; 1047,35	Regangan =C-O-C
900-1000	Alkena trans

Tabel 4.8 Identifikasi gugus fungsi senyawa hasil reaksi trans-isoegenol

Bilangan gelombang (cm^{-1})	Identifikasi gugus fungsi
3525,93	Regangan O-H
2937,64	Regangan C-H aromatik
1739,79	Cincin lingkaran 5
1242,16	Regangan =C-O-C

Berdasarkan tabel tersebut, dapat disimpulkan bahwa pada senyawa hasil reaksi trans-isoegenol masih terdapat gugus -OH, cincin aromatik, dan gugus eter. Sedangkan, gugus baru yang terbentuk pada bilangan gelombang 1739,79 cm^{-1} merupakan indikasi adanya cincin lingkaran lima yang terbentuk.

Spektra IR senyawa cis-isoegenol dan senyawa hasil reaksinya, dapat dilihat pada Gambar 4.15.



Gambar 4.15 Spektra IR cis-isoegenol dan senyawa hasil reaksinya

Berdasarkan hasil spektra yang didapat, maka identifikasi terhadap gugus fungsi yang ada pada tiap spektrum dapat dilakukan. Tabel 4.8 dan Tabel 4.9 menunjukkan identifikasi gugus fungsi dari masing-masing spektrum.

Tabel 4.9 Identifikasi gugus fungsi cis-iso Eugenol

Bilangan gelombang (cm^{-1})	Identifikasi gugus fungsi
3516,29	Regangan O-H
2939,57	Regangan C-H aromatik
1595,16	Regangan C=C
1207,46 ; 1033,86	Regangan =C-O-C
600-700	Alkena cis

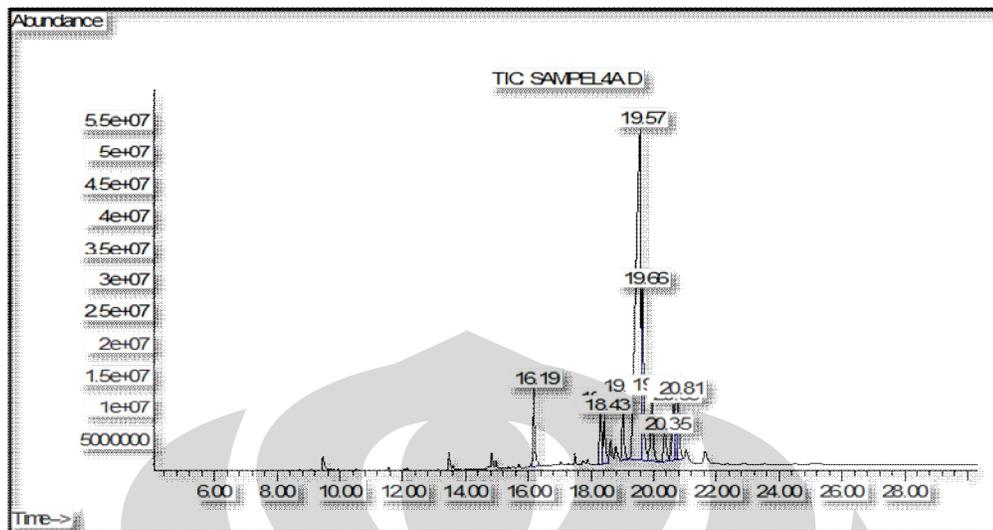
Tabel 4.10 Identifikasi gugus fungsi senyawa hasil reaksi cis-iso Eugenol

Bilangan gelombang (cm^{-1})	Identifikasi gugus fungsi
3523,95	Regangan O-H
2985,81	Regangan C-H aromatik
1739,79	Cincin lingkaran 5
1244,09 ; 1047,35	Regangan =C-O-C

Berdasarkan tabel tersebut, dapat disimpulkan bahwa pada senyawa hasil reaksi trans-iso Eugenol masih terdapat gugus -OH, cincin aromatik, dan gugus eter. Sedangkan, gugus baru yang terbentuk pada bilangan gelombang 1739,79 cm^{-1} merupakan indikasi adanya cincin lingkaran lima yang terbentuk.

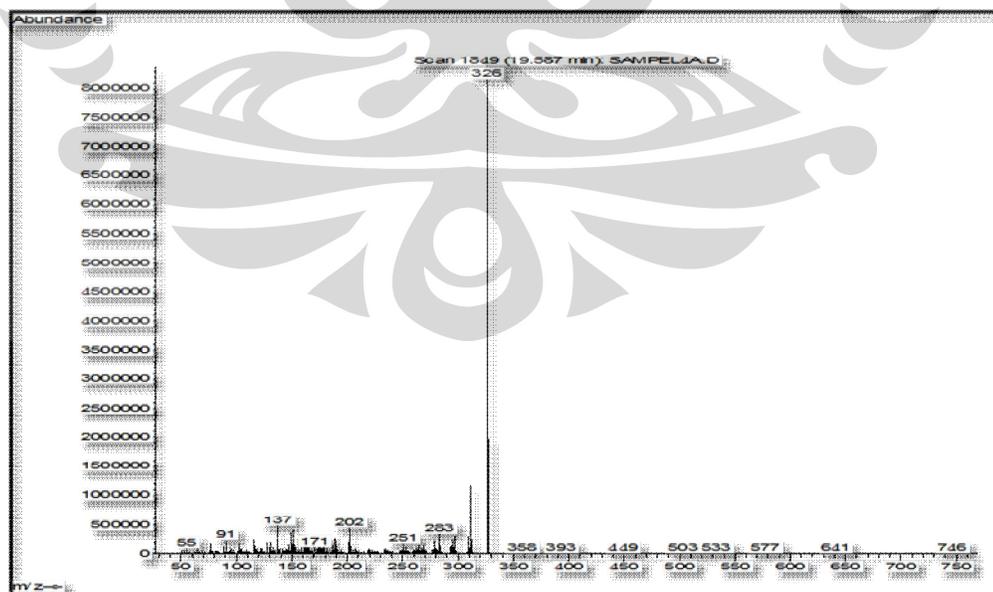
4.6.3 Analisa Dengan GC-MS

Analisa dengan GC-MS digunakan untuk menentukan bobot molekul senyawa hasil reaksi. Hasil kromatogram dari senyawa hasil reaksi trans-iso Eugenol dapat dilihat pada Gambar 4.15.

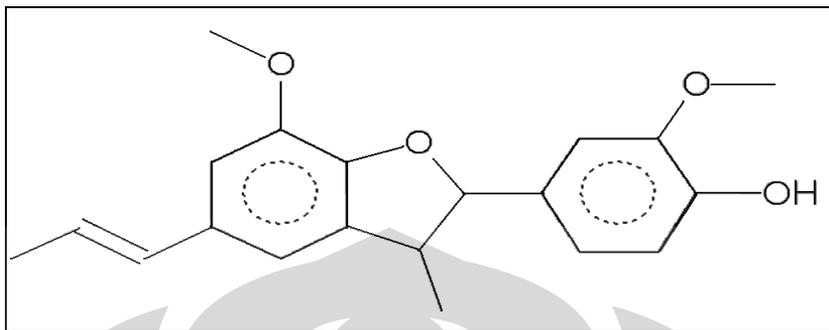


Gambar 4.16 Kromatogram GC senyawa hasil reaksi trans-iso Eugenol

Dari kromatogram GC senyawa hasil reaksi trans-iso Eugenol, diketahui bahwa puncak tertinggi memiliki waktu retensi sebesar 19,57 dengan luas area 41,77%. Kromatogram GC yang diperoleh dianalisa lebih lanjut dengan menggunakan data *library* MS dan didapat data bahwa pada waktu retensi 19,57 menit, terdapat senyawa yang memiliki berat molekul sebesar 326. Spektrum massa dan struktur molekul senyawa tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.16.



a)

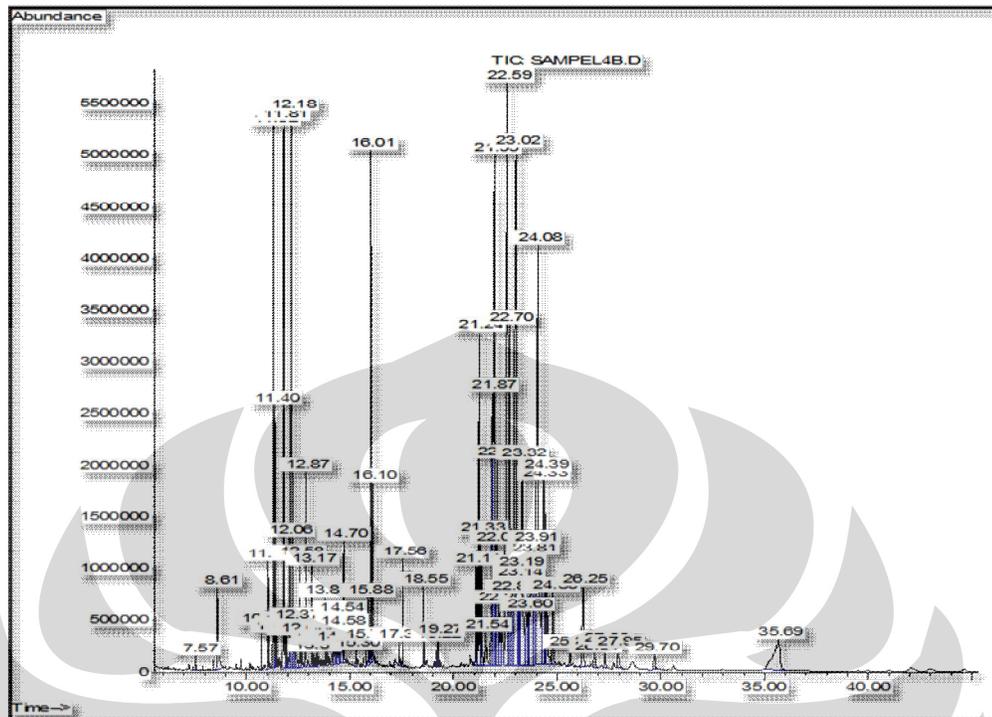


b)

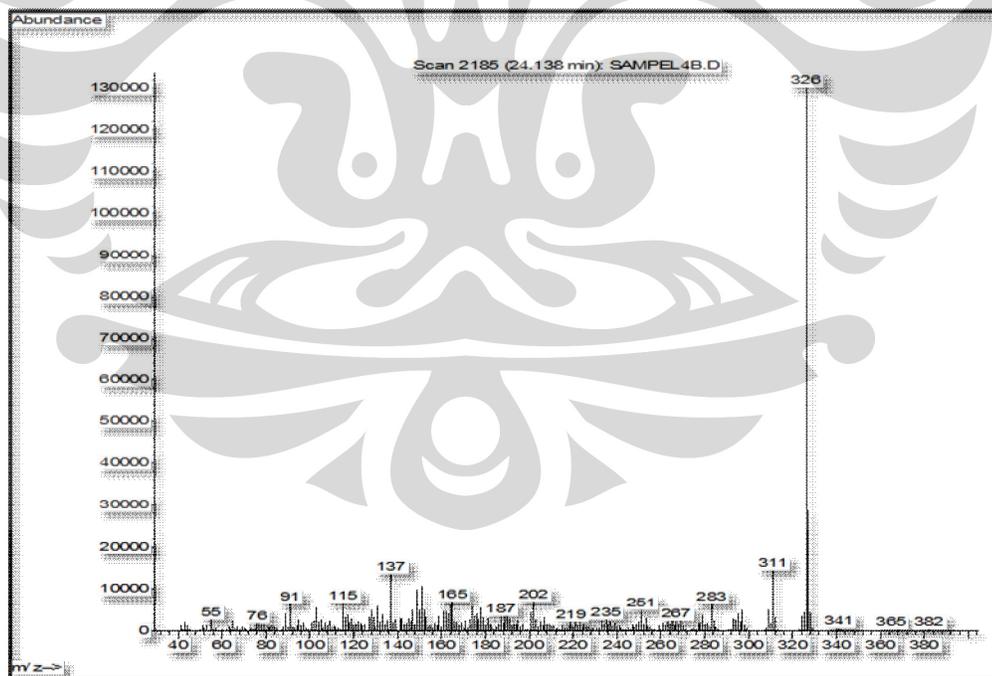
Gambar 4.17 a) Spektrum massa dan b) Struktur molekul senyawa hasil reaksi trans-isoeugenol

Berdasarkan data *library* yang dimiliki oleh instrumen GC-MS yang terdapat pada Laboratorium PUSLABFOR POLRI, diketahui bahwa senyawa hasil reaksi trans-isoeugenol mirip dengan senyawa phenol, 4-[2,3-dihydro-7-methoxy-3-methyl-5-(1-propenyl)-2-benzofuranyl]-2-methoxy, yang lebih dikenal sebagai dehidrodiisoeugenol atau Licarin A, dengan *quality* sebesar 91. Senyawa ini merupakan senyawa dimer isoeugenol dengan posisi penggabungan 8-5'.

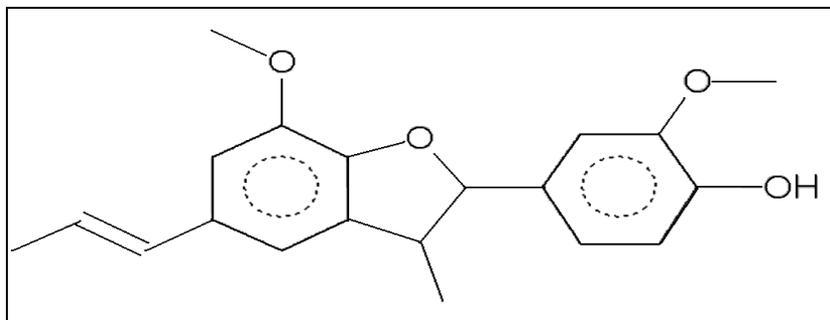
Untuk kromatogram senyawa hasil reaksi cis-isoeugenol dapat dilihat pada Gambar 4.17 a). Kromatogram GC yang diperoleh dianalisa lebih lanjut dengan menggunakan data *library* MS dan didapat data bahwa pada waktu retensi 23,03 menit dengan luas area 9,22, terdapat senyawa yang memiliki berat molekul sebesar 326. Spektrum massa dan struktur molekul senyawa tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.18 b) dan c).



a)



b)



c)

Gambar 4.18 a) Kromatogram GC, b) Spektrum massa, dan c) Struktur molekul senyawa hasil reaksi cis-isoeugenol

Berdasarkan data *library* yang dimiliki oleh instrumen GC-MS yang terdapat pada Laboratorium PUSLABFOR POLRI, diketahui bahwa senyawa hasil reaksi cis-isoeugenol mirip dengan senyawa Phenol, 4-[2,3-dihydro-7-methoxy-3-methyl-5-(1-propenyl)-2-benzofuranyl]-2-methoxy, yang lebih dikenal sebagai dehidroisoeugenol atau Licarin A, dengan *quality* sebesar 94. Senyawa ini merupakan merupakan senyawa dimer isoeugenol dengan posisi penggabungan 8-5'.

Licarin A yang terdeteksi pada GC-MS, diisolasi pertama kali oleh Feringa pada tahun 1996. Senyawa ini diisolasi dari batang pohon *Licaria aritu* yang berasal dari spesies *Lauraceae* di wilayah Amazon dan telah diteliti memiliki aktivitas biologis sebagai antitumor.

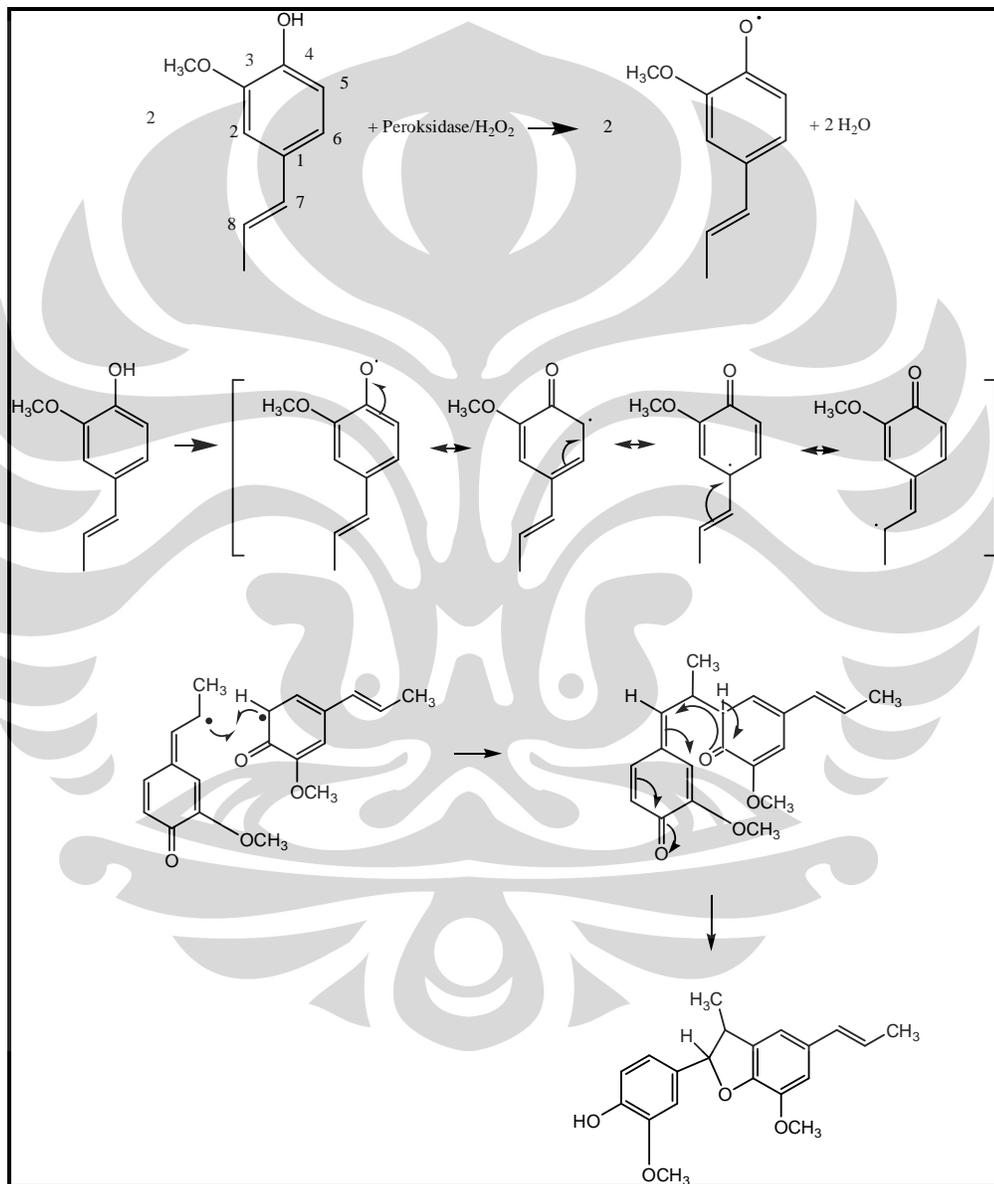
4.7 Mekanisme Reaksi Pembentukan Senyawa Hasil Reaksi Oksidasi Koping

Pembentukan dimer cis/trans-isoeugenol terjadi melalui reaksi oksidasi koping, yaitu penggabungan dua molekul cis/trans-isoeugenol yang disertai dengan proses oksidasi melalui pembentukan radikal fenoksi. Reaksi ini melibatkan cis/trans-isoeugenol sebagai donor proton, H_2O_2 sebagai akseptor elektron, dan peroksidase sebagai katalis.

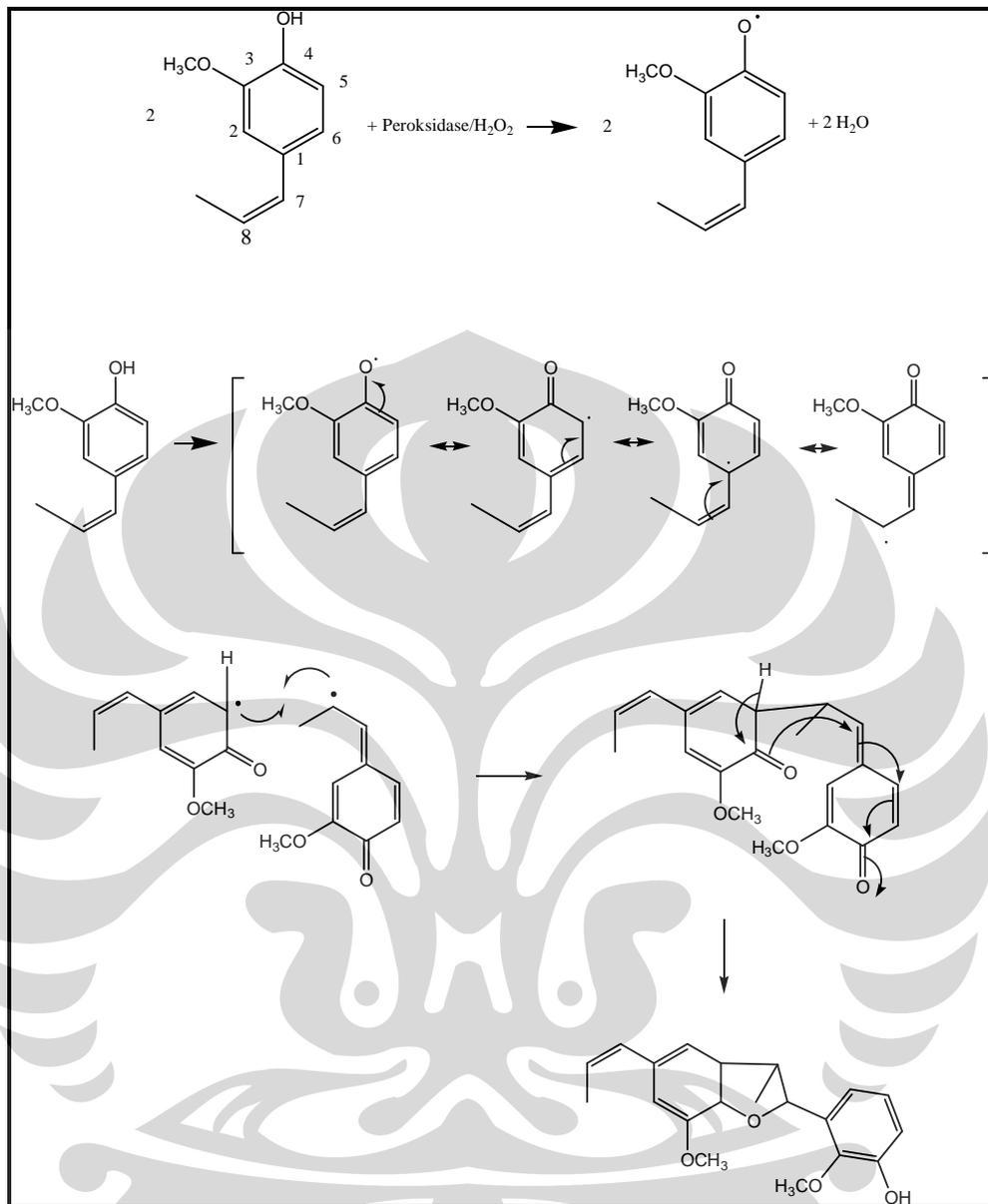
Peroksidase yang telah teraktivasi oleh H_2O_2 akan bereaksi dengan cis/trans-isoeugenol menghasilkan radikal cis/trans-isoeugenol. Radikal yang

terbentuk akan melakukan reaksi kopling dengan radikal cis/trans-isoeugenol lainnya membentuk dimer cis/trans-isoeugenol.

Produk yang dihasilkan dari reaksi oksidasi kopling trans-isoeugenol dan cis-isoeugenol merupakan dimer dengan posisi penggabungan 8-5'. Mekanisme reaksi pembentukannya dapat dilihat pada Gambar 4.19.



a)



b)

Gambar 4.19 Kemungkinan mekanisme reaksi pembentukan dimer a) Trans-isoegenol dan b) Cis-isoegenol

[Sumber: Setala, 2008, Bortolomeazzi et al., 2010, dan Elvi, 2010]

Berdasarkan mekanisme reaksi di atas, penggabungan atau kopling dari dua buah molekul C₆C₃ terjadi pada atom C-8 dan C-5 serta melibatkan atom oksigen membentuk senyawa dimer.

BAB 5

KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

1. Pemurnian peroksidase dari *Raphanus sativus* L. melalui pengendapan menggunakan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang dilanjutkan dengan dialisis mampu meningkatkan aktivitas spesifik enzim dari 1,3995 U/mg menjadi 33,3063 U/mg.
2. Peroksidase hasil isolasi dari *Raphanus sativus* L. memiliki aktivitas katalisis pada reaksi oksidasi kopling baik untuk cis-isoeugenol maupun trans-isoeugenol.
3. Produk reaksi oksidasi kopling trans-isoeugenol memberikan nilai absorbansi tertinggi pada pH 5,0 dengan perbandingan mol jumlah substrat trans-isoeugenol : H_2O_2 5% = 1,5 : 1. Sedangkan, produk reaksi oksidasi kopling cis-isoeugenol memberikan nilai absorbansi tertinggi pada pH 6,0 dengan perbandingan mol jumlah substrat cis-isoeugenol : H_2O_2 5% = 1,5 : 1.
4. Berdasarkan hasil analisa menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FTIR, dan GC-MS, diketahui bahwa produk oksidasi kopling trans-isoeugenol dan cis-isoeugenol merupakan senyawa dehidrodiisoeugenol atau Licarin A dengan posisi model penggabungan 8-5'.

5.2 Saran

1. Untuk meningkatkan kemurnian peroksidase hasil isolasi dari *Raphanus sativus* L., perlu dilakukan langkah pemurnian enzim lebih lanjut.
2. Untuk memisahkan produk reaksi oksidasi kopling dengan lebih baik, perlu dilakukan pemisahan lebih lanjut dengan metode yang lebih baik, misalnya dengan metode kromatografi kolom.

DAFTAR PUSTAKA

- Anita, Yulia. (2004). *Produksi senyawa bioaktif dari reaksi guaiakol dengan enzim peroksidase dan uji aktivitas alelopati*. Karya Utama Sarjana Kimia. Depok: Departemen Kimia, FMIPA UI.
- Ardiyani, Lelly. (2003). *Isolasi dan purifikasi parsial enzim peroksidase dari tanaman sawi hijau (Brassica juncea)*. Karya Utama Sarjana Kimia. Depok: Departemen Kimia, FMIPA UI
- Aruna, N. dan Lali, A. (2001). Purification of a plant peroxidase using reversibly soluble ion-exchange polymer. *Process Biochemistry*, 37, 431-437.
- Astuti, Sri Mulia. (2007). Teknik mempertahankan mutu lobak (*Raphanus sativus*) dengan menggunakan alat pengering vakum. *Buletin Teknik Pertanian*, 12, 30-34.
- Atsumi, T., Fujisawa, S., dan Tonosaki, K. (2005). A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions. *Toxicology in Vitro*, 19, 1025-1033.
- Backer, C.A. dan Bakhuizen v.d. Brink, Jr. (1968). *Flora of Java*. Vol. 1. Groningen: N.V. Noordhof.
- Bergonzelli, G.E., et al. (2003). Essential oils as components of a diet-based approach to management of Helicobacter infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 3240-3246.
- Bortolomeazzi, R., et al. (2010). Formation of dehydrodiisoeugenol and dehydrodieugenol from the reaction of isoeugenol and eugenol with DPPH radical and their role in radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 118, 256-265.
- Boyer, R. (2000). *Modern experimental biochemistry* (3rd ed). USA: Addison Wesley Longman.
- Croteau, R., et al. (2000). Natural product (secondary metabolites). American Society of Plant Physiology.
- Cullere, L., et al. (2004). Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 24, 1653-1660.

- Dennison, Clive. (2002). *A guide to protein isolation*. New York: Kluwer Academic Publishers.
- Duarte-Vazquez, M. A., et al. (2000). Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica napus* L. var. *esculenta* D.C.) peroxidases. *J. Agric. Food Chem*, 48, 1574-1579.
- Elvi, Dewi. (2010). *Sintesis senyawa dimer eugenol dan isoeugenol yang dikatalisis oleh enzim peroksidase dari tumbuhan horseradish, serta uji aktivitas antioksidan*. Tesis Magister Program Studi Ilmu Kimia. Depok: Departemen Kimia, FMIPA UI.
- Fekete, Szabolcs. (2008). *Climate adaptation and peroxidase activity of newly bred balcony plants*. Doctoral theses. Budapest: Department of floriculture and dendrology, Faculty of horticultural science.
- Fessenden dan Fessenden. (1982). *Kimia organik*. (ed. 3). Jakarta: Erlangga.
- Fleming, Williams. (1980). *Spectroscopic methods in organic chemistry* (3rd ed.). Great Britain: McGraw-Hill Book Company.
- Gunawan, Reigina. (2009). *Studi terhadap modifikasi peptida siklis menggunakan prolin-prolin (peptide bonds) sebagai inhibitor potensial enzim NS3-NS2B protease virus dengue secara in silico*. Karya Utama Sarjana Kimia. Depok: Departemen Kimia FMIPA UI.
- <http://hanagoyomi-satellite.blog.so-net.ne.jp/upload/detail/E38380E3-82A4E382B3E383B3.jpg.html>. 2 September 2010, 05.57 WIB.
- http://opensource.telkomspeedy.com/repo/abba/v12/artikel/ttg_tanaman_obat/depkes/buku3/3-117.pdf. 30 Juni 2010, 15:37 WIB.
- http://suharjawanasuria.tripod.com/teknologi_pakan_enzyme.htm. 5 September 2010, 08.30 WIB.
- <http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/InfraRed/infrared.htm#ir3>. 25 November 2010, 21.30 WIB.
- <http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR000823>. 7 Juli 2010, 16.36 WIB.
- <http://www.sebelasduabelas.ipa.co.cc/>. 1 Juli 2010, 17.46 WIB.
- <http://www.plantamor.com/index.php?plant=1074>. 30 Juni 2010, 16.52 WIB.
- <http://www.worthington-biochem.com/HPO/default.html>. 13 Juli 2010, 19.10 WIB.

- Hudiyono, Sumi. (1998). *Teori dasar enzim*. Depok: Departemen Kimia, FMIPA UI.
- Huixian, Zou dan K. E. Taylor. (1994). Product of oxidative coupling of phenol by horseradish peroxidase. *Chemosphere*, 10, 1807-1817.
- Jannah, Idoh R. (2006). *Optimasi kondisi reaksi oksidasi senyawa fenolik guaiakol yang dikatalisis enzim peroksidase dari brokoli (Brassica oleracea Var. italica)*. Karya Utama Sarjana Kimia. Depok: Departemen Kimia, FMIPA UI.
- Kobayashi, Akio. (1998). *Unique ecosystems under plant-microbe interaction can produce new types of bioactive compound*. UNESCO-Internetwork Cooperative Regional Seminar and Workshop on Bioassay Guided Isolation of Bioactive Substances from Natural Product and Microbial Product, Seoul, Rep. Of Korea.
- Koolman, J., dan Klaus-Heinrich, R. (2005). *Color atlas of biochemistry* (2nd ed.). New York: Thieme.
- McDougall, G. J. (1991). Cell wall-associated peroxidases and lignification during growth of flax fibers. *J. Plant Physiol*, 139, 182–186.
- Murray, R. K., et al. (2003). *Harper's illustrated biochemistry* (26th ed.). USA: McGraw-Hill Companies, Inc.
- Nelson, David L., dan Cox, Michael M. (2004). *Lehninger principles of biochemistry 4th Edition*. New York: W.H. Freeman and Company.
- Nicel, J. A. dan Wright, H. (1997). Oxidation of lignin for synthesis of phenolic resins. *Enzyme Microbial Technology*, 21, 302-310.
- Passardi, F., Penel, C., dan Dunand, C. (2004). Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *TRENDS in Plant Science*, 11. *Protein Purification Handbook*. Amersham Biosciences
- Pudjiraharti, S., et al. (1997). Pemurnian dan karakterisasi peroksidase hasil kultur sel tanaman horseradish (*Armorachia lapatifolia*). *Buletin IPT*, III, 1.
- Rakhmawati, R., Anggarwulan, E., dan Retnaningtyas, E. (2009). Potency of lobak leaves (*Raphanus sativus* L. var. *Hortensis* Back) as anticancer and antimicrobial candidates. *Biodiversitas*, 10, 158-162.
- Saepudin, E., dan Setiasih, S. (2009). *Handout kuliah bioteknologi*. Depok:

FMIPA UI.

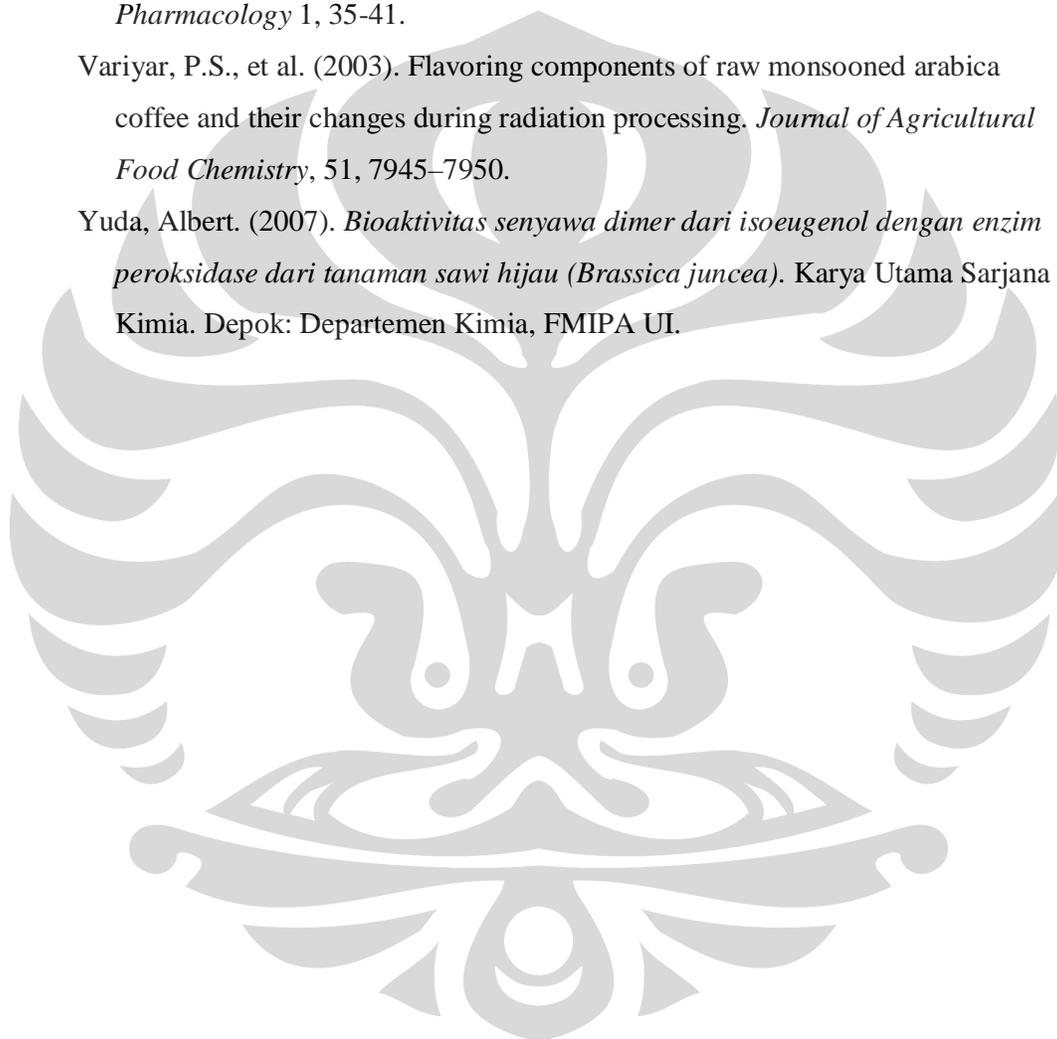
Scopes, R. K. (1994). *Protein purification principles and practice* (3rd ed.). New York: Springer-Verlag.

Setälä, Harri. (2008). *Regio- and stereoselectivity of oxidative coupling reactions of phenols*. Finland: VTT publications.

Shoeb, M. (2006). Anticancer agents from medicinal plants. *Bangladesh Journal Pharmacology* 1, 35-41.

Variyar, P.S., et al. (2003). Flavoring components of raw monsooned arabica coffee and their changes during radiation processing. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51, 7945–7950.

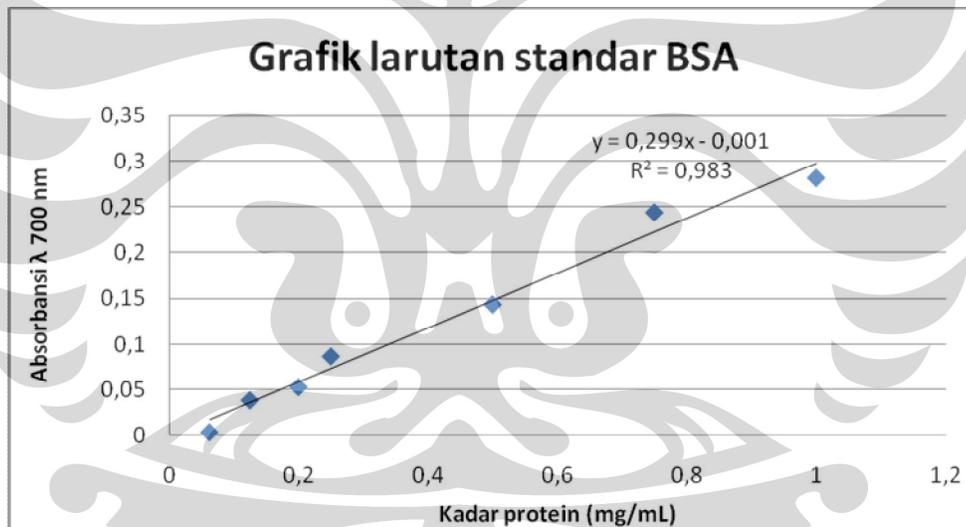
Yuda, Albert. (2007). *Bioaktivitas senyawa dimer dari isoeugenol dengan enzim peroksidase dari tanaman sawi hijau (Brassica juncea)*. Karya Utama Sarjana Kimia. Depok: Departemen Kimia, FMIPA UI.



Lampiran 1

Pengukuran kadar protein dengan metode Lowry, dengan menggunakan standar BSA (Bovine Serum Albumin)

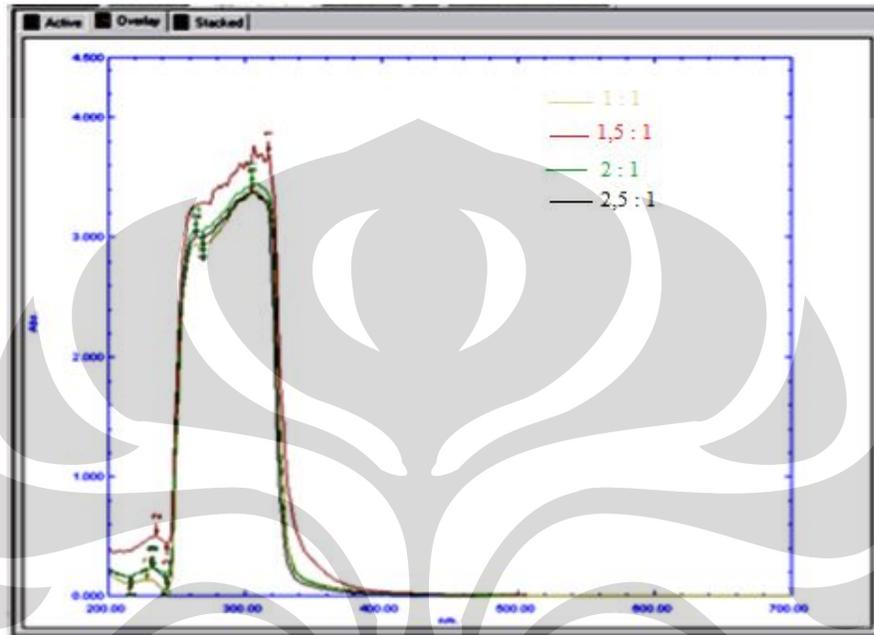
Kadar protein larutan standar (mg/mL)	Absorbansi pada λ 700 nm
0,0625	0,00400
0,125	0,03864
0,2	0,05305
0,25	0,08691
0,5	0,14392
0,75	0,24403
1	0,28140



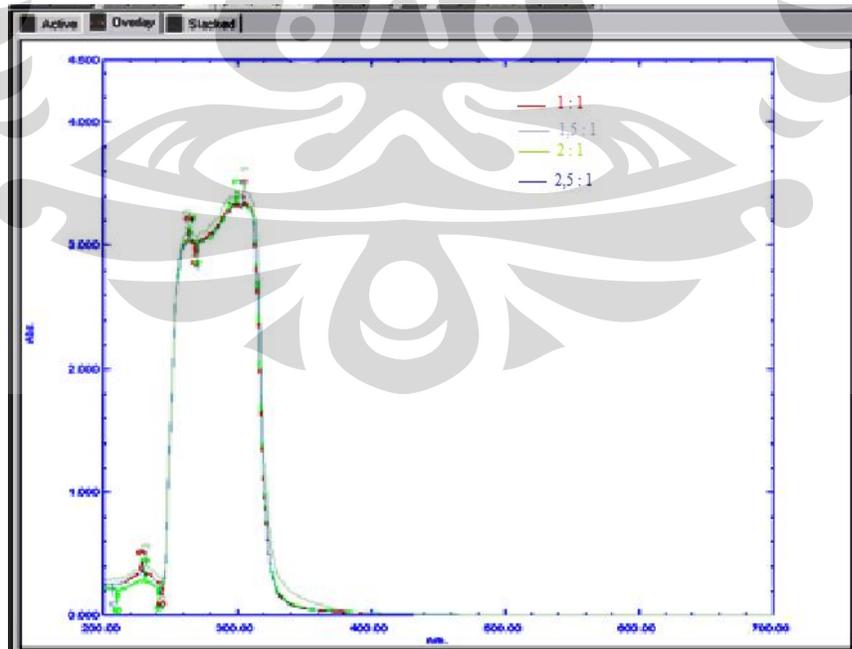
Lampiran 2

Spektra UV-Vis dan data absorbansi optimasi jumlah substrat dan pH reaksi oksidasi kopling

a. pH 3,0



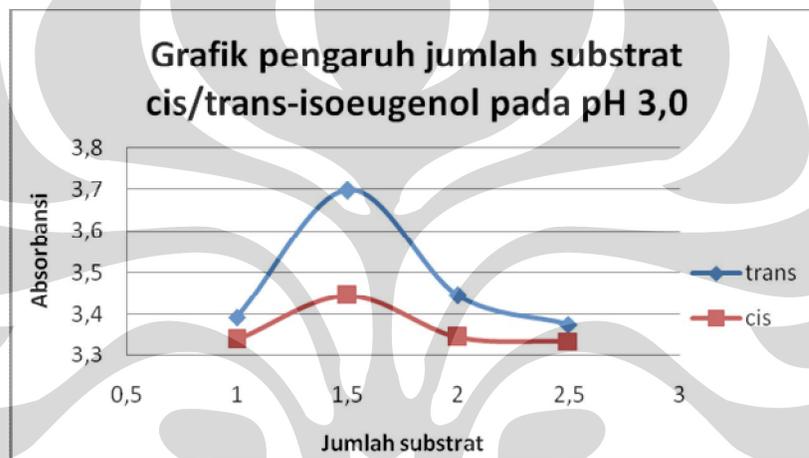
Trans-iso Eugenol



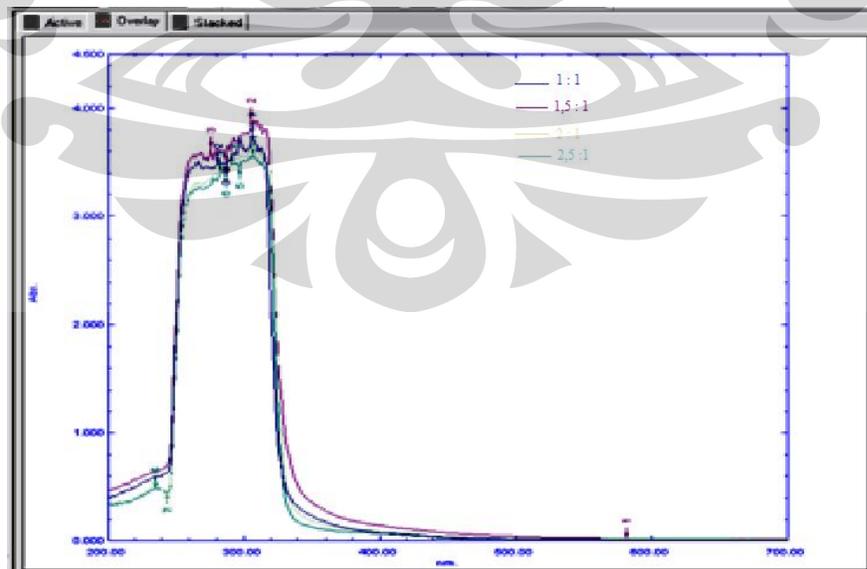
Cis-iso Eugenol

(Lanjutan)

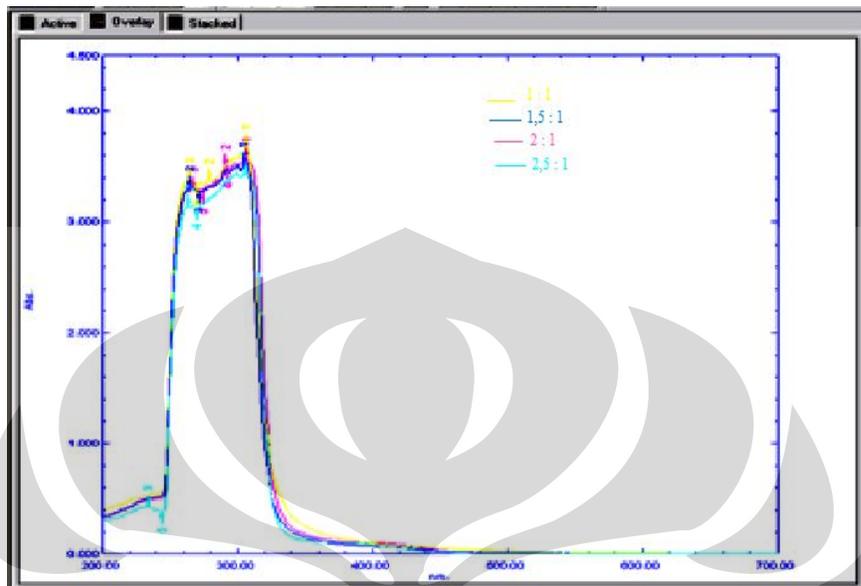
Jumlah substrat	Trans-isoeugenol		Cis-isoeugenol	
	λ maksimum	Absorbansi	λ maksimum	Absorbansi
1:1	305	3,392	304	3,339
1,5:1	317	3,697	305	3,445
2:1	305	3,445	299	3,344
2,5:1	305	3,375	304	3,334



b. pH 4,0

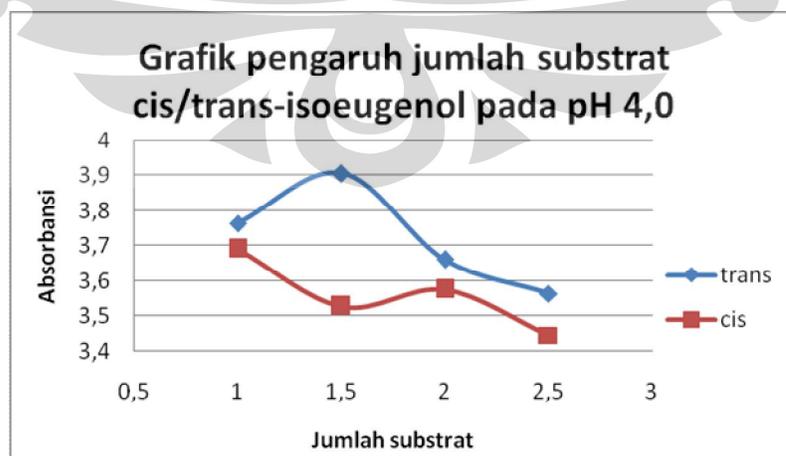


(Lanjutan)



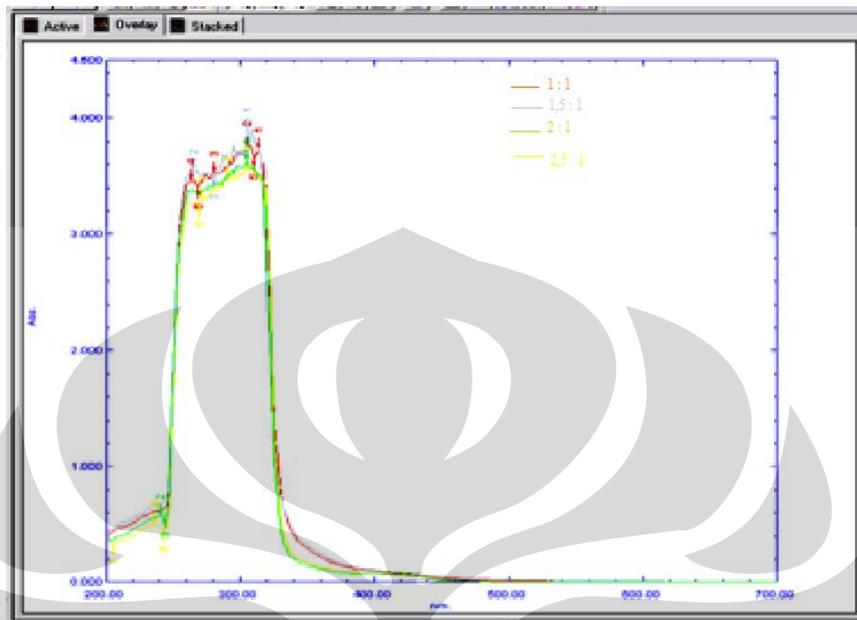
Cis-isoeugenol

Jumlah substrat	Trans-isoeugenol		Cis-isoeugenol	
	λ maksimum	Absorbansi	λ maksimum	Absorbansi
1:1	306	3,765	306	3,692
1,5:1	305	3,906	304	3,528
2:1	306	3,661	306	3,576
2,5:1	307	3,564	305	3,445

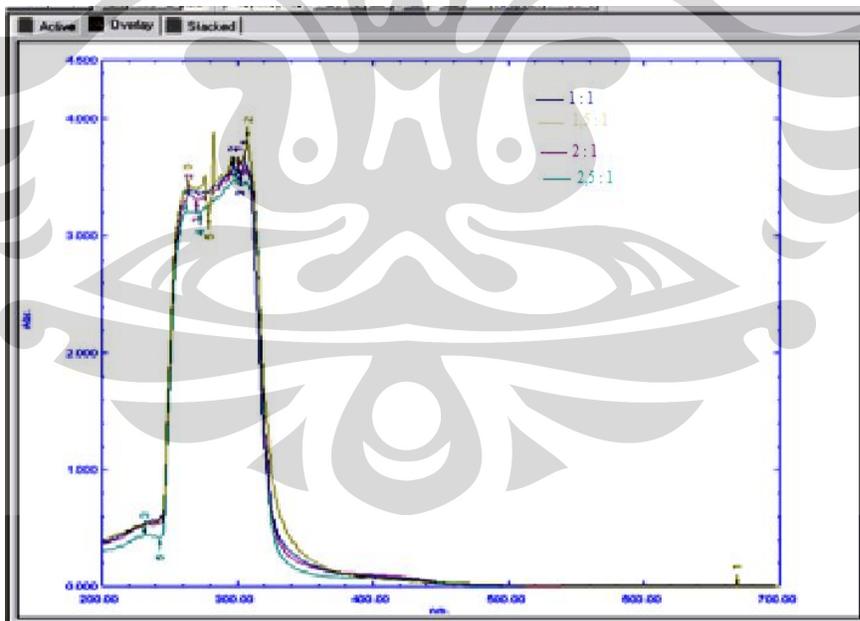


(Lanjutan)

c. pH 5,0



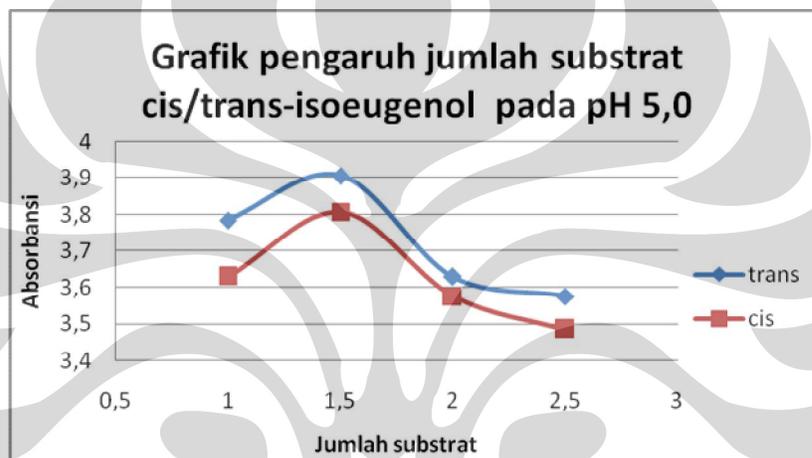
Trans-iso Eugenol



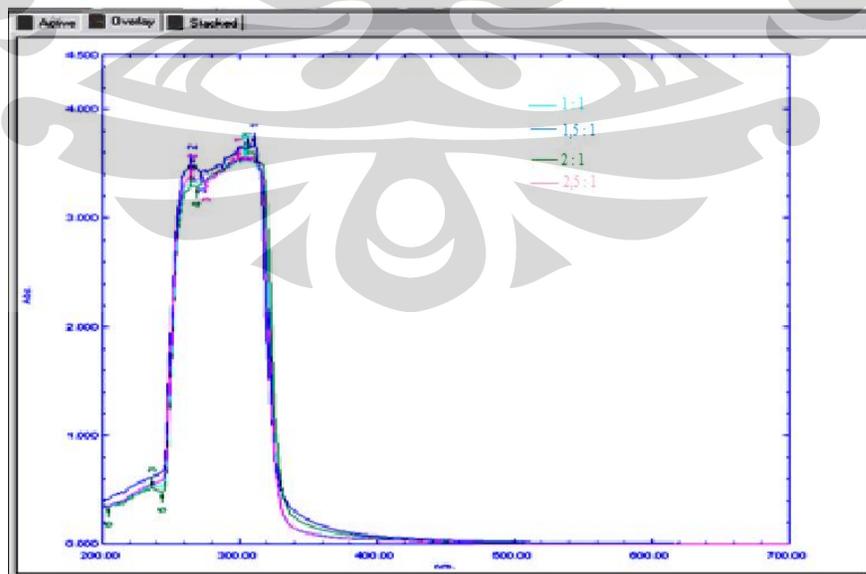
Cis-iso Eugenol

(Lanjutan)

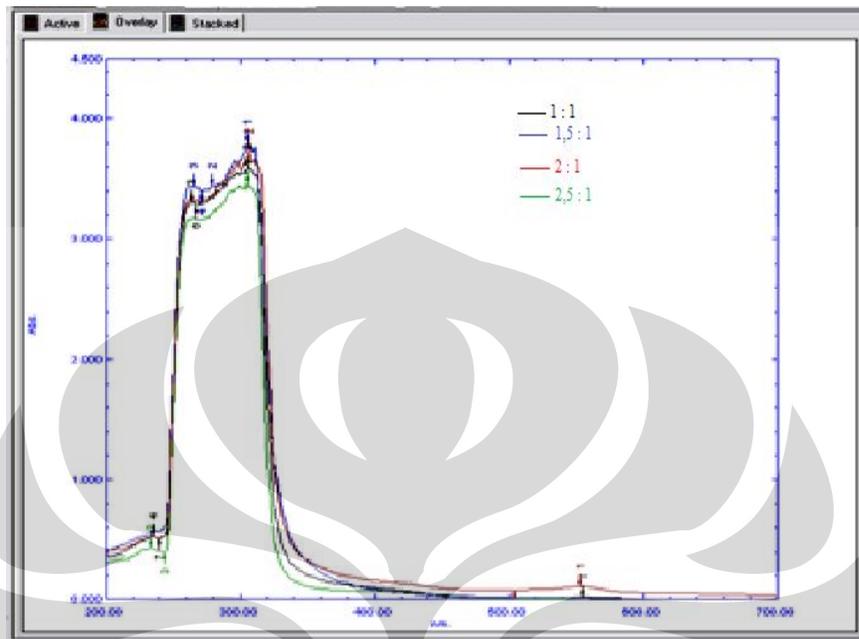
Jumlah substrat	Trans-isoeugenol		Cis-isoeugenol	
	λ maksimum	Absorbansi	λ maksimum	Absorbansi
1:1	305	3,785	305	3,630
1,5:1	305	3,906	305	3,808
2:1	305	3,630	301	3,576
2,5:1	305	3,576	298	3,485



d. pH 6,0

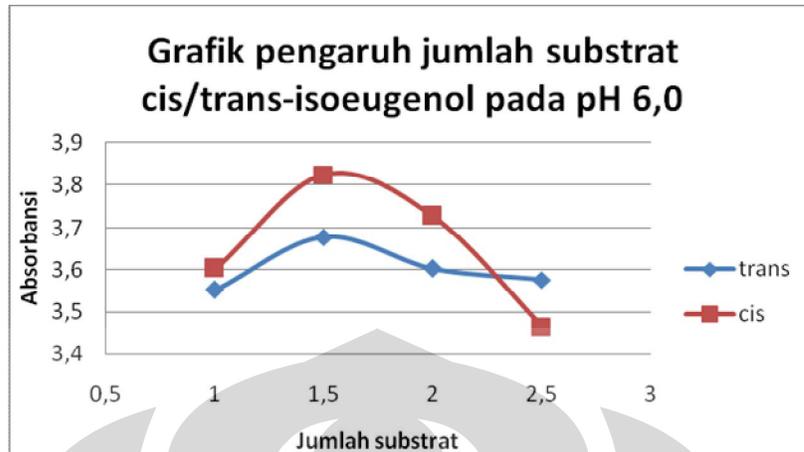


Trans-isoeugenol



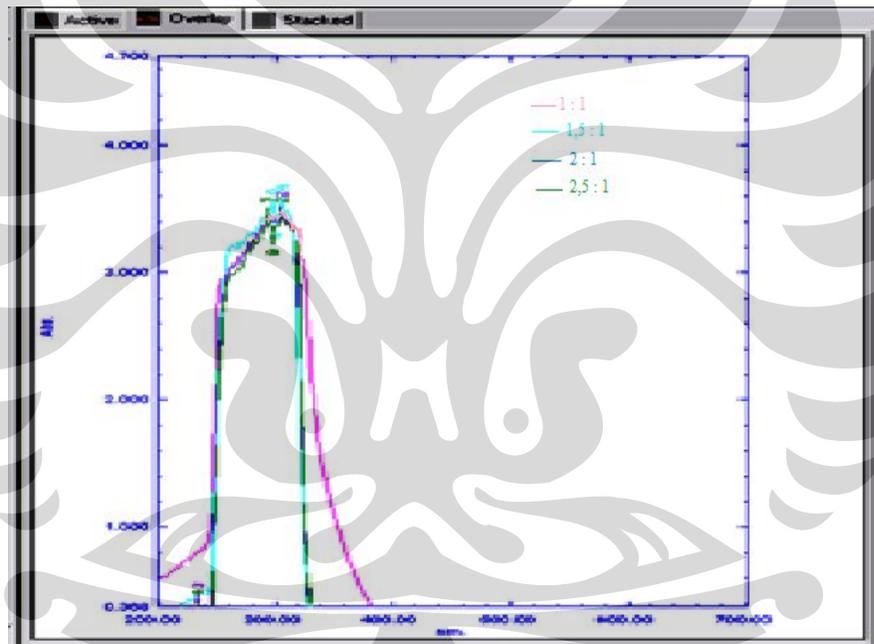
Cis-isoeugenol

Jumlah substrat	Trans-isoeugenol		Cis-isoeugenol	
	λ maksimum	Absorbansi	λ maksimum	Absorbansi
1:1	305	3,552	305	3,603
1,5:1	305	3,678	305	3,826
2:1	305	3,603	301	3,728
2,5:1	305	3,576	298	3,465

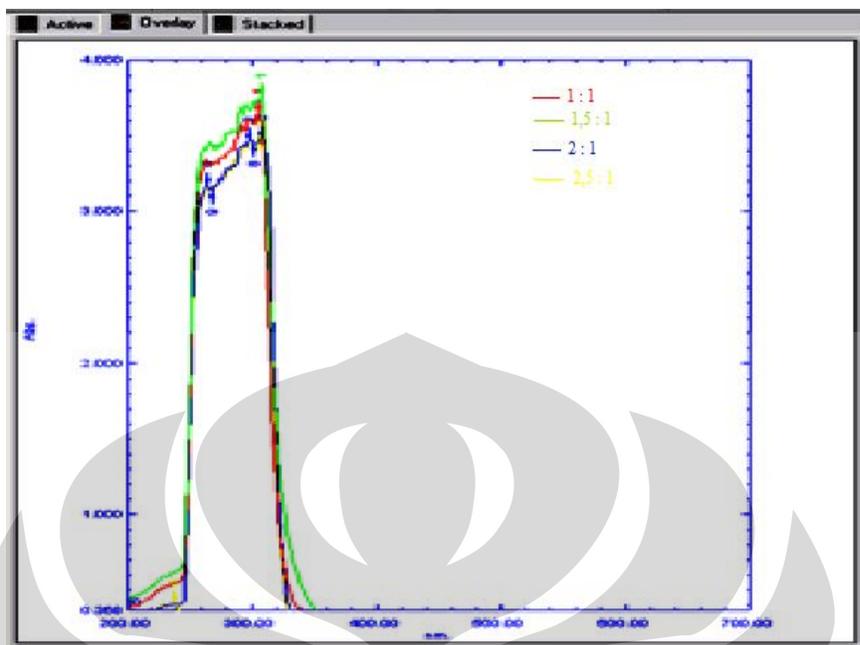


(Lanjutan)

e. pH 7,0



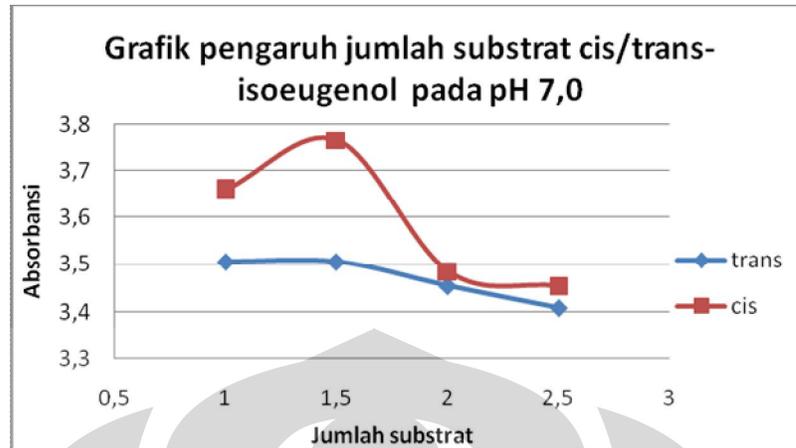
Trans-isoeugenol



Cis-isoeugenol

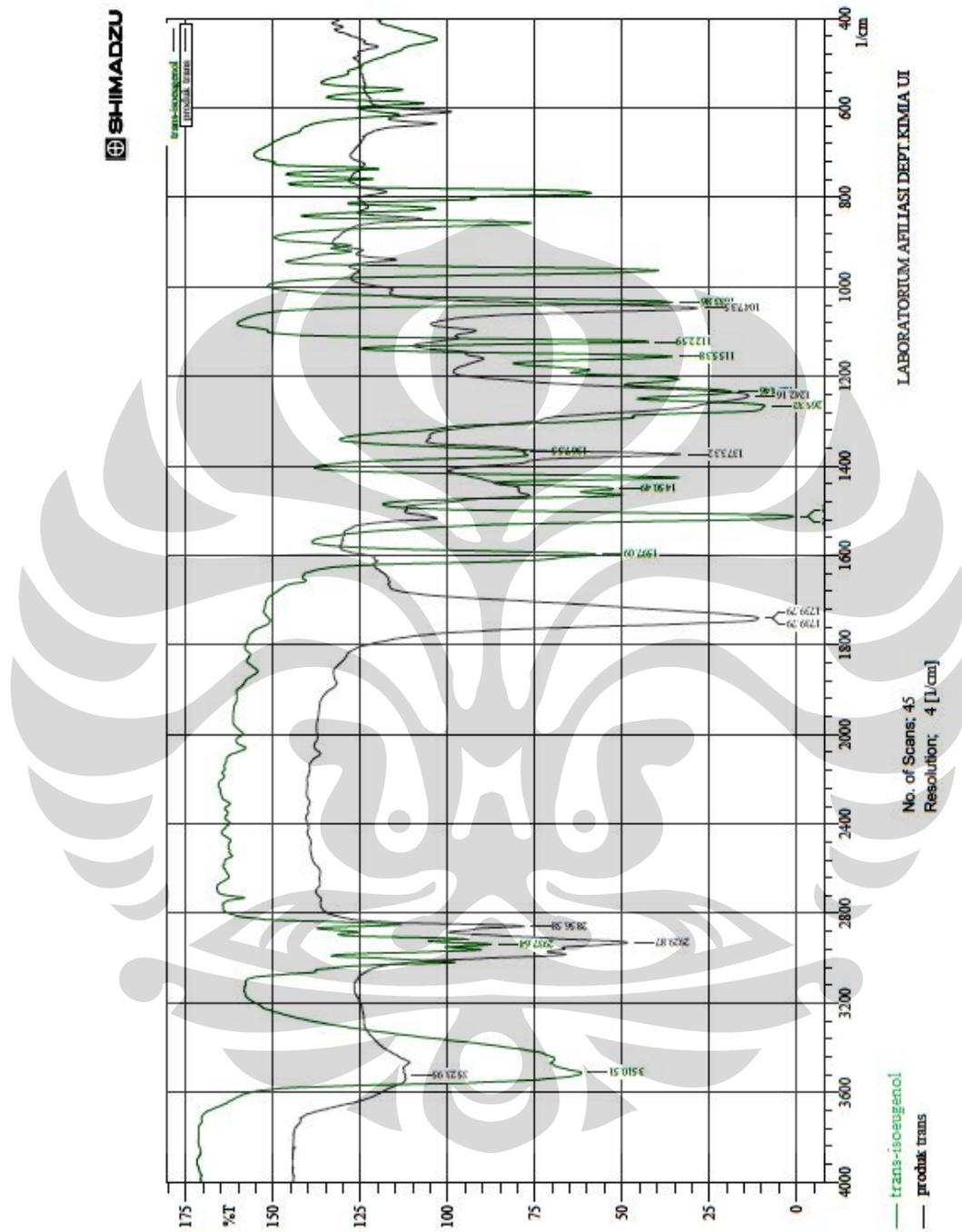
(Lanjutan)

Jumlah substrat	Trans-isoeugenol		Cis-isoeugenol	
	λ maksimum	Absorbansi	λ maksimum	Absorbansi
1:1	306	3,506	304	3,659
1,5:1	306	3,506	307	3,765
2:1	305	3,455	307	3,485
2,5:1	305	3,409	306	3,455



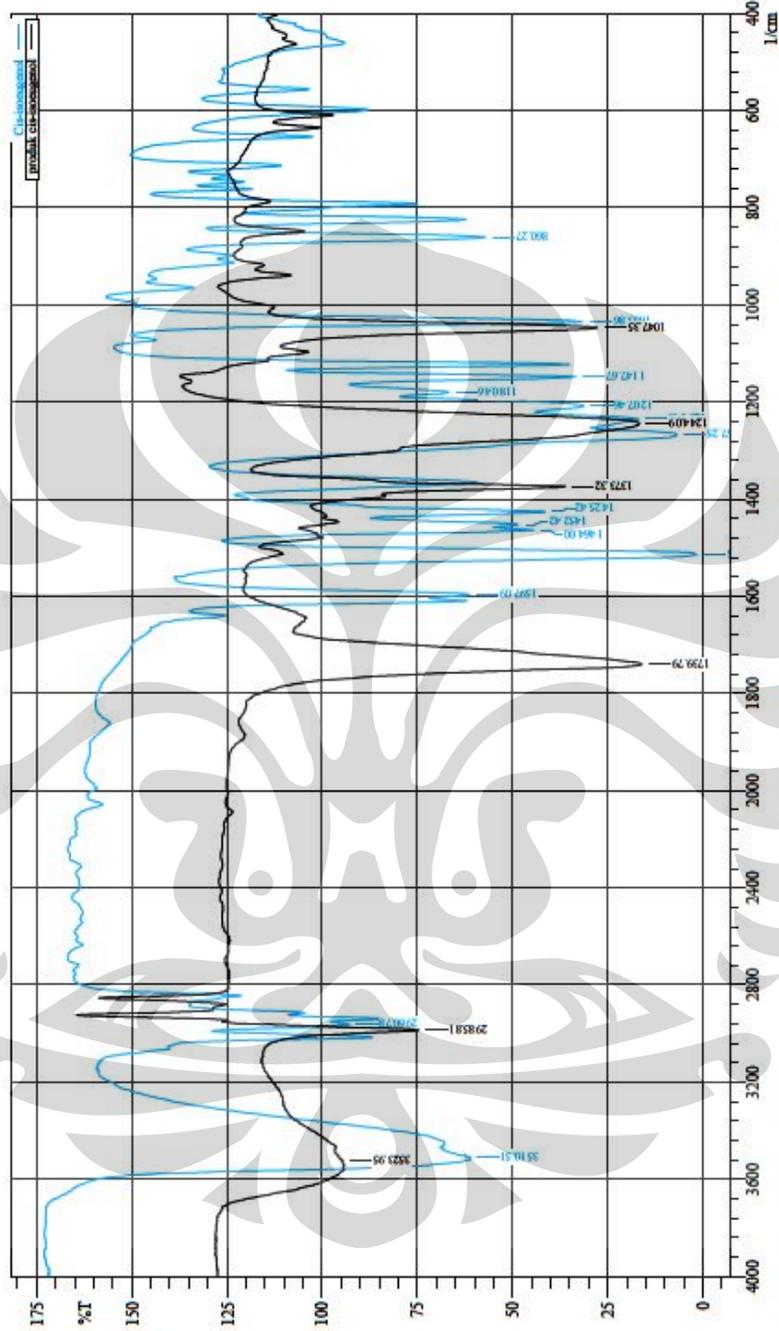
Lampiran 3

Spektra IR trans-isoeugenol dan senyawa hasil reaksinya



Lampiran 4

Spektra IR cis-isoegenol dan senyawa hasil reaksinya



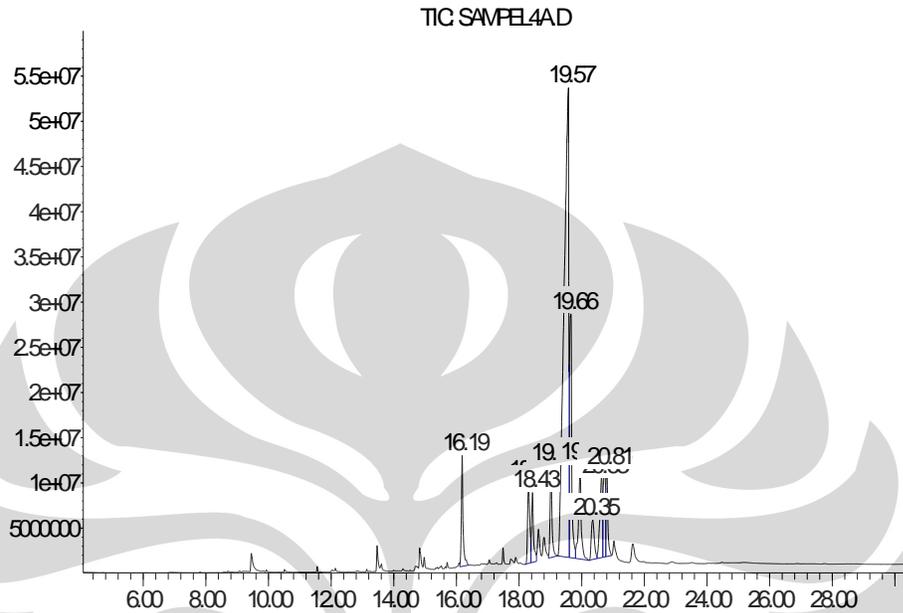
LABORATORIUM AFIILIASI DEPT. KIMIA UI

No. of Scans: 45
Resolution: 4 [1/cm]

Lampiran 5

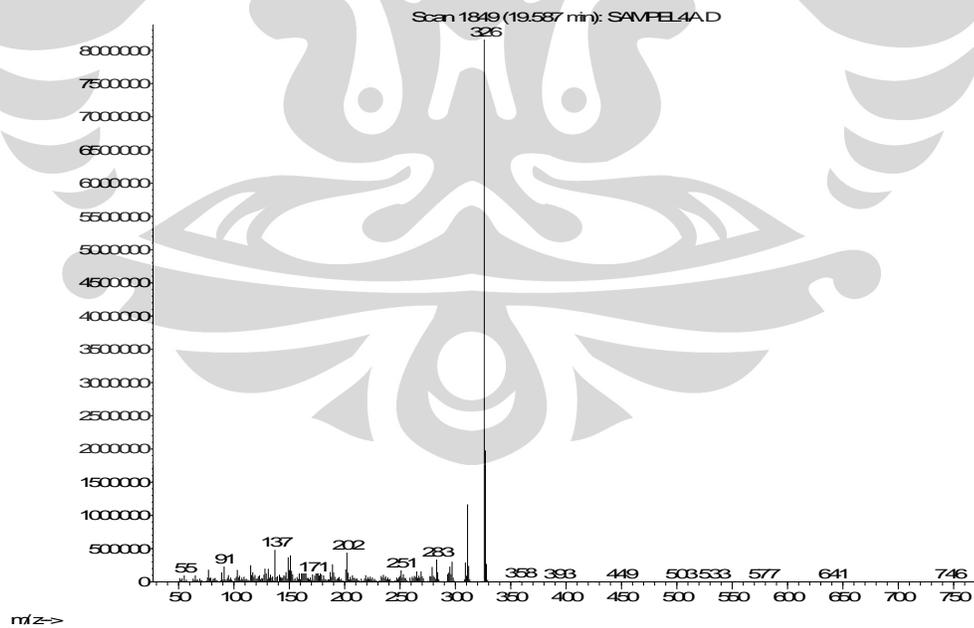
Kromatogram GC-MS senyawa hasil reaksi trans-isoeugenol

Abundance



Time->

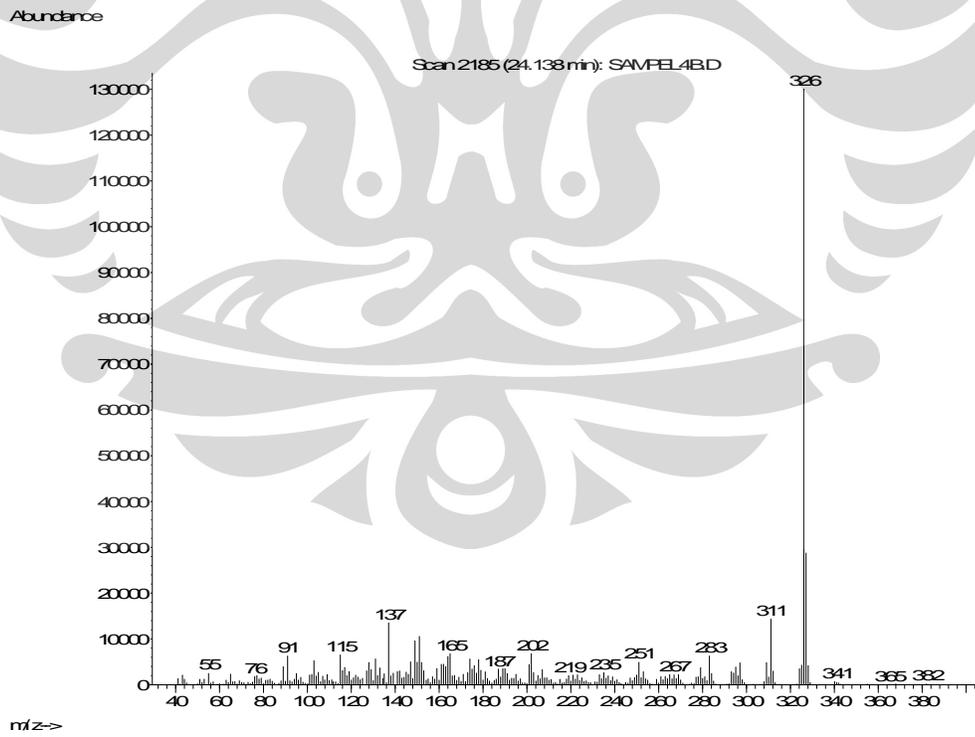
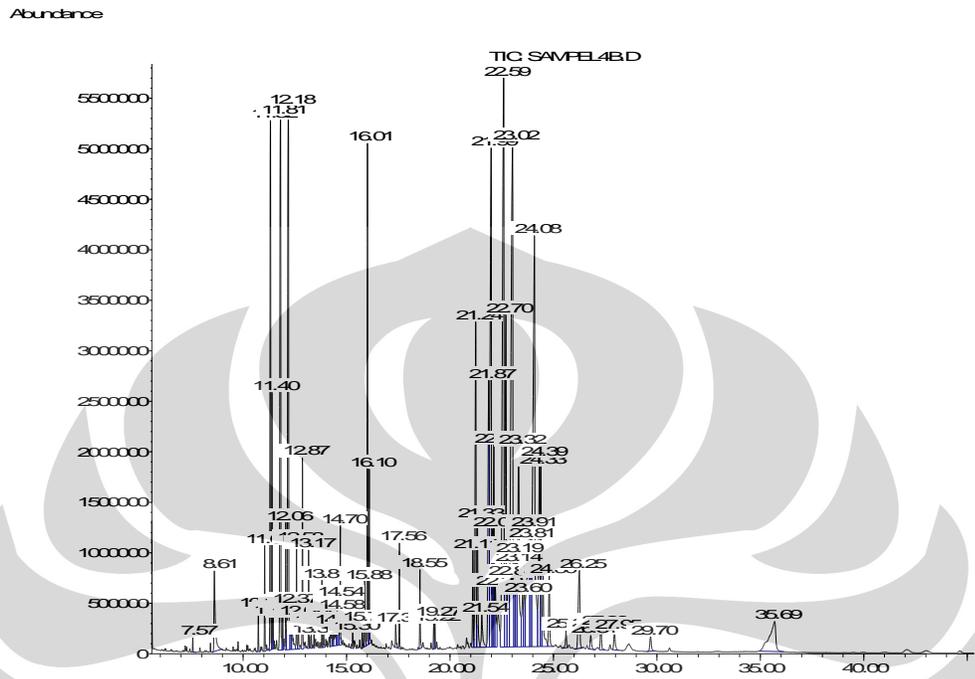
Abundance



m/z->

Lampiran 6

Kromatogram GC-MS senyawa hasil reaksi cis-isoegenol



Lampiran 7

Bagan kerja isolasi enzim dari *Raphanus sativus* L.

