

**IDENTIFIKASI SENYAWA PRODUK OKSIDATIF KOPLING ISOEUGENOL
DENGAN KATALIS ENZIM LAKASE DARI JAMUR TIRAM PUTIH
(*Pleurotus ostreatus*) DAN UJI AKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIOKSIDAN**

RISKA LUTHFIANA PUSPITA

0304030464



UNIVERSITAS INDONESIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

DEPARTEMEN KIMIA

DEPOK

2008

**IDENTIFIKASI SENYAWA PRODUK OKSIDATIF KOPLING ISOEUGENOL
DENGAN KATALIS ENZIM LAKASE DARI JAMUR TIRAM PUTIH
(*Pleurotus ostreatus*) DAN UJI AKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIOKSIDAN**

Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

oleh:

Riska Luthfiana Puspita

0304030464



DEPOK

2008

SKRIPSI : IDENTIFIKASI SENYAWA PRODUK OKSIDATIF KOPLING
ISOEUGENOL DENGAN KATALIS ENZIM LAKASE DARI
JAMUR TIRAM PUTIH (*Pleurotus ostreatus*) DAN UJI
AKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIOKSIDAN

NAMA : RISKALUTHFIANA PUSPITA

NPM : 0304030464

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, DESEMBER 2008



Dr. HERRY CAHYANA

PEMBIMBING I

Tanggal Lulus Ujian Sidang Sarjana :

Penguji I :

Penguji II :

Penguji III :

KATA PENGANTAR

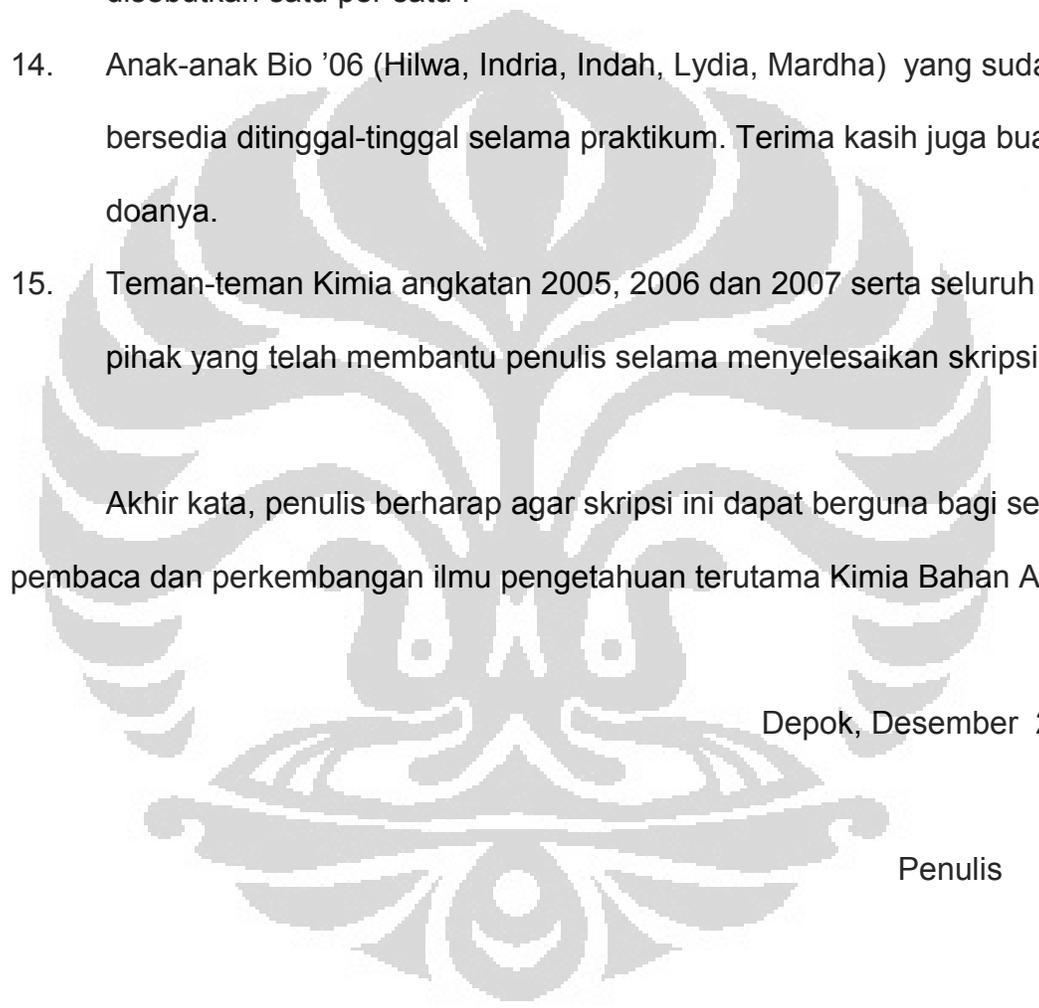
Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah memberikan berkah dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini.

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

Dalam kesempatan ini, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dr. Herry Cahyana selaku Pembimbing I yang telah membimbing dan memberikan saran serta bantuan kepada penulis selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
2. Dr. Ridla Bakri selaku Ketua Departemen Kimia FMIPA UI dan Pembimbing Akademis.
3. Dra. Tresye Utari, M.Si selaku Koordinator Penelitian Departemen Kimia FMIPAUI.
4. Bapak dan ibu atas segala cinta, pengorbanan, dukungan, perhatian, dan doa yang selama ini telah diberikan. Adikku reza yang walaupun terlihat cuek tapi sebenarnya selalu memberikan perhatian dan dukungan.

5. Bpk. Jaswanto dan mba Eti selaku operator GC-MS PUSLABFOR Mabes Polri, yang telah meluangkan waktunya untuk membantu penulis selama penelitian.
6. Eyang, tante Hestin, tante Mimin, tante Tuti dan seluruh keluarga besar di Purwokerto dan Banyuwangi.
7. Sahabat terbaikku, Chacha, terima kasih untuk tidak pernah lelah mendengarkan cerita dan keluh kesahku juga untuk semua tawa dan air mata yang dibagi selama ini.
8. Sahabat-sahabatku dari kecil : Ica, Anggrie, Ninie untuk dukungan dan persahabatan indah yang telah terjalin.
9. Khusus untuk Ika, Fajriah dan Habibah, terima kasih sudah membuat hari-hari di lantai 4 menjadi ceria dengan kehadiran kalian.
10. Teman-teman penelitian lantai 4 dan 3 (S1 dan Ekstensi) atas segala bantuannya selama penulis melakukan penelitian : Indah, Yunita, Visti, Alex, Ridlo, Redi, Andi, Vena, Imel, Weri, Riza.
11. Kak Puji, seseorang yang dengan cepat bisa akrab menjadi teman sekaligus kakak. Terima kasih untuk doa, semangat dan perhatian yang diberikan.
12. Rasyid dan kak Izul dari afiliasi yang telah membantu mengajarkan dan menjelaskan cara mengoperasikan instrumen UV-Vis dan GC.

- 
13. Tya dan Lindiyah (yang selalu bersedia memberikan informasi seputar penelitian), Cing2 (buat transfer ilmu dan masukannya), Ana, Farida, Ratih, Hamim, Nur, Niezha, Wakhid, Gentur, Wuri, Iman, Ima, QQ, Opik, Fitri, Ari dan semua teman-teman kimia 2004 yang tidak bisa disebutkan satu per satu .
 14. Anak-anak Bio '06 (Hilwa, Indria, Indah, Lydia, Mardha) yang sudah bersedia ditinggal-tinggal selama praktikum. Terima kasih juga buat doanya.
 15. Teman-teman Kimia angkatan 2005, 2006 dan 2007 serta seluruh pihak yang telah membantu penulis selama menyelesaikan skripsi ini.

Akhir kata, penulis berharap agar skripsi ini dapat berguna bagi setiap pembaca dan perkembangan ilmu pengetahuan terutama Kimia Bahan Alam.

Depok, Desember 2008

Penulis

ABSTRAK

Senyawa dimer dari golongan fenolik dapat dibentuk melalui reaksi oksidatif kopling dan diketahui mempunyai berbagai aktivitas biologis yang penting bagi manusia. Penelitian ini dilakukan untuk membentuk senyawa dimer dari isoeugenol dengan enzim lakase sebagai katalis dan hidroquinon sebagai mediator. Enzim lakase diisolasi dari jamur tiram putih dan mempunyai aktivitas spesifik sebesar 0,56 U/mg. Reaksi oksidatif kopling dilakukan dalam medium bifasa (etil asetat : buffer fosfat = 4:1). Hasil reaksi berupa cairan kental berwarna kuning dan mempunyai spot dengan Rf 0,62 dengan pengembang n-heksana : etil asetat = 2 : 1. Pemurnian dengan KLT preparatif, diperoleh endapan kuning sebesar 0,2092 g dengan rendemen 5,74 %. Identifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis diperoleh λ maksimum 289 nm. Hasil GC-MS menunjukkan bahwa terdapat senyawa yang diduga dimer isoeugenol dengan nilai m/z = 326 dalam produk reaksi pada waktu retensi 20,67 menit (luas area 26,10%). Dari uji aktivitas antioksidan, diketahui senyawa produk mempunyai kemampuan antioksidan lebih tinggi dibandingkan dengan isoeugenol, yaitu nilai IC₅₀ isoeugenol sebesar 81,32 μ g/mL dan produk sebesar 60,66 μ g/mL.

Kata kunci : dimer, oksidatif kopling, isoeugenol, lakase, antioksidan

xi + 75 hlm ; gbr, tbl, lamp

Bibliografi : 27 (1991-2008)

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	i
ABSTRAK.....	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
1.3 Hipotesis.....	3
1.4 Metode Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Jamur tiram putih.....	5
2.2 Enzim.....	7
2.2.1 Klasifikasi enzim.....	8
2.2.2 Aktivitas enzim.....	10
2.2.3 Enzim lakase.....	12
2.3 Senyawa fenolik.....	14
2.3.1 Lignan.....	15

2.3.2	Isoeugenol.....	17
2.4	Reaksi oksidasi kopling fenolik.....	19
2.4.1	Reaksi oksidasi kopling isoeugenol.....	20
2.5	Antioksidan.....	22
BAB III ALAT, BAHAN DAN CARA KERJA.....		27
3.1	Alat.....	27
3.2	Bahan.....	28
3.3	Cara Kerja.....	28
3.3.1	Isolasi Enzim.....	28
3.3.2	Pemurnian Enzim dengan Metode Pengendapan.....	29
3.3.3	Penentuan Kadar Protein Enzim (Metode Lowry).....	29
3.3.4	Penentuan Aktivitas Enzim Lakase.....	30
3.3.5	Reaksi Kopling Oksidasi Isoeugenol dengan Katalis Ezim Lakase.....	31
3.3.6	Isolasi Produk Reaksi.....	32
3.3.7	Uji KLT dan Pemisahan Komponen Campuran Produk.....	32
3.3.8	Uji aktivitas antioksidan.....	33
3.4	Bagan Kerja.....	34

3.4.1	Isolasi, pemurnian dan pengujian enzim.....	34
3.4.2	Reaksi oksidatif kopling isoeugenol.....	35
3.4.3	Uji aktivitas sebagai antoksidan.....	36
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....		37
4.1	Isolasi dan pemurnian Enzim	37
4.2	Reaksi oksidasi kopling isoeugenol dengan katalis enzim lakase.....	40
4.3	Identifikasi senyawa produk reaksi dengan instrumen.....	45
4.3.1	Identifikasi dengan spektrofotometer UV-Visibel.....	45
4.3.2	Identifikasi dengan GC-MS.....	47
4.4	Mekanisme reaksi pembentukan dehidroisoeugenol....	51
4.5	Uji aktivitas antioksidan.....	52
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....		58
5.1	Kesimpulan.....	58
5.2	Saran.....	59
.		
DAFTAR PUSTAKA.....		60
LAMPIRAN.....		64

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 2.1 Jamur tiram putih.....	6
Gambar 2.2 Interaksi enzim dengan substrat.....	8
Gambar 2.3 Struktur molekul mediator.....	13
Gambar 2.4 Mekanisme reaksi oksidasi yang dikatalisis enzim lakase.....	14
Gambar 2.5 Struktur beberapa senyawa fenolik.....	15
Gambar 2.6 Struktur lignan.....	16
Gambar 2.7 Struktur neolignan	16
Gambar 2.8 Struktur oksineolignan.....	17
Gambar 2.9 Resonansi radikal pada isoeugenol.....	20
Gambar 2.10 Reaksi oksidasi kopling isoeugenol.....	21
Gambar 2.11 Tahapan reaksi yang melibatkan radikal bebas.....	22
Gambar 2.12 Pembentukan lipid peroksida.....	23
Gambar 2.13 Mekanisme tahapan oksidasi lipid.....	24
Gambar 2.14 Mekanisme kerja antioksidan.....	25
Gambar 2.15 Mekanisme antioksidan sebagai prooksidan.....	26

Gambar 4.1 Ekstrak enzim lakase kasar dan pengendapan enzim.....	38
Gambar 4.2 Skema reaksi yang dikatalisis oleh lakase dan mediator....	40
Gambar 4.3 Hasil pengamatan reaksi dengan dan tanpa enzim.....	41
Gambar 4.4 Produk reaksi yang dilarutkan dalam etil asetat dan setelah dipekatkan.....	42
Gambar 4.5 Hasil KLT isoeugenol dan produk kasar.....	43
Gambar 4.6 Kristal isolat produk.....	45
Gambar 4.7 Spektrum UV isoeugenol dan isolat produk.....	46
Gambar 4.8 Alat GC-MS.....	48
Gambar 4.9 Spektrum GC dari senyawa produk reaksi.....	48
Gambar 4.10 Perbandingan fragmentasi peak pada waktu retensi 20,67 dengan database.....	50
Gambar 4.11 Mekanisme reaksi pembentukan dehidroisoeugenol...	52
Gambar 4.12 Perubahan warna pada DPPH.....	53
Gambar 4.13 Grafik perbandingan nilai IC ₅₀ dari isoeugenol dan senyawa produk.....	55
Gambar 4.14 Mekanisme penangkapan radikal DPPH.....	56

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 2.1 Klasifikasi enzim.....	6
Tabel 4.1 Hasil pengukuran dan perhitungan kadar protein dan aktivitas spesifik enzim lakase.....	40
Tabel 4.2 Hasil pengukuran UV isoeugenol dan isolat produk.....	47
Tabel 4.3 Hasil pengukuran GC-MS.....	49
Tabel 4.4 % inhibisi radikal bebas isoeugenol dan senyawa produk.....	54

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1 Penentuan kadar protein	64
Lampiran 2 Spektrum UV-Visibel dan perhitungan aktivitas spesifik enzim.....	66
Lampiran 3 Kromatogram GC dari senyawa produk.....	67
Lampiran 4 Kromatogram MS dari puncak dengan waktu retensi 20,67.....	68
Lampiran 5 Kondisi alat dari GC-MS.....	69
Lampiran 6 Data pengukuran aktivitas antioksidan dari isoeugenol dan senyawa produk	71
Lampiran 7 Grafik aktivitas antioksidan isoeugenol dan senyawa produk.....	73
Lampiran 8 Penentuan % inhibisi radikal bebas	74
Lampiran 9 Penentuan nilai IC ₅₀	75

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Senyawa bahan alam merupakan senyawa kimia yang disintesis oleh tumbuhan dan pada umumnya dikenal sebagai metabolit sekunder. Walaupun tidak berperan dalam proses pertumbuhan dan perkembangan, tetapi metabolit sekunder dalam tumbuhan memiliki fungsi penting terutama untuk perlindungan diri dari spesies lain yang mengancam kelangsungan hidupnya. Seiring dengan perkembangannya ternyata senyawa bahan alam juga memiliki fungsi lain terutama bagi manusia. Dalam beberapa dekade terakhir ini, telah banyak senyawa yang berhasil diisolasi dari tanaman dan diketahui memiliki aktivitas biologis yang beragam seperti antioksidan dan antikanker¹. Senyawa bahan alam hasil isolasi tersebut kemudian digunakan manusia sebagai obat yang berkhasiat menyembuhkan bermacam penyakit. Selain sebagai obat, senyawa-senyawa bioaktif ini juga digunakan produksi pestisida dan insektisida.

Senyawa turunan fenolik merupakan salah satu metabolit sekunder yang mempunyai variasi struktur yang beragam dan banyak ditemui pada berbagai jenis tumbuhan.

Selain disintesis sebagai senyawanya, golongan fenolik juga dapat diubah menjadi bentuk dimernya dengan bantuan enzim di dalam tumbuhan. Senyawa dimer dari fenolik ini belakangan diketahui juga memiliki aktivitas biologis tertentu seperti antioksidan. Oleh karena itu, saat ini semakin banyak dikembangkan produksi senyawa bioaktif mengacu pada proses yang terjadi secara alami di dalam tumbuhan.

Pembentukan dimer dari senyawa turunan fenolik seperti isoeugenol dapat terjadi melalui reaksi oksidasi kopling. Reaksi ini melibatkan suatu enzim dari golongan oksidoreduktase sebagai katalis. Dari beberapa penelitian sebelumnya telah berhasil disintesis produk dimer dari isoeugenol dengan katalis enzim peroksidase^{2,3}. Selain itu, telah berhasil pula disintesis produk dimer dari isomernya, eugenol, dengan katalis enzim lainnya yaitu lakase⁴.

Enzim lakase memiliki kemampuan mentransfer elektron antara dua sistem redoks. Proses transfer elektron inilah yang menyebabkan terjadinya oksidasi kopling pada senyawa fenolik. Penggunaan lakase sebagai katalis

oksidasi fenolik mempunyai keuntungan yaitu lebih spesifik dan mudah terbiodegradasi sehingga lebih ramah lingkungan ⁵.

1.2 Tujuan Penelitian

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

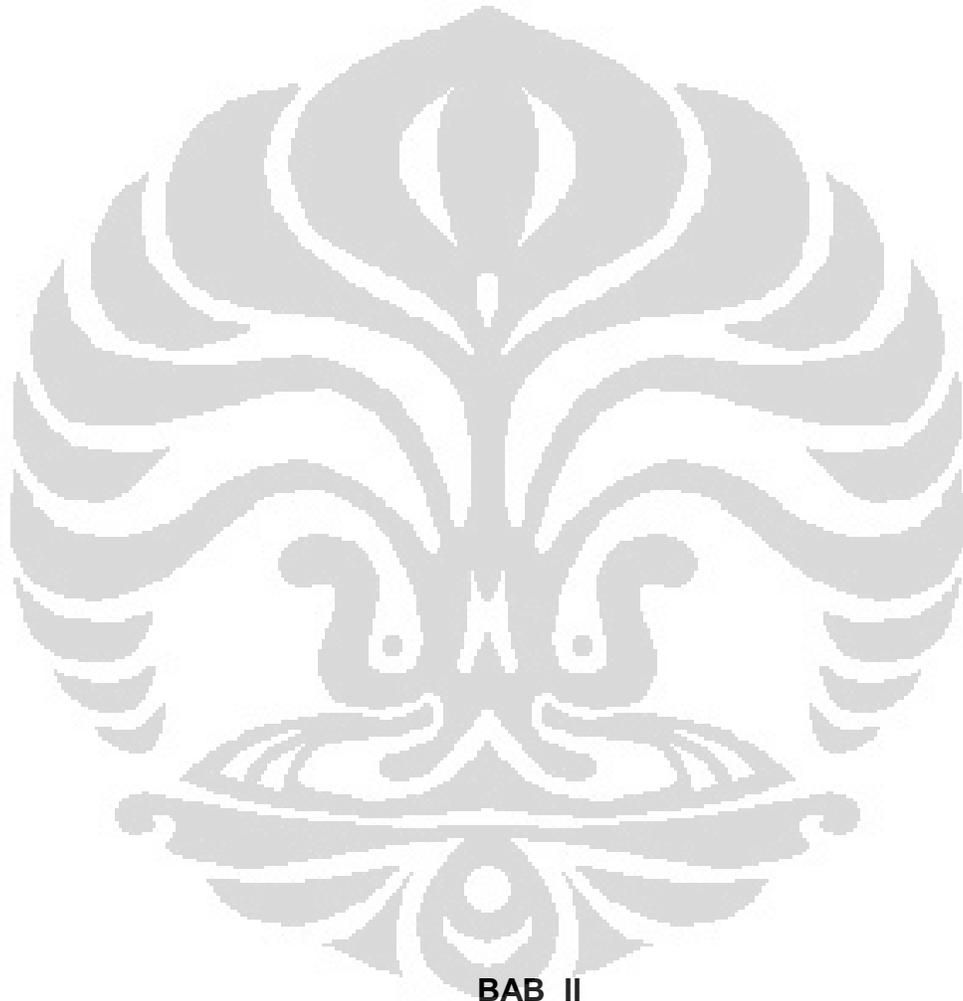
1.3 Hipotesis

1. Enzim lakase dapat mengkatalisis reaksi oksidatif kopling dari isoeugenol membentuk dimernya

2. Produk oksidatif kopling isoeugenol yang terbentuk diduga memiliki aktivitas biologis yang lebih besar sebagai antioksidan dibandingkan dengan isoeugenol.

1.4 Metode Penelitian

Enzim lakase dari media jamur tiram putih (*Pleurotus oestreatus*) diisolasi dengan menggunakan larutan buffer K-fosfat pH 6,0. Enzim kasar dimurnikan dengan cara pengendapan enzim akibat penambahan pelarut aseton dan *dry ice*. Enzim yang sudah dimurnikan diukur aktivitas enzim dan kadar proteinnya. Enzim lakase ini digunakan untuk mengkatalisis reaksi oksidasi isoeugenol dalam medium (buffer fosfat : etil asetat = 1: 4) dengan mediator hidroquinon dan produknya diekstrak dengan etil asetat. Produk reaksi dimurnikan dengan menggunakan KLT preparatif dengan pelarut pengembang n-heksana : etil asetat = 2 : 1 dan diidentifikasi dengan spektrofotometer UV-Visibel dan GC-MS. Selanjutnya produk reaksi diuji aktivitas biologisnya sebagai antioksidan yang dibandingkan dengan isoeugenol.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Jamur tiram putih

Jamur tiram putih yang dalam bahasa latin dinamakan *Pleurotus ostreatus* adalah jamur pangan dengan tudung berbentuk setengah lingkaran mirip cangkang tiram dengan bagian agak cekung dan berwarna putih hingga hitam. Selain sebagai campuran makanan, jamur tiram juga dapat digunakan sebagai bahan obat ⁶.

Di alam bebas, jamur tiram bisa dijumpai hampir sepanjang tahun di hutan pegunungan daerah yang sejuk. Tubuh buah terlihat saling bertumpuk di permukaan batang pohon yang sudah melapuk atau pokok batang pohon yang sudah ditebang. Saat ini, tingkat konsumsi jamur tiram semakin meningkat sehingga banyak dikembangkan dan dijual di pasaran. Jamur tiram yang banyak dijumpai di pasaran adalah jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*) tetapi ada juga jenis lain yang sudah dibudidayakan seperti yang berwarna merah jambu (*Pleurotus flabellatus*) dan hitam (*Pleurotus cystidiosus*).

Jamur tiram memiliki kandungan asam-asam amino esensial dan sejumlah vitamin penting yaitu vitamin B, C, dan provitamin D. Sementara kandungan mineral utamanya adalah kalium (K), fosfor (P), dan kalsium (Ca).

Taksonomi jamur tiram putih :

Kingdom : Fungi
Divisi : Basidiomycota
Kelas : Hymenomyces
Orde : Agaricales
Famili : Tricholomataceae
Genus : Pleurotus
Spesies : *Pleurotus ostreatus*



Gambar 2.1 Jamur tiram putih

2.2 Enzim ⁷

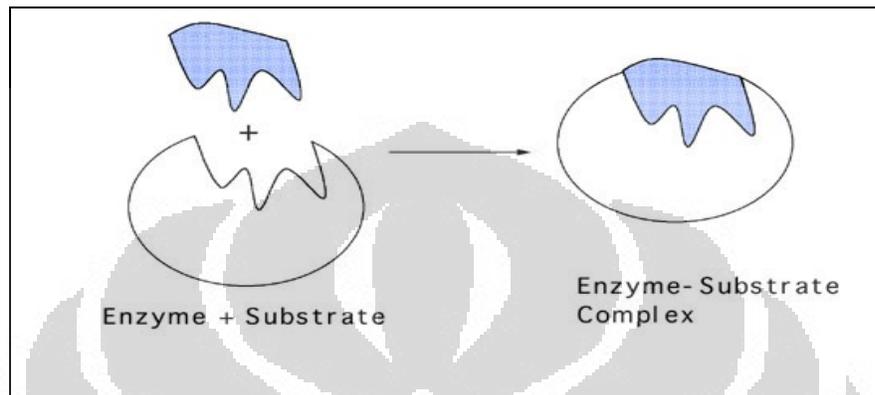
Enzim merupakan katalis biologis yang berfungsi untuk mempercepat reaksi-reaksi kimia yang terjadi terutama dalam sistem metabolisme di dalam sistem hidup tanpa mempengaruhi kesetimbangan reaksi. Enzim dapat

meningkatkan kecepatan reaksi kimia dengan cara menurunkan energi aktivasi yang diperlukan untuk menghasilkan suatu produk. Sebagian besar enzim termasuk dalam golongan protein. Molekul enzim biasanya juga mengikat suatu komponen non protein yang disebut kofaktor. Kofaktor bisa berupa molekul organik yang disebut koenzim atau ion logam.

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

Enzim bersifat spesifik baik terhadap substrat yang dikatalisis maupun produk reaksinya. Enzim hanya bekerja terhadap substrat tertentu dan dapat membedakan molekul-molekul dengan struktur yang sangat mirip. Karena

sebagian besar enzim merupakan protein, maka enzim juga bisa mengalami denaturasi. Enzim yang terdenaturasi akan mengurangi aktivitas katalitiknya.



Gambar 2.2 Interaksi enzim dengan substrat

2.2.1 Klasifikasi enzim ⁷

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

Tabel 2.1 Klasifikasi enzim

	Kelas Enzim	Jenis reaksi yang dikatalisis	Contoh
1.	Oksidoreduktase	Reaksi redoks (transfer elektron atau proton)	Lakase, Peroksidase, Laktat dehidrogenase
2.	Transferase	Transfer atom atau gugus antara dua molekul	Kinase
3.	Hidrolase	Reaksi hidrolisis	Protease, Lipase, Amilase
4.	Liase	Penambahan gugus fungsi pada ikatan rangkap (adisi) atau pembentukkan ikatan rangkap dengan pelepasan gugus fungsi.	Fumarase, Histidin dekarboksilase
5.	Isomerase	Pemindahan gugus dalam satu molekul yang menghasilkan bentuk isomer	Epimerase, Alanin rasemase
6.	Ligase	Pembentukkan ikatan C-C, C-S, C-O, dan C-N diikuti dengan pemutusan isofosfat dari ATP	Tiokinase, Glutamin sintase

2.2.2 Aktivitas enzim

Enzim memiliki aktivitas yang spesifik, yaitu hanya bekerja terhadap substrat tertentu dan dapat membedakan molekul-molekul dengan struktur yang sangat mirip. Aktivitas kuantitatif enzim berhubungan dengan jumlah (unit) enzim yang dibutuhkan untuk mengkatalisis reaksi. Satu unit enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang mampu mengkatalisis 1 μmol

substrat dalam 1 menit pada kondisi optimum. Sedangkan aktivitas spesifik enzim didefinisikan sebagai jumlah unit enzim yang terdapat dalam 1 mg protein. Aktivitas spesifik ini menunjukkan kemurnian suatu enzim. Semakin tinggi nilai aktivitas spesifiknya, menunjukkan makin murni pula enzim tersebut.

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain :

1. Pengaruh pH

Aktivitas enzim (kemampuan enzim untuk mengkatalisis suatu reaksi) bergantung pada besarnya pH. Enzim mempunyai aktivitas yang optimum pada suatu harga pH tertentu yang disebut juga pH optimum. Jika enzim berada pada pH yang lebih kecil daripada pH optimum, maka aktivitas enzim mengkatalitik reaksi belum optimal. Sebaliknya pada pH diatas pH optimum, enzim akan terdenaturasi karena rantai polipeptida akan terputus sehingga struktur protein akan membuka. Hal ini menyebabkan enzim tidak lagi mempunyai aktivitas katalitik.

2. Pengaruh konsentrasi substrat

Peranan enzim dalam mengkatalisis suatu reaksi sangat bergantung pada jenis substrat yang spesifik. Kontak antara substrat dengan enzim terjadi pada sisi aktif enzim. Kontak ini hanya mungkin terjadi apabila sisi aktif enzim

mempunyai ruang yang tepat untuk menampung substrat yang sesuai. Penambahan substrat akan semakin meningkatkan kontak yang terjadi pada sisi aktif aktif enzim sampai pada konsentrasi yang optimum. Pada konsentrasi ini, aktivitas enzim pun akan maksimum. Peningkatan konsentrasi substrat sampai melebihi konsentrasi optimumnya akan mengakibatkan aktivitas enzim menurun. Dalam hal ini, semua enzim yang ada sudah terikat dengan substrat sehingga kelebihan substrat bisa menghambat enzim.

3. Pengaruh suhu

Sebagian besar enzim merupakan golongan protein. Sama halnya dengan protein, pada temperatur yang tinggi enzim dapat mengalami denaturasi yang berakibat pada hilangnya fungsi kerja dari enzim tersebut.

4. Pengaruh Inhibitor

Inhibitor adalah suatu senyawa yang dapat menurunkan laju suatu reaksi enzimatik. Inhibitor ini dapat menghambat aktivitas enzim sehingga enzim tidak lagi dapat berfungsi sebagai katalis. Secara umum, inhibitor dibagi

menjadi dua jenis, yaitu inhibitor reversibel dan inhibitor irreversibel. Inhibitor reversibel terikat pada enzim secara reversibel dan dapat dilepas dari enzim dengan cara dialisis atau dengan menambah komponen lain. Inhibitor irreversibel terikat secara kuat dengan enzim dan derajat inhibisinya akan semakin kuat, sehingga tidak bisa dipisahkan dengan enzim tanpa merusaknya (menurunkan aktivitasnya).

2.2.3 Enzim lakase^{5,8,9}

Molekul enzim lakase (EC 1.10.3.2) terbentuk dari dimer atau tetramer glikoprotein dimana pada masing-masing monomernya terdapat empat atom Cu yang terdistribusi pada tiga sisi redoksnya. Lakase tersebar luas pada tanaman dan jamur.

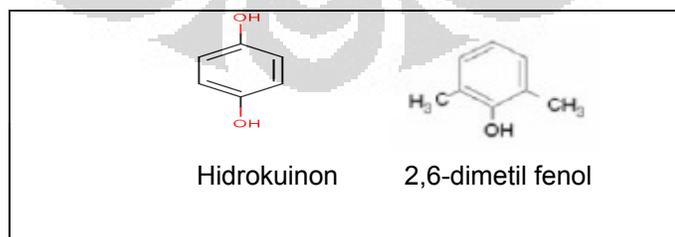
Lakase termasuk dalam golongan enzim oksidoreduktase yang dapat berperan sebagai katalis suatu reaksi reduksi- oksidasi. Lakase dapat mengoksidasi substrat yang sesuai dan spesifik seperti orto difenol, para difenol, aminofenol, polifenol, poliamina, lignin, dan aril diamina. Reaksi oksidasi ini terjadi melalui mekanisme transfer elektron tunggal. Sehingga akan dihasilkan suatu radikal substrat yang reaktif. Sementara itu, secara bersamaan molekul O₂ juga direduksi menjadi H₂O.

Teknik oksidasi enzimatik terutama yang menggunakan lakase telah banyak diaplikasikan pada berbagai bidang industri seperti tekstil, kertas dan

pulp, industri makanan serta nanobioteknologi. Aplikasi lainnya adalah untuk bioremediasi tanah dan kimia sintetik. Penggunaan lakase yang semakin berkembang luas ini terutama disebabkan karena tingkat spesifisitas yang tinggi terhadap produk yang dihasilkan. Selain itu, keuntungan lainnya yang didapat adalah reaksi yang dikatalisis oleh lakase termasuk ramah lingkungan karena hanya dihasilkan molekul air sebagai produk samping.

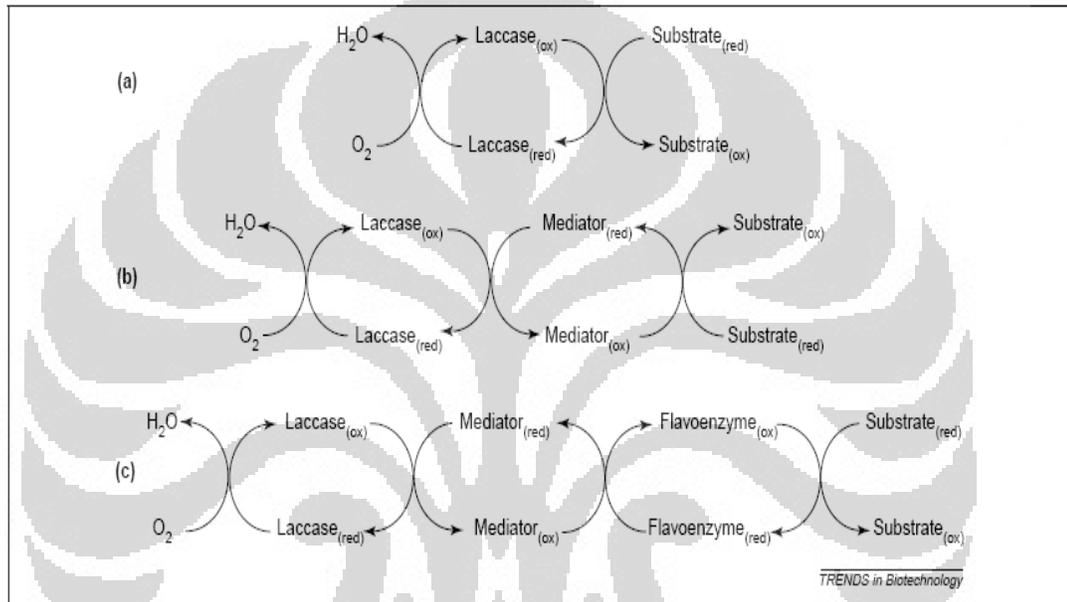
Sebagai katalis reaksi oksidasi, lakase mempunyai kespesifikan terhadap substrat untuk berbagai senyawa aromatik, terutama golongan fenolik. Kemampuan lakase untuk mengkatalisis reaksi oksidasi suatu substrat fenolik dapat ditingkatkan dengan adanya suatu mediator. Oksidasi enzimatik yang melibatkan lakase dan mediatornya disebut dengan *Laccase Mediated System (LMS)*.

Beberapa molekul senyawa organik maupun anorganik yang berukuran kecil dapat dijadikan sebagai mediator seperti senyawa tiol, derivat fenol aromatik, senyawaan N-hidroksi, dan ferrosianida. Mediator disini berperan sebagai elektron transfer yang akan dioksidasi oleh lakase dan selanjutnya mediator tereduksi ini yang akan mengoksidasi substrat.



Gambar 2.3 Struktur beberapa molekul sebagai mediator

Struktur mediator yang lebih kecil daripada substrat memungkinkan dapat dioksidasi oleh lakase. Mediator dalam bentuk teroksidasi ini selanjutnya dapat mengoksidasi substrat fenolik menjadi bentuk radikal yang reaktif melalui transfer elektron tunggal. Skema mekanisme reaksi oksidasi yang dikatalisis enzim lakase dapat dilihat pada gambar berikut :



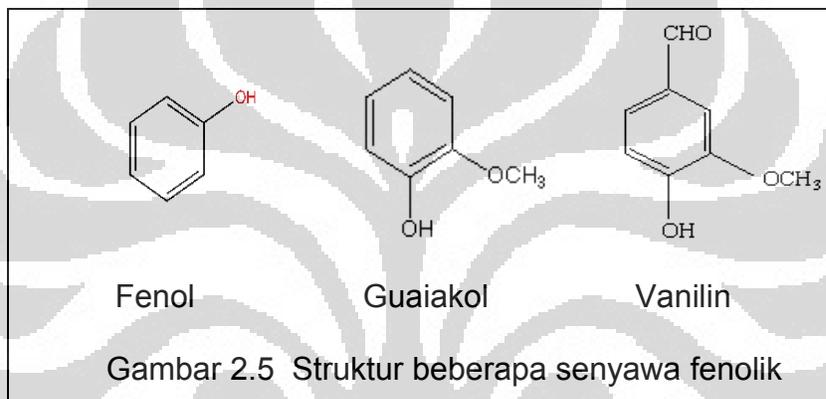
Gambar 2.4 Mekanisme reaksi oksidasi yang dikatalisis enzim lakase

2.3 Senyawa fenolik^{10,11}

Secara umum, senyawa fenolik didefinisikan sebagai senyawa yang memiliki kerangka dasar cincin aromatik yang mengikat satu atau lebih gugus hidroksil. Golongan senyawa fenolik ini mempunyai variasi struktur yang luas

dan beragam serta mudah ditemukan sebagai metabolit sekunder di hampir semua bagian tanaman mulai dari daun, bunga sampai buah .

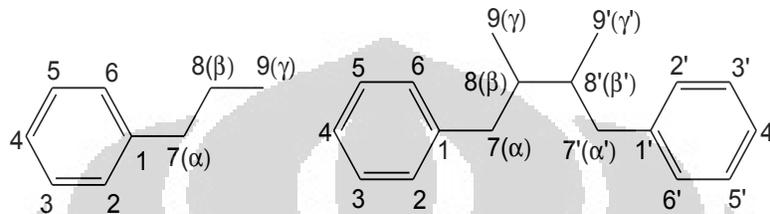
Senyawa fenolik biasanya terdapat dalam bentuk senyawa ester, eter, glikosida, dan sebagian besar termasuk ke dalam golongan flavonoid. Beberapa golongan senyawa fenolik yang sederhana antara lain fenol, vanillin, guaiakol dan asam kumarat.



2.3.1 Lignan ^{11,12,13}

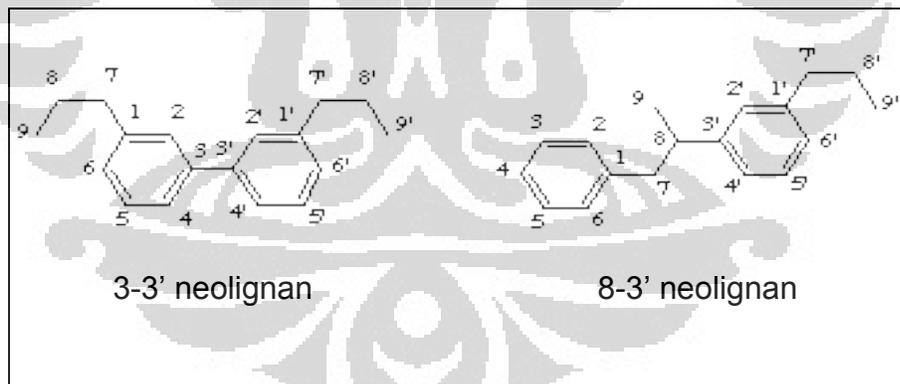
Derivat dari senyawaan fenolik yang mempunyai kerangka dasar C₆-C₃ adalah golongan fenil propanoid. Dua molekul fenil propanoid dapat bergabung membentuk dimernya melalui reaksi oksidasi kopling yang melibatkan radikal bebas. Dimer fenil propanoid yang demikian disebut

lignan. Struktur lignan terbentuk dengan adanya ikatan β - β atau 8-8 yang terjadi antara dua molekul senyawa fenil propanoid ¹⁰.

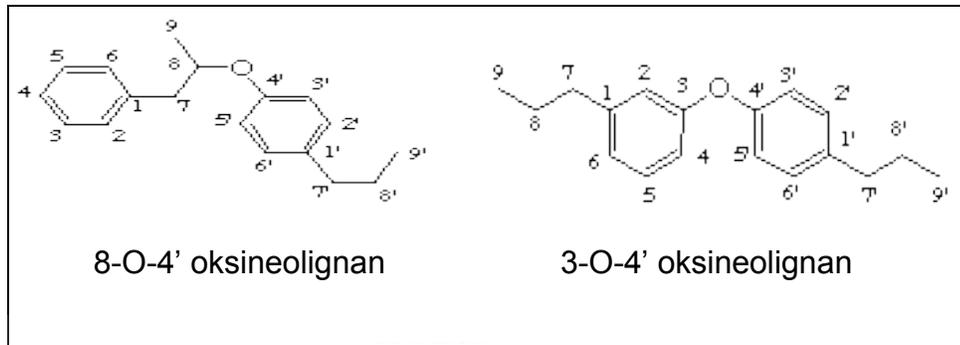


Gambar 2.6 Struktur lignan

Selain itu, penggabungan dua molekul fenil propanoid juga bisa terjadi pada ikatan 3-3' dan 8-3' yang disebut neolignan dan ikatan pada 8-O-4' dan 3-O-4' yang disebut oksineolignan.



Gambar 2.7 Struktur neolignan



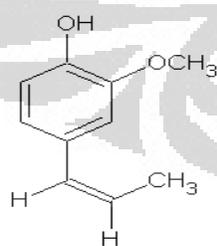
Gambar 2.8 Struktur oksineolignan

Senyawa lignan telah diketahui memiliki aktivitas biologis yang banyak dan beragam. Beberapa diantaranya memiliki aktivitas biologis sebagai antioksidan, antimikroba, alelopati, antiinflamatori, dan antikanker. Senyawa fenolik juga dapat bersifat racun terhadap hewan pemakan tumbuhan sehingga dapat dijadikan sebagai insektisida.

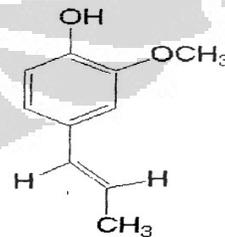
2.3.1 Isoeugenol

Struktur, sifat fisika dan kimia dari isoeugenol sebagai berikut ¹⁴ :

Struktur :



cis-isoeugenol



trans-isoeugenol

Nama trivial : Isoeugenol
Nama IUPAC : 4-hidroksi-3-metoksi-1-propenil benzena
Rumus : $C_{10}H_{12}O_2$
Bentuk fisik : Cairan kental berwarna kekuningan
Berat molekul : 164
Titik leleh : $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$
Titik didih : $266\text{ }^{\circ}\text{C}$
Titik nyala : $112\text{ }^{\circ}\text{C}$
Berat jenis : 1,077 g/L
Kelarutan dalam air : sedikit larut dalam air (1 mg/mL) tetapi larut dalam eter dan etanol

Isoeugenol merupakan isomer dari eugenol yang sama-sama terdapat dalam kandungan minyak cengkeh dan biji pala. Isoeugenol pada tanaman berasal dari senyawa turunan fenilpropanoid yang disintesis dari asam ferulat dan *coniferyl alcohol*.

Isoeugenol merupakan suatu alil fenol yang lebih tersubstitusi dan memiliki sistem terdelokalisasi elektron lebih besar daripada eugenol. Pada isoeugenol, ikatan rangkap di rantai samping membentuk sistem konjugasi dengan elektron π di dalam cincin benzena. Isoeugenol memiliki dua isomer

yaitu cis-iseugenol dan trans-iseugenol. Berdasarkan struktur ruangnya, cis-iseugenol mempunyai tegangan ruang yang lebih besar dibandingkan dengan trans-iseugenol akibat adanya tolakan gugus yang berdekatan. Karena pengaruh tegangan ruang itulah maka cis-iseugenol cenderung kurang stabil dibandingkan trans-iseugenol.

Isoeugenol mempunyai bau yang khas sehingga banyak digunakan dalam produksi parfum, sabun, deterjen, sampo, pewangi ruangan, dan kosmetik. Selain itu, isoeugenol juga luas digunakan di bidang kedokteran sebagai antiseptik lokal dan analgesik. Isoeugenol memiliki aktivitas biologis antara lain sebagai antioksidan, antiinflamatori, dan antikanker.

2.4 Reaksi oksidasi kopling ^{15,16}

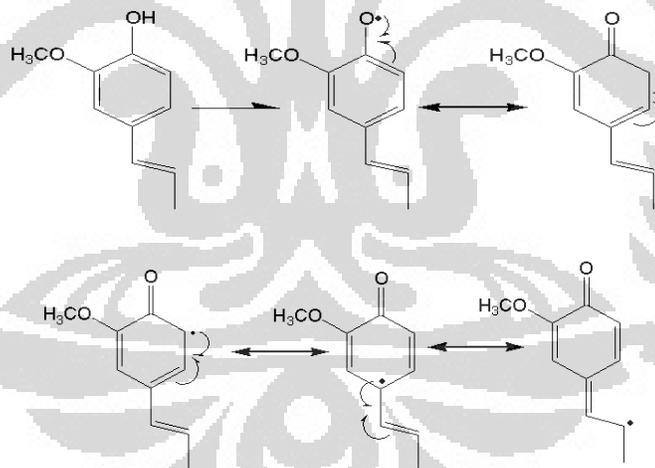
Reaksi oksidasi kopling adalah reaksi penggabungan dua molekul melalui reaksi oksidasi membentuk ikatan C-C atau C-O. Mekanisme reaksi oksidasi kopling dapat terjadi dengan bantuan katalis mengandung logam.

Secara umum, reaksi oksidasi kopling dibagi menjadi dua yaitu hetero kopling dan homokopling. Heterokopling adalah penggabungan dua molekul yang berbeda membentuk suatu molekul baru. Sedangkan homokopling adalah penggabungan dua molekul sejenis membentuk dimer atau oligomernya. Homokopling ini terutama banyak terjadi pada pembentukan dimer dan oligomer dari senyawa fenolik yang sangat penting pada

biosintesis bahan alam. Mekanisme oksidasi kopling ini melibatkan suatu radikal sebagai intermediet. Radikal ini bersifat reaktif dan mampu menyerang atau bergabung dengan radikal lainnya.

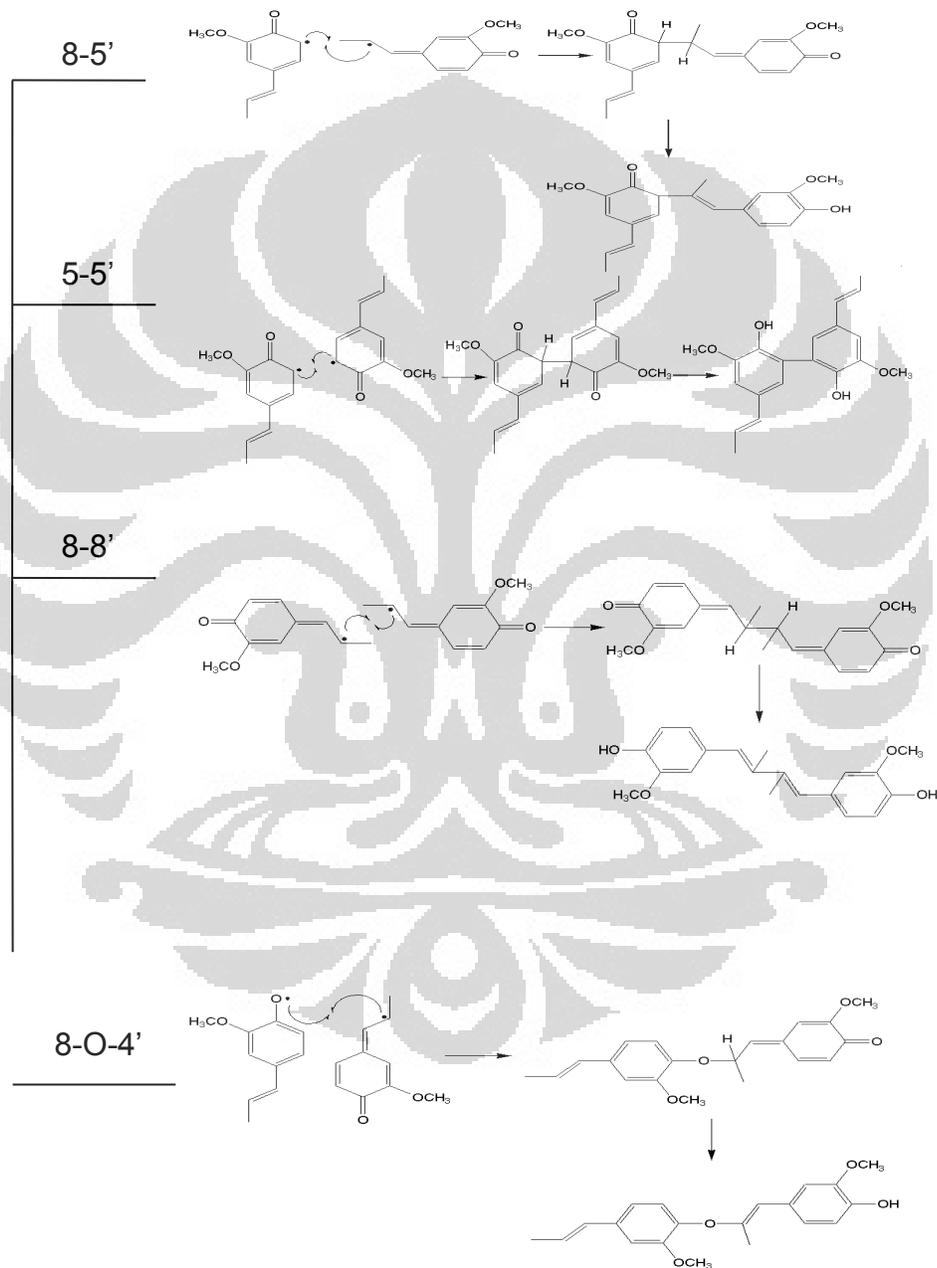
2.4.1 Reaksi oksidasi kopling isoeugenol ^{16,17}

Senyawa turunan fenil propanoid seperti isoeugenol dapat bergabung melalui reaksi oksidasi kopling dengan melibatkan radikal bebas. Kehadiran enzim lakase dapat mengoksidasi isoeugenol menjadi bentuk radikal. Radikal fenoksi isoeugenol yang terbentuk akan mengalami resonansi dan dapat bergabung membentuk suatu dimer isoeugenol.



Gambar 2.9 Resonansi radikal pada isoeugenol

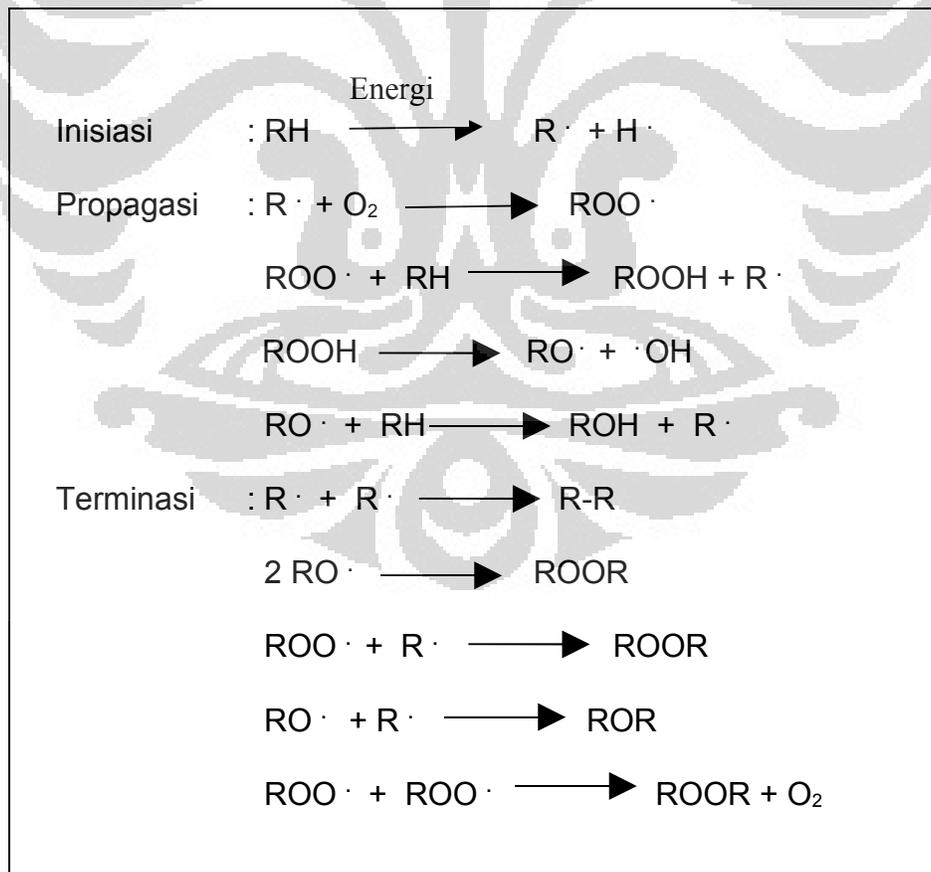
Dari kemampuan resonansi radikal fenoksi isoeugenol tersebut, maka ada 4 kemungkinan posisi penggabungan dua molekul isoeugenol yaitu :



Gambar 2.10 Reaksi oksidasi kopling isoeugenol

2.5 Antioksidan ^{18,19,20}

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



Gambar 2.11 Tahapan reaksi yang melibatkan radikal bebas

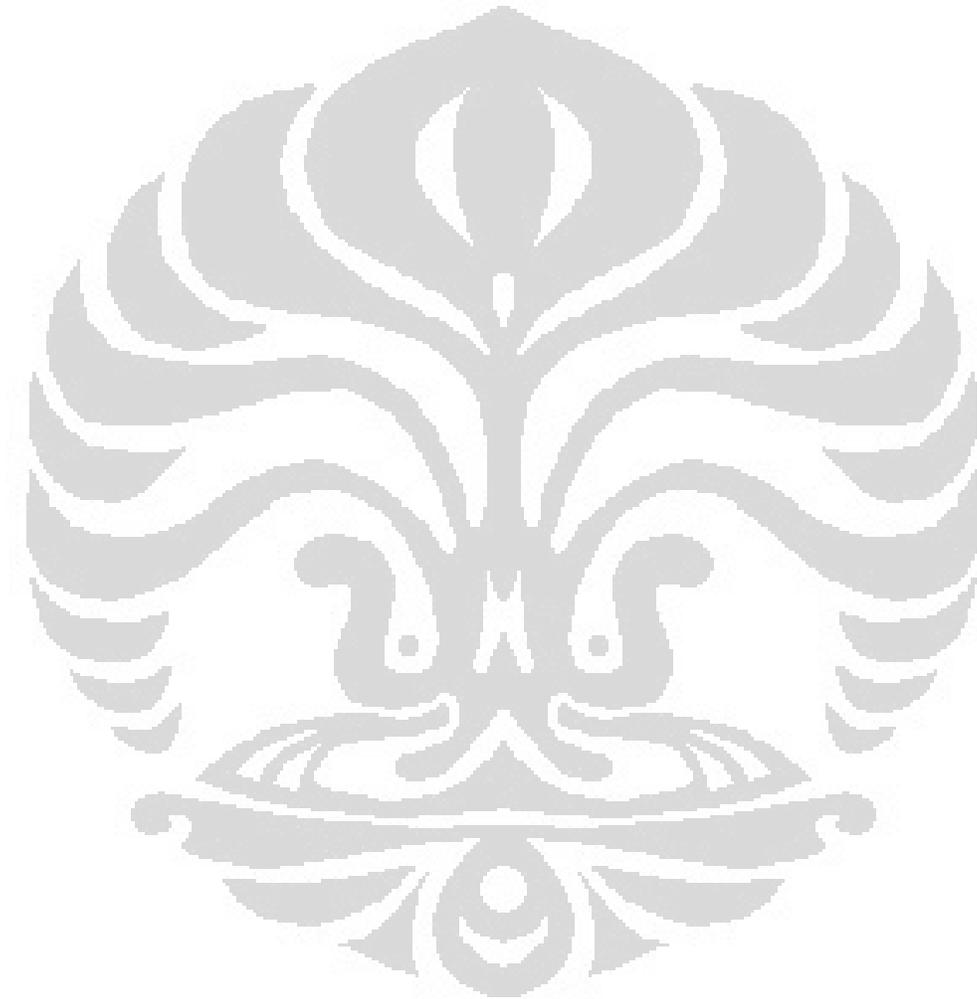
Radikal bebas dapat dihasilkan dari hasil metabolisme tubuh dan faktor eksternal seperti asap rokok, hemolisis, penyinaran ultra violet, zat kimiawi dalam makanan dan polutan lain. Di dalam tubuh, radikal bebas dapat menyerang molekul-molekul seperti DNA dan protein. Hal ini dapat mengakibatkan perubahan struktur DNA sehingga memicu munculnya sel-sel mutan. Bila perubahan DNA ini terjadi bertahun-tahun, maka dapat menjadi penyakit kanker.

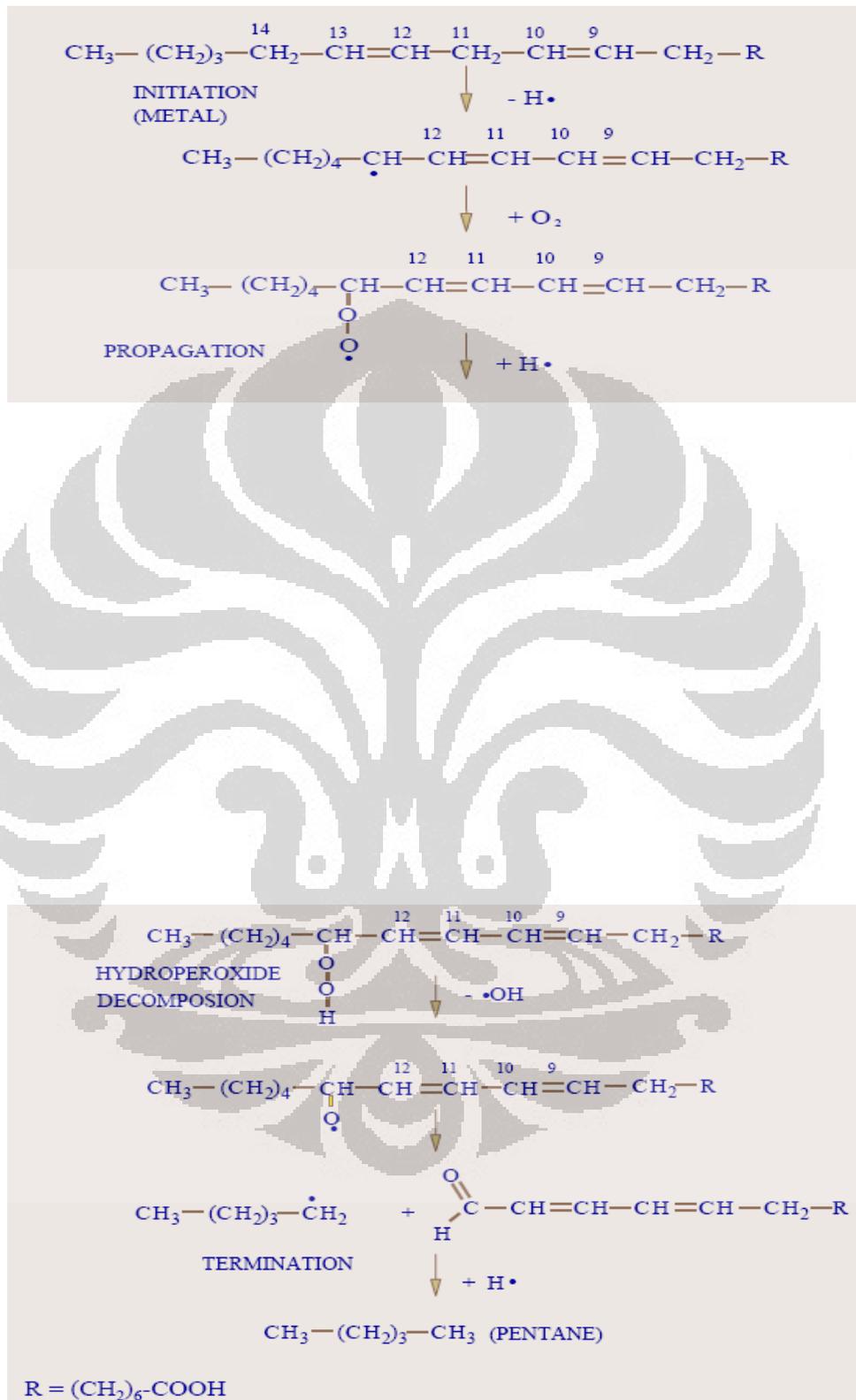
Pembentukan radikal bebas yang reaktif dapat terjadi pada proses oksidasi lipid baik di dalam maupun di luar tubuh kita. Oksidasi lipid menghasilkan hidroperoksida sebagai produk antara.



Gambar 2.12 Pembentukan lipid peroksida

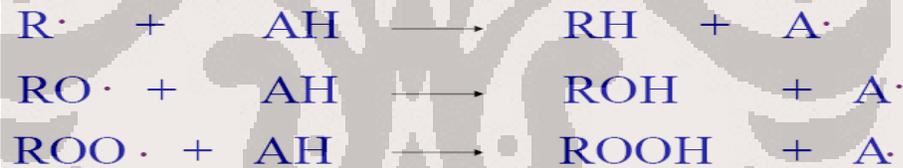
Pembentukan hidroperoksida ini secara umum melalui radikal bebas hasil inisiasi energi luar seperti panas, sinar atau senyawa kimia seperti ion logam dan metaloprotein.





Gambar 2.13 Mekanisme tahapan oksidasi lipid

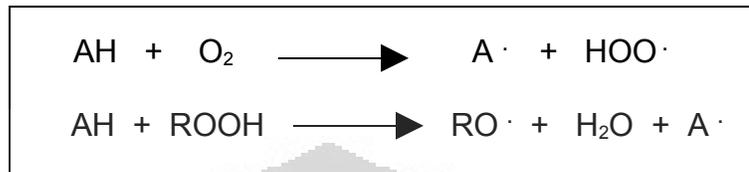
Secara umum, antioksidan didefinisikan sebagai suatu molekul atau senyawa yang mampu memperlambat atau mencegah oksidasi dari molekul atau senyawa lain. Antioksidan dapat bersifat sebagai *radical scavenger* dengan cara menangkap radikal bebas. Penangkapan atau inaktivasi radikal bebas yang terbentuk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



Gambar 2.14 Mekanisme kerja antioksidan

Radikal-radikal antioksidan ($A\cdot$) yang terbentuk pada reaksi tersebut relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipida lain membentuk radikal lipida baru.

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



Gambar 2.15 Mekanisme antioksidan sebagai prooksidan

Berdasarkan sumbernya, antioksidan dapat dikelompokkan menjadi dua jenis yaitu antioksidan sintetik dan antioksidan alami. Antioksidan sintetik adalah antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesis reaksi kimia. Beberapa contoh antioksidan sintetik yang sering digunakan yaitu butil hidroksi anisol (BHA), butil hidroksi toluen (BHT), propil galat, tert-butil hidroksi quinon (TBHQ) dan tokoferol.

Sedangkan antioksidan alami adalah antioksidan yang berasal dari makanan seperti buah dan sayuran atau senyawa yang langsung diisolasi dari bahan alam. Antioksidan alami tersebar di beberapa bagian tanaman, seperti pada kayu, kulit kayu, akar, daun, buah, bunga, biji dan serbuk sari. Senyawa antioksidan alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol dan asam-asam organik polifungsional.

BAB III

ALAT, BAHAN DAN CARA KERJA

3.1 Alat

1. Blender
2. Beaker glass
3. Gelas ukur
4. Batang pengaduk
5. Neraca
6. Kain penyaring
7. Kertas saring
8. pH meter
9. Lemari pendingin
10. Termometer
11. Tabung reaksi
12. Alat dan tabung sentrifuge
13. Pipet tetes
14. Pipet kapiler
15. Pengaduk magnet dan stirrer
16. Penangas air
17. Plat KLT
18. Cawan porselein
19. Kaca arloji
20. Spektrofotometer UV-Visibel
21. GC-MS

3.2 Bahan

1. Jamur tiram putih
2. Buffer K-fosfat pH 6,0
3. Isoeugenol
4. Es
5. Aseton
6. *Dry ice*
7. Aquades
8. Katekol
9. BSA
10. NaOH 0.1 N
11. Pereaksi Folin Ciocalteu
12. K-Na Tartrat 1%
13. Na₂CO₃
14. CuSO₄.5H₂O
15. Na₂SO₄ anhidrat
16. Metanol
17. Hidrokuinon
18. Etil asetat
19. n-heksana
20. Silika gel

3.3 Cara kerja

3.3.1 Isolasi enzim lakase

Sebanyak 300 gram jamur tiram putih diblender dalam larutan buffer K-fosfat pH 6,0 kemudian pada suhu 0-5 °C. Setelah itu, homogenat disaring menggunakan kain penyaring dan filtrat yang diperoleh disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak enzim kasar yang selanjutnya akan dimurnikan dengan aseton dan *dry ice*.

3.3.2 Pemurnian enzim dengan metode pengendapan

Ke dalam larutan aseton ditambahkan sejumlah *dry ice* hingga suhunya di bawah 0°C. Lalu ekstrak enzim kasar yang telah diperoleh dicampurkan dengan aseton dimana perbandingan aseton : enzim kasar (3:1). Larutan dibiarkan beberapa lama sampai mengendap. Campuran disentrifugasi dan endapan yang diperoleh dipisahkan dari filtratnya. Endapan tersebut lalu disuspensikan dalam buffer K-fosfat pH 6,0 dan disebut larutan enzim fraksi I. Suspensi dari enzim fraksi I ini kemudian ditentukan aktivitas enzim dan kadar proteinnya.

3.3.3 Penentuan kadar protein enzim (metode Lowry)

Pada penentuan kadar protein dari enzim ini dilakukan dengan menggunakan pereaksi Lowry yang terdiri dari :

- A. 2 g Na_2CO_3 dalam 100 mL NaOH 0,1 N
- B. 0,25 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam 50 mL larutan K-Na Tartrat 1 %
- C. Campuran 50 mL larutan A dan 1 mL larutan B (dibuat segar)
- D. Pereaksi Folin Ciocalteu 1 N

Ke dalam 1 mL larutan enzim lakase fraksi I ditambahkan 5 mL larutan C, lalu diaduk hingga merata dan dibiarkan selama 10 menit. Setelah itu, ditambahkan lagi 0,5 mL pereaksi D dan dibiarkan selama 30 menit.

Serapannya diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 470 nm. Sebagai larutan standar digunakan BSA dengan variasi konsentrasi 0,0625 ; 0,125 ; 0,250 ; 0,500 ; 0,750 ; 1,00 mg/mL. Pada pengukuran blanko, larutan enzim diganti dengan aquades.

3.3.4 Penentuan aktivitas enzim lakase

Penentuan aktivitas enzim lakase dilakukan dengan cara menambahkan 2 mL larutan buffer K-fosfat pH 6,0 ; 2,5 mL larutan katekol $2,0 \times 10^{-3}$ M ; 0,5 mL larutan enzim lakase fraksi I dan 0,5 mL aquademin ke dalam tabung reaksi. Tabung tersebut diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Setelah itu, tabung direndam di dalam beaker berisi air mendidih selama 1 menit untuk menghentikan aktivitas enzim. Larutan diukur

absorbansinya dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 470 nm.

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

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

Selain larutan sampel yang berisi enzim dan katekol sebagai substrat, disiapkan juga kontrol. Larutan kontrol terdiri dari 2 mL larutan buffer K-fosfat pH 6,0 ; 2,5 mL larutan katekol 2×10^{-3} M dan 0,5 mL aquades, lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 470 nm.

3.3.5 Reaksi oksidasi kopling isoeugenol dengan katalis enzim lakase

Disiapkan dua buah tabung reaksi yang berbeda yang masing-masing diisi dengan campuran etil asetat dan buffer fosfat sebagai medium bifasa dengan perbandingan etil asetat : buffer fosfat (4:1). Tabung pertama diisi dengan 1 mL hidroquinon (0,5 mg/mL) dan 4 mL enzim fraksi I. Selanjutnya,

ke dalam masing-masing tabung ditambahkan 1 mL larutan isoeugenol.

Reaksi yang terjadi diamati secara kualitatif.

3.3.6 Isolasi produk reaksi

Media bifasa dibuat dengan mencampurkan buffer fosfat dan etil asetat dengan perbandingan buffer fosfat : etil asetat = 1:4. Ke dalamnya ditambahkan 20 mL larutan ekstrak enzim, 5 mL larutan isoeugenol dan 5 mL hidroquinon lalu diaduk selama 30 menit dan dibiarkan selama 48 jam. Endapan yang terbentuk dipisahkan dari larutannya dengan cara didekantasi. Selanjutnya endapan dilarutkan dalam etil asetat lalu dipekatkan dengan cara menguapkan pelarutnya pada suhu ruang. Senyawa produk reaksi dikeringkan dan ditimbang.

3.3.7 Uji KLT dan pemisahan komponen campuran produk

Teknik uji kromatografi lapis tipis (KLT) digunakan untuk mengidentifikasi komponen-komponen senyawa yang terdapat pada campuran produk kasar. Pelarut pengembang yang digunakan berupa n-heksana : etil asetat dengan variasi perbandingan 1 : 1, 2 : 1, 3 : 2, 4 : 1, dan 5 : 1. Dari variasi tersebut dicari perbandingan yang paling optimum.

Komponen senyawa dalam produk reaksi dapat dipisahkan dengan teknik KLT preparatif. Hasil pemurnian produk secara preparatif selanjutnya dianalisis dengan spektrofotometer UV-Visibel dan GC-MS serta diuji aktivitasnya sebagai antioksidan.

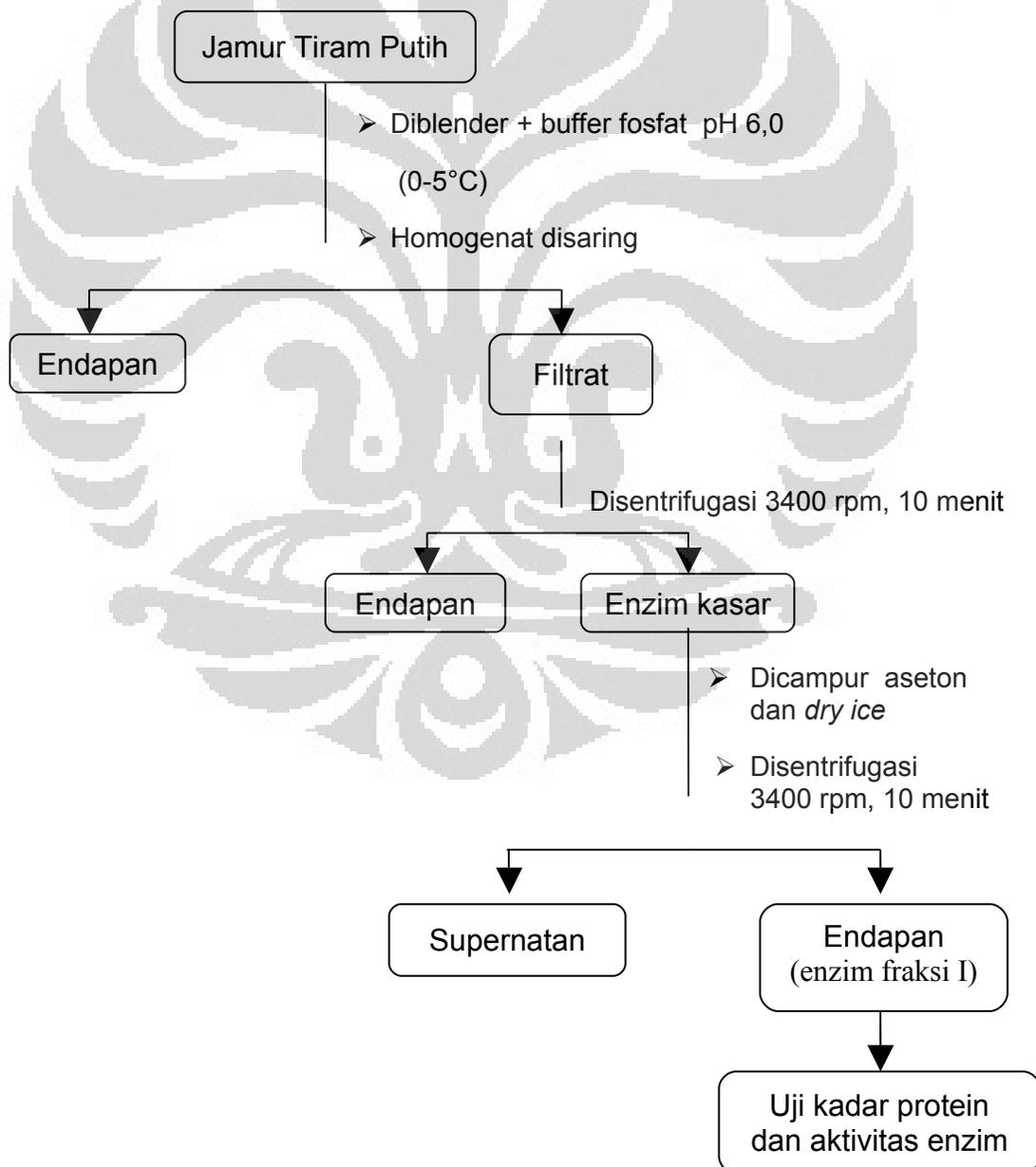
3.3.8 Uji aktivitas antioksidan

Larutan senyawa produk dalam metanol dan isoeugenol dibuat masing-masing dengan variasi konsentrasi 25 µg/mL, 50 µg/mL dan 100 µg/mL. Kemudian ke dalam 1 mL larutan produk dan isoeugenol dengan masing-masing konsentrasi tersebut ditambahkan 2 mL larutan DPPH dan 2 mL metanol. Sebagai kontrol, ditambahkan ke dalam tabung reaksi 2 mL DPPH dan 3 mL metanol.

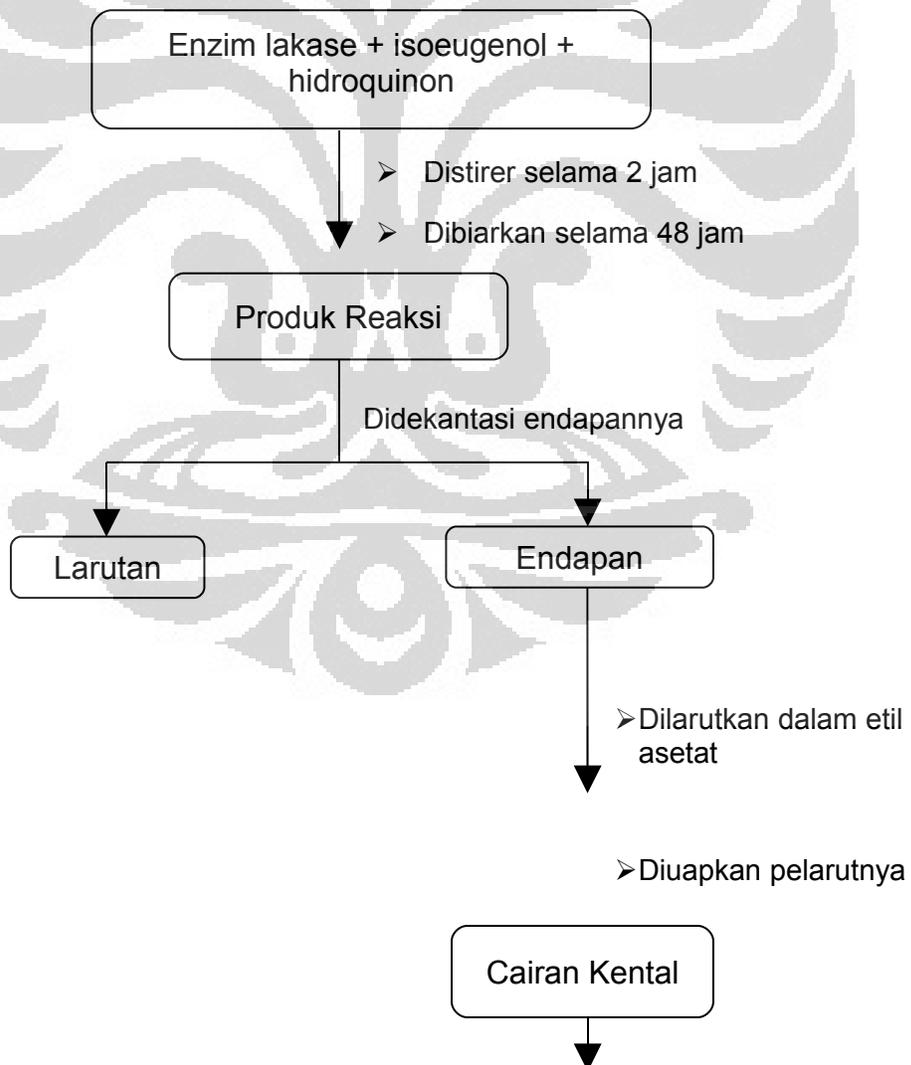
Semua larutan yang telah disiapkan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 515 nm setiap 5 menit sekali selama 35 menit.

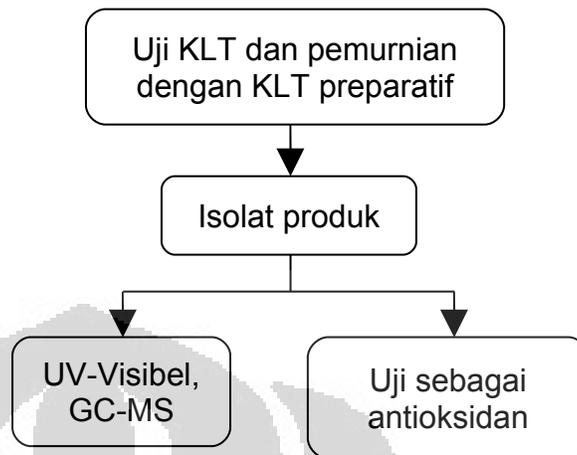
3.4 Bagan Kerja

3.4.1 Isolasi, pemurnian, dan pengujian enzim Lakase

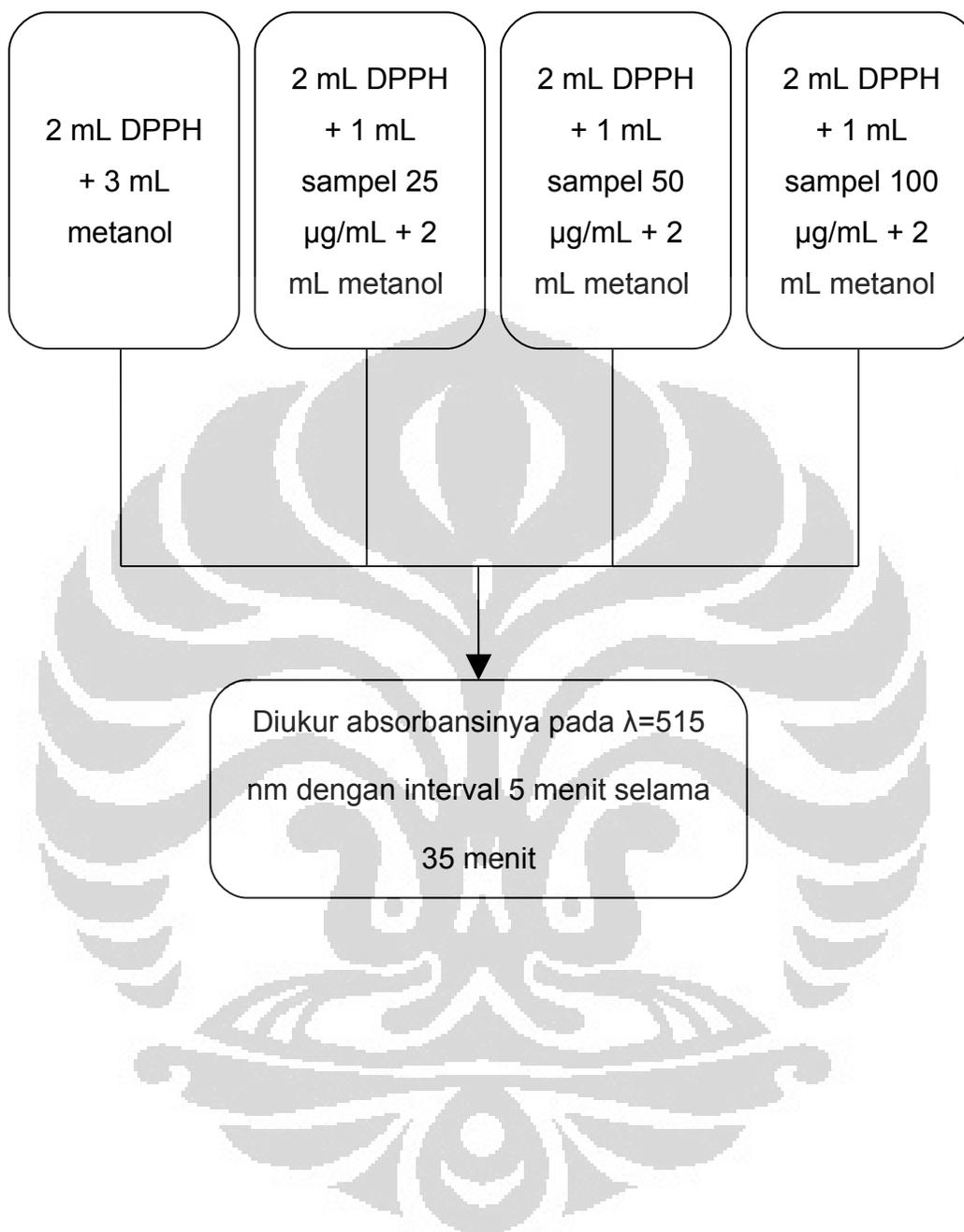


3.4.2 Reaksi oksidatif kopling isoeugenol





3.4.3 Uji aktivitas sebagai antioksidan



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi dan pemurnian enzim

Enzim lakase diisolasi dari jamur tiram putih sebanyak 300 gram yang dihaluskan dengan blender dalam larutan buffer K-fosfat pH 6,0 pada suhu 0-5 °C. Penambahan buffer K-fosfat pH 6,0 berfungsi untuk mempertahankan aktivitas enzim dan struktur protein dengan tidak memotong rantai polipeptidanya karena umumnya pH 6,0 merupakan pH optimum untuk enzim lakase⁴. Isolasi juga dilakukan pada suhu 0-5 °C untuk mencegah terdenaturasinya enzim pada suhu yang lebih tinggi. Hasil penghalusan disaring dengan kain untuk memisahkan filtrat dan endapannya. Filtrat disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit dan diambil supernatannya. Supernatannya ini selanjutnya disebut sebagai ekstrak enzim lakase kasar. Ekstrak enzim lakase kasar yang didapat berupa cairan berwarna kuning sebanyak 250 mL.

Selanjutnya, enzim lakase kasar yang diperoleh dimurnikan dengan menambahkan pelarut aseton dan *dry ice*. Prinsip pemurnian ini didasarkan pada kelarutan enzim yang rendah dalam aseton. Mula-mula molekul enzim tersolvasi oleh molekul air. Dengan penambahan aseton, solvasi enzim oleh air semakin berkurang karena molekul air ditarik oleh aseton. Lama kelamaan

molekul enzim yang tidak lagi tersolvasi air akan jatuh ke bawah dan mengendap. Penambahan sejumlah *dry ice* adalah untuk menjaga suhu agar tetap rendah karena campuran *dry ice* dan aseton dapat menghasilkan suhu sampai di bawah 0 °C. Dengan demikian, diharapkan enzim tidak akan terdegradasi. Enzim lakase murni yang didapatkan berupa endapan berwarna putih kecoklatan. Endapan ini kemudian disuspensikan dalam buffer K-fosfat pH 6,0 dan disebut sebagai larutan enzim fraksi I .



Gambar 4.1 Ekstrak enzim lakase kasar dan pengendapan enzim

Enzim lakase yang telah dimurnikan ini kemudian ditentukan kadar protein dan aktivitas spesifiknya. Pengukuran kadar protein dilakukan dengan metode Lowry. Prinsip dasar dari metode Lowry ini adalah pembentukan kompleks dari protein yang direaksikan dengan CuSO_4 . Inkubasi pada

larutan bertujuan untuk menyempurnakan reaksi dan juga mendapatkan kondisi aktivitas yang optimum. Penambahan pereaksi folin menyebabkan terjadinya reaksi oksidasi-reduksi pada gugus triptofan dan tirosin dari protein sehingga menghasilkan suatu warna biru yang sensitif. Kemudian larutan berwarna biru ini diukur absorbansinya pada panjang gelombang 750 nm. Sebagai standar digunakan larutan BSA (*Bovine Serum Albumine*) dengan variasi konsentrasi 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1 mg/mL. Dengan perlakuan yang sama, larutan standar juga diukur absorbansinya pada panjang gelombang 750 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh lalu diplot untuk membuat kurva kalibrasi standar yang dapat dipakai persamaannya untuk menghitung kadar protein dari enzim lakase.

Penentuan aktivitas enzim lakase dilakukan dengan menggunakan substrat dari golongan fenolik seperti katekol. Katekol sebagai substrat berfungsi untuk mengaktifkan aktivitas katalitik dari enzim lakase. Sama halnya seperti substrat fenolik lainnya, katekol juga akan dioksidasi oleh enzim lakase. Larutan katekol dan enzim lakase diinkubasi pada suhu 30 °C selama 30 menit supaya reaksi berjalan lebih optimum. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya⁴. Larutan direndam dalam air mendidih selama 3 menit untuk menghentikan aktivitas enzimnya, lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 470 nm. Perhitungan kadar protein dan aktivitas spesifik enzim lakase dapat dilihat pada lampiran 1 dan 2. Sementara hasil

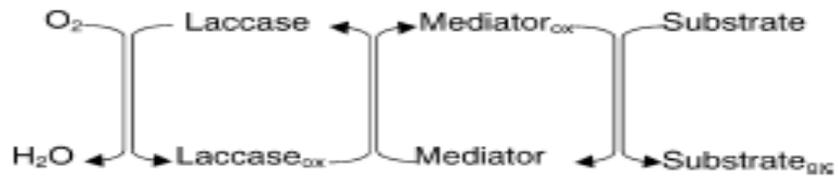
pengukuran dan perhitungan kadar serta aktivitas enzim lakase dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil pengukuran dan perhitungan kadar protein dan aktivitas spesifik enzim lakase

Absorbansi pada $\lambda = 750 \text{ nm}$	Kadar protein	Absorbansi pada $\lambda = 470 \text{ nm}$	Aktivitas spesifik enzim
0,699	0,39 mg/ml	1,43216	0,56 unit/mg protein

4.2 Reaksi oksidasi kopling isoeugenol dengan katalis enzim lakase

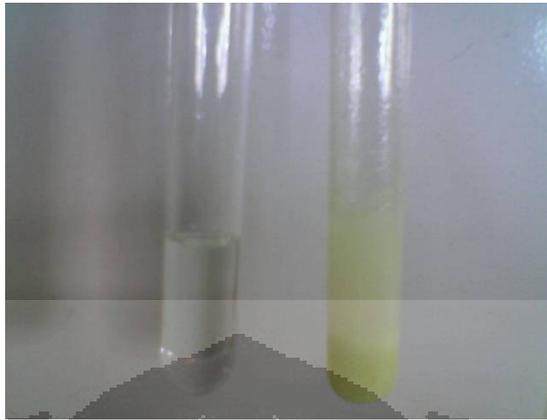
Pembentukan produk oksidasi kopling isoeugenol dapat terjadi dengan adanya enzim lakase sebagai katalis dan bantuan mediator seperti hidroquinon. Mediator hidroquinon berperan sebagai *electron transfer* yang akan teroksidasi lebih dahulu menjadi radikal hidroquinon. Molekul hidroquinon yang kecil memungkinkannya untuk berinteraksi dengan enzim lebih mudah dibandingkan substrat. Radikal hidroquinon yang reaktif ini kemudian dapat mengoksidasi substrat fenolik seperti isoeugenol menjadi radikal isoeugenol. Sementara itu O_2 bertindak sebagai akseptor hidrogen dan tereduksi menjadi H_2O .



Gambar 4.2 Skema reaksi yang dikatalisis oleh lakase dan mediator

Reaksi oksidatif kopling isoeugenol dilakukan dengan menyiapkan dua buah tabung reaksi yang berbeda. Tabung pertama hanya berisi isoeugenol sementara tabung kedua berisi isoeugenol, enzim lakase dan hidroquinon. Masing-masing reaksi dilakukan dalam media bifasa (etil asetat : buffer = 4 : 1). Adanya media bifasa ini dapat meningkatkan kestabilan produk yang terbentuk dan terekstraksi lebih banyak pada fasa non polarnya (etil asetat).

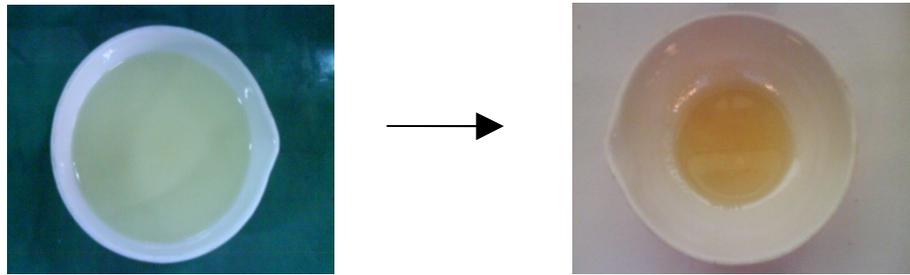
Kedua tabung kemudian diamati secara kualitatif perbedaannya. Setelah dibiarkan beberapa lama, tabung kedua yang berisi isoeugenol, enzim lakase dan hidroquinon mengalami perubahan warna menjadi kuning. Hal ini menandakan bahwa enzim lakase telah mengkatalisis reaksi oksidasi isoeugenol menjadi suatu senyawa baru yang berbeda dari senyawa awalnya.



Gambar 4.3 Hasil pengamatan reaksi dengan enzim dan tanpa enzim

Untuk mengisolasi produk yang terbentuk, reaksi dilakukan dalam skala besar dalam media bifasa (etil asetat : buffer fosfat = 4 : 1). Campuran distirer selama 2 jam lalu dibiarkan selama 48 jam agar reaksi dapat berjalan lebih optimal. Hasil reaksi yang didapat setelah 48 jam berupa larutan putih keruh dan endapan berwarna kuning di bawahnya.

Endapan kuning yang merupakan produk dipisahkan dari larutannya dengan cara dekantasi. Selanjutnya endapan ini dilarutkan dalam etil asetat dan diuapkan pada suhu ruang untuk menghilangkan pelarutnya. Sehingga didapat produk berupa cairan kental berwarna kuning dengan berat 3,64 g.

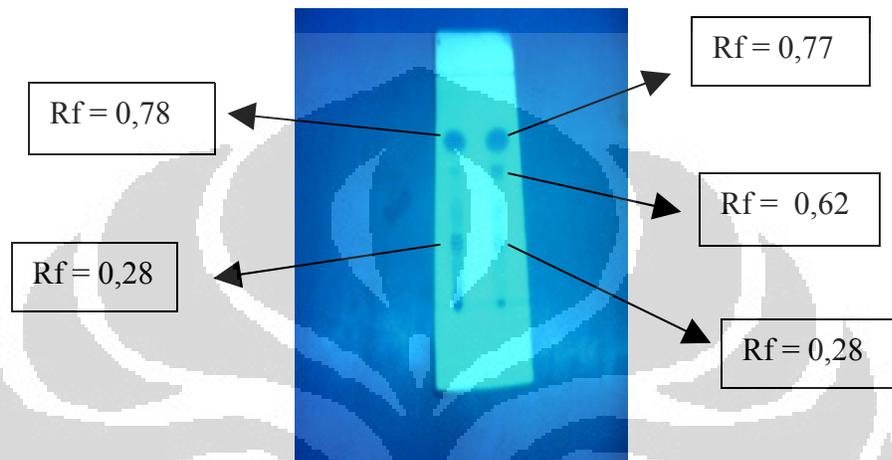


Gambar 4.4 Produk reaksi yang dilarutkan dalam etil asetat dan setelah dipekatkan

Produk kasar tersebut kemudian diuji secara kualitatif dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Pada dasarnya, metode kromatografi digunakan untuk memisahkan substansi campuran menjadi komponen-komponennya. Kromatografi lapis tipis (KLT) terdiri dari fasa diam yang biasanya berupa silika gel atau alumina dan fasa gerak berupa suatu pelarut atau campuran pelarut yang berbeda. Fase gerak mengalir melalui fase diam dan membawa komponen-komponen yang terdapat dalam campuran. Komponen-komponen yang berbeda bergerak dengan kecepatan yang berbeda dan akan tampak sebagai suatu bercak warna (spot). Jarak yang ditempuh komponen per jarak yang ditempuh pelarut dikenal dengan nilai R_f . Nilai R_f berbeda untuk masing-masing komponen sehingga dapat digunakan untuk uji kualitatif komponen dalam suatu senyawa.

Pada uji KLT ini, digunakan silika gel sebagai fasa diam dan fasa geraknya berupa campuran pelarut n-heksana dan etil asetat dengan variasi perbandingan yang berbeda mulai dari 1 : 1 , 2 : 1 , 3 : 2 , 4 : 1 dan 5 : 1.

Dari berbagai variasi perbandingan n-heksana dan etil asetat tersebut, diperoleh perbandingan yang paling optimum yaitu 2 : 1.



Gambar 4.5 Hasil KLT isoeugenol dan produk kasar

Dari uji KLT, dihasilkan 2 spot untuk isoeugenol yaitu dengan nilai Rf sebesar 0,28 dan 0,78. Sedangkan produk kasarnya menghasilkan 3 spot dengan masing-masing nilai Rf sekitar 0,28 ; 0,62 dan 0,77. Sehingga diduga spot produk yang terbentuk berada pada Rf sekitar 0,62.

Untuk memisahkan senyawa produk yang diinginkan dilakukan dengan KLT preparatif. Plat KLT preparatif dibuat dari kaca berukuran 5 x 8 cm sebanyak 10 buah yang dilapisi silika gel. Produk kasar ditotolkan pada tiap-tiap plat KLT dan dielusikan dengan larutan pengembang n-heksana : etil asetat = 2 : 1. Spot yang diduga sebagai produk dikerok lalu ditampung di dalam beaker dan dilarutkan dalam etil asetat. Senyawa produk larut dalam

etil asetat sedangkan silikanya tidak larut. Kemudian hasil tampungan disaring untuk memisahkan silika dan produk isolat. Produk isolat dipekatkan dengan cara menguapkan pelarut etil asetat sehingga didapatkan kristal berwarna kuning dengan berat sebesar 0,2092 g dan rendemen sebesar 5,74 %.

Reaksi oksidatif kopling isoeugenol ini merupakan jenis reaksi yang membutuhkan bantuan dari suatu katalis biologis seperti enzim. Sehingga jumlah produk yang terbentuk pun bergantung pada besarnya aktivitas enzim dalam mengkatalisis substrat. Nilai rendemen produk yang rendah kemungkinan juga disebabkan karena aktivitas spesifik enzim lakase yang relatif masih rendah yaitu 0,56 unit/mg protein. Aktivitas spesifik berhubungan dengan kemurnian suatu enzim. Rendahnya aktivitas spesifik menunjukkan enzim lakase yang diisolasi dari jamur tiram putih masih belum murni. Hal ini berakibat masih sedikitnya jumlah unit enzim yang dapat mengkatalisis substrat membentuk produknya. Sehingga dengan meningkatkan kemurnian enzim, maka jumlah unit enzim yang dapat mengkatalisis reaksi semakin banyak dan rendemen produk yang dihasilkan pun ikut meningkat.

Kristal dari isolat ini kemudian diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Visibel dan GC-MS.



Gambar 4.6 Kristal produk isolat

4.3 **Identifikasi senyawa produk reaksi dengan instrumentasi**

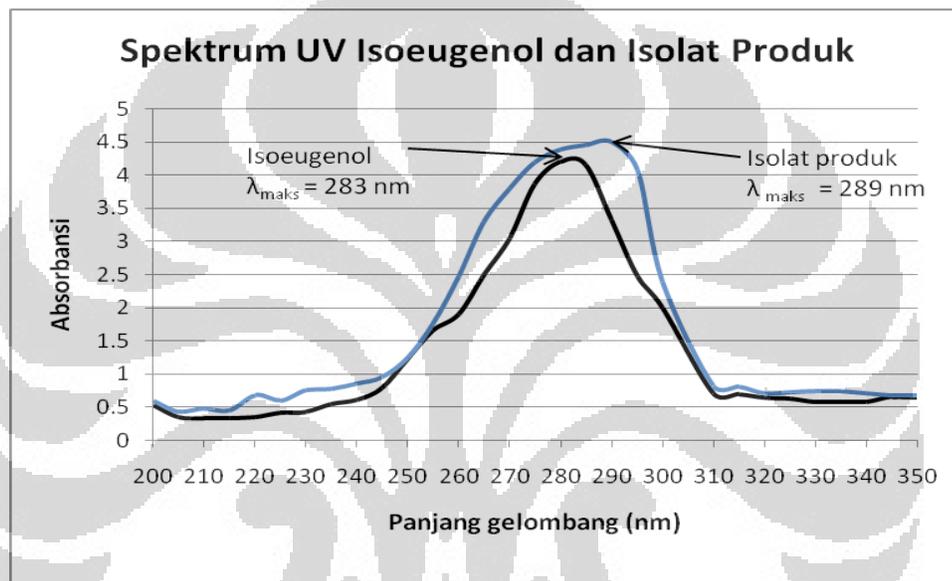
4.3.1 **Identifikasi dengan spektrofotometer UV-Visibel**

Identifikasi dengan spektrofotometer UV-Visibel bertujuan untuk mengetahui adanya senyawa baru hasil reaksi yang memiliki panjang gelombang maksimum yang berbeda dengan isoeugenol.

Dari hasil pengukuran, didapatkan panjang gelombang maksimum untuk senyawa isoeugenol adalah 283. Sedangkan untuk senyawa hasil reaksi panjang gelombang maksimumnya adalah 289. Disini terlihat adanya perbedaan panjang gelombang maksimum antara senyawa awal dengan senyawa produk reaksi.

Senyawa hasil reaksi mengalami pergeseran ke arah panjang gelombang lebih besar yang disebut juga dengan efek batokromik. Hal ini

terjadi karena bertambahnya ikatan rangkap terkonjugasi pada senyawa hasil reaksi. Bertambahnya ikatan rangkap terkonjugasi mengakibatkan energi (ΔE) yang diperlukan untuk transisi elektronik menjadi lebih kecil. Sehingga panjang gelombang sinar yang diperlukan untuk transisi tersebut menjadi bergeser ke arah lebih besar.



Gambar 4.7 Spektrum UV isoeugenol dan isolat produk

Tabel 4.2 Hasil pengukuran UV isoeugenol dan isolat produk

Senyawa	λ maksimum	Absorbansi
Isoeugenol	283	4,203
Isolat produk	289	4,503

4.3.2 Identifikasi dengan GC-MS

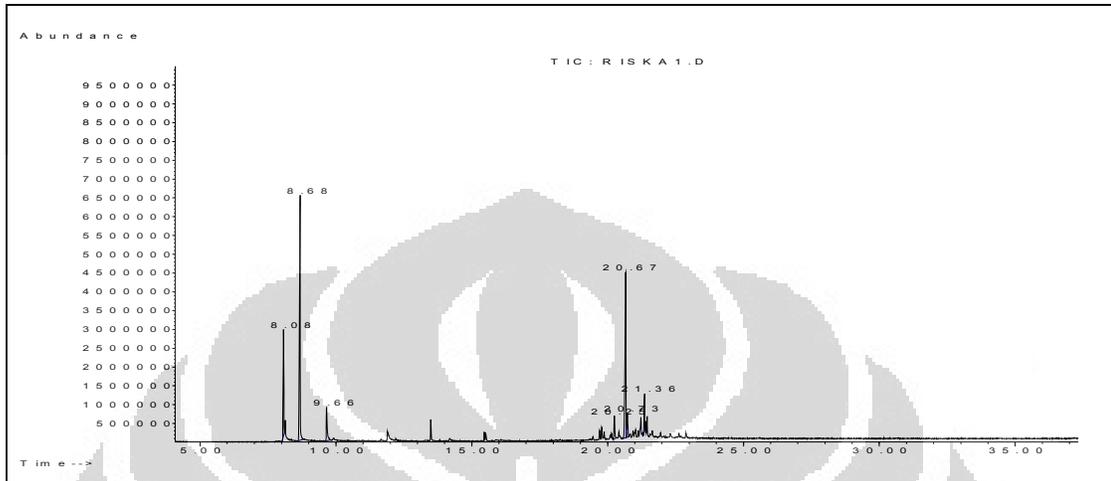
Identifikasi dengan *Gas Chromatography- Mass Spectroscopy* (GC-MS) digunakan untuk mengetahui komponen senyawa-senyawa yang terdapat dalam suatu sampel sekaligus menentukan berat molekul dan pola fragmentasinya. Prinsip *gas chromatography* adalah mengubah wujud sampel suatu senyawa menjadi fasa gas. Sampel dalam fasa gas ini dibawa oleh fasa gerak dan melewati kolom. Kolom yang digunakan bisa bersifat polar, non polar atau intermediet. Komponen senyawa yang terikat kuat dengan kolom akan tertahan dan keluar dengan waktu retensi yang lebih lama dibandingkan dengan komponen yang tidak terikat kuat. Komponen yang keluar akan dideteksi oleh suatu detektor dan diterjemahkan dalam bentuk spektrum-spektrum. Dari komponen-komponen tersebut kemudian diidentifikasi pola fragmentasinya dengan *mass spectroscopy*.



Gambar 4.8 Alat GC-MS

Hasil pengukuran GC-MS pada senyawa produk didapatkan spektrum

GC sebagai berikut :



Gambar 4.9 Spektrum GC dari senyawa produk reaksi

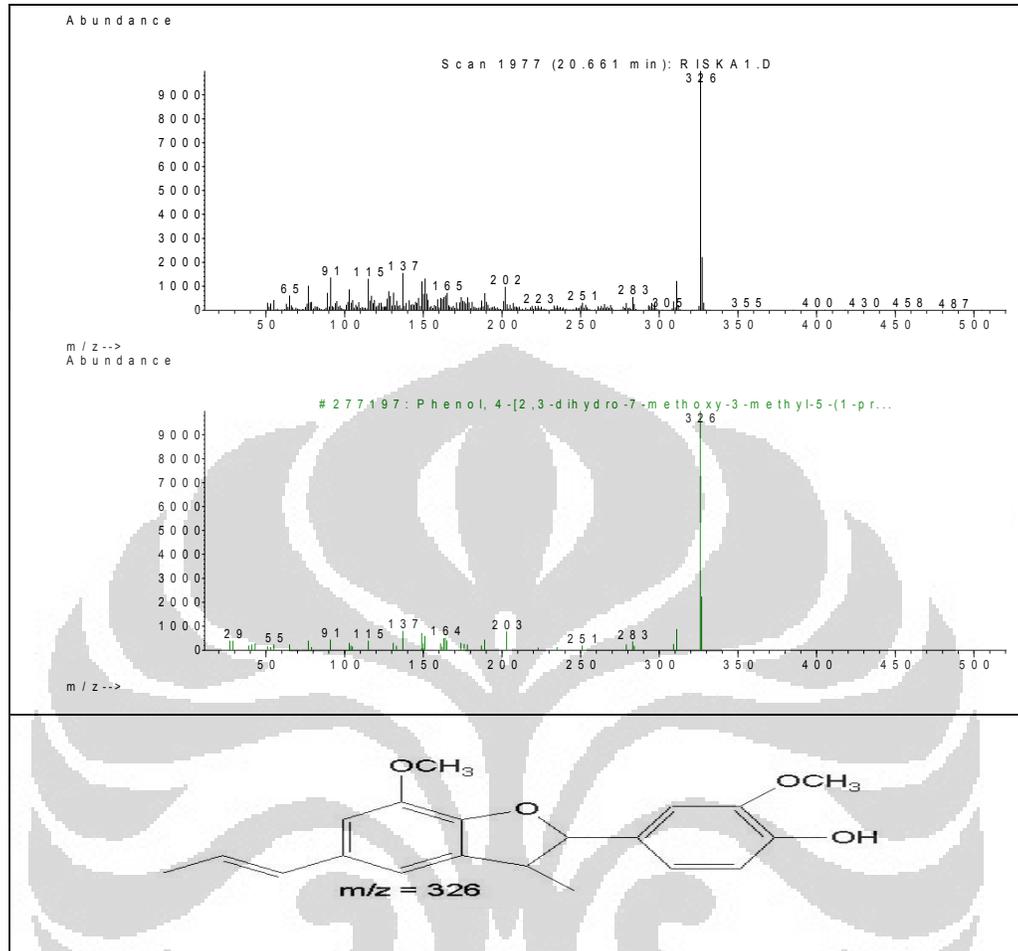
Dari hasil kromatogram ini selanjutnya dilakukan identifikasi terhadap 5 puncak kromatogram tertinggi dengan menggunakan MS dan didapatkan data seperti pada Tabel 4.3

Tabel 4.3 Hasil pengukuran GC-MS

Waktu retensi	Luas peak area (%)	m/z
8,08	13,7	164
8,68	31,85	164
9,66	4,97	164
20,67	26,10	326
21,36	5,05	326

Dari data pada Tabel 4.3, terdapat puncak pada waktu retensi 20,67 dengan luas *peak area* sebesar 26,10% yang mempunyai nilai $m/z = 326$. Puncak ini menunjukkan adanya suatu senyawa yang diduga merupakan dimer dari isoeugenol. Hal ini dikarenakan berat molekul dari dimer isoeugenol yang juga 326, hasil dari dua kali berat molekul isoeugenol dikurangi dua kali berat molekul atom H yang dilepas.

Dari hasil perbandingan dengan *database*, diketahui bahwa senyawa produk reaksi mempunyai kemiripan dengan *database*, yaitu senyawa dimer dari dua molekul isoeugenol. Pada *database* GC-MS menunjukkan dimer isoeugenol yang terbentuk adalah *phenol, 4-[2,3-dihydro-7-methoxy-3-methyl-5-(1-propenyl)-2-benzofuran]-2-methoxy* atau dehidrodiisoeugenol. Perbandingan senyawa produk reaksi dengan *database* memiliki kualitas kemiripan (*match quality*) sebesar 95. Nilai *match quality* ini menunjukkan tingkat kemiripan senyawa yang diidentifikasi dengan *database*. Sehingga dari *database* ini, diduga bahwa struktur dimer yang terbentuk termasuk dalam kelompok lignan, dengan penggabungan dari model struktur lignan tipe 8-5'.



Gambar 4.10 Perbandingan fragmentasi puncak pada waktu retensi 20,67 menit dengan database

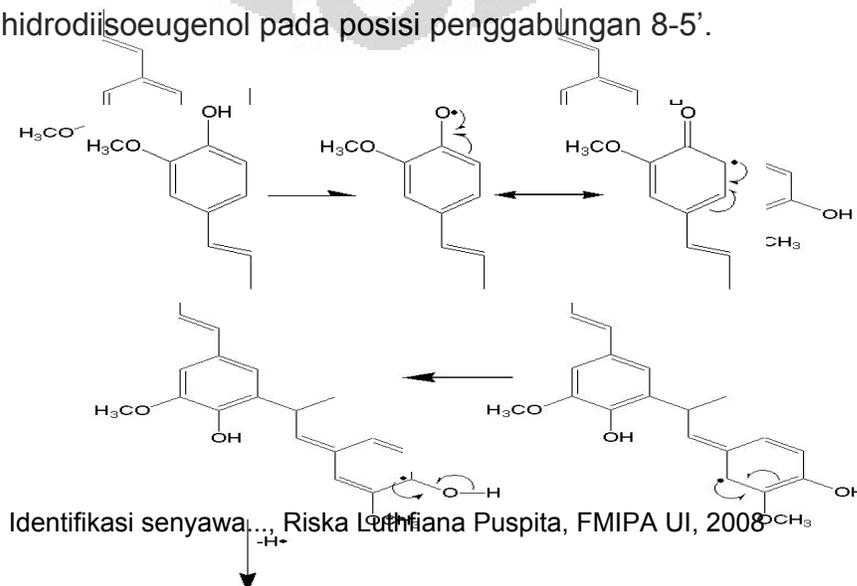
Tipe lignan seperti yang teridentifikasi dalam GC-MS ini, diketahui telah terisolasi dalam bahan alam yaitu licarin A. Licarin A pertama kali diisolasi dari batang pohon tanaman *Licaria aritu* yang berasal dari spesies *Lauraceae* di wilayah Amazon²¹. Senyawa Licarin A ini juga diketahui memiliki aktivitas biologis sebagai antitumor.

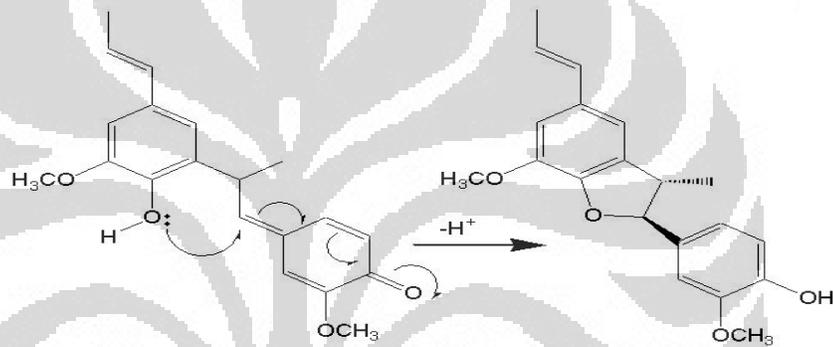
Maka dari penelitian ini dapat diinformasikan bahwa dimer yang teridentifikasi dari reaksi oksidatif kopling isoeugenol dengan enzim lakase, berpotensi untuk dapat dikembangkan lebih lanjut sehingga menghasilkan senyawa bioaktif yang bermanfaat.

4.4 Mekanisme reaksi pembentukan dehidroisoeugenol

Pembentukan dimer isoeugenol terjadi melalui reaksi oksidatif kopling yaitu reaksi penggabungan dua molekul isoeugenol disertai dengan proses oksidasi melalui pembentukan radikal fenoksi sebagai intermedietnya. Radikal fenoksi dapat beresonansi baik pada cincin aromatiknya maupun pada gugus propenil. Resonansi radikal ini memungkinkan terjadinya penggabungan dengan posisi yang berbeda-beda.

Dehidroisoeugenol terbentuk melalui penggabungan dua molekul isoeugenol pada posisi 8-5'. Awalnya isoeugenol teroksidasi dan menghasilkan radikal fenoksi yang dapat beresonansi. Radikal pada posisi C-5 kemudian bergabung dengan molekul isoeugenol yang lain membentuk dimer dehidroisoeugenol pada posisi penggabungan 8-5'.





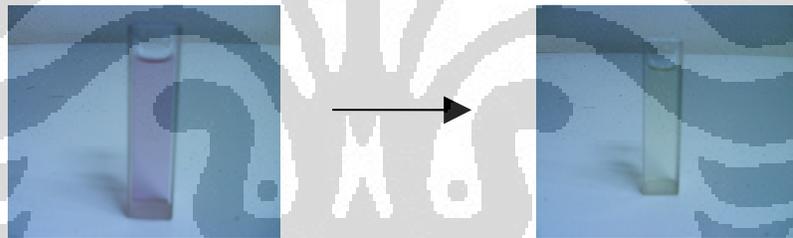
Gambar 4.11 Mekanisme reaksi pembentukan dehidroisoeugenol ²

4.5 Uji aktivitas antioksidan

Pada penelitian ini, juga dilakukan uji aktivitas biologis sebagai antioksidan terhadap senyawa produk reaksi yang didapat. Uji antioksidan ini berdasarkan pada kemampuan suatu senyawa untuk menangkap radikal dari larutan DPPH (1,1-difenil-2-pikril hidrazil).

Untuk uji antioksidan ini, disiapkan larutan isoeugenol dan senyawa produk dalam metanol dengan variasi konsentrasi 25 µg/mL ; 50 µg/mL dan 100 µg/mL. Larutan diambil tiap 5 menit sekali selama 35 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 515 nm.

Penangkapan radikal (*radical scavenging*) yang terjadi bisa terlihat secara kualitatif yaitu dari larutan DPPH radikal yang awalnya berwarna ungu lama kelamaan berubah warna menjadi kuning. Semakin tajam perubahan warna dari DPPH menandakan semakin banyak radikal dari DPPH yang ditangkap oleh antioksidannya, dalam hal ini isoeugenol dan senyawa produk



Gambar 4.12 Perubahan warna pada DPPH

Dari data hasil pengukuran, dapat dibuat grafik yang menunjukkan absorbansi yang semakin menurun sebanding dengan lamanya waktu pengukuran (lampiran 7). Selain itu, semakin tinggi konsentrasi larutan maka penurunan absorbansinya semakin tajam. Hal ini karena semakin banyak senyawa yang dapat menangkap radikal dari DPPH sehingga absorbansinya turun tajam dari saat awal pengukuran.

Nilai absorbansi yang didapat selanjutnya digunakan untuk menghitung % inhibisi radikal bebas dari kedua senyawa (perhitungan dapat dilihat pada lampiran 8) sehingga didapatkan data seperti pada Tabel 4.4.

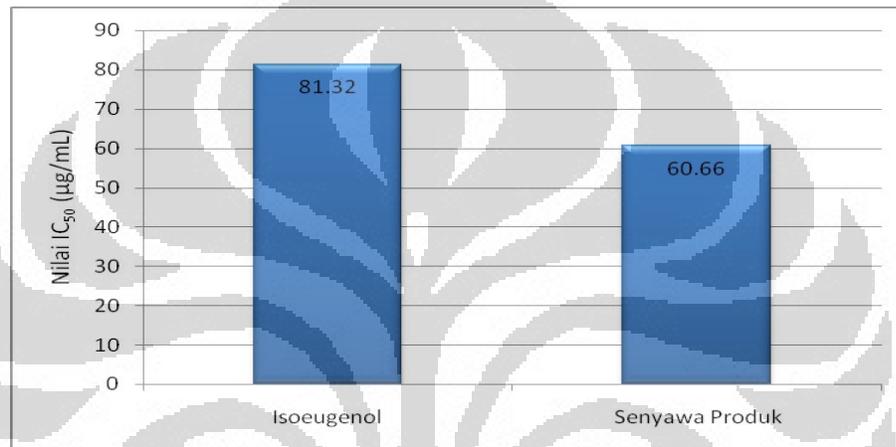
Tabel 4.4 % inhibisi radikal bebas dari isoeugenol dan senyawa produk

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	% inhibisi radikal	
	Isoeugenol	Senyawa produk
25	12,29	18,27
50	32,28	42,62
100	61,28	72,44

Data % inhibisi radikal bebas menunjukkan kemampuan senyawa antioksidan untuk menginhibisi suatu radikal. Semakin tinggi nilainya, maka semakin banyak radikal yang ditangkap oleh senyawa antioksidan. Nilai % inhibisi radikal senyawa produk ternyata lebih tinggi dibandingkan dengan isoeugenol. Ini berarti senyawa produk memiliki kemampuan yang lebih besar untuk menangkap radikal dari DPPH daripada isoeugenol.

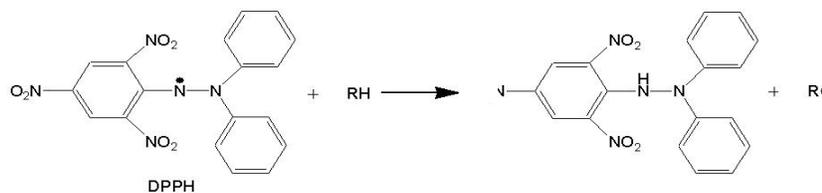
Inhibitor Concentration 50 % (IC_{50}) didefinisikan sebagai konsentrasi senyawa yang mampu menginhibisi sebanyak 50 % radikal. Suatu senyawa dikatakan memiliki aktivitas antioksidan yang besar jika pada konsentrasi sekecil-kecilnya dapat menginhibisi 50 % dari jumlah radikal. Sehingga, semakin kecil nilai IC_{50} menunjukkan semakin besar aktivitas senyawa tersebut sebagai antioksidan.

Berdasarkan uji aktivitas antioksidan yang dilakukan, senyawa produk memiliki IC_{50} sebesar 60,66 $\mu\text{g/mL}$ sedangkan IC_{50} untuk isoeugenol sebesar 81,32 $\mu\text{g/mL}$. Sehingga dapat dikatakan bahwa senyawa produk memiliki aktivitas antioksidan yang lebih besar karena nilai IC_{50} yang lebih kecil dibandingkan isoeugenol.



Gambar 4.13 Grafik perbandingan nilai IC_{50} dari isoeugenol dan senyawa produk

Secara umum reaksi penangkapan radikal bebas dari larutan DPPH oleh senyawa antioksidan adalah sebagai berikut :



Gambar 4.14 Mekanisme penangkapan radikal DPPH

Dari mekanisme di atas, terlihat bahwa senyawa isoeugenol dan senyawa produk memiliki kemampuan sebagai *radical scavenging* dengan cara mendonorkan atom H kepada radikal DPPH. Hal ini membuat molekul DPPH menjadi lebih stabil.

Kemampuan donor H dari isoeugenol dan senyawa produk berasal dari gugus OH yang terikat pada masing-masing molekulnya. Senyawa produk yang diduga mengandung dimer dari isoeugenol memiliki gugus OH yang lebih banyak dibandingkan dengan isoeugenolnya. Bertambahnya gugus OH ini semakin meningkatkan kemampuan sebagai donor H.

Proses donor H kepada radikal dari DPPH, menyebabkan terbentuknya radikal fenoksi dari isoeugenol dan senyawa produk. Namun, berbeda dengan radikal pada DPPH, radikal fenoksi ini cenderung lebih stabil.

Hal ini disebabkan karena adanya resonansi baik pada cincin aromatik maupun pada gugus propenilnya. Semakin banyak ikatan rangkap terkonjugasi yang ada, maka semakin banyak kemungkinan resonansinya dan radikalnya semakin stabil. Radikal yang lebih stabil ini mencegah kemungkinan terbentuknya suatu peroksida dengan adanya O_2 .

Senyawa produk yang diduga mengandung dimer isoeugenol mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi yang lebih banyak dibandingkan

monomer isoeugenol. Sehingga kemungkinan resonansi radikalnya lebih banyak dan membuat radikal lebih stabil. Hal ini terbukti dari nilai IC_{50} senyawa produk yang lebih kecil dibandingkan dengan isoeugenol.

Mekanisme penangkapan radikal DPPH pada uji antioksidan ini mirip dengan yang terjadi di dalam tubuh. Di dalam tubuh, radikal bebas bisa terbentuk dari proses oksidasi lipid. Adanya senyawa antioksidan dapat memutus rantai oksidasi terutama pada tahap propagasi dengan cara mendonorkan atom H secara cepat kepada radikal lipid ($R\cdot$ atau $ROO\cdot$) dan menjadikannya lebih stabil. Dari kemampuan donor atom H dan resonansi radikal fenoksi, dapat dikatakan bahwa senyawa fenolik terutama hasil dimerisasi mempunyai potensi yang besar untuk menjadi antioksidan di dalam tubuh.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan :

1. Enzim lakase yang diisolasi dari jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*) mempunyai kadar protein sebesar 0,39 mg/mL dan aktivitas spesifiknya sebesar 0,55 unit/mg.
2. Reaksi oksidasi kopling isoeugenol yang dikatalisis oleh enzim lakase dengan bantuan hidrokuinon sebagai mediator menghasilkan produk berupa cairan kental berwarna kuning dengan berat 3,64 g.
3. Pemurnian produk dengan KLT preparatif menghasilkan produk berupa Kristal berwarna kuning dengan berat 0,21 g dengan rendemen sebesar 5,74 %.
4. Identifikasi dengan UV-Visibel, didapatkan panjang gelombang maksimum dari senyawa produk adalah 289 nm dan mengalami pergeseran ke arah panjang gelombang yang lebih besar.
5. Pada identifikasi dengan GC-MS, terdapat puncak pada waktu retensi 20,67 menit dengan luas area 26,10 % dan nilai $m/z = 326$, yang diduga merupakan dimer isoeugenol (dehidroisoeugenol) dengan penggabungan pada posisi 8-5'.
6. Pada pengujian aktivitas antioksidan, senyawa produk ternyata memiliki aktivitas antioksidan yang lebih besar dibandingkan dengan isoeugenol.

Hal ini terlihat dari nilai IC_{50} sebesar 81,32 untuk isoeugenol dan 60,66 untuk senyawa produk.

5.2 Saran

Perlu ditingkatkan yield enzim lakase hasil isolasi dengan cara lebih memurnikan enzim, sehingga didapatkan enzim lakase dengan aktivitas spesifik yang lebih tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hartwell, J. L. 1991. *Types of Antioxidant and Anticancer Agents Isolated From Plants*. *Cancer Treatment Reports*. 60 : 1031-1067.
2. Yuda, A. 2007. *Bioaktivitas Senyawa Dimer dari Isoeugenol dengan Enzim Peroksidase dari Tanaman Sawi Hijau (Brassica juncea)*. Karya Utama Sarjana Kimia. Departemen Kimia FMIPA UI.
3. Lindiyah. 2008. *Studi Reaksi Kopliling Oksidatif Eugenol dan Isoeugenol Oleh Enzim Peroksidase dari Horseradish*. Karya Utama Sarjana Kimia. Departemen Kimia FMIPA UI.
4. Arifin, Z. M. 2008. *Pembentukan Dimer Eugenol dengan Katalis Enzim Lakase dan Uji Aktivitasnya Sebagai Antioksidan*. Karya Utama Sarjana Kimia. Departemen Kimia FMIPA UI.
5. Riva, S. 2006. *Laccases : Blue Enzyme for Green Chemistry*.
Rev. TRENDS in Biotechnology. 24 : 219-226.
6. Jamur tiram. <http://id.wikipedia.org/wiki/jamurtiram>

9 Juli 2008. 10.00

7. Hudiyono, P.W.S, S. 1998. *Teori Dasar Enzim*. Jurusan Kimia FMIPA UI. Depok

8. Couto, S. R.2006. *Industrial and Biotechnological Applications of Laccases : A Review*. *Biotechnology Advances* 24 : 500-513

9. Adinarayana, K. 2007. *Fungal Laccase-a Versatile Enzyme for Biotechnological Applications*. *J. Trends in App. Microbiol.* 4 : 233-245.

10. Cahyana, H. 2004. *Kimia Bahan Alam*. Departemen Kimia. FMIPA UI. Depok

11. Mann, J. 1986. *Secondary Metabolism. Second Edition*. Oxford University Press Inc : New York.

12. Lignans and neolignans. <http://media.iupac.org/publication/2000>.

10 Juli 2008. 11.00

13. Giang, P.M. *et al.*2006. *New Neolignans and Lignans from Vietnamese Medicinal Plant Machilus odoratissima Nees*. *Chem. Pharm. Bull* 54(3) 380-383.

14. Isoeugenol. <http://www.chemicaland21.com/isoegenol>

15 Juli 2008. 13.00

15. Hull, K.L. 2006. *Highly Regioselective Catalytic Oxidative Coupling Reactions : Synthetic and Mechanistic Investigation*. J. Am. Chem. Soc. 128 : 14047-1409.
16. Kobayashi, S.H. *et al.* 2001. *Enzymatic Polymerization*. Chem. Rev, 101, 3793-3818.
17. Guo, Z. 1997. Enzymatic Oxidative Phenolic Coupling. J. Org. Chem. 62: 6700-6701
18. Prakash, A. 2001. *Antioxidant Activity*. Med. Lab. Anal. 19 (2)
19. Frankel, E. N. 2005. *Lipid Oxidation. Second Edition*. The Oily Press : UK
20. Hudiyono, P.W.S, S. 1998. *Lipid : Kimia, Biokimia dan Pangan*. Jurusan Kimia FMIPA UI. Depok
21. Feringa, B. 1996. Biomimetic Asymmetric Oxidative Coupling of Phenols. Bioorganic Chemistry. 7 : 397-408.
22. Zille, A. *et. al.* 2005. *Laccase Kinetics of Degradation and Coupling Reactions*. J. of Molecular Catalysis B : Enzymatic. 33 : 23-28

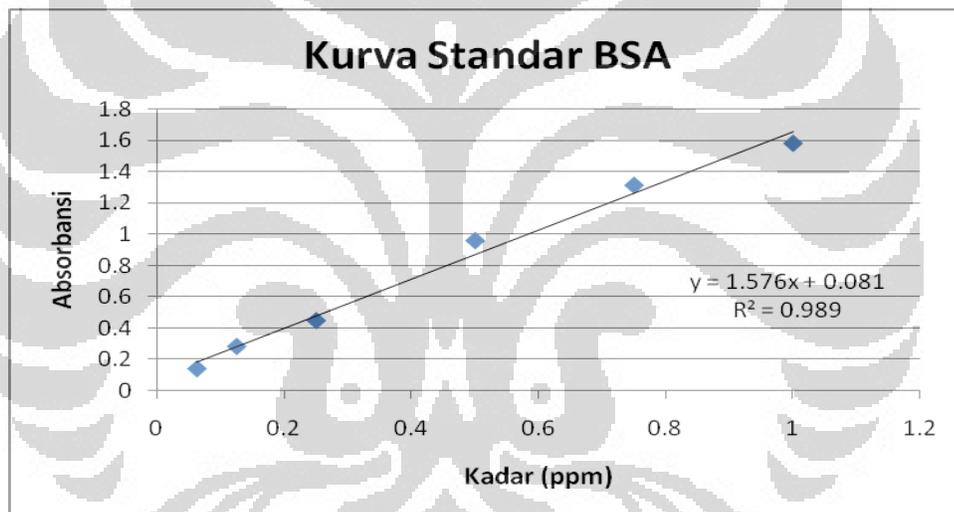
23. Junaedi, Y. 2007. *Uji Aktivitas Biologi Senyawa Hasil Reaksi Guaiacol Oleh Enzim Lakase dari Jamur Tiram Putih (Pleurotus ostreatus)*. Karya Utama Sarjana Kimia. Departemen Kimia FMIPA UI.
24. Mendoza, R. M. D. 2006. *Enzymatic Polymerization of Phenolic Compounds Using Laccase and Tyrosinase from Ustilago maydis*. *Biomacromolecules*. 7 : 1845-1854.
25. Tonami, H. et al. 2000. *Chemoselective Oxidative Polymerization of m-Ethynylphenol by Peroxidase Catalyst to a New Reactive Polyphenol*. *Biomacromolecules*. American Chemical Society.
26. Haro, A. 2007. *Identifikasi Produk Oxidative Coupling Etil Ferulat Oleh Enzim Peroksidase dan Uji Aktivitas Biologis*. Karya Utama Sarjana Kimia. Departemen Kimia FMIPA UI.
27. Ralph, J. et. al. 2004. *Lignins : Natural Polymers from Oxidative Coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids*. *Phytochemistry Reviews*. 3 : 29-60.
28. *Antioxidant*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Antioxidant>
15 Juli 2008. 14.00
29. Kadoma, Y. 2007. *Radical-scavenging Activity of the Reaction Products of Isoeugenol with Thiol, Thiophenol, Mercaptothiazoline Mercaptomethyl imidazole Using the Induction Period Method*. *Molecule*. 12 : 1836-1844

30. Ogata, M. 2000. *Antioxidant Activity of Eugenol and Related Monomeric and Dimeric Compound*. J. Chem. Pharm. Bull. 48(10): 1467-1469.

Lampiran 1

Penentuan kadar protein

Kadar larutan standar BSA (mg/mL)	Absorbansi pada $\lambda = 750 \text{ nm}$
0,0625	0,13851
0,125	0,28120
0,25	0,44719
0,5	0,96045
0,75	1,31516
1	1,584112
Sampel	0,69980



Persamaan least square :

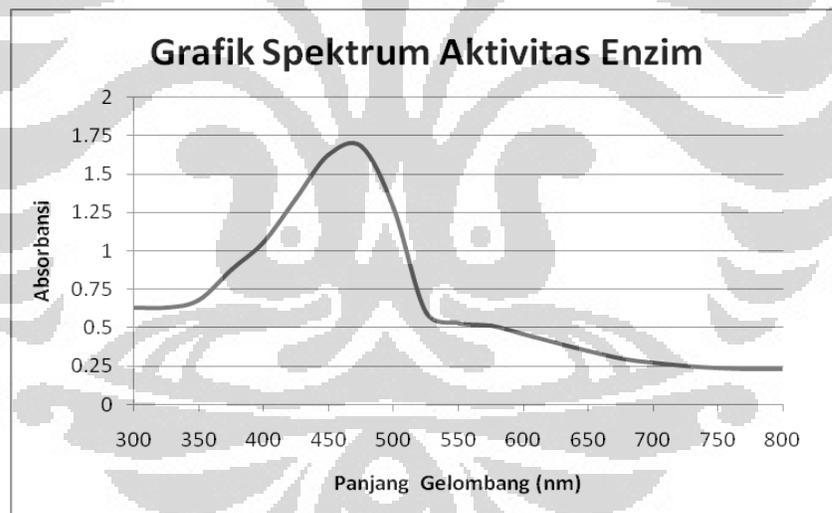
$$y = 1,576 x + 0,081$$

$$0,69980 = 1,576 x + 0,081$$

$$X = \frac{0,69980 - 0,081}{1,576} = 0,39 \text{ mg/mL}$$

Jadi, kadar protein enzim lakase adalah 0,39 mg/mL

Lampiran 2
Spektrum UV-Visibel dan perhitungan aktivitas spesifik enzim



$$A_{470 \text{ nm}} \text{ sampel} - A_{470 \text{ nm}} \text{ kontrol}$$

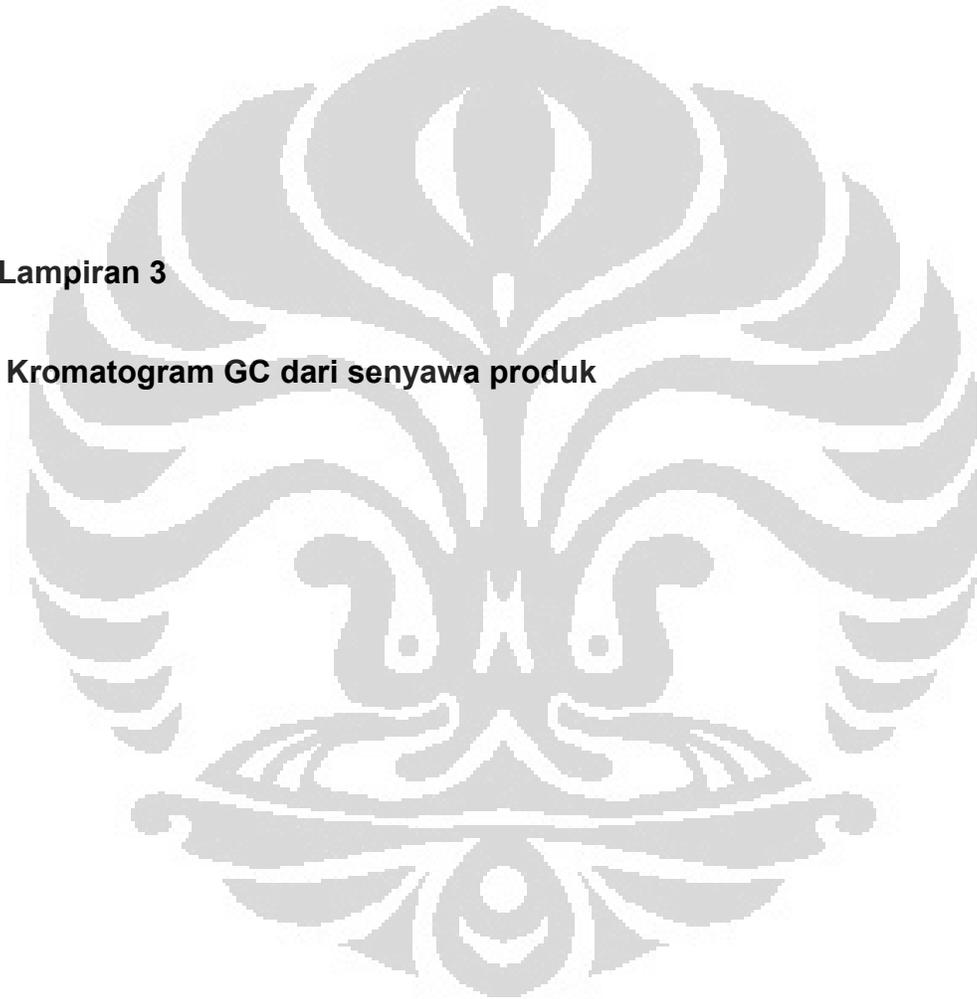
$$\text{Aktivitas spesifik} = \frac{\quad}{6,58 \times \text{Kadar protein}}$$

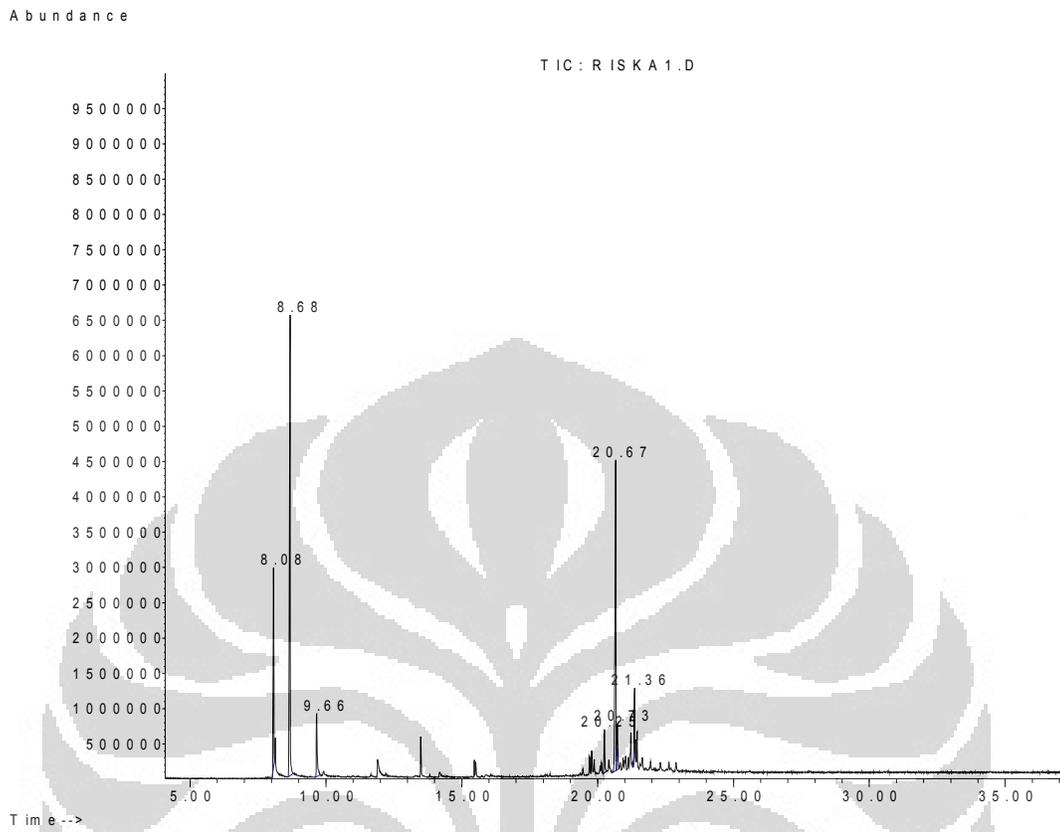
$$1,68836 - 0,25620$$

$$= \frac{\quad}{6,58 \times 0,39} = 0,56 \text{ unit / mg protein}$$

Lampiran 3

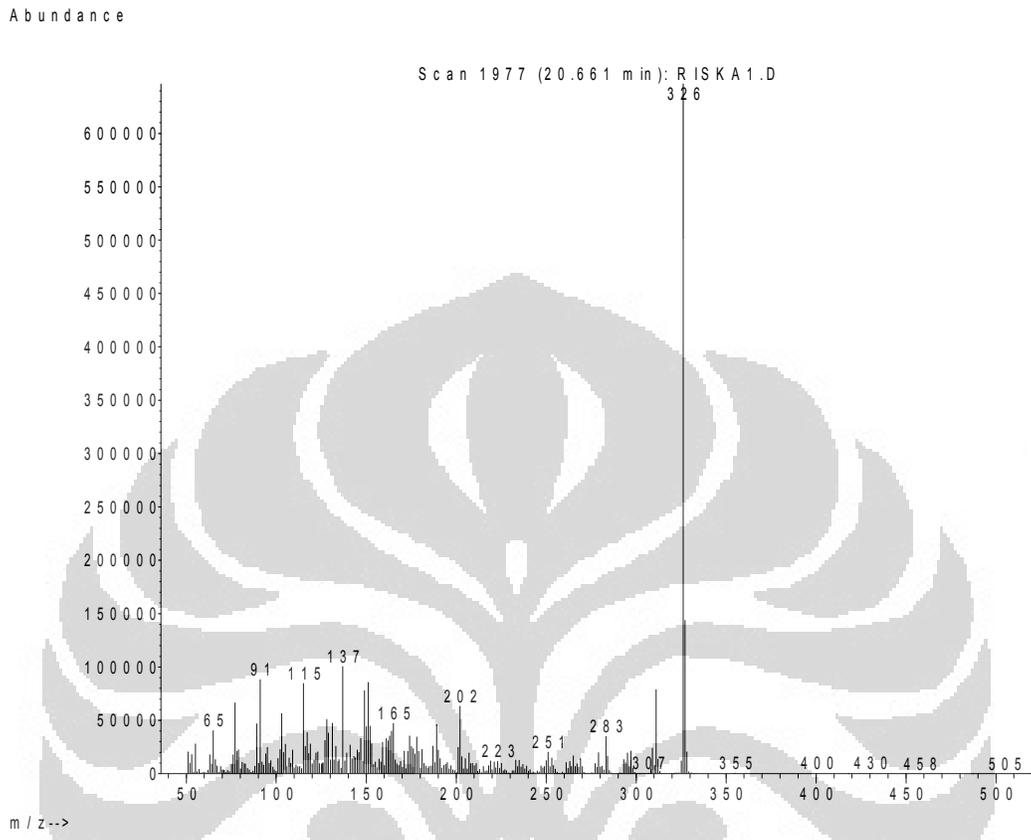
Kromatogram GC dari senyawa produk





Lampiran 4

Kromatogram MS dari puncak dengan waktu retensi 20,67 menit



Lampiran 5

Kondisi alat dari GC-MS

INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS

=====

6890 GC METHOD

=====

OVEN

Initial temp: 80 'C (On) Maximum temp: 300 'C
Initial time: 0.00 min Equilibration time: 0.00 min
Ramps:
Rate Final temp Final time
1 10.00 290 38.00
2 0.0(Off)
Post temp: 80 'C
Post time: 0.00 min
Run time: 59.00 min

FRONT INLET (SPLIT/SPLITLESS)

Mode: Split Split flow : 98.9 mL/min
Initial temp: 290 'C (On) Saver flow : 20.0 mL/min
Pressure: 9.25 psi (On) Saver time : 2.00 min
Split ratio: 100:1 Gas type : Helium

COLUMN 1

Capillary Column
Model Number: Agilent 19091S-433
HP-5MS, 0.25mm * 30m * 0.25um

COLUMN 2

(not installed)

Max temperature: 350 'C
Nominal length: 30.0 m
Nominal diameter: 250.00 um
Nominal film thickness: 0.25 um
Mode: constant flow
Initial flow: 1.0 mL/min
Nominal init pressure: 9.26 psi
Average velocity: 37 cm/sec
Inlet: Front Inlet
Outlet: MSD
Outlet pressure: vacuum

FRONT DETECTOR

Temperature: 250 'C (Off)
flow: 40.0 mL/min (Off)
flow: 450.0 mL/min (Off)
Mode: Constant makeup flow
flow: 45.0 mL/min (Off)
Makeup Gas Type: Helium

Lampiran 6

Data pengukuran aktivitas antioksidan dari isoeugenol dan senyawa produk

1. Isoeugenol

Tabel hasil pengukuran absorbansi larutan DPPH :

Waktu (menit)	Kontrol	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
0	0,36623	0,36623	0,36623	0,36623
5	0,36621	0,34335	0,28561	0,17592
10	0,36621	0,33765	0,26685	0,16885
15	0,36619	0,3301	0,25895	0,16418
20	0,36616	0,32881	0,25201	0,15820
25	0,364	0,32601	0,24780	0,15482
30	0,36205	0,32001	0,24253	0,15126
35	0,36182	0,31735	0,24466	0,14009

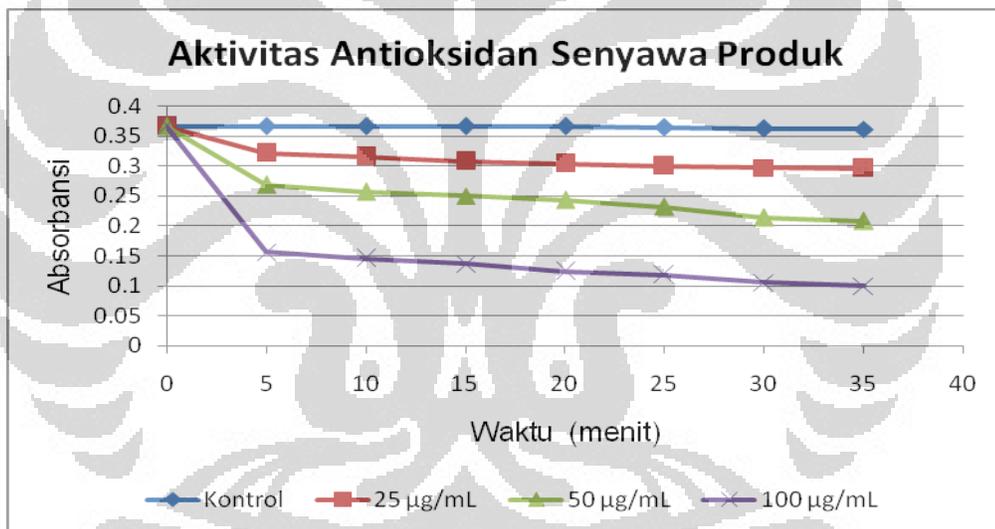
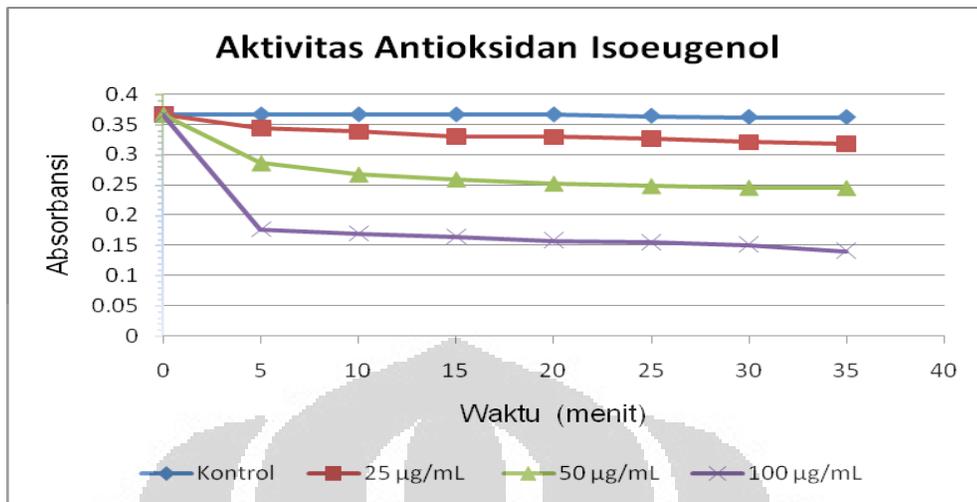
2. Senyawa produk reaksi

Tabel hasil pengukuran absorbansi larutan DPPH :

Waktu (menit)	Kontrol	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
0	0,36623	0,36623	0,36623	0,36623
5	0,36621	0,32140	0,26815	0,15580
10	0,36621	0,31548	0,25661	0,14573
15	0,36619	0,30774	0,24992	0,13641
20	0,36616	0,30421	0,23105	0,12365
25	0,364	0,29952	0,21541	0,11257
30	0,36205	0,29702	0,20348	0,09316
35	0,36182	0,29571	0,19675	0,07077

Lampiran 7

Grafik aktivitas antioksidan isoeugenol dan senyawa produk



Lampiran 8

Penentuan % inhibisi radikal bebas

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

Keterangan : A kontrol = absorbansi kontrol pada menit ke 35

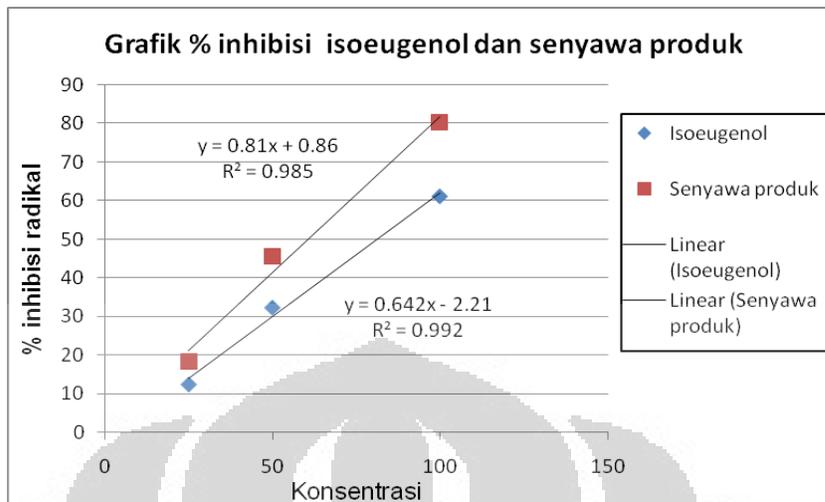
A sampel = absorbansi sampel pada menit ke 35

Dari hasil perhitungan didapatkan data % inhibisi radikal dari isoeugenol dan senyawa produk reaksi :

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	% inhibisi radikal	
	Isoeugenol	Senyawa produk
25	12,29	18,27
50	32,28	42,62
100	61,28	72,44

Lampiran 9

Penentuan nilai IC_{50}



Perhitungan nilai IC_{50} untuk isoeugenol :

Persamaan garis : $y = 0,642 x - 2,21$

$$50 = 0,642 x - 2,21$$

$$x = 81,32 \mu\text{g/mL}$$

Jadi nilai IC_{50} untuk isoeugenol adalah 81,32 $\mu\text{g/mL}$.

Perhitungan nilai IC_{50} untuk senyawa produk :

Persamaan garis : $y = 0,81 x + 0,86$

$$50 = 0,81 x + 0,86$$

$$x = 60,66 \mu\text{g/mL}$$

Jadi nilai IC_{50} untuk isoeugenol adalah 60,66 $\mu\text{g/mL}$.