



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI DIMERISASI EUGENOL DAN ISOEUGENOL
MENGUNAKAN ENZIM HORSERADISH PEROKSIDASE
SERTA UJI AKTIVITAS ANTI KANKER**

TESIS

Muryeti

0906495311

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KIMIA
DEPOK
JULI 2011**

Universitas Indonesia



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI DIMERISASI EUGENOL DAN ISOEUGENOL
MENGUNAKAN ENZIM HORSERADISH PEROKSIDASE
SERTA UJI AKTIVITAS ANTI KANKER**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains

Muryeti

0906495311

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KIMIA
DEPOK
JULI 2011**

Universitas Indonesia

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Muryeti
NPM : 0906495311
Tanda Tangan : 
Tanggal : 18 Juli 2011

UNIVERSITAS INDONESIA





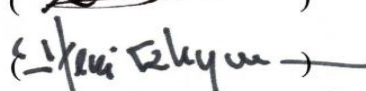

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
 Nama : Muryeti
 NPM : 0906495311
 Program Studi : Kimia
 Judul Tesis : Optimasi Dimerisasi Eugenol dan Isoeugenol Melalui Reaksi Kopling Oksidatif Menggunakan Enzim Horseradish Peroksidase Serta Uji Aktivitas Anti Kanker

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Prof. Dr. Wahyudi PS
 Pembimbing : Dr. rer.nat. Agustino Zulys
 Penguji : Prof. Dr. Soleh Kosela
 Penguji : Dr. Ridla Bakri M.Phil
 Penguji : Dr. Herry Cahyana
 Penguji : Dr. Asep Saefumillah

()
 ()
 ()
 ()
 ()
 ()

Ditetapkan di : Depok
 Tanggal : 14 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Sains Jurusan Kimia pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Wahyudi PS dan Dr. Agustino Zulys selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran dalam penyusunan tesis ini;
2. Prof. Dr. Johnny Wahyuadi selaku Direktur Politeknik Negeri Jakarta yang telah memberikan kesempatan melanjutkan pendidikan
3. Nunung Martina, MT selaku direktur Eksekutif PHKI atas bantuan, arahan dan kepercayaannya selama ini serta tim task force PHKI Tema B 2009 atas kerja samanya selama ini.
4. Dr. Endang Saepudin selaku Ketua Program Studi Magister Kimia.
5. Dr. Yuni Krisyuningsih dan Rahmat Wibowo, M.Si atas bantuan, bimbingan dan referensi yang diberikan
6. Ibu Suzan dari lab KOBA ITB, ibu Endah dari Puslabfor, ibu Nurul dari Universitas Pancasila atas bantuannya dalam pengumpulan data.
7. Teman-teman S2 angkatan 2009 Ellya, Deni, Destya, Sofa, Evi, Tanti, Nurul dan Dwi
8. Orang tua, suami, anakku dan adik-adikku yang telah memberikan bantuan

dukungan dan dorongan semangat kepada penulis

Seluruh dosen dan karyawan Departemen Kimia FMIPA UI. Rekan-rekan mahasiswa s2 yang telah memberi bantuan dan dorongan semangat kepada penulis dan semua pihak yang telah memberi bantuan selama penelitian dan penyusunan tesis ini.

Akhir kata, penulis berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Penulis
2011

ABSTRAK

Nama : Muryeti
Program Studi : Kimia
Judul : Optimasi Dimerisasi Eugenol Dan Isoeugenol Dengan Reaksi Menggunakan Enzim Horseradish Peroksidase Serta Uji Aktivitas Anti Kanker

Sintesis dimer eugenol dan isoeugenol telah dilakukan melalui reaksi kopling oksidatif dengan H_2O_2 dengan katalis enzim Horseradish peroksidase (EC 1.11.1.7). Kondisi optimum reaksi yang diperoleh adalah pada perbandingan jumlah eugenol dan H_2O_2 adalah 1:0,5, pH 3 dan penambahan 10% metanol sebagai cosolvent. Identifikasi senyawa hasil sintesis diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, IR, GCMS, NMR (H-NMR, C-NMR) dan polarimeter. Reaksi kopling oksidatif eugenol diidentifikasi sebagai dehidrodieugenol (8,52 %), titik leleh $105,5^{\circ}C$ serta sudut putar optik $\alpha=+0,04$. Senyawa dimer yang terbentuk merupakan kopling pada posisi C5 dan C5'. Sedangkan reaksi kopling isoeugenol menghasilkan senyawa (7R,8R)-Licarin A (9,52 %) dengan titik leleh $132,5^{\circ}C$ serta sudut putar optik $\alpha=+0,02$, yang merupakan kopling pada posisi C8 dan C5'. Uji toksisitas dilakukan dengan metode BSLT, sedangkan uji sitotoksik dilakukan terhadap sel Murine Leukimia P388 dengan metode MTT. Hasil BSLT yang diperoleh menunjukkan bahwa toksisitas dehidrodieugenol ($LC_{50} = 301,9 \mu g/mL$) dan Licarin A ($LC_{50} = 181,9 \mu g/mL$). Uji sitotoksitas terhadap sel kanker Murine Leukimia P388 diperoleh nilai $IC_{50} = 10,8 \mu g/mL$ untuk senyawa Licarin A.

Kata Kunci : dehidrodieugenol, Licarin A, Uji BSLT, Uji MTT, Sel Murine Leukimia P388
xiv+90 halaman : 39 gambar + 8 tabel
Daftar Pustaka : 41

ABSTRACT

Name : Muryeti
Program Study : Chemistry
Title : Optimization of Eugenol and Isoeugenol Dimerisation catalyzed by Horseradish peroxidase and Cytotoxicity Test

Dimerisation of eugenol and isoeugenol has been produced through oxidative coupling reaction with H_2O_2 , catalyzed by Horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7). Optimum reaction condition were obtained by varying mol ratio of eugenol: H_2O_2 1:0,5, pH 3.0, and 10% methanol as cosolvent. The structure of compounds synthesized were analyzed and characterization by UV-Visible spectrophotometer, FTIR, GCMS, NMR and polarimeter. Oxidative coupling reaction of eugenol were identified as dehydrodieugenol (8,52 %), 105,5⁰C and optical angle $\alpha = + 0,04$. Dimeric compounds were formed by coupling at C5 and C5'. While coupling oxidation isoeugenol produced (7R,8R)-Licarin A (9,52 %), with melting point 132.5⁰ C and optical angle $\alpha = +0.02$, which is the coupling at C8 and C5'. Toxicity assay was conducted using BSLT method, while cytotoxicity assay performed against Murine Leukimia P388 cell lines was conducted using MTT method. The LC_{50} value of brine shrimp lethality test of dehydrodieugenol compound was 301,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and Licarin A (LC_{50} : 181,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cytotoxicity test on Murine Leukimia P388 cell lines yielded IC_{50} 10,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Key words : dehydrodieugenol, Licarin A, Uji BSLT, Uji MTT, Murine Leukimia P388 Cell line
xiv+90 pages : 39 figures + 8 table
Bibliography : 41

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

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

Nama : Muryeti
NPM : 0906495311
Program Studi : Kimia
Departemen : Kimia
Fakultas : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Tesis

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 :
Optimasi Dimerisasi Eugenol dan Isoeugenol Menggunakan Enzim Horseradish Peroksidase Serta Uji Aktivitas Anti Kanker.

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 18 Juli 2011
Yang menyatakan


(Muryeti)

UNIVERSITAS INDONESIA

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	vi
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	viii
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Hipotesa Penelitian	4
1.5. Manfaat	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Enzim	5
2.1.1. Enzim Peroksidase	7
2.2. Senyawa Fenolik	12
2.3. Lignan	13
2.4. Eugenol	15
2.5. Isoeugenol	16
2.6. Reaksi Kopling Oksidatif Fenol	17
2.7. Reaksi Kopling Oksidatif Senyawa Golongan Fenol Lainnya	20
2.8. Reaksi Kopling Oksidatif Eugenol	22
2.9. Reaksi Kopling Oksidatif Isoeugenol	24

2.10.	Analisis Hasil Reaksi	26
2.10.1.	Analisis Dengan UV-Vis	26
2.10.2.	Analisis Dengan FTIR	26
2.9.3.	Analisis Dengan GC-MS	27
2.9.4.	Analisis dengan Polarimeter	27
2.11.	Uji Toksisitas	28
2.11.1.	Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)	28
2.11.2.	Uji Sitotoksik	29
BAB III.	METODE PENELITIAN	31
3.1.	Tempat dan Waktu Penelitian	31
3.2.	Alat dan Bahan	31
3.2.1.	Bahan Penelitian	31
3.2.2.	Peralatan Penelitian	31
3.3.	Cara Kerja	32
3.3.1.	Optimasi reaksi kopling oksidatif eugenol yang dikatalisis enzim HRP	32
3.3.2.	Sintesis Dimer Eugenol Melalui Reaksi Kopling Oksidatif Menggunakan Enzim HRP	33
3.3.3.	Sintesis Dimer Isoeugenol Melalui Reaksi Kopling Oksidatif Menggunakan Enzim HRP	34
3.3.4.	Uji KLT Dan Pemisahan Komponen Hasil Reaksi	34
3.3.5.	Pengukuran Dengan Spektrofotometer UV-Visibel	35
3.3.6.	Pengukuran Dengan Spektrofotometer FTIR	35
3.3.7.	Pengukuran Dengan Kromatografi Gas Dan Spektrometer Massa	35
3.3.8.	Pengukuran Dengan NMR (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)	35
3.3.9.	Penentuan Sudut putar $[\alpha]$ Dengan Polarimeter.	36
3.4.	Uji Toksisitas Metode BSLT	36
3.4.1.	Penetasan Larva Udang	36
3.4.2.	Persiapan Larutan Yang Akan Diuji	36
3.4.3.	Uji Toksisitas Metode BSLT	36

3.5. Uji Sitotoksik terhadap Sel Murine leukimia P-388	37
3.6. Bagan Kerja	39
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	40
4.1. Optimasi Reaksi Kopling Oksidatif Eugenol Dengan Menggunakan Enzim Horseradish Peroksidase	40
4.1.1. Optimasi Perbandingan Eugenol dan H ₂ O ₂	40
4.1.2. Optimasi pH Reaksi	42
4.1.3. Optimasi Jenis Cosolvent	44
4.1.4. Optimasi Jumlah Cosolvent	49
4.2. Sintesis Reaksi Kopling Oksidatif Eugenol dan Isoeugenol dengan Katalis Enzim Horseradish peroksidase	51
4.2.1. Sintesis Reaksi Kopling Oksidatif Eugenol dan HRP	51
4.3. Analisis Senyawa Hasil Reaksi Kopling Oksidatif Eugenol Dengan Menggunakan Instrumen	52
4.3.1. Analisis Dengan Spektrofotometer UV-Visibel	52
4.3.2. Analisis Dengan Menggunakan FTIR	53
4.3.3. Analisis Dengan Kromatografi Gas Spektrometer Massa	54
4.3.4. Analisis Dengan H-NMR dan C-NMR	56
4.3.5. Analisis Dengan Polarimeter	58
4.4. Mekanisme Reaksi Kopling Oksidatif Eugenol Dengan Enzim HRP	59
4.5. Sintesis Reaksi Kopling Oksidatif Isoeugenol dengan Katalis Enzim Horseradish peroksidase	61
4.5.1. Sintesis Reaksi Kopling Oksidatif Isoeugenol dan HRP	61
4.6. Analisis Senyawa Hasil Reaksi Kopling Oksidatif Isoeugenol Dengan Menggunakan Instrumen	62
4.6.1. Analisis Dengan Spektrofotometer UV-Visible	62
4.6.2. Analisis Dengan Menggunakan FTIR	62
4.6.3. Analisis dengan Menggunakan Kromatografi Gas Spektroskopi Massa (GCMS)	63
4.6.4. Analisis Produk Reaksi Isoeugenol Dengan NMR	66

4.6.5. Analisis Dengan Polarimeter	70
4.7. Uji Bioaktivitas Senyawa Produk Reaksi Kopling Oksidatif Eugenol dan Isoeugenol	70
4.7.1. Uji <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT).	70
4.7.2. Uji Sitotoksik Senyawa Produk Reaksi Kopling Oksidatif Isoeugenol Terhadap Sel Kanker Leukimia P388	71
4. 8. Mekanisme Reaksi Kopling Oksidatif Isoeugenol Dengan Enzim HRP	73
BAB V. PENUTUP	75
5.1. Kesimpulan	75
5.2. Saran	75
DAFTAR PUSTAKA	76

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Struktur Protophyrin IX besi (III)	9
Gambar 2.2.	Mekanisme reaksi yang dikatalisis oleh enzim peroksidase	10
Gambar 2.3.	Mekanisme pembentukan senyawa I kompleks Enzim HRP dengan H ₂ O ₂	11
Gambar 2.4.	senyawa fenolik	13
Gambar 2.5	Dasar penomeran atom karbon senyawa monolignol dan lignan	14
Gambar 2.6.	Senyawa golongan neolignan	14
Gambar 2.7.	Senyawa golongan oxineolignan	15
Gambar 2.8.	Struktur eugenol	16
Gambar 2.9.	Struktur isoeugenol	17
Gambar 2.10.	Reaksi kopling oksidatif senyawa fenolik	18
Gambar 2.11.	Tahapan pembentukan dimer dan polimer senyawa fenolik	20
Gambar 2.12.	Mekanisme reaksi pembentukan dimer dan trimer naphthol	21
Gambar 2.13.	Resonansi radikal eugenol	22
Gambar 2.14.	Pembentukan reaksi kopling oksidatif eugenol	23
Gambar 2.15.	Resonansi radikal isoeugenol	24
Gambar 2.16.	Reaksi kopling oksidatif isoeugenol	25
Gambar 4.1.	Hasil KLT reaksi kopling oksidatif eugenol pada berbagai perbandingan eugenol dan H ₂ O ₂	40
Gambar. 4.2.	Grafik Serapan UV-Vis Produk Reaksi pada Variasi Perbandingan Eugenol dan H ₂ O ₂	41
Gambar 4.3.	Hasil KLT reaksi kopling oksidatif eugenol dengan katalis enzim HRP pada berbagai pH	42
Gambar. 4.4	Grafik Serapan UV-Vis produk reaksi pada variasi pH	43
Gambar 4.5.	Tahapan pembentukan dimer dan trimer eugenol pada pH 3 dan 6	44

Gambar 4.6.	Hasil KLT reaksi kopling oksidatif eugenol dengan katalis enzim HRP pada berbagai pelarut	45
Gambar 4.7	Grafik Serapan UV-Vis Produk Reaksi Pada Variasi Pelarut	45
Gambar. 4.8.	Radikal fenoksi dan intermediet quinon metide	46
Gambar. 4.9.	Diagram mekanisme reaksi penyerangan nukleofil dalam pembentukan dimer	47
Gambar 4.10.	Struktur quinon metide dan serangan nukleofil CH ₃ OH dalam suasana asam	48
Gambar 4.11	Hasil KLT Reaksi Kopling Oksidatif Eugenol dengan enzim HRP dalam berbagai komposisi jumlah cosolvent	49
Gambar 4.12.	Grafik Serapan UV-Vis Produk Reaksi Pada Variasi jumlah cosolvent	50
Gambar 4.13.	Hasil sintesis produk eugenol dengan uji KLT	52
Gambar 4.14.	Kromatogram GCMS senyawa produk reaksi eugenol	54
Gambar 4.15	Spektrum massa produk reaksi eugenol	55
Gambar 4.16.	Struktur dehidrodieugenol	55
Gambar. 4.17.	Struktur senyawa dehidrodieugenol	56
Gambar 4.18.	Struktur (Ra)-(+)-dehidrodieugenol	59
Gambar 4.19.	Hasil KLT sintesis produk isoeugenol	61
Gambar 4.20	Kromatogram GCMS senyawa produk reaksi isoeugenol	64
Gambar 4.21.	Spektrum massa senyawa hasil reaksi isoeugenol	64
Gambar 4.22.	Fragmentasi spektroskopi massa Licarin A	66
Gambar 4.23.	Struktur senyawa Licarin A	67
Gambar 4.24.	Struktur molekul (+) Licarin A	70

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.	Klasifikasi Enzim	7
Tabel 4.2.	Beberapa pita serapan spektrum FTIR senyawa dimer eugenol	53
Tabel 4.3.	Data $^1\text{H-NMR}$ Senyawa Produk Reaksi Eugenol (500 MHz, CDCl_3)	57
Tabel 4.4.	Data Spektroskopi $^{13}\text{C-NMR}$ Senyawa Produk Reaksi Eugenol (500 MHz, CDCl_3)	58
Tabel 4.5.	Perbandingan λ_{max} pada spektrum UV-Vis Isoeugenol dan hasil reaksi	62
Tabel 4.6.	Beberapa pita serapan spektrum FTIR senyawa produk reaksi isoeugenol	63
Tabel 4.7.	Data $^1\text{H-NMR}$ Senyawa Licarin A (500 MHz, CDCl_3)	68
Tabel 4.8.	Data pergeseran kimia $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa Licarin A	69

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Spektrum Serapan UV-Visible Eugenol Dan Produk Reaksi Eugenol	80
Lampiran 2	Spektrum Serapan UV-Visible Senyawa Isoeugenol dan Produk Reaksi	81
Lampiran 3	Spektrum serapan IR senyawa produk reaksi eugenol	82
Lampiran 4	Spektrum serapan IR senyawa produk reaksi isoeugenol	83
Lampiran 5	Hasil Kromatogram GCMS produk reaksi eugenol	84
Lampiran 6.	Hasil Kromatogram GCMS produk reaksi isoeugenol	85
Lampiran 7.	Spektrum H-NMR Produk Reaksi Eugenol	86
Lampiran 8.	Spektrum C-NMR Produk Reaksi Eugenol	87
Lampiran 9.	Spektrum H-NMR Produk Reaksi Isoeugenol	88
Lampiran 10.	Spektrum C-NMR Produk Reaksi Isoeugenol	89
Lampiran 11.	Data Hasil Pengukuran Senyawa Hasil Reaksi Dimer Eugenol Dengan Polarimeter	90
Lampiran 12.	Data Hasil Pengukuran Senyawa Hasil Reaksi Dimer Eugenol Dengan Polarimeter	91
Lampiran 13.	Data Hasil Pengujian BSLT	92
Lampiran 14.	Hasil Pengujian MTT	94



BAB I

Universitas Indonesia

PENDAHULUAN

I.1. LATAR BELAKANG

Kanker merupakan penyakit yang mengakibatkan kematian kedua di Indonesia setelah penyakit jantung. Di Indonesia dan dunia tiap tahun penderita kanker terus meningkat. Mulai dari yang tertinggi: kanker payudara, kanker leher rahim (serviks), kanker paru, kanker usus besar (kolorektal), kanker prostat, kanker darah, kanker tulang, kanker hati dan kanker kulit. WHO memperkirakan setiap tahun, 12 juta orang di seluruh dunia menderita kanker dan 7,6 juta di antaranya meninggal dunia. Jika tidak dikendalikan, diperkirakan 26 juta orang akan menderita kanker dan 17 juta meninggal karena kanker pada tahun 2030. (www//health.detik.com/read/2010/04/26/123804/1345485/763/penyebab-kanker-orang-indonesia)

Kanker timbul karena terjadi mutasi pada sel normal oleh bahan radiasi, virus dan bahan karsinogen. Terapi kanker bertujuan untuk mengontrol pertumbuhan atau mematikan sel kanker tanpa mengganggu kelangsungan hidup dan fungsi sel sehat. Terapi kanker dapat dilakukan dengan radiasi (radioterapi), pembedahan, bahan kimia (kemoterapi) dan hormon (endokrinoterapi). Berbagai kajian dan studi tentang obat kanker dilakukan terus menerus mengingat manfaatnya yang besar bagi kesehatan.

Senyawa fenolik memiliki aktifitas biologis penting pada tumbuhan dan hewan seperti peranannya pembawa elektron pada fotosintesis dan dalam aktivitas enzim tertentu, menghambat dan mempercepat pertumbuhan, bersifat racun terhadap herbivora, sehingga dimanfaatkan sebagai herbisida dan lainnya. Selain dimanfaatkan sebagai antioksidan, senyawa fenolik bermanfaat sebagai antimikroba, antikanker dan lain-lain. Eugenol dan isoeugenol termasuk senyawa fenolik yang banyak digunakan dalam industri kosmetik dan makanan. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh T. Atsumi dkk (2000), senyawa tersebut memiliki aktivitas sebagai antioksidan dan memiliki toksisitas yang cukup tinggi yang dapat dimanfaatkan sebagai obat kanker.

Pada umumnya sintesis polimer fenolik dalam kimia organik dapat dilakukan dengan menggunakan katalis logam atau enzim. Katalis logam yang umumnya digunakan adalah Fe(III), Pd(II), Cu(II), Ce(IV) dan Pb(IV). Penggunaan katalis logam membutuhkan pengontrolan yang kadang-kadang lebih rumit dan prosedur daur ulang yang mahal. (Williamson, TC. 1999)

Sintesis polimer fenolik dapat juga dilakukan dengan bantuan enzim. Keuntungan menggunakan enzim sebagai biokatalis adalah sifatnya yang ramah lingkungan, hasil reaksinya spesifik dan tidak berbahaya. Sedangkan kelemahan penggunaan enzim adalah kondisi reaksi yang harus mengikuti kondisi optimum dari enzim tersebut dan reaksi yang berlangsung spesifik, hanya dapat mengkatalisis senyawa-senyawa dari golongan tertentu, sehingga penggunaannya di industri menjadi terbatas.

Salah satu enzim digunakan dalam mengoksidasi senyawa fenolik adalah enzim peroksidase, yang merupakan kelompok enzim oksidoreduktase yang mampu mengkatalisis reaksi oksidasi oleh hidrogen peroksida dari sejumlah substrat. Enzim ini mengkatalisis reaksi oksidasi reduksi dengan substrat yang bertindak sebagai donor hidrogen. Oksidasi senyawa fenolik dan H_2O_2 serta katalis enzim peroksidase akan menghasilkan reaksi penggabungan oksidatif. Radikal fenoksi yang terbentuk akan bereaksi dengan radikal fenoksi lainnya dan membentuk polimer fenolik.

Zat polifenol pada tanaman yang berasal dari turunan fenil alanin melalui proses dimerisasi yang dikenal sebagai monolignol membentuk lignan dengan bantuan enzim peroksidase. Senyawa lignan misalnya podophyllotoxin dan matairesinol memiliki aktivitas sebagai anti kanker. Begitu juga dengan penggunaan polimer fenolik sebagai antioksidan telah banyak dimanfaatkan pada berbagai industri seperti pengolahan pertanian, makanan, kosmetik dan obat-obatan. Selain itu lignan memiliki aktivitas sebagai antimikroba. (Sok, Dai-Eun, 2009)

Reaksi kopling oksidatif senyawa fenolik dengan menggunakan enzim peroksidase dapat menghasilkan senyawa dimer, trimer, dan polimer lainnya. Pembentukan reaksi kopling oksidatif senyawa dimer fenolik dipengaruhi oleh

pH, jumlah oksidator dan jenis *cosolvent* yang digunakan. (Setala, H, 2008).

Pada penelitian yang telah dilakukan oleh Dewi Elvi (2010) melalui reaksi penggabungan (coupling) oksidatif eugenol dan isoeugenol dengan menggunakan enzim Horseradish peroksidase, menghasilkan senyawa dimer yang bersifat optis aktif yaitu (R_a)-(+)-dihidrodieugenol dan (7S,8S)-(-) licarin A dengan hasil 1,1 % yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Pada penelitian ini dilakukan pengontrolan suhu dibawah 35⁰C agar enzim Horseradish peroksidase tidak terdenaturasi selama reaksi berlangsung. Dalam penelitian ini tidak dilakukan penentuan kondisi optimal reaksi, padahal sintesis dimer melalui reaksi kopling oksidatif senyawa fenolik menggunakan enzim peroksidase dipengaruhi oleh faktor pH, oksidator dan *cosolvent* yang digunakan.

Dengan melakukan penentuan kondisi optimal reaksi kopling oksidatif eugenol dan isoeugenol diharapkan akan dihasilkan senyawa dimer dengan rendemen yang tinggi dan akan dilakukan uji aktivitas sebagai anti kanker. Penelitian ini akan mempelajari kondisi optimal reaksi kopling oksidatif untuk pembentukan senyawa dimer eugenol dengan bantuan enzim HRP dengan berbagai variasi perbandingan substrat dan H₂O₂, variasi pH, jenis dan jumlah *cosolvent*. Setelah itu dilakukan reaksi kopling oksidatif menggunakan enzim HRP berdasarkan kondisi optimum reaksi dan selanjutnya produk reaksi yang terbentuk diidentifikasi dengan menggunakan UV-Vis, GCMS, IR dan NMR. Untuk mengetahui bioaktivitas produk reaksi maka dilakukan uji pendahuluan toksisitas dengan menggunakan metode BSLT. Senyawa produk yang diduga memiliki toksisitas yang tinggi kemudian dilakukan uji antikanker dengan metode MTT.

1.2. Rumusan Masalah

Masalah dalam penelitian ini adalah apakah rendemen (yield) akan semakin meningkat dengan mengatur kondisi reaksi sesuai dengan kondisi optimal enzim dan apakah produk reaksi yang dihasilkan memiliki aktivitas sebagai anti kanker.

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan

- untuk menentukan kondisi optimal reaksi penggabungan (coupling) oksidatif senyawa eugenol dan isoeugenol dengan menggunakan enzim Horseradish peroksidase sebagai katalis.
- Mengetahui aktivitas produk reaksi terhadap sel kanker

1.4. Hipotesis Penelitian

- Reaksi penggabungan oksidatif eugenol dan isoeugenol dengan katalis enzim Horseradish peroksidase pada kondisi optimum akan menghasilkan produk reaksi dalam bentuk dimer yang memiliki aktivitas sebagai antikanker.

1.5. Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan kajian dan informasi ilmiah mengenai sintesis dimer eugenol dan isoeugenol yang kemungkinan mempunyai potensi antikanker. Senyawa yang dihasilkan dari hasil sintesis ini dapat dimanfaatkan dan dikembangkan sebagai calon obat antikanker yang bermanfaat untuk penyembuhan penyakit kanker, yang hingga saat ini masih terus diteliti.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Enzim

Enzim merupakan katalis biologis yang umumnya berupa senyawa protein yang dapat meningkatkan kecepatan reaksi kimia dengan menurunkan energi aktivasi. Sebagian besar enzim bekerja secara khas, yang artinya setiap enzim hanya dapat bekerja pada satu macam senyawa atau reaksi kimia tertentu. Hal ini disebabkan karena perbedaan struktur kimia setiap enzim.

Satuan standar yang digunakan untuk mengukur aktivitas enzim adalah unit aktivitas yang dikenal sebagai unit. Satu unit enzim adalah jumlah enzim yang mampu untuk mengkatalisis perubahan setiap μmol substrat menjadi produk per menit pada kondisi tertentu, sedangkan aktivitas spesifik enzim didefinisikan sebagai jumlah unit enzim yang terdapat pada 1 mg protein enzim.

Berdasarkan definisi tersebut maka nilai aktivitas spesifik enzim menunjukkan kemurnian suatu enzim, dengan demikian semakin besar aktivitas spesifiknya maka berarti kemurnian enzim tersebut makin tinggi.

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain: konsentrasi substrat, pH, temperatur, aktivator dan inhibitor. (Sumi Hudiyono, 1998)

1. Konsentrasi substrat

Reaksi enzimatik terjadi karena adanya hubungan atau kontak antara enzim dan substratnya. Oleh karena ukuran enzim lebih besar dari substratnya maka tidak seluruh bagian enzim mengadakan kontak dengan substrat. Kontak antara enzim dan substrat terjadi pada sisi aktif enzim. Kontak ini hanya mungkin terjadi apabila sisi aktif enzim mempunyai ruang yang tepat untuk menampung substrat yang sesuai. Substrat yang konformasinya tidak cocok dengan sisi aktif enzim tidak dapat mengadakan kontak dengan enzim. Hal ini mengakibatkan enzim tidak dapat berfungsi terhadap substrat tersebut. Kontak antara enzim dan

substrat menyebabkan terjadinya suatu kompleks enzim substrat. Kompleks ini akan terurai kembali menjadi produk dan reaktan.

2. Pengaruh pH

Sebagian besar enzim adalah suatu protein, maka perubahan pH akan langsung mempengaruhi sifat ionik dari gugus amino dan gugus karboksilat. Hal ini akan mempengaruhi sisi aktif dan konformasi enzim. pH yang terlalu tinggi atau terlalu rendah akan menyebabkan denaturasi protein, sehingga enzim menjadi tidak aktif lagi. Oleh karena itu perlu dicari pH optimum enzim tersebut.

3. Pengaruh suhu

Pada umumnya enzim adalah suatu protein, sehingga temperatur yang tinggi akan menyebabkan hilangnya fungsi enzim karena mengalami denaturasi.

4. Pengaruh aktivator

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

5. Pengaruh Inhibitor

Inhibitor adalah suatu senyawa yang cenderung menurunkan laju suatu reaksi enzimatik.

Menurut komisi enzim, International Union of Biochemistry (IUB), enzim diklasifikasikan menjadi 6 kelas besar, berdasarkan reaksi total yang dikatalisis seperti ditunjukkan Tabel 2.1 berikut ini (Trevor Palmer, 1991)

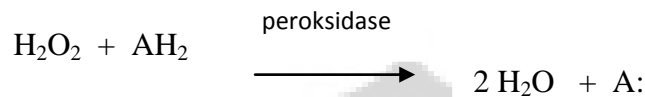
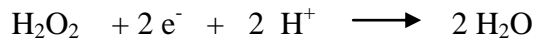
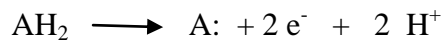
Tabel 2.1. Klasifikasi enzim

Digit Pertama	Kelas Enzim	Jenis Reaksi
1	Oksidoreduktase	Reaksi redoks (transfer elektron atau proton)
2	Transferase	Transfer atom atau gugus dari suatu substrat ke substrat lainnya
3	Hidrolase	Reaksi hidrolisis
4	Liase	Penambahan gugus fungsi pada ikatan rangkap (adisi) atau pemutusan ikatan rangkap dengan pelepasan gugus fungsi
5	Isomerase	Reaksi isomerisasi
6	Ligase	Pembentukan ikatan C-C, C-S, C-O dan C-N diikuti dengan pembentukan isofosfat dari ATP

2.1.1. Enzim Peroksidase (EC 1.11.1.7)

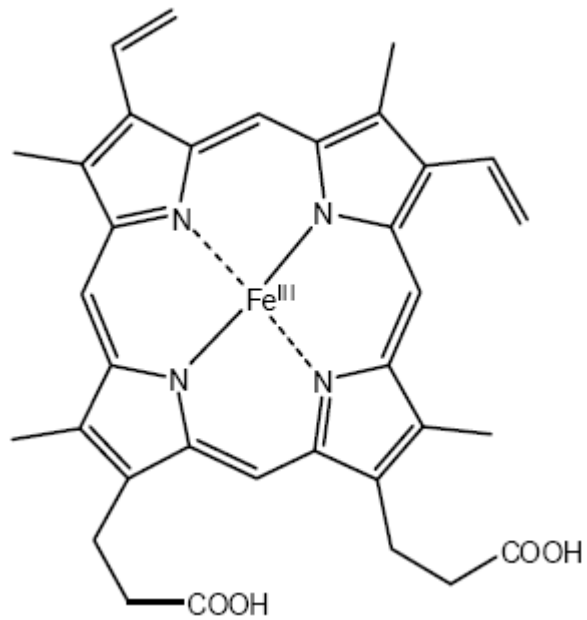
Enzim peroksidase umumnya terdapat pada sel hewan, maupun tanaman. Peroksidase banyak ditemukan pada tanaman sayuran, khususnya pada akar horseradish, kedelai, kentang, tomat dan wortel. Jenis enzim ini sering ditemukan pada golongan horseradish sehingga disebut dengan Horseradish peroksidase (HRP). Enzim peroksidase dalam metabolisme makhluk hidup berfungsi untuk mempercepat konversi H_2O_2 menjadi H_2O , dengan adanya substrat yang bertindak sebagai donor proton.

Persamaan reaksinya adalah sebagai berikut:



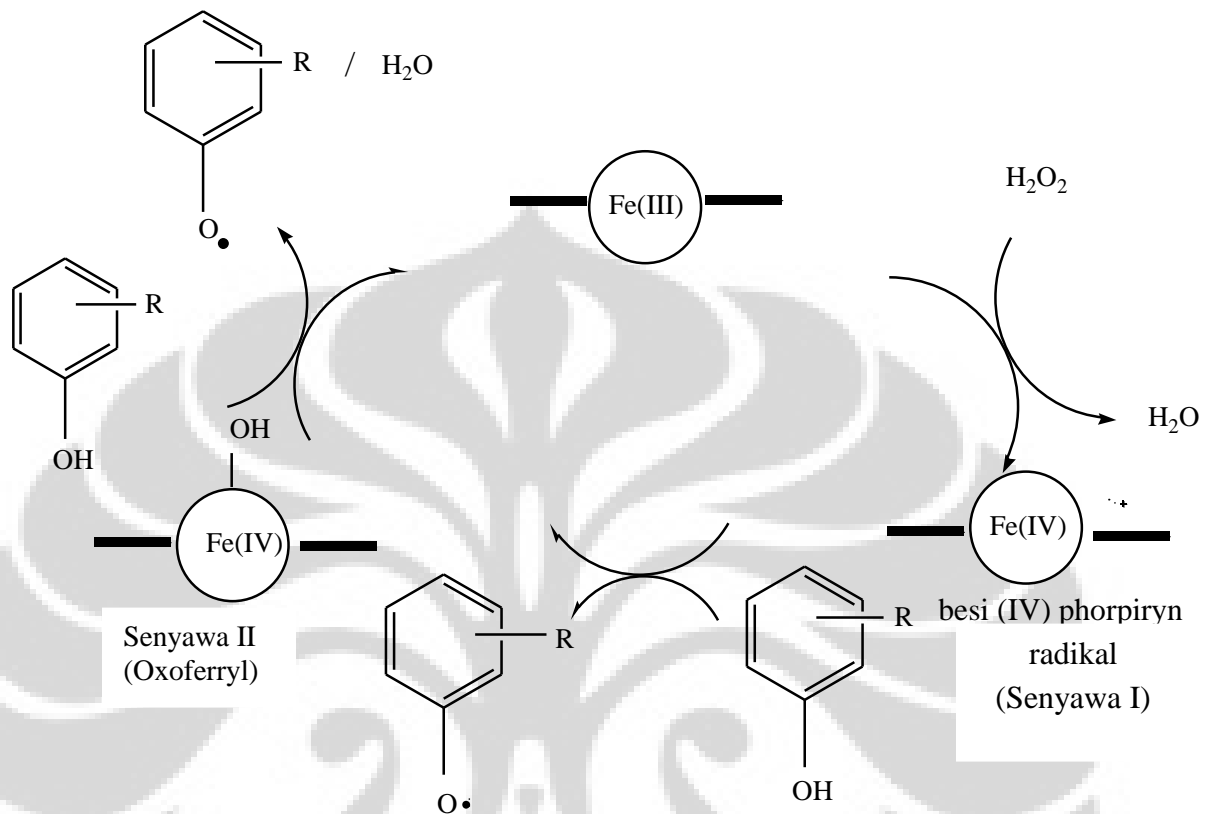
Keterangan: AH_2 = substrat yang bertindak sebagai donor hidrogen

HRP memiliki kofaktor heme yang terdiri dari atom besi yang terikat pada gugus protophorphirin IX. HRP memiliki dua residu asam amino yang berperan penting dalam heme *pocket* yaitu residu His42 dan Arg38. HRP juga memiliki ikatan kovalen antara ion Fe dengan His170 dan ikatan hidrogen dengan Asp247. Ikatan hidrogen ini yang memainkan peranan dalam menjaga kestabilan Fe dalam struktur geometrinya. Residu His42 memiliki peranan dalam mengatur katalisis asam basa. Residu Arg38 dan Asp membantu histidin dalam mengatur katalisis asam basa. Residu Arg38 tidak hanya terlibat dalam mempromosikan pemutusan ikatan O-O peroksida tetapi juga memiliki peranan penting dalam memfasilitasi pengikatan H_2O_2 pada HRP. Beberapa residu asam amino lainnya yang memainkan peranan dalam mengatur keasaman His42, yaitu Asn70 yang memodulasi katalisis asam-basa, melalui ikatan hidrogen antara oksigen rantai samping dan atom nitrogen dari His42.



Gambar. 2.1. Struktur Protophyrin IX besi (III) (Setala, H. 2008)

Mekanisme reaksi antara enzim HRP dengan senyawa fenolik sebagai substrat dapat dilihat pada Gambar 2.2.

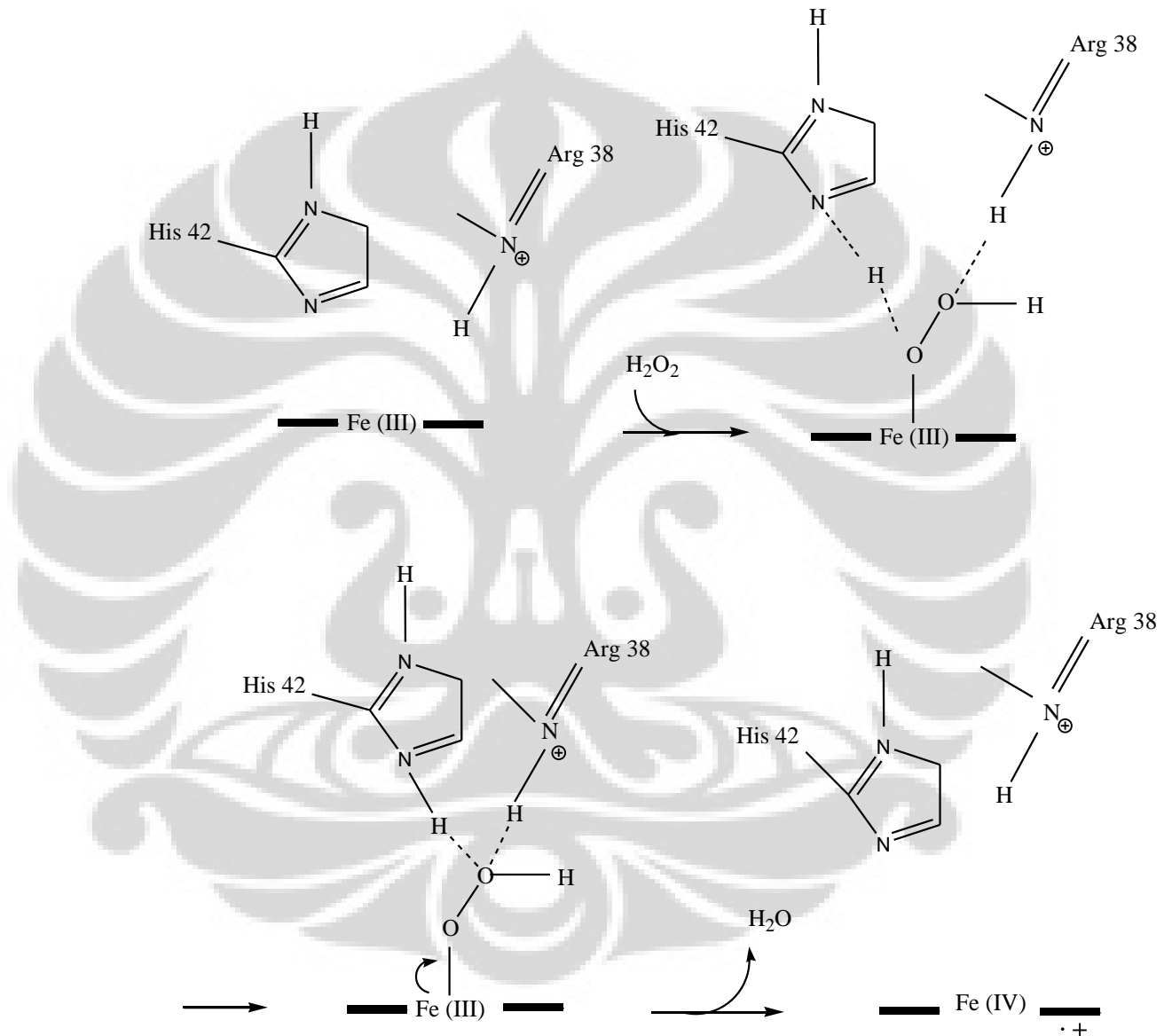


Gambar 2.2. Mekanisme reaksi yang dikatalisis oleh enzim HRP

(Kobayashi,2001)

Tahap pertama dalam siklus katalitik adalah reaksi antara H₂O₂ dan Fe(III) enzim membentuk ikatan kompleks Fe(III)-hidroperoksi dan akan mereduksi H₂O₂ menjadi H₂O. Atom Fe(III) pada protoporphyrin IX akan teroksidasi menjadi Fe(IV) porphyrin radikal. Tahap selanjutnya Fe(IV) porphyrin radikal akan mengikat atom hidrogen dari suatu senyawa fenolik dan menghasilkan radikal fenoksi dan oxoferryl (senyawa II). Radikal fenoksi ini akan berekombinasi satu dengan yang lain dan menghasilkan produk dimer, oligomer maupun polimer.

Tahap penting dalam reaksi kopling oksidatif senyawa fenolik adalah pembentukan senyawa I (Fe(IV) porphyrin radikal). Mekanisme pembentukan reaksi senyawa I dapat dilihat pada Gambar 2.3. dibawah ini.



Gambar. 2.3. Mekanisme pembentukan senyawa I kompleks Enzim HRP dengan H₂O₂ (Hiner, Alexander. 2002)

Reaksi dimulai ketika H_2O_2 memasuki heme dan membentuk keadaan transisi. Pada keadaan ini proton dari peroksida ditransfer ke residu Histidin, selanjutnya ikatan O-O pada peroksida putus secara heterolitik dan atom O akan berikatan koordinasi dengan Fe dari Heme. Selanjutnya molekul H_2O akan terlepas dan terbentuk senyawa I. (Hiner, 2002)

Enzim HRP banyak digunakan sebagai katalis pada reaksi polimerisasi secara radikal dan reaksi kopling. Penelitian yang dilakukan oleh Davidenko dan tim (2004) menyatakan bahwa enzim HRP dapat digunakan sebagai katalis untuk mengoksidasi senyawa-senyawa fenolik seperti guaiakol, pyrogallol, katekin dan katekol.

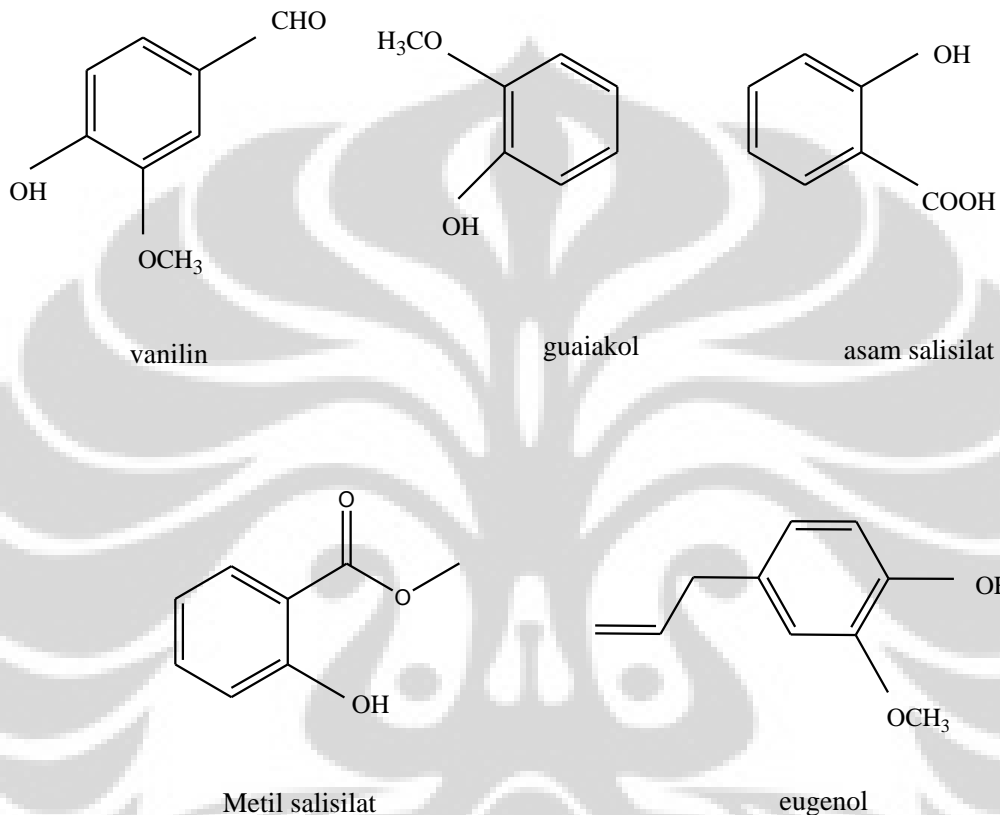
Kelompok enzim oksidoreduktase lain yang banyak digunakan dalam reaksi kopling oksidatif senyawa fenolik adalah enzim laccase yang mengandung Cu, sedangkan oksidator yang digunakan adalah O_2 (Mita, Naruyoshi. 2003)

2.2. Senyawa Fenolik

Senyawa fenolik banyak terdapat di alam, mempunyai variasi struktur yang luas, mudah ditemukan di tanaman, daun, bunga dan buah. Golongan senyawa yang termasuk fenolik sederhana antara lain adalah vanilin, guaiakol, asam salisilat dan asam sinamat. Senyawa fenolik memiliki struktur yang khas yaitu memiliki satu atau lebih gugus hidroksil yang terikat pada satu atau lebih cincin aromatik benzena, sehingga senyawa ini memiliki sifat yang khas yaitu dapat teroksidasi. Kemampuan membentuk radikal fenoksi yang stabil pada proses oksidasi menyebabkan senyawa ini banyak digunakan sebagai antioksidan.

Aktivitas fisiologis senyawa fenolik yang ada pada tumbuhan sangat beragam. Senyawa fenol sederhana terlibat dalam pembawa elektron pada fotosintesis dan dalam pengaturan enzim tertentu. Beberapa senyawa tertentu yang tergolong senyawa flavanoid berperan dalam merangsang atau menarik

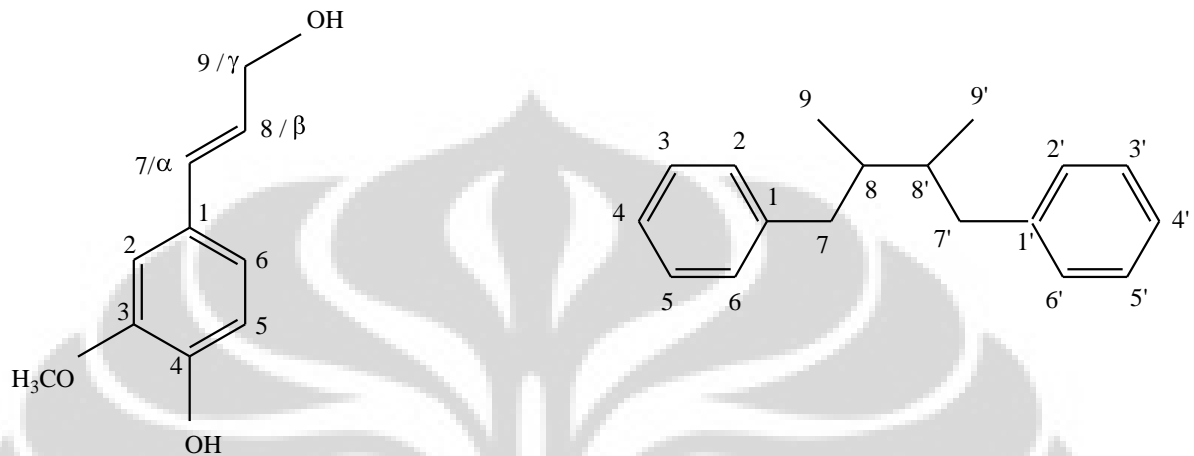
serangga agar membantu penyerbukan ke bunga. Adapula beberapa senyawa fenolik yang bersifat racun terhadap hewan pemangsa tanaman.



Gambar 2.4. senyawa fenolik

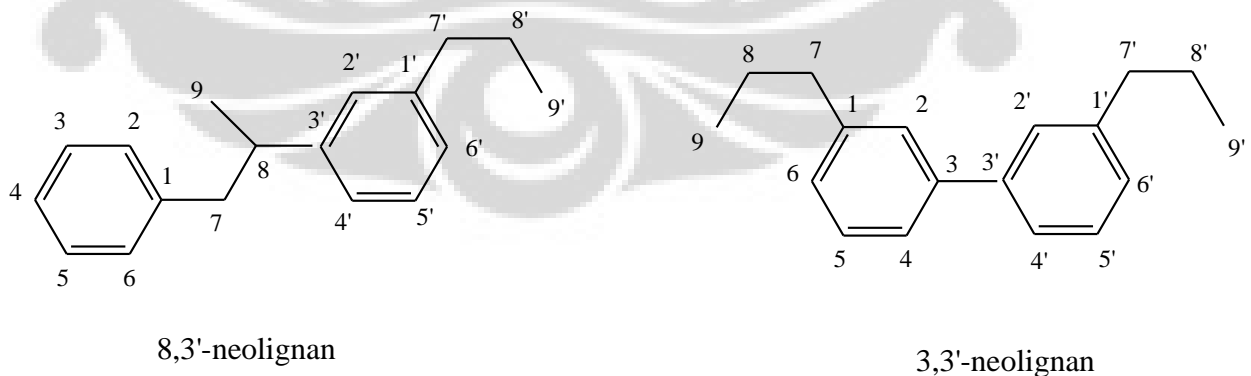
2.3. Lignan

Senyawa-senyawa golongan fenil propanoid membentuk dimer dengan struktur lignan. Senyawa lignan memiliki struktur dasar (struktur induk) yang terdiri dari 2 unit fenil propanoid yang tergabung melalui ikatan 8-8' atau ikatan β - β . Ikatan khas ini digunakan sebagai dasar penamaan lignan.

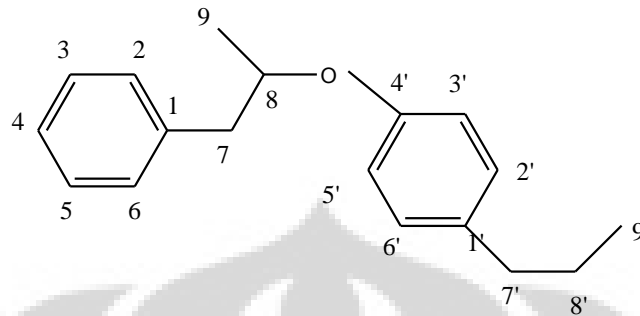


Gambar. 2.5. Dasar penomeran atom karbon senyawa monolignol dan lignan

Penggabungan 2 unit fenil propanoid dapat terjadi selain melalui ikatan selain 8-8' digolongkan dalam neolignan. Sedangkan, jika 2 unit fenil propanoid bergabung melalui atom O, maka senyawa tersebut termasuk golongan oxineolignan. (www.chem.qmul.ac.uk/iupac/lignan)



Gambar.2.6. Senyawa golongan neolignan



8-4' oxineolignan

Gambar.2.7. Senyawa golongan oxineolignan

Senyawa lignan memiliki banyak modifikasi pada struktur induknya, yang antara lain dapat menghasilkan penambahan cincin, penambahan atau penghilangan atom C dan sebagainya. Senyawa ini tersebar luas di dunia tumbuhan dan banyak digunakan sebagai antioksidan dan sebagai komponen sinergistik dalam insektisida. Selain itu lignan merupakan komponen aktif dalam tumbuhan obat tertentu. (Herbert, B. 1995). Salah satu senyawa golongan lignan yaitu podophylotoxin diketahui dapat menghambat tumor.

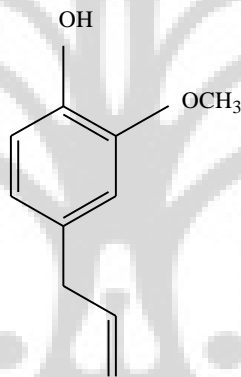
2.4. Eugenol

Eugenol adalah senyawa guaiakol yang tersubstitusi oleh gugus alil dan merupakan turunan fenil propanoid. Senyawa eugenol tidak bersifat toksik, stabil pada suhu ruang, namun sensitif terhadap cahaya. Eugenol merupakan komponen utama minyak cengkeh. Hampir 95% total minyak atsiri pada minyak cengkeh tersusun atas eugenol. Selain itu eugenol juga ditemukan pada pala, kayu manis dan daun salam. Kandungan eugenol terbesar diperoleh dari kuncup bunga tanaman *Eugenia caryophyta*, family Myrtaceae.

Nama IUPAC : 1-hidroksi-2 metoksi-4-(2-propenil) benzena

Rumus molekul : $C_{10}H_{12}O_2$

Bentuk Fisik	: cairan tidak berwarna
Berat molekul	: 164,20 g/mol
Titik leleh	: -9 ⁰ C
Titik didih	: 256 ⁰ C
Titik nyala	: 104 ⁰ C
Berat jenis (20 ⁰ C)	: 1,06 g/cm ³
Indeks bias (20 ⁰ C)	: 1,5410
Kelarutan	: Tidak larut dalam air, tetapi larut dalam alkohol, eter, kloroform dan asam asetat.



Gambar. 2.8. Struktur eugenol

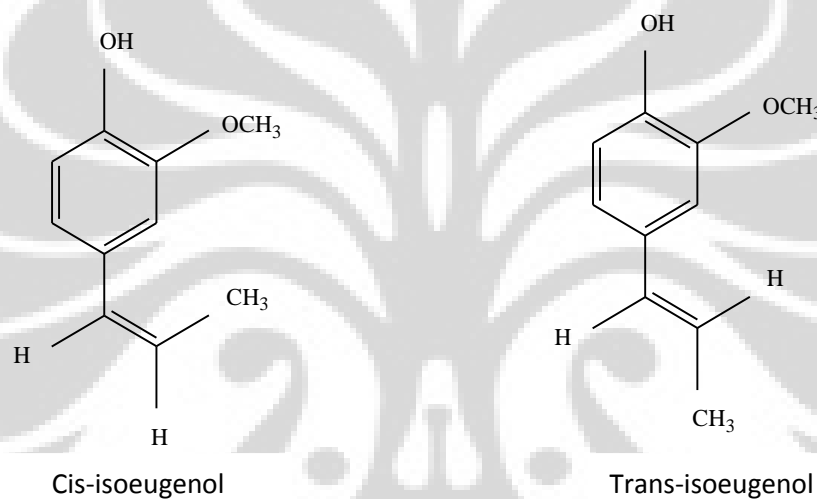
2.5. Isoeugenol

Isoeugenol berasal dari turunan fenil propanoid, yang berfungsi sebagai pertahanan terhadap serangan hewan dan organisme serta sebagai penarik serangga dalam proses penyerbukan bunga.

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

Nama IUPAC	: 2 metoksi-4-(1-propenil) fenol
Rumus molekul	: C ₁₀ H ₁₂ O ₂
Bentuk Fisik	: cairan tidak berwarna sampai kekuningan
Berat molekul	: 164,20 g/mol

Titik leleh	: -10°C
Titik didih	: $266-268^{\circ}\text{C}$
Titik nyala	: 112°C
Indeks bias (20°C)	: 1,5410
Kelarutan	: Tidak larut dalam air, tetapi larut dalam eter dan etanol



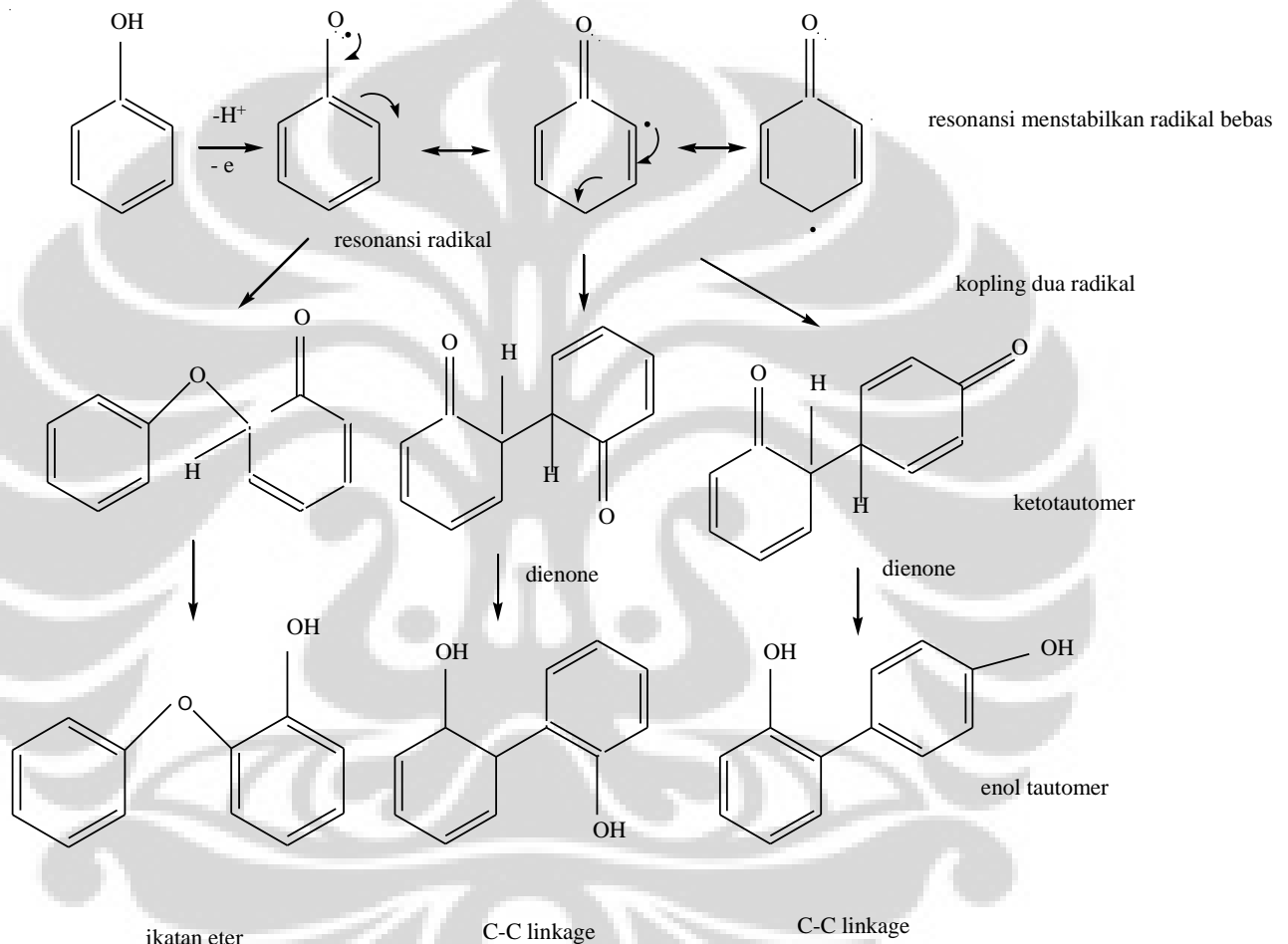
Gambar. 2.9. Struktur isoeugenol

Isoeugenol digunakan sebagai pewangi pada parfum, pemberi rasa dan aroma, minyak esensial dan sebagai obat (antiseptik dan analgesik). Isoeugenol terdapat dalam minyak cengkeh dan biji pala.

2.6. Reaksi Kopling Oksidatif Fenol

Reaksi kopling oksidatif fenol adalah suatu reaksi penggabungan antara dua molekul fenol atau lebih melalui proses reaksi oksidasi. Penggabungan dari dua residu fenolat dapat terjadi secara inter dan intra molekuler dari dua radikal yang dibentuk melalui oksidasi elektron tunggal pada masing-masing senyawa fenol.

Reaksi yang dikatalisis oleh enzim peroksidase dengan adanya H_2O_2 akan menghasilkan produk radikal dimana radikal tersebut akan mengalami penggabungan dengan senyawa lain yang memiliki radikal. Intermediet radikal yang terbentuk lebih stabil pada atom C-8, C-5 dan atom O.

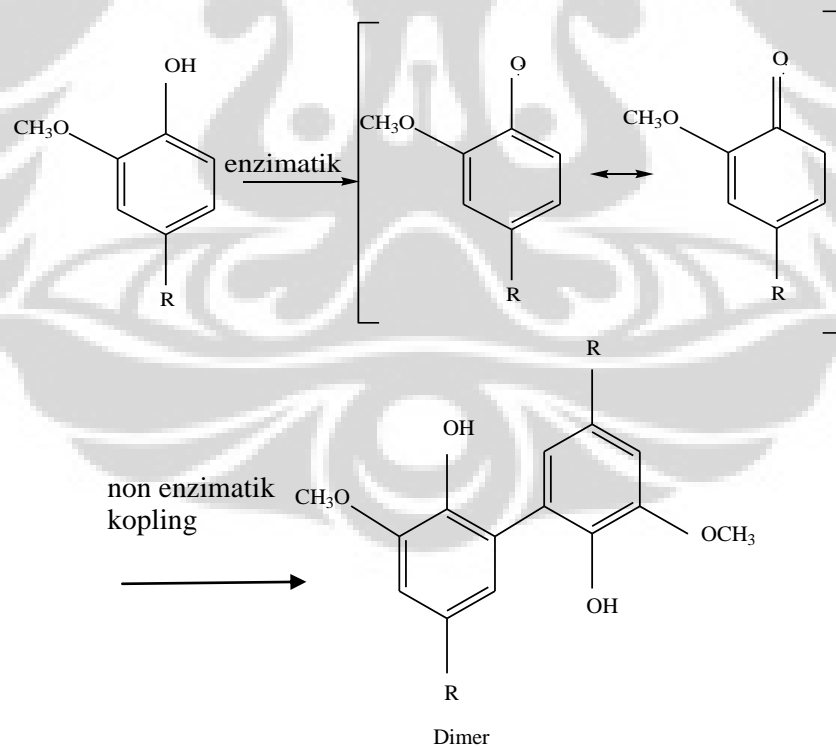


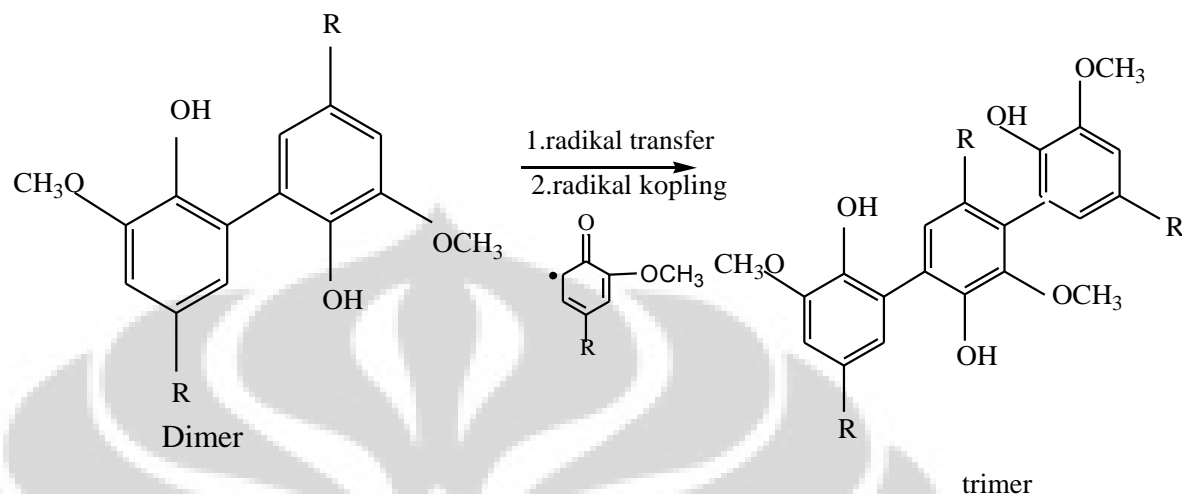
Gambar.2.10. Reaksi kopling oksidatif senyawa fenolik

Hasil kopling radikal dapat membentuk dimer fenol, baik pada posisi orto-orto maupun orto-para. Selain itu juga terdapat kemungkinan penggabungan O-para, O-orto dan O-O.

Reaksi kopling oksidatif senyawa fenolik dengan menggunakan enzim HRP dipengaruhi oleh pH, jumlah oksidator, jenis cosolvent dan jumlah cosolvent. (Setala, H. 2008). Tahapan penggabungan intermediet radikal dalam reaksi kopling oksidatif tidak dipengaruhi oleh adanya enzim. Pengaruh enzim hanya terjadi pada terbentuknya radikal fenoksi. (Antoniotti, S, 2004)

Tingkat keasaman (pH) akan mempengaruhi pembentukan hasil reaksi kopling oksidatif (dimer, trimer, ataupun polimer). Pembentukan dimer melalui kopling radikal fenolik berlangsung pada kondisi asam, hal ini disebabkan intermediet radikal fenoksi yang dihasilkan akan lebih stabil pada kondisi asam, sedangkan pembentukan trimer, tetramer, dan pentamer akan berlangsung pada pH netral. (Antoniotti, Sylvain. 2004). Pembentukan dimer pada pH netral akan menghasilkan rendemen (*yield*) yang rendah. (Brunow, 2001)



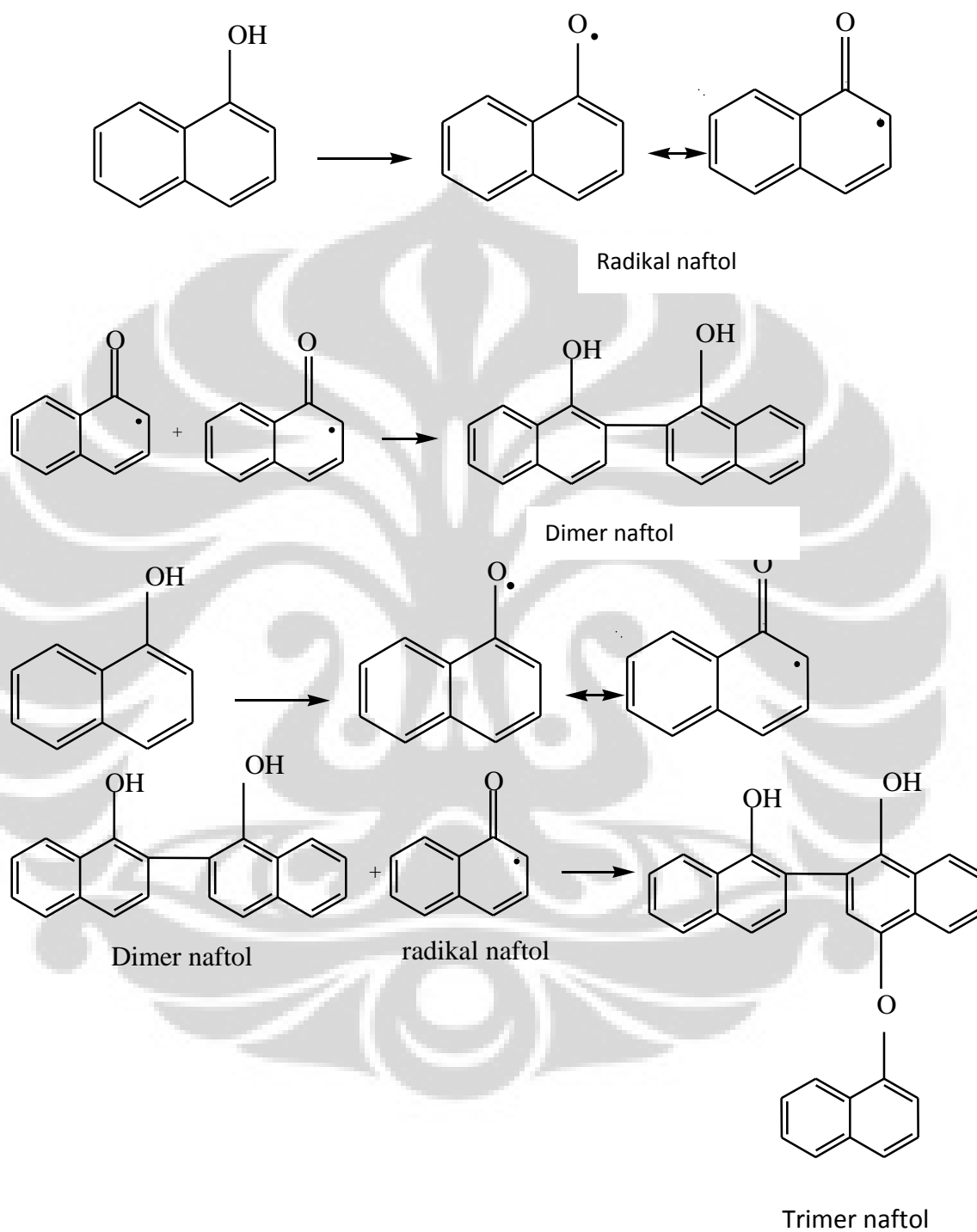


Gambar. 2.11. Tahapan pembentukan dimer dan polimer senyawa fenolik (Antoniotti, Sylvain. 2004)

2.7. Reaksi Kopling Oksidatif Senyawa Golongan Fenol Lainnya

Reaksi kopling oksidatif senyawa fenolik dengan katalis enzim peroksidase lainnya yang pernah dilaporkan antara lain adalah penelitian yang dilakukan oleh Kaisa Syrjanen (2000) dengan substrat apocynol yang menghasilkan neolignan dehydroapocynol. Reaksi kopling oksidatif berlangsung pada pH 3,5, *cosolvent* yang digunakan adalah aseton dan berlangsung pada temperatur ruang.

Fangxiang Xu (2005) menggunakan substrat 1-naftol yang dikatalisis oleh enzim HRP pada pH 7, yang menghasilkan senyawa polimer naftol (trimer naftol dan tetramer naftol).

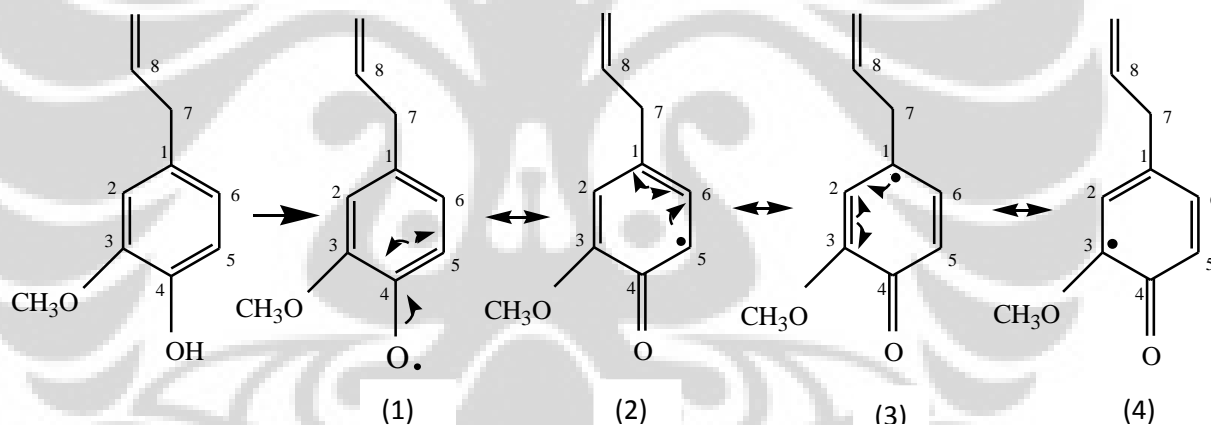


Gambar. 2.12. Mekanisme reaksi pembentukan dimer dan trimer naphthol
(Fangxiang,2005)

2.8. Reaksi Kopling Oksidatif Eugenol

Senyawa eugenol dapat mengalami proses kopling oksidatif yang sama dengan senyawa fenolik. Terjadi pembentukan radikal dengan bantuan enzim peroksidase yang dapat mengoksidasi eugenol menjadi bentuk radikal. Kemudian radikal eugenol akan beresonansi dan mengalami proses kopling membentuk dimer, trimer bahkan polimer.

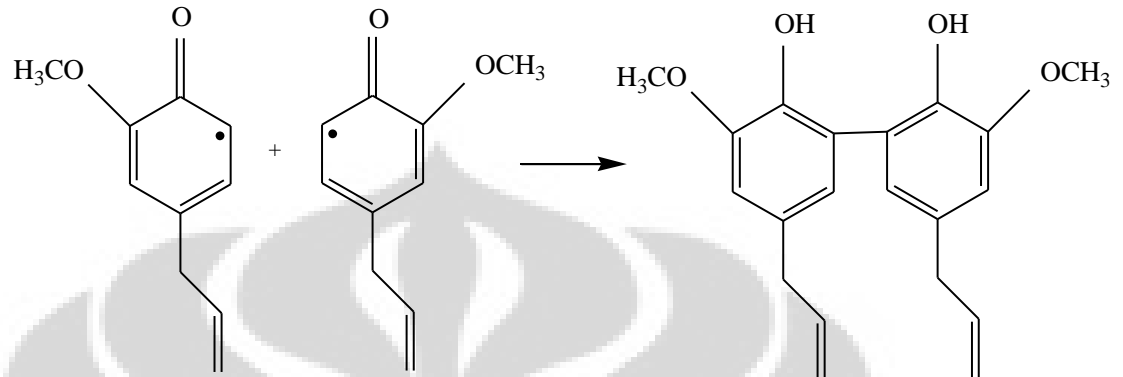
Produk dimer yang banyak terbentuk merupakan kopling pada posisi orto-orto. Hal ini disebabkan karena kestabilan radikal yang lebih tinggi dibandingkan dengan posisi lainnya dan rintangan sterik yang lebih kecil.



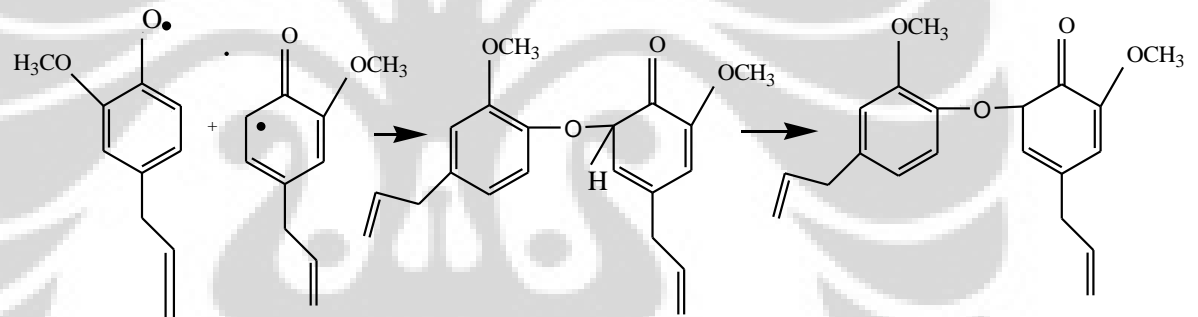
Gambar. 2.13. Resonansi radikal eugenol

Dari kemungkinan resonansi radikal fenoksi eugenol tersebut maka dapat diduga kopling oksidatif yang dapat membentuk dimer. Kemungkinan dimer yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar. 2.14

1. Penggabungan radikal pada posisi C-5 dan C-5'

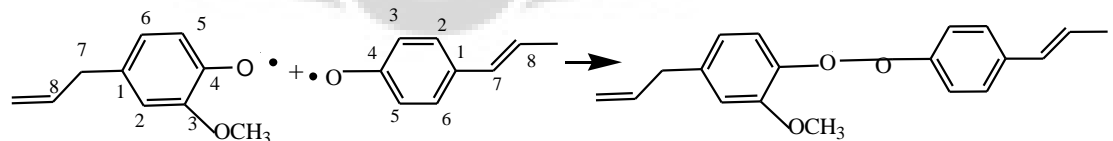


2. Penggabungan radikal pada posisi C-5 dan O radikal



Gambar. 2.14. Pembentukan Reaksi Kopleng Oksidatif Eugenol

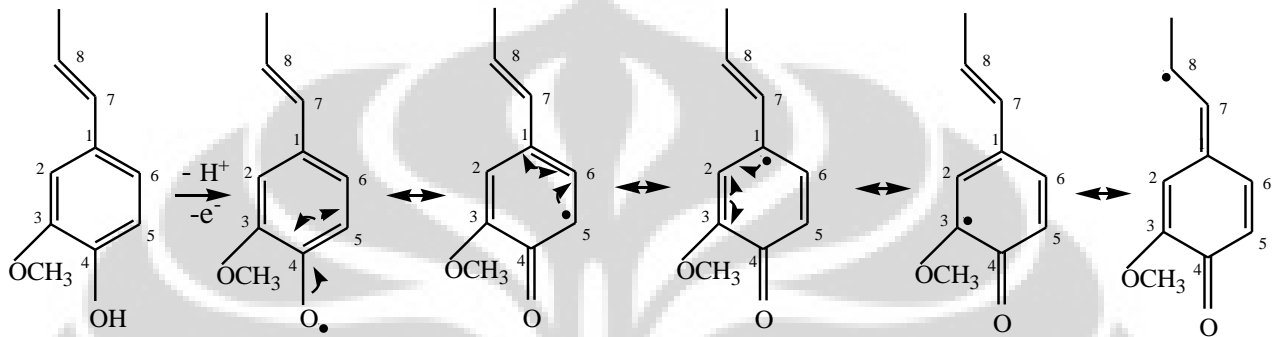
Penggabungan pada posisi radikal oksigen (1) dan radikal oksigen (1) akan membentuk senyawa peroksi yang tidak stabil.



Sedangkan penggabungan radikal pada posisi C-1 dan C-1 (3), sulit untuk terbentuk, hal ini disebabkan karena pengaruh rintangan sterik.

2.9 Reaksi Kopling Oksidatif Isoeugenol

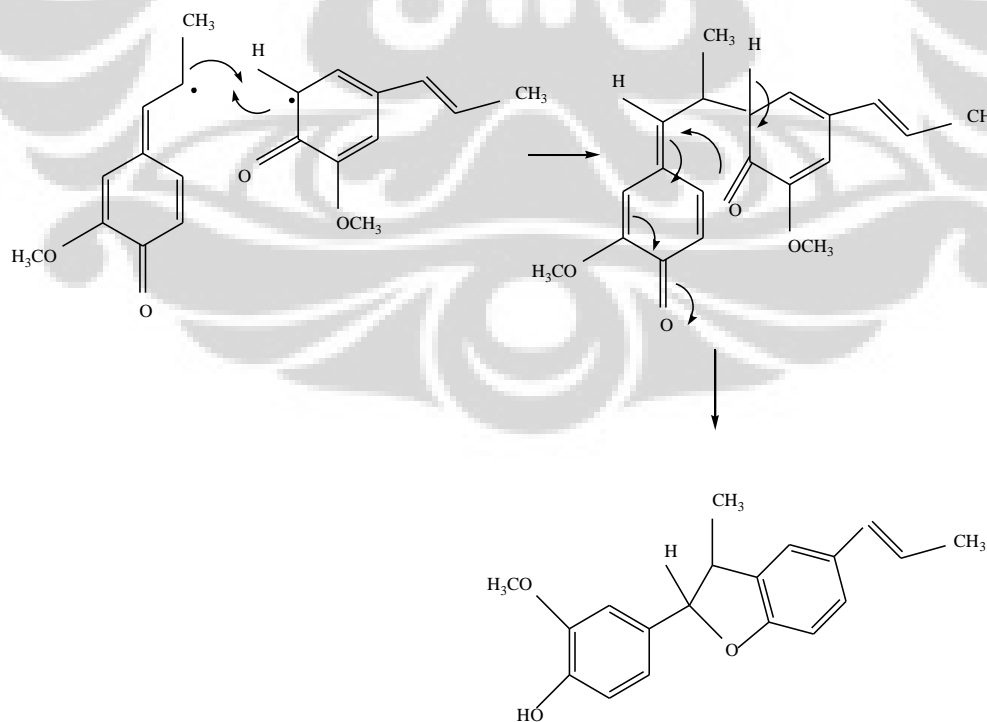
Senyawa isoeugenol dapat mengalami proses kopling oksidatif yang sama dengan senyawa fenolik.



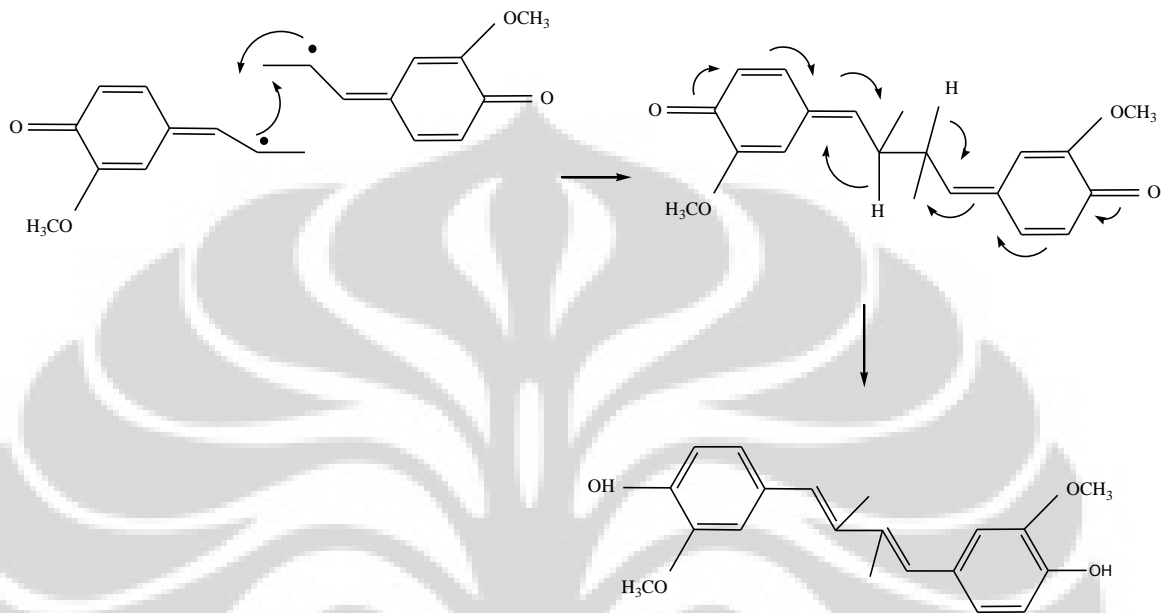
Gambar. 2.15. Resonansi radikal isoeugenol

Dilihat dari struktur resonansi radikal fenoksi isoeugenol tersebut, kemungkinan dimer yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 2.16.

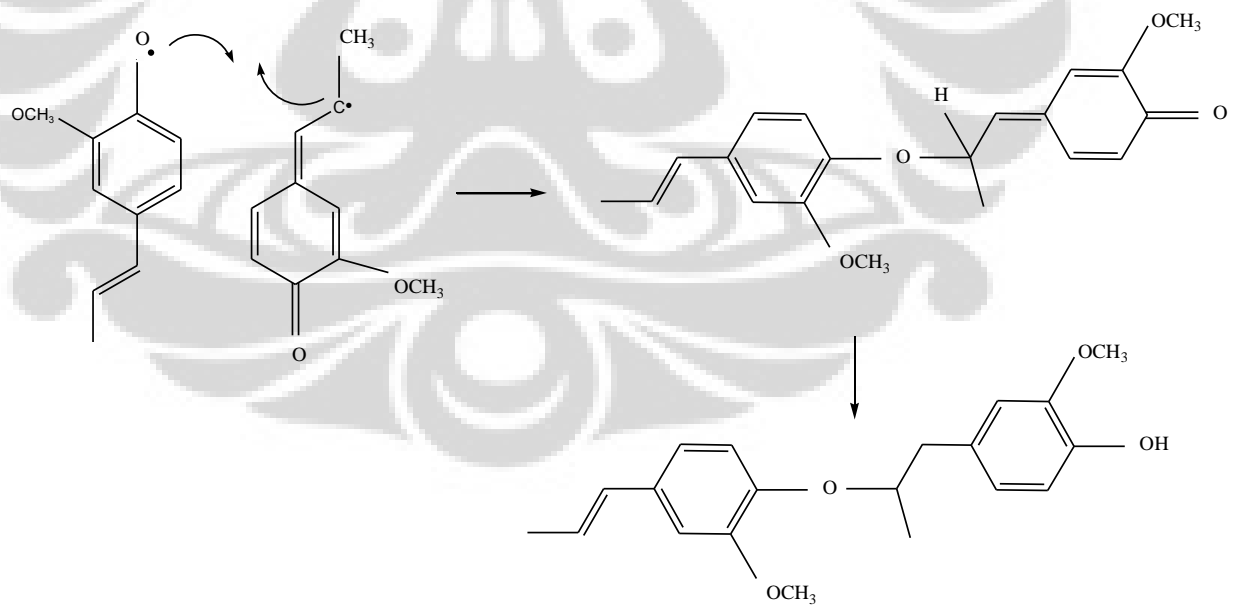
1. Penggabungan pada posisi 8-5'



2. Penggabungan pada posisi 8-8'



3. Penggabungan pada posisi 8-O-4'



Gambar. 2.16. Reaksi kopling oksidatif isoeugenol

2.10. Analisis Hasil Reaksi

Senyawa dimer yang terbentuk dari eugenol dan isoeugenol dapat diamati secara kualitatif dengan UV-Vis, FTIR, GC-MS, NMR (H-NMR dan C-NMR). Untuk mengetahui sudut putar $[\alpha]$ digunakan polarimeter dan aktivitas anti kanker dapat diukur dengan metode BSLT dan MTT.

2.10.1. Analisis Dengan UV-Vis

Spektrum UV dan cahaya tampak digunakan untuk mengidentifikasi suatu senyawa. Penyerapan sinar UV (200-400 nm) oleh suatu molekul, akan menghasilkan transisi diantara tingkat energi elektronik molekul tersebut. Oleh karena itu, serapan cahaya oleh sampel dalam daerah spektrum UV tergantung pada struktur elektronik dari senyawa tersebut. Panjang gelombang dari absorbansi maksimum adalah nilai karakteristik suatu serapan oleh senyawa sampel dinyatakan sebagai λ_{\max} .

2.10.2. Analisis Dengan FTIR

Spektrofotometer FTIR dapat mengidentifikasi ikatan kimia dalam sebuah molekul dengan menghasilkan spektrum serapan sinar infra merah. FTIR meneruskan scan spektrum infra merah dari suatu sampel yang menyerap sinar infra merah. Ikatan kimia dapat bervibrasi pada berbagai frekuensi bergantung pada unsur dan jenis ikatannya. Pada ikatan tertentu, terdapat beberapa frekuensi spesifik yang dapat bervibrasi. Berdasarkan mekanika kuantum, frekuensi ini berhubungan dengan keadaan dasar (frekuensi paling rendah) dan keadaan tereksitasi (frekuensi lebih tinggi). Salah satu yang menghasilkan frekuensi vibrasi molekul adalah dengan mengeksitasi ikatan kimia dengan cara menyerap energi cahaya infra merah. Energi yang berhubungan dengan tingkat vibrasi molekul ini umumnya 1-10 kkal/mol yang akan menghasilkan spektrum

elektromagnetik pada sinar inframerah. Kalau gerakan vibrasi aktif, dapat menyebabkan terjadinya polarisasi, adanya muatan positif dan negatif yang hanya akan menghasilkan pita serapan.

2.10.3. Analisis Dengan GC-MS

GC-MS adalah metode yang menggabungkan kromatografi gas dan spektroskopi massa, untuk mengidentifikasi zat dalam sampel. Metode analisis dilakukan dengan membandingkan konsentrasi massa atom dari spektrum yang dihasilkan. Prinsip kerja GC-MS, dimulai dari sampel dipanaskan atau diuapkan, kemudian dilewatkan pada kolom. Campuran senyawa ini dipisahkan berdasarkan kekuatan absorpsi atau elusi dalam fasa diam dari kolom. Selanjutnya senyawa yang sudah terpisah akan ditembak oleh arus elektron, dan menyebabkan senyawa terpisah menjadi fragmen. Fragmen ini dapat lebih besar atau lebih kecil dari molekul aslinya. Fragmen sebenarnya adalah muatan ion dengan massa tertentu. Massa fragmen jika dibagi muatan disebut perbandingan massa per muatan (m/z), dimana nilai m/z biasanya mewakili berat molekul fragmen.

2.10.4. Analisis Dengan Polarimeter

Senyawa yang dapat memutar bidang sinar terpolarisasi ke kanan atau dalam arah yang sesuai dengan gerak jarum jam didefinisikan sebagai zat putar ke kanan (dextrorotatory) atau positif (+), sedangkan senyawa yang memutar dalam arah kebalikannya disebut putar kekiri (levorotatory) atau negatif (-). Alat yang dapat mengukur besarnya perputaran optik dari senyawa disebut polarimeter. Polarimeter adalah alat yang didesain untuk mempolarisasikan cahaya dan kemudian mengukur sudut rotasi bidang polarisasi cahaya oleh suatu senyawa optis aktif. Besarnya perputaran itu bergantung pada struktur

molekul, suhu, panjang gelombang sinar yang digunakan untuk pengukuran, banyaknya molekul (konsentrasi) pada jalan cahaya dan pelarut.

Sudut putar spesifik (*specific rotatory*) ialah besarnya perputaran yang dinyatakan dalam derajat dari larutan yang mengandung X g senyawa di dalam 1mL larutan yang diletakkan di dalam tabung polarimeter sepanjang 1 dm pada suhu dan panjang gelombang tertentu. Panjang gelombang (λ) yang sering digunakan adalah 589,3 nm (garis D natrium), dimana 1 nm = 10^{-9} m. Sudut putar spesifik untuk suatu senyawa (misalnya pada 25⁰C) dapat dihitung dari sudut putar diamati dengan menggunakan rumus :

$$[\alpha]_{D}^{25} = \frac{\alpha}{L.C}$$

Dengan $[\alpha]_{D}^{25}$ = Sudut putar spesifik garis D natrium pada 25⁰C

α = Sudut putar teramati pada 25⁰C

L = panjang tabung dalam dm

C = konsentrasi larutan sampel dalam g/mL

2.11 . Uji Toksisitas

2.11.1. Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Metode BSLT merupakan uji toksisitas pendahuluan yang banyak digunakan terhadap suatu senyawa aktif. Kemampuan bahan aktif untuk membunuh larva udang (*brine shrimp*) *Artemia salina* L., merupakan salah satu metode yang banyak digunakan dalam studi senyawa anti tumor dari jaringan tumbuhan, selain pengamatan kemampuan daya inhibisi bahan aktif terhadap pertumbuhan sel tumor pada tanaman kentang. Metode ini banyak digunakan untuk uji hayati dalam analisis residu pestisida, anestetika, senyawa turunan morfin, karsinogenitas suatu senyawa dan polutan pada air laut. Keuntungan metode ini diantaranya adalah cepat, biaya yang digunakan relatif sedikit dan

sederhana. Besarnya aktivitas toksisitas terhadap larva udang laut dinyatakan dengan LC_{50} (*lethal median concentration*) yaitu konsentrasi senyawa uji (ppm) yang dapat menyebabkan kematian 50% organisme uji dibawah kondisi yang sesuai.

Larva *A. salina* Leah didapat dengan cara menetasakan telurnya dalam air laut atau air laut buatan selama 24 jam dengan temperatur maksimum untuk penetasan adalah 20-30%. Larva udang *Arthemia Salina* yang digunakan berumur 48 jam karena pada umur tersebut larva *A. salina* bersifat paling peka. Hal ini disebabkan dinding sel larva masih lunak sehingga senyawa asing dalam air laut yang diserap melalui dinding selnya akan segera mempengaruhi hidupnya. Senyawa asing yang bersifat racun itu akan menyebabkan kematian pada larva udang.

Sebanyak 10-15 ekor larva udang dimasukkan kedalam vial berisi sampel dengan beberapa konsentrasi berbeda, dan dibiarkan pada tempat dengan udara dan sinar yang cukup. Persentasi kematian larva *A. Salina* dihitung setelah 24 jam pemberian terhitung sejak larva dimasukkan kedalam vial berisi sampel uji, untuk kemudian dihitung nilai LC_{50} (konsentrasi senyawa uji dalam ppm yang dapat menyebabkan kematian sebanyak 50% larva salina dibawah kondisi yang telah ditetapkan).

2.11.2. Uji Sitotoksik

Uji sitotoksitas merupakan salah satu contoh uji yang digunakan untuk mengevaluasi daya sitotoksik suatu senyawa yang dilakukan secara invitro untuk senyawa-senyawa seperti produk farmasi, obat kanker dan kosmetik. Pengembangan metode invitro sebagai alternatif pengganti pengujian menggunakan hewan uji mempunyai relevansi yang cukup baik yang bertujuan untuk mendeteksi potensi sitotoksik suatu obat pada manusia.

Metode yang digunakan dalam uji sitotoksitas salah satunya adalah

metode MTT. Metode ini didasarkan atas pengukuran intensitas warna secara kolorimeter, yang terjadi sebagai hasil metabolisme suatu substrat oleh sel hidup menjadi sel berwarna. Garam MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida) yang ditambahkan pada media akan direduksi oleh enzim reduktase suksinat tetrazolium yang terdapat didalam mitokondria aktif menjadi formazan yang merupakan zat warna ungu.

Kemampuan suatu sel untuk mereduksi MTT memberikan indikasi aktivitas pada mitokondria dari suatu sel yang dapat diinterpretasi sebagai suatu ukuran dari jumlah sel.



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai bulan September 2010 sampai bulan Mei 2011 di Laboratorium Penelitian Kimia, FMIPA Universitas Indonesia, Laboratorium Kimia Bahan Alam dan Pangan, Laboratorium NMR Pusat Penelitian Kimia LIPI Serpong dan Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam, ITB Bandung.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Bahan Penelitian

- Substrat : eugenol, isoeugenol
- Katalis : Enzim Horseradish peroksidase (HRP) dengan aktivitas 100 unit/mg
- Aktivator katalis (oksidator) : H_2O_2 30%
- Buffer fosfat dan Buffer sitrat
- Pelarut: metanol, etil asetat, asetonitril, aseton, etanol, n-heksan, aquades
- Zat pengering : Na_2SO_4 anhidrat
- Pemurnian dan pemisahan : Pelat KLT

3.2.2. Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas yang ada di laboratorium kimia seperti labu, gelas piala, gelas ukur, corong pisah, batang pengaduk, labu dua leher, pipet tetes, termometer, neraca analitik, pH meter, stirrer, lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm. Instrumentasi yang digunakan antara lain spektrofotometer UV-Vis, spektrofotometer IR, GCMS, NMR (H-NMR dan C-NMR) serta polarimeter.

3.3. Cara Kerja

3.3.1. Optimasi reaksi kopling oksidatif eugenol yang dikatalisis enzim HRP

- Penentuan perbandingan eugenol dan H₂O₂

Variasi perbandingan mol eugenol dan H₂O₂ yang digunakan adalah 1:0,25; 1:0,5; 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5; 1:6; 1:7; 1:8; 1:9

Sebanyak 0,5 gram eugenol dan H₂O₂ sesuai dengan perbandingan tertentu dimasukkan kedalam labu bulat dua leher. Selanjutnya ditambahkan enzim HRP 7,5 mg dalam 10 mL buffer fosfat pH 6,5 dan diaduk dengan menggunakan stirrer. Reaksi berlangsung selama 30 menit dan temperatur dijaga agar tidak melebihi 35⁰C. Kemudian campuran reaksi diekstraksi dengan menggunakan etil asetat, sehingga didapatkan fasa etil asetat dan fasa air. Fasa etil asetat hasil pemisahan dilakukan uji KLT dan pengukuran dengan UV-Vis untuk mengetahui perbandingan eugenol dan H₂O₂ optimal. Selanjutnya dilakukan reaksi pada berbagai perbandingan eugenol dan H₂O₂ 1:0,5; 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5; 1:6; 1:7; 1:8; 1:9. Kemudian dilakukan uji KLT dan pengukuran dengan spektrofotometer UV-Vis untuk menentukan perbandingan eugenol dan H₂O₂ optimal.

- Penentuan pH reaksi

Variasi pH yang digunakan adalah 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8.

Kedalam labu bulat 2 leher dimasukkan eugenol dan H₂O₂ sesuai dengan perbandingan optimal dan enzim HRP 7,5 mg. Selanjutnya ditambahkan larutan buffer pada berbagai pH sebanyak 10 mL dan diaduk dengan menggunakan stirrer. Reaksi berlangsung selama 30 menit dan temperatur dijaga agar tidak melebihi 35⁰C. Kemudian campuran reaksi diekstraksi dengan menggunakan etil asetat, sehingga didapatkan fasa etil asetat dan fasa air. Fasa etil asetat hasil pemisahan digunakan untuk uji KLT dan pengukuran dengan UV-Vis untuk menentukan produk reaksi optimal.

- Penentuan jenis *cosolvent*

Variasi jenis *cosolvent* yang digunakan adalah aseton, etanol, metanol, asetonitril dan etil asetat. Kedalam labu bulat 2 leher dimasukkan eugenol dan H₂O₂ sesuai dengan perbandingan optimal, enzim HRP 7,5 mg dan larutan buffer pH reaksi optimal dan *cosolvent*, kemudian diaduk dengan menggunakan stirrer. Reaksi berlangsung selama 30 menit. Kemudian campuran reaksi diekstraksi dengan menggunakan etil asetat, sehingga didapatkan fasa etil asetat dan fasa air. Fasa etil asetat hasil pemisahan digunakan untuk uji KLT dan pengukuran dengan UV-Vis untuk menentukan produk reaksi optimal.

- Penentuan jumlah *cosolvent*

Variasi jumlah *cosolvent* yang digunakan adalah 5%, 10%, 25%, 50%, 75% dan 90%. Kedalam labu bulat 2 leher dimasukkan eugenol dan H₂O₂ sesuai dengan perbandingan optimal, enzim HRP 7,5 mg dan larutan bufer pH reaksi optimal dan jumlah *cosolvent* sebanyak 10 mL, kemudian diaduk dengan menggunakan stirrer. Reaksi berlangsung selama 30 menit. Kemudian campuran reaksi diekstraksi dengan menggunakan etil asetat, sehingga didapatkan fasa etil asetat dan fasa air. Fasa etil asetat hasil pemisahan digunakan untuk uji KLT dan pengukuran dengan UV-Vis untuk mengetahui jumlah *cosolvent* yang digunakan. Kemudian dilakukan uji KLT dan pengukuran dengan spektrofotometer UV-Vis untuk menentukan produk reaksi optimal.

3.3.2. Sintesis Dimer Eugenol Melalui Reaksi Kopliling Oksidatif

Menggunakan Enzim HRP Pada Kondisi Optimum

Sebanyak 1,01 gram eugenol ditambahkan 0,3 mL H₂O₂ 30% dalam labu bulat dua leher tertutup, kemudian direaksikan dengan enzim HRP 15 mg, 20 mL buffer pH 3 dan 20 mL 10% metanol. Reaksi berlangsung dengan pengadukan

menggunakan stirrer selama 1 jam dan dikontrol suhunya agar tidak melebihi 35°C. Keberhasilan reaksi diamati secara kualitatif dengan terjadinya perubahan warna reaksi. Setelah 1 jam campuran hasil reaksi diekstraksi dengan menggunakan etil asetat dalam corong pisah. Fasa etil asetat dipisahkan dari fasa air, sisa air yang terdapat dalam fasa organik dihilangkan dengan menambahkan Na₂SO₄ anhidrat 5 gram. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan cara menguapkan pelarutnya. Untuk mengetahui jumlah komponen yang terdapat dalam hasil reaksi dilakukan dengan Uji Kromatografi Lapisan Tipis, dimana sebagai pembanding digunakan larutan eugenol dalam etil asetat.

3.3.3. Sintesis Dimer Isoeugenol Melalui Reaksi Kopling Oksidatif Menggunakan Enzim HRP

Sebanyak 1,01 gram isoeugenol ditambahkan 0,3 mL H₂O₂ 30% dalam labu bulat dua leher tertutup, kemudian direaksikan dengan enzim HRP 15 mg, 20 mL buffer pH 3 dan 20 mL 10% metanol. Reaksi berlangsung dengan pengadukan menggunakan stirrer selama 1 jam dan dikontrol suhunya agar tidak melebihi 35°C. Keberhasilan reaksi diamati secara kualitatif dengan terjadinya perubahan warna reaksi. Setelah 1 jam campuran hasil reaksi diekstraksi dengan menggunakan etil asetat dalam corong pisah. Fasa etil asetat dipisahkan dari fasa air, sisa air yang terdapat dalam fasa organik dihilangkan dengan menambahkan Na₂SO₄ anhidrat 5 gram. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan cara menguapkan pelarutnya. Untuk mengetahui jumlah komponen yang terdapat dalam hasil reaksi dilakukan dengan Uji Kromatografi Lapisan Tipis, dimana sebagai pembanding digunakan larutan eugenol dalam etil asetat.

3.3.4. Uji KLT Dan Pemisahan Komponen Hasil Reaksi

Uji KLT dilakukan untuk mengetahui banyaknya komponen yang terdapat dalam senyawa hasil reaksi. Uji KLT dilakukan dengan menggunakan larutan pengembang n heksan dan etil asetat dengan perbandingan optimum 4:1.

Selanjutnya dilakukan pemisahan dengan menggunakan KLT preparatif. Spot yang diduga produk utama kemudian diambil dan dilarutkan dengan etil asetat. Hasil pemisahan berupa kristal kemudian dianalisa lebih lanjut menggunakan instrumentasi UV-Visible, IR, GCMS, H-NMR, C-NMR dan polarimeter.

3.3.5. Pengukuran Dengan Spektrofotometer UV-Visibel

Sebanyak 1 mg senyawa uji dilarutkan dalam 10 mL pelarut etil asetat sehingga terbentuk larutan homogen. Larutan tersebut ditentukan panjang gelombangnya pada serapan maksimum (λ_{\max}).

3.3.6. Pengukuran Dengan Spektrofotometer FTIR

Sebanyak 1 mg senyawa uji digerus dengan 50 mg KBr dengan mortar sampai homogen, selanjutnya diletakkan dalam cetakan pellet. Pellet KBr diukur pada rentang bilangan gelombang 4000-660 cm^{-1} .

3.3.7. Pengukuran Dengan Kromatografi Gas Dan Spektrometer Massa

Pengukuran kromatografi gas menggunakan instrument dari Agilent seri 6890 dan spektrometer massa seri 5953. Metode yang digunakan pada pengukuran kromatografi gas dan spektrometer massa adalah metode 6890, menggunakan kolom kapiler model Agilent 19091J-433 (HP-5, 0,25 mm*30 m* 0,25 μm), fasa gerak yang digunakan adalah gas helium sedangkan fasa diamnya adalah campuran fenil dan polimer dimetilsiloksana 5:95. Model alirannya adalah aliran konstan dengan laju alir 1 mL/menit. Sebanyak 2 μL sampel dengan konsentrasi 50 ppm diinjeksikan ke dalam kolom kromatografi dan diteruskan ke spektrometer massa. Hasil kromatografi dan spektrometer massa dikeluarkan dalam bentuk puncak senyawa (GC) dan dilanjutkan dengan bentuk-bentuk fragmentasi senyawa tersebut (MS).

3.3.8. Pengukuran Dengan NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*)

Sampel dilarutkan dalam pelarut CDCl_3 . Sampel dimasukkan kedalam

tabung NMR sampai tinggi larutan berada 4 cm dari tinggi tabung 20 cm. Tabung dimasukkan kedalam alat NMR untuk dianalisis ^1H NMR dan ^{13}C NMR.

3.3.9. Penentuan Sudut putar $[\alpha]$ Dengan Polarimeter.

Sebanyak 0,02 g senyawa hasil reaksi dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL, kemudian dilarutkan dengan etil asetat hingga tanda batas. Selanjutnya, larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung polarimeter 20 cm dan dibaca sudut putar optiknya, $[\alpha]$.

3.4. Uji Toksisitas Metode BSLT

Uji Brine Shrimp Lethality Test dilakukan sesuai dengan yang tercantum dalam Meyer et al,1982.

3.4.1. Penetasan Larva Udang

Kurang lebih 50-100 mg telur udang ditetaskan didalam tempat persegi panjang (2x10 cm) yang dilengkapi pembatas berlubang diameter 2 mm dan diisi air laut, ditutup dengan kertas aluminium pada bagian telur dan dibiarkan 48 jam, maka telur akan menetas dan larva-larva udang yang akan diuji diambil dengan pipet dari sisi yang terang.

3.4.2. Persiapan Larutan Yang Akan Diuji

Senyawa produk reaksi yang akan diuji dibuat dengan konsentrasi 10, 100, 500 dan 1000 ppm dalam air laut.

3.4.3. Uji Toksisitas Metode BSLT

Larva udang yang hidup sebanyak 10-11 ekor dimasukkan kedalam vial uji yang berisi 100 μL air laut. Ditambahkan larutan sampel yang akan diuji dengan konsentrasi 10, 100, 500 dan 1000 ppm.masing-masing sebanyak 100 μL .Untuk setiap konsentrasi dilakukan 3 kali pengulangan. Kontrol dilakukan tanpa penambahan sampel, kemudian didiamkan selama 24 jam. Dihitung jumlah

larva yang mati dan yang masih hidup. Selanjutnya tingkat mortalitas dihitung dengan membandingkan antara jumlah larva mati dibagi dengan jumlah total larva.

Dengan membuat grafik antara log konsentrasi terhadap mortalitas diperoleh regresi linier dengan $y = ax + b$. Nilai LC_{50} diperoleh dengan memasukkan nilai $y = 50$, maka diperoleh konsentrasi senyawa uji yang menyebabkan kematian 50% larva yang disebut LC_{50} . Suatu zat dikatakan aktif jika mempunyai nilai $LC_{50} \leq 50$ ppm.

3.5. Uji Sitotoksik terhadap Sel Murine leukimia P-388

Pengujian terhadap sel kanker Murine leukimia P-388 dilakukan penambahan sampel yang dilarutkan dalam pelarut DMSO. Pengenceran sampel dilakukan dengan penambahan larutan bufer fosfat pH 7,3-7,65. Sampel dengan konsentrasi yang beragam ditambahkan kedalam sel dalam *microplate* lalu dikocok dengan *microplate mixer* dan disimpan kembali dalam inkubator CO_2 . Sebagai kontrol negatif digunakan DMSO dan kontrol positif digunakan senyawa standar cisplatin. Sel diinkubasi selama 48 jam, kemudian ditambahkan reagen MTT [3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida] dan dikocok dengan *microplate mixer*. Inkubasi dilakukan selama 4 jam, kemudian ditambahkan stop solution (SDS) dan dikocok dengan baik tanpa meninggalkan busa yang mengganggu dalam pengamatan. Inkubasi dilanjutkan kembali selama 24 jam.

Pengukuran optical density (OD) dilakukan dengan *microplate reader*, 24 jam setelah penambahan stop solution. Setelah itu dilakukan penentuan nilai aktivitas yang dinyatakan dalam persen (%) menggunakan persamaan:

$$\% \text{ aktivitas} = \frac{X - Y}{X} \times 100\%$$

X = OD dari sel P388 yang tidak mendapat perlakuan (kontrol negatif)

Y = OD dari sel P388 yang mendapat perlakuan

Nilai IC_{50} diperoleh dari grafik hubungan antara konsentrasi senyawa bahan uji dengan nilai % aktivitas. Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan sel sebanyak 50%.

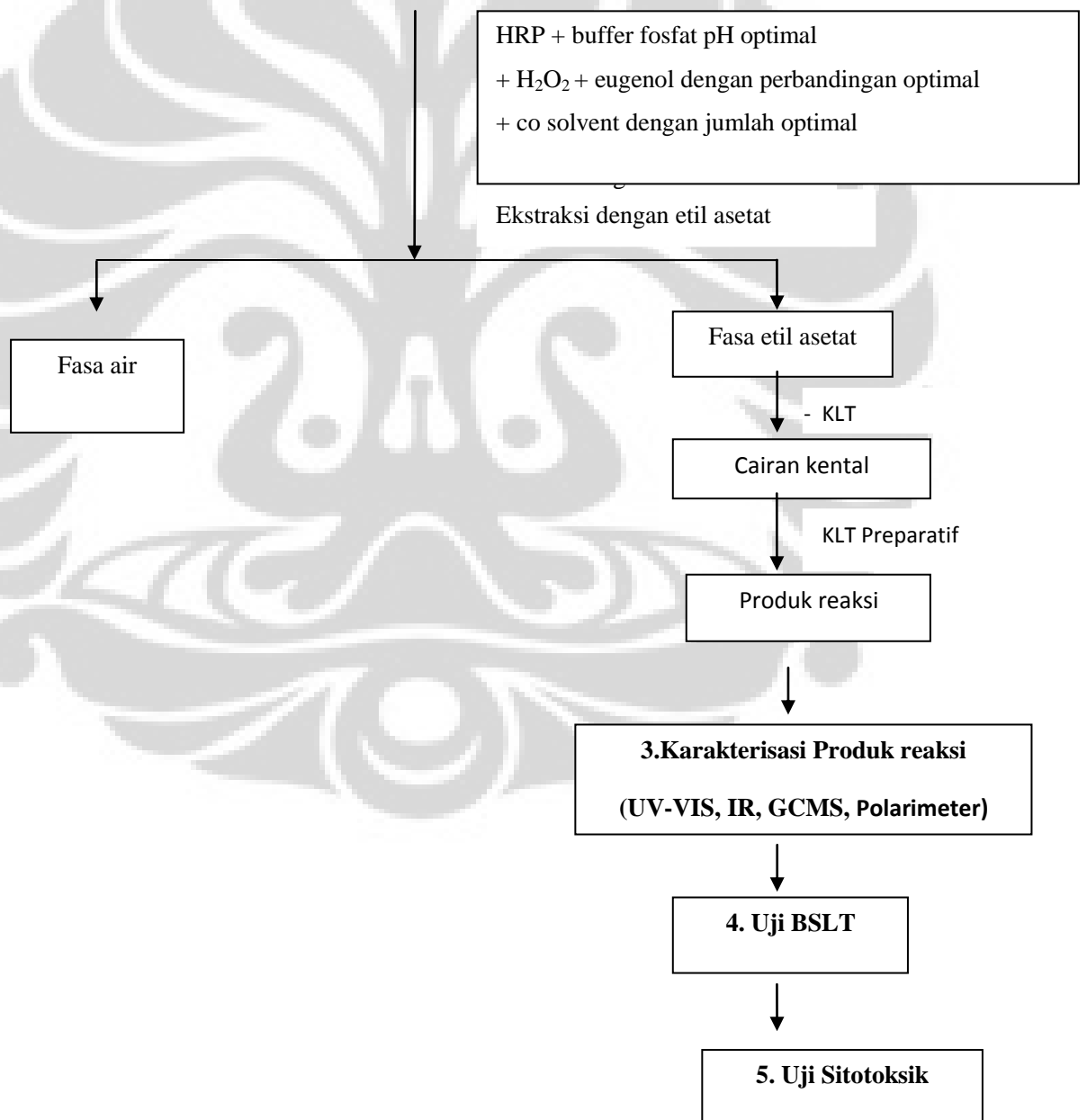


3.6. Bagan Kerja

1. Optimasi Reaksi Kopling Oksidatif Senyawa Eugenol Dengan Enzim Peroksidase

- a. Variasi perbandingan jumlah eugenol dan oksidan (H_2O_2)
- b. pH
- c. jenis cosolvent
- d. jumlah cosolvent

2. Sintesis Reaksi Penggabungan (Kopling) Oksidatif senyawa eugenol (isoeugenol)



BAB IV

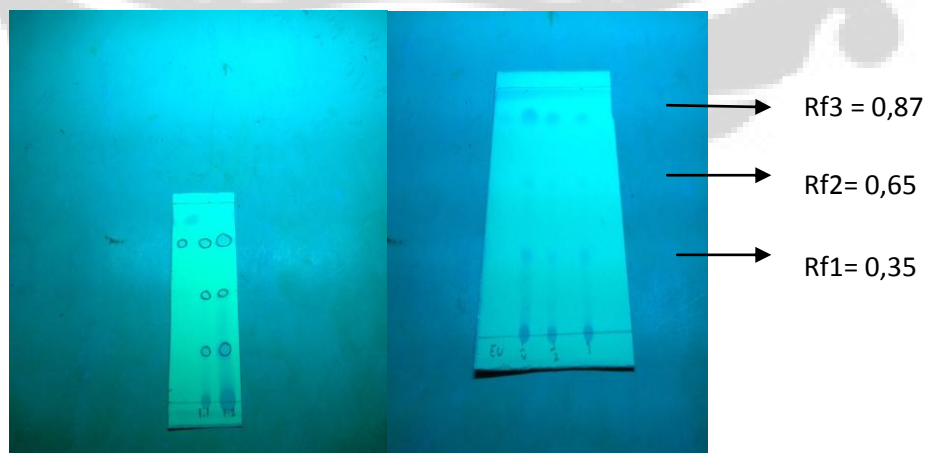
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Optimasi Reaksi Kopling Oksidatif Eugenol Menggunakan Enzim Horseradish Peroksidase

Reaksi kopling oksidatif eugenol dengan bantuan enzim Horseradish peroksidase (HRP) dipengaruhi oleh beberapa faktor. Untuk mendapatkan produk yang optimal maka pada penelitian ini dilakukan pengujian reaksi terhadap pengaruh perbandingan jumlah eugenol dan oksidator (H_2O_2), pH, jenis pelarut (*cosolvent*) dan jumlah *cosolvent*.

4.1.1. Optimasi Perbandingan Eugenol dan H_2O_2

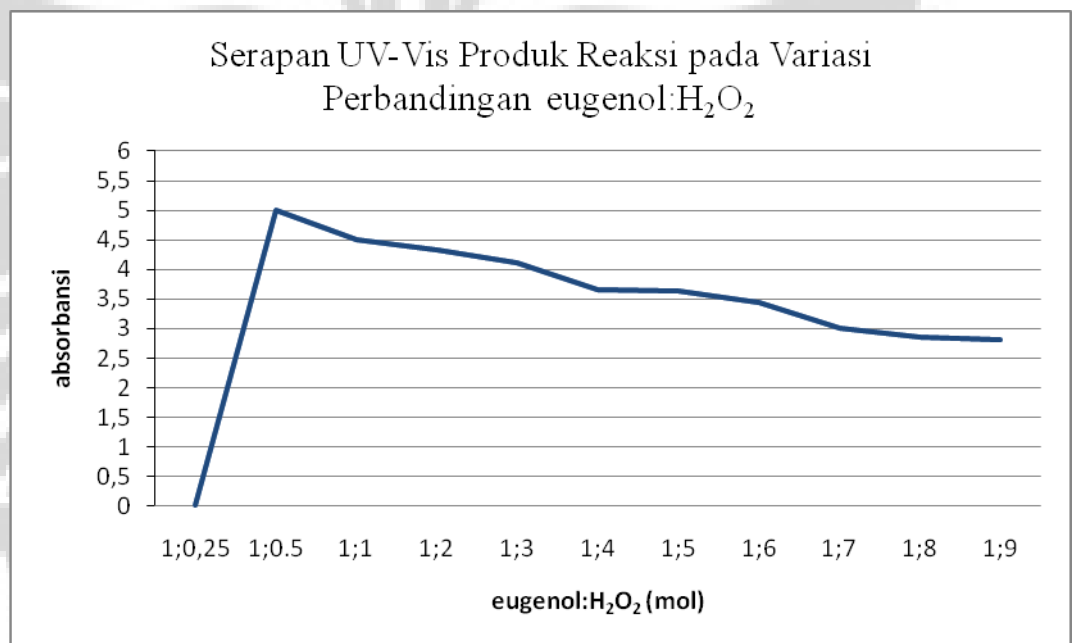
Pembentukan produk melalui reaksi kopling oksidatif dengan berbagai perbandingan eugenol dan H_2O_2 dengan bantuan katalis enzim HRP menghasilkan larutan berwarna kuning dan kemudian diekstraksi dengan etil asetat. Fasa etil asetat yang diperoleh kemudian diuji KLT dengan larutan pengembang n-heksan dan etil asetat 4:1. Hasil KLT dapat dilihat pada Gambar 4.1



Gambar 4.1. Hasil KLT reaksi kopling oksidatif eugenol pada berbagai perbandingan eugenol dan H₂O₂

Hasil KLT menunjukkan terdapat 3 spot dengan R_f yang berbeda. Spot pertama memiliki R_f1 = 0,35 yang berukuran lebih besar dan diduga merupakan produk utama, spot kedua dengan R_f 2 = 0,65 yang berukuran lebih kecil dibandingkan dengan spot pertama yang diduga merupakan hasil reaksi samping. Spot ketiga memiliki R_f 3 = 0,87 sama dengan R_f eugenol yang menunjukkan masih ada eugenol yang masih tersisa.

Hasil pengukuran dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 285 nm dapat dilihat pada Gambar 4.2 dibawah ini



Gambar. 4.2. Grafik Serapan UV-Vis Produk Reaksi pada Variasi Perbandingan Eugenol dan H₂O₂

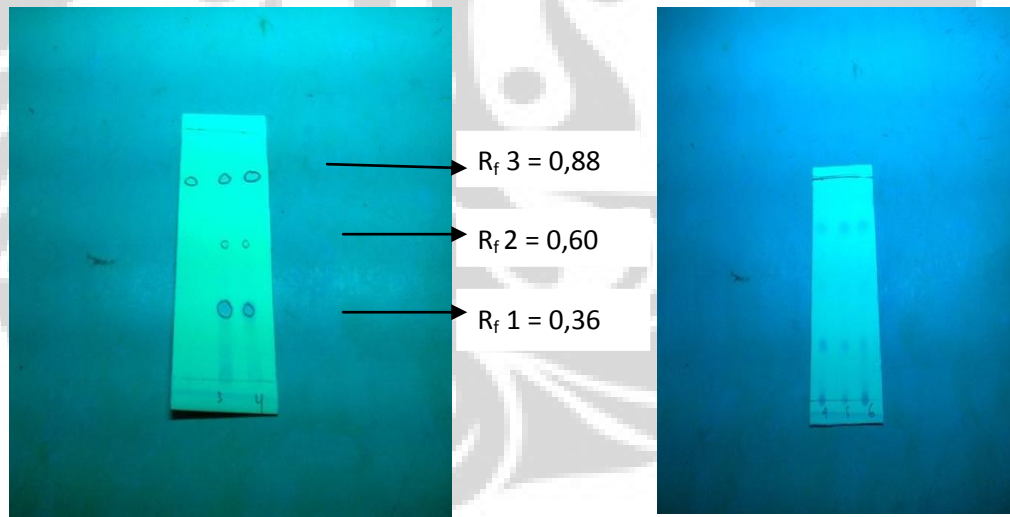
Hasil pengujian dengan UV-Vis menunjukkan pada perbandingan 1:0,25 absorbansi akan meningkat. Hal ini yang berkaitan dengan laju reaksi pembentukan produk yang semakin meningkat dan mencapai optimal pada perbandingan eugenol dan H₂O₂ 1:0,5. Hal ini menunjukkan bahwa kompleks

substrat enzim telah terbentuk dan enzim telah jenuh. Selanjutnya pembentukan produk semakin berkurang yang ditandai dengan terjadi penurunan absorbansi dengan semakin meningkatnya jumlah H_2O_2 . Pada kondisi ini tidak ada lagi enzim bebas, sehingga penambahan H_2O_2 tidak akan meningkatkan laju reaksi. Perbandingan optimum eugenol: H_2O_2 dalam reaksi kopling oksidatif eugenol adalah 1:0,5.

4.1.2. Optimasi pH Reaksi

Salah satu faktor yang mempengaruhi reaksi kopling oksidatif dengan enzim adalah pH. Tingkat keasaman (pH) akan menentukan produk reaksi yang dihasilkan dalam bentuk dimer, trimer, oligomer bahkan polimer lainnya.

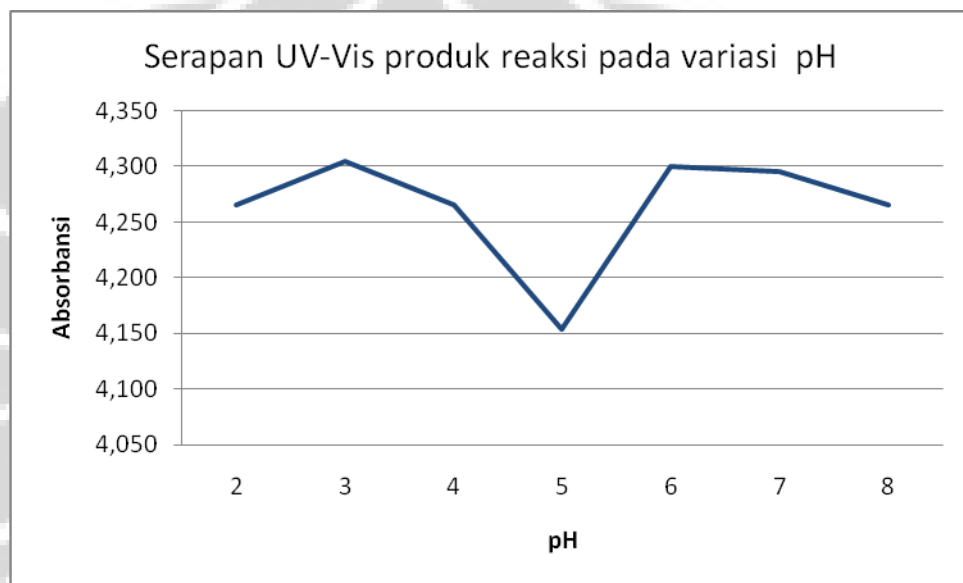
Hasil KLT sintesis reaksi kopling oksidatif eugenol dan H_2O_2 dengan katalis HRP dengan berbagai pH dapat dilihat pada Gambar 4.3. dibawah ini



Gambar 4.3. Hasil KLT reaksi kopling oksidatif eugenol dengan katalis enzim HRP pada berbagai pH

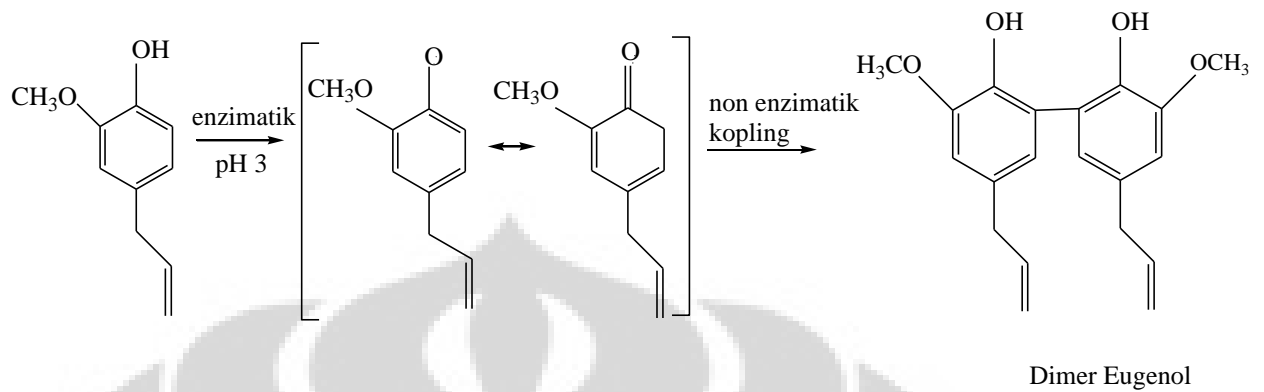
Hasil KLT menunjukkan terdapat 3 spot dengan nilai R_f yang berbeda, spot 1 yang lebih besar dari spot lainnya dengan $R_f 1 = 0,36$ yang diduga merupakan

produk utama reaksi. Spot kedua dengan $R_f2 = 0,6$ yang berukuran lebih kecil yang diduga merupakan hasil reaksi samping dan spot yang ketiga dengan $R_f3=0,88$ yang memiliki spot yang sama dengan standar eugenol. Hasil KLT menunjukkan spot pada pH 3 lebih besar dibandingkan dengan spot lainnya. Sedangkan hasil pengukuran dengan UV-Vis dalam penentuan pH reaksi dapat dilihat pada Gambar 4.4.

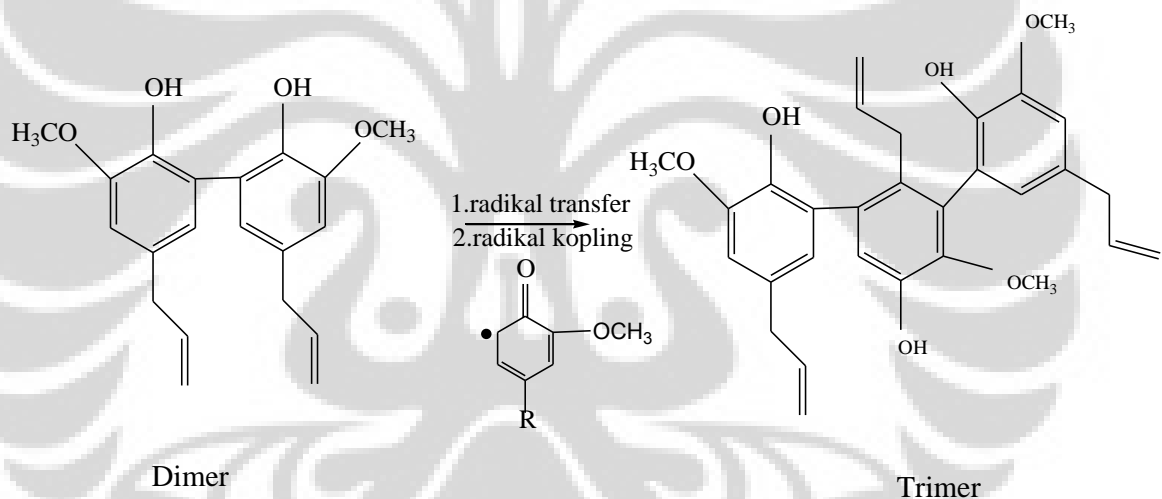


Gambar. 4.4. Grafik Serapan UV-Vis produk reaksi pada variasi pH

Grafik 4.4 menunjukkan pH pembentukan reaksi kopling oksidatif eugenol dengan katalis enzim HRP dengan absorbansi paling tinggi pada pH 3 dan pH 6-7. Sintesis dimer senyawa fenolik berlangsung dalam kondisi asam (pH 3-4), hal ini disebabkan oleh intermediet radikal fenoksi yang dihasilkan akan lebih stabil pada kondisi asam, sedangkan pembentukan trimer, tetramer, dan pentamer ataupun polimer lainnya akan berlangsung pada pH netral. (Antoniotti, Sylvain. 2004). Selain itu pembentukkan dimer pada pH netral akan menghasilkan rendemen (*yield*) yang rendah (Brunow, 2001).



sedangkan pada pH 6-7, reaksi ini terus berlanjut membentuk trimer dan polimer lainnya

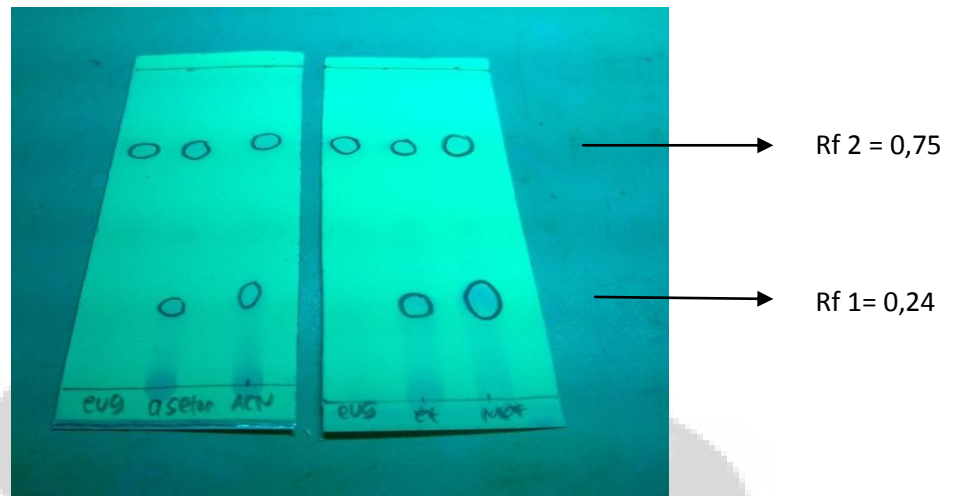


Gambar. 4.5. Tahapan pembentukan dimer dan trimer eugenol pada pH 3 dan 6

Oleh karena itu dalam penelitian ini, pH reaksi kopling oksidatif pembentukan dimer eugenol berlangsung pada pH 3.

4.1.3. Optimasi Jenis *Cosolvent*

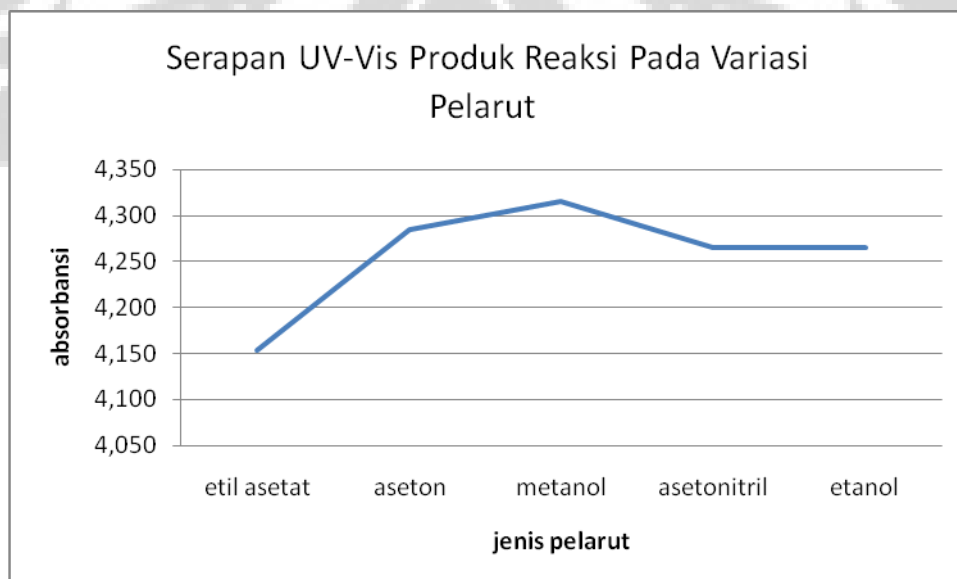
Hasil KLT pembentukan reaksi kopling oksidatif eugenol dengan berbagai jenis *cosolvent* dapat dilihat pada Gambar 4.6. dibawah ini.



Gambar 4.6. Hasil KLT reaksi kopling oksidatif eugenol dengan katalis enzim HRP pada berbagai pelarut

Hasil KLT menunjukkan adanya 2 spot dengan R_f yang berbeda. Spot 1 dengan $R_{f1} = 0,24$ dan spot kedua dengan $R_f 2 = 0,75$ yang sama dengan standar eugenol. Hasil KLT menunjukkan spot dengan $R_f = 0,24$ dengan *cosolvent* metanol lebih besar dibandingkan dengan spot yang lainnya.

Hasil pengukuran absorbansi dengan UV-Vis dapat dilihat pada Gambar 4.7



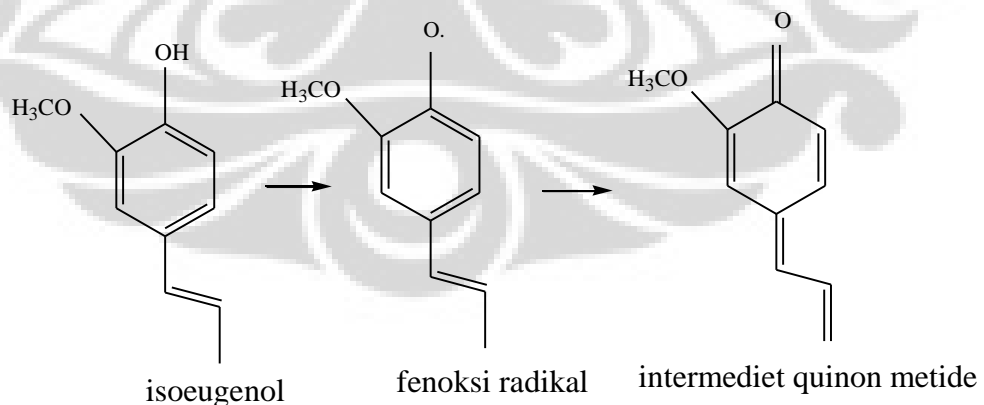
Gambar 4.7. Grafik Serapan UV-Vis Produk Reaksi Pada Variasi Pelarut

Grafik menunjukkan penggunaan *cosolvent* metanol dalam reaksi ini memiliki nilai absorbansi paling tinggi dibandingkan dengan jenis *cosolvent* lainnya. Hal ini ditandai dengan adanya kenaikan suhu di atas 37⁰C, sehingga reaksi harus diatur suhunya di bawah 35⁰C agar enzim tidak mengalami kerusakan.

Penggunaan *cosolvent* pelarut organik mempengaruhi struktur dari enzim HRP, tetapi tidak mengakibatkan rusaknya struktur sekunder dan sisi aktif enzim (Keungarp, 1999). Hasil penelitian Keungarp dengan substrat metoksi fenol dengan enzim HRP dilaporkan bahwa enzim HRP terdenaturasi pada pelarut organik volume rendah (> 30% dioksan dan > 20% asetonitril).

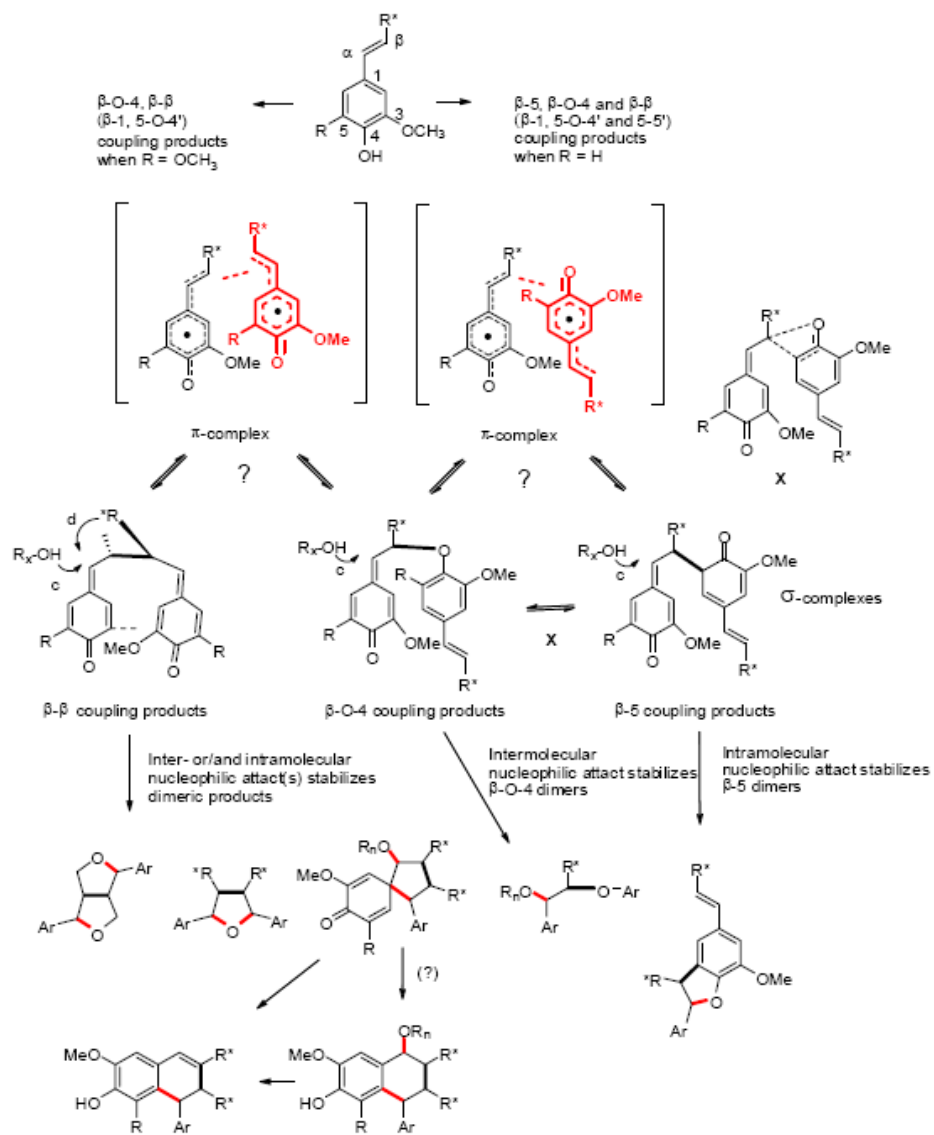
Penelitian yang dilakukan oleh Kaisa Syrjanen (2001) dalam reaksi kopling senyawa acetovanillone yang menghasilkan dimer dehydrodiacetovanillone menggunakan etanol sebagai *cosolvent*. Sedangkan pembentukan dimer melalui reaksi kopling senyawa metil sinapat menggunakan *cosolvent* metanol (Setala, 1994). Penggunaan *cosolvent* dalam reaksi kopling oksidatif tergantung dari jenis substrat yang digunakan

Penggunaan *cosolvent* memiliki peranan dalam reaktivitas intermediet radikal fenoksi yang dihasilkan. Radikal fenoksi yang dihasilkan dalam reaksi kopling oksidatif akan membentuk intermediet quinon metide. (Setala, 2008)



Gambar. 4.8. Radikal fenoksi dan intermediet quinon metide (Bolton, 1995)

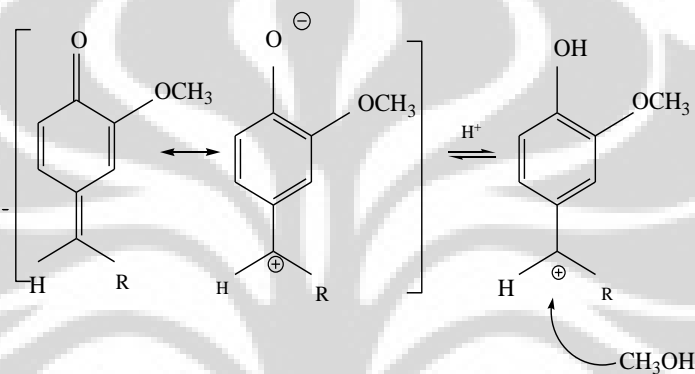
Penggunaan *cosolvent* berfungsi sebagai nukleofil yang memiliki peranan dalam reaktivitas intermediet quinon metide yang dihasilkan. Serangan nukleofil pada intermediet quinon metide dalam reaksi kopling oksidatif dapat dilakukan secara intramolekuler maupun intermolekular (Setala, 2008). (Gambar.4.9)



Gambar. 4.9. Diagram mekanisme reaksi penyerangan nukleofil dalam pembentukan dimer (Setala, 2008)

Penggunaan cosolvent mempengaruhi struktur quinon metida dan kecepatan reaksi. Penggunaan pelarut polar akan mempengaruhi reaksi solvolisis dan adisi nukleofilik pada quinon metida. Reaksi adisi nukleofil akan lebih cepat berlangsung pada suasana asam.

Mekanisme reaksi antara intermediet quinon metide dengan nukleofil CH_3OH dapat dilihat pada Gambar. 4.10.



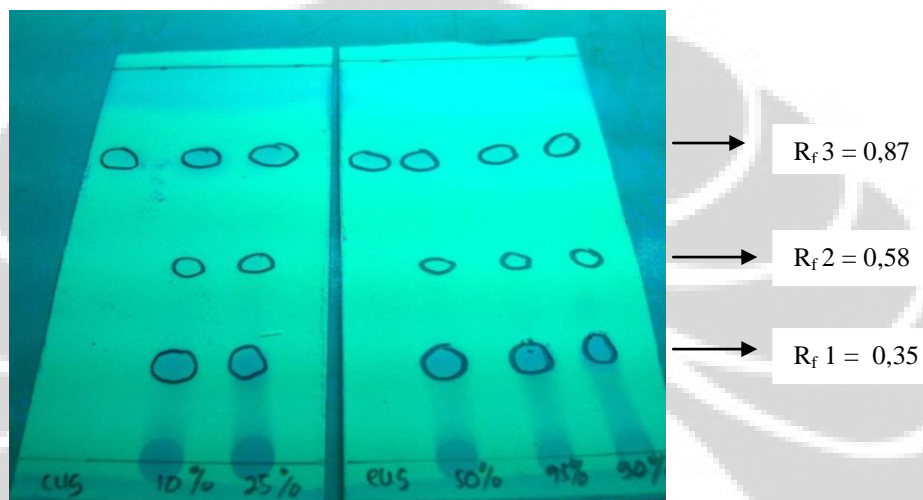
Gambar. 4.10. Struktur quinon metide dan serangan nukleofil CH_3OH dalam suasana asam

Dari literatur diketahui bahwa metanol merupakan nukleofil yang lebih reaktif dibandingkan dengan air dan etanol yang akan menyerang karbokation benzil alkohol (Setala, 2008, dan Fessenden, 1985).

Selain nukleofil, mekanisme reaksi ini juga dipengaruhi oleh pelarut. Pelarut polar seperti air, etanol dan metanol yang memiliki tetapan dielektrik yang tinggi mampu mensolvasi kation dan anion, sehingga laju reaksi akan semakin meningkat. Sebaliknya pelarut aseton dan asetonitril yang merupakan pelarut polar aprotik hanya mensolvasi kation saja. Reaksi penyerangan nukleofil terhadap karbokation lebih cepat terjadi pada pelarut polar seperti metanol, air dan etanol dibandingkan dengan pelarut polar aprotik seperti aseton dan asetonitril. (Hart,2003). Kondisi optimal reaksi kopling oksidatif eugenol diperoleh dengan menggunakan metanol sebagai *cosolvent*.

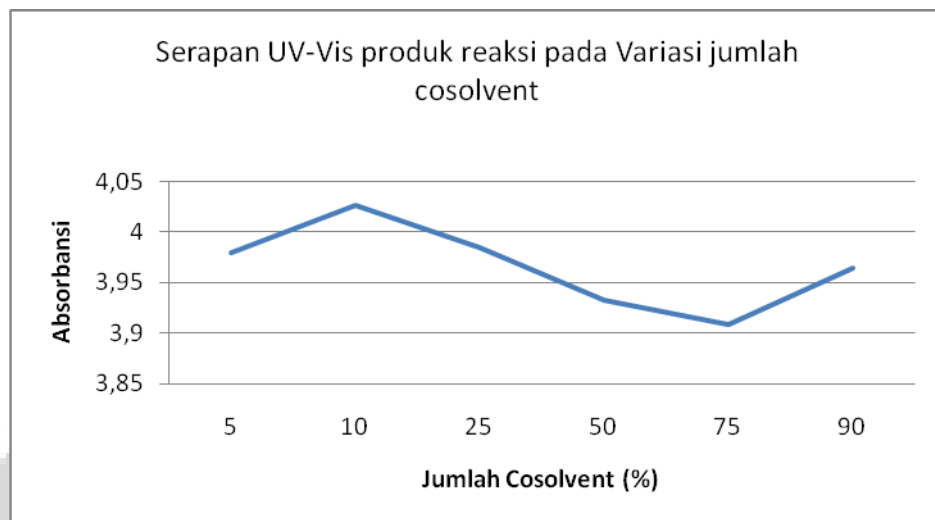
4.1.4. Optimasi Jumlah Cosolvent

Hasil KLT menunjukkan terdapat 3 spot dengan R_f berbeda yaitu spot pertama dengan $R_f 1 = 0,35$ yang diduga merupakan produk utama. Spot kedua dengan $R_f 2 = 0,58$ yang diduga merupakan produk samping dan spot ketiga dengan $R_f 3 = 0,87$ memiliki R_f yang sama dengan spot eugenol sebagai standar.



Gambar. 4.11. Hasil KLT Reaksi Koplting Oksidatif Eugenol dengan enzim HRP dalam berbagai komposisi jumlah pelarut

Hasil pengujian pengaruh jumlah optimal dalam reaksi dengan menggunakan UV-Vis pada $\lambda=285$ nm dapat dilihat pada Gambar. 4.12 dibawah ini



Gambar. 4.12. Grafik Serapan UV-Vis Produk Reaksi Pada Variasi jumlah cosolvent

Pada Gambar 4.12. terlihat bahwa absorbansi produk akan meningkat dengan bertambahnya % jumlah metanol, dan mencapai absorbansi maksimum pada penambahan 10% metanol. Hal ini menunjukkan bahwa laju reaksi akan meningkat dan mencapai optimal dengan penambahan 10% metanol. Kandungan air yang lebih banyak pada 10% metanol diperlukan oleh enzim HRP untuk mempertahankan konformasi strukturnya dan meningkatkan aktivitas katalitiknya. Pada penambahan lanjut % metanol diatas 10% akan menurunkan nilai absorbansi produk, hal ini disebabkan karena penambahan metanol diatas 10% akan mengurangi kandungan air yang berpengaruh terhadap turunnya aktivitas enzim sehingga mengakibatkan jumlah produk yang dihasilkan juga berkurang. Dan pada penambahan metanol 75% diperoleh nilai absorbansi produk paling kecil, hal ini menunjukkan kemungkinan enzim HRP akan mengalami perubahan struktur atau terdenaturasi sehingga aktivitas enzim akan turun atau hilang sama sekali. Kondisi reaksi optimal kopling oksidatif eugenol diperoleh pada penambahan 10% metanol.

4.2. Sintesis Reaksi Kopling Oksidatif Eugenol dan Isoeugenol dengan Katalis Enzim Horseradish peroksidase Pada Kondisi Optimal

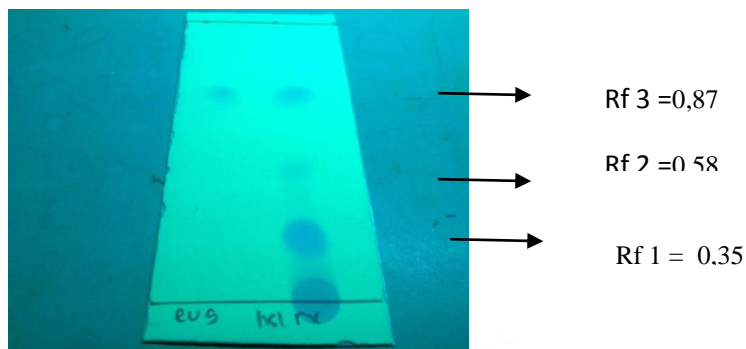
4.2.1. Sintesis Reaksi Kopling Oksidatif Eugenol dan HRP

Dalam penelitian ini menggunakan eugenol sebagai substrat yang merupakan senyawa fenolik yang mampu menyumbangkan proton jika direaksikan dengan H_2O_2 sebagai akseptor proton dan enzim HRP yang berfungsi sebagai katalis.

Kondisi optimal yang telah diperoleh digunakan dalam sintesis reaksi kopling oksidatif eugenol dengan menggunakan enzim HRP. Eugenol dan H_2O_2 dengan perbandingan mol 1:0,5 direaksikan dengan menggunakan enzim HRP 15 mg dan 20 mL larutan buffer sitrat pH 3, dan diaduk dengan stirrer. Kemudian ditambahkan 20 ml metanol 10% secara perlahan-lahan dan dijaga temperaturnya agar tidak melebihi $35^{\circ}C$ agar enzim tidak terdenaturasi. Reaksi dilakukan selama 60 menit.

Hasil reaksi yang diperoleh berupa larutan kuning dan selanjutnya diekstraksi dengan etil asetat 50 mL dengan menggunakan corong pisah, sehingga didapatkan 2 fasa yaitu fasa air dan fasa etil asetat. Kemudian fasa etil asetat dipisahkan dan diuapkan sehingga didapatkan larutan kental berwarna kuning.

Untuk mengetahui jumlah komponen yang terdapat dalam senyawa hasil reaksi maka dilakukan uji kromatografi lapisan tipis dengan menggunakan larutan pengembang campuran n heksan:etil asetat dengan perbandingan optimum yaitu 4:1. Hasil pengujian KLT dapat dilihat pada Gambar 4.13.



Gambar.4.13. Hasil sintesis produk eugenol dengan uji KLT

Hasil KLT menunjukkan adanya 3 spot yang memiliki Rf yang berbeda. Spot 1 yang berukuran besar memiliki $R_f 1 = 0,35$. Spot kedua yang berukuran paling kecil memiliki $R_f 2 = 0,58$, yang diduga merupakan hasil reaksi samping, sedangkan spot ketiga memiliki $R_f 3 = 0,87$, sama dengan spot eugenol sebagai standar. Selanjutnya dilakukan pemisahan komponen dengan KLT preparatif. Spot yang diduga sebagai produk utama kemudian dikerok dan dilarutkan dalam etil asetat kemudian disaring dan diuapkan pelarutnya. Hasil yang diperoleh berupa kristal kuning dengan berat 0,0852 gram (8,52 %) dan memiliki titik leleh $105,5^{\circ}\text{C}$.

Untuk mengidentifikasi struktur molekul dari senyawa yang diperoleh dilakukan pengukuran menggunakan instrumentasi spektrofotometer UV-Visibel, spektrofotometer Infra merah, GCMS, H-NMR, C-NMR dan polarimeter.

4.3. Analisis Senyawa Hasil Reaksi Kopling Oksidatif Eugenol Dengan Menggunakan Instrumen

4.3.1. Analisis Dengan Spektrofotometer UV-Visibel

Spektrofotometer UV-Visible digunakan untuk mengidentifikasi terbentuknya senyawa baru berdasarkan pergeseran serapan maksimum. Penyerapan sinar UV (200-400 nm) oleh suatu molekul akan menghasilkan transisi diantara tingkat energi elektronik molekul tersebut. Oleh karena itu serapan cahaya oleh sampel dalam spektrum UV tergantung pada struktur elektronik senyawa tersebut. Molekul-molekul yang memerlukan lebih banyak

energi untuk transisi elektronik akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih pendek, begitu pula sebaliknya.

Eugenol memiliki satu pita serapan maksimum pada panjang gelombang 278 nm yang berasal dari cincin aromatik yang diduga akibat terjadinya transisi elektronik $\pi \rightarrow \pi^*$. Sedangkan senyawa hasil reaksi memiliki dua pita serapan maksimum pada panjang gelombang 251 nm dan 286 nm. Munculnya dua panjang gelombang maksimum diduga berasal dari transisi elektronik $\pi \rightarrow \pi^*$ dari sistem aromatik (benzen). Puncak pada panjang gelombang maksimum 286 nm menunjukkan terjadinya pergeseran panjang gelombang ke arah yang lebih panjang (efek batokromik). Pergeseran ke arah panjang gelombang yang lebih panjang kemungkinan disebabkan oleh delokalisasi elektron π^* dalam molekul karena adanya konjugasi elektron yang dapat menyebabkan elektron dapat berpindah tempat dalam molekul yang mengandung dua sistem aromatik.

4.3.2. Analisis Dengan Menggunakan FTIR

Identifikasi gugus-gugus fungsional tertentu pada suatu molekul dapat ditentukan dengan mengukur serapan radiasi infra merah (IR) pada berbagai frekuensi yang dinyatakan dalam fungsi bilangan gelombang $4000-500 \text{ cm}^{-1}$.

Berdasarkan hasil spektrum FTIR (Lampiran 3) diperoleh beberapa pita serapan pada panjang gelombang yang dapat dilihat pada Tabel 4.2

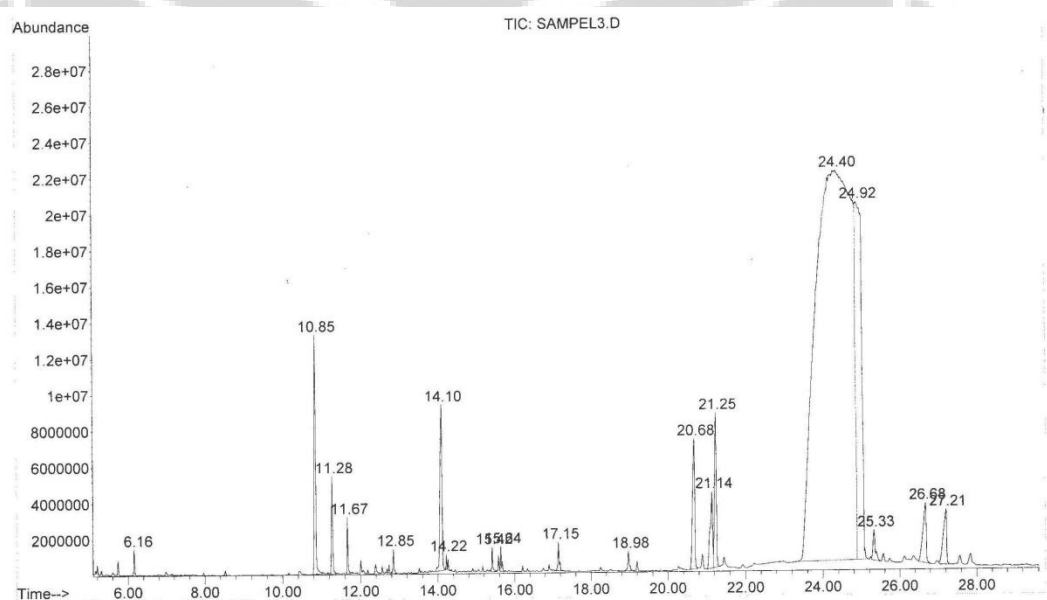
Tabel 4.2. Beberapa pita serapan spektrum FTIR senyawa dimer eugenol

Puncak (cm^{-1})	Keterangan
3346	Vibrasi ulur OH
3012 dan 3026	Vibrasi ulur =C-H
1600-1500	Vibrasi ulur C=C aromatik
1228	Vibrasi ulur C-O-C
1163	Vibrasi ulur C(aromatik)-O-C(aromatik)
1000-600	Vibrasi lentur C(aromatik)-H

Berdasarkan analisis hasil spektrum FTIR diketahui bahwa senyawa produk reaksi kopling oksidatif eugenol memiliki gugus OH, gugus aromatik dan ikatan C-O-C.

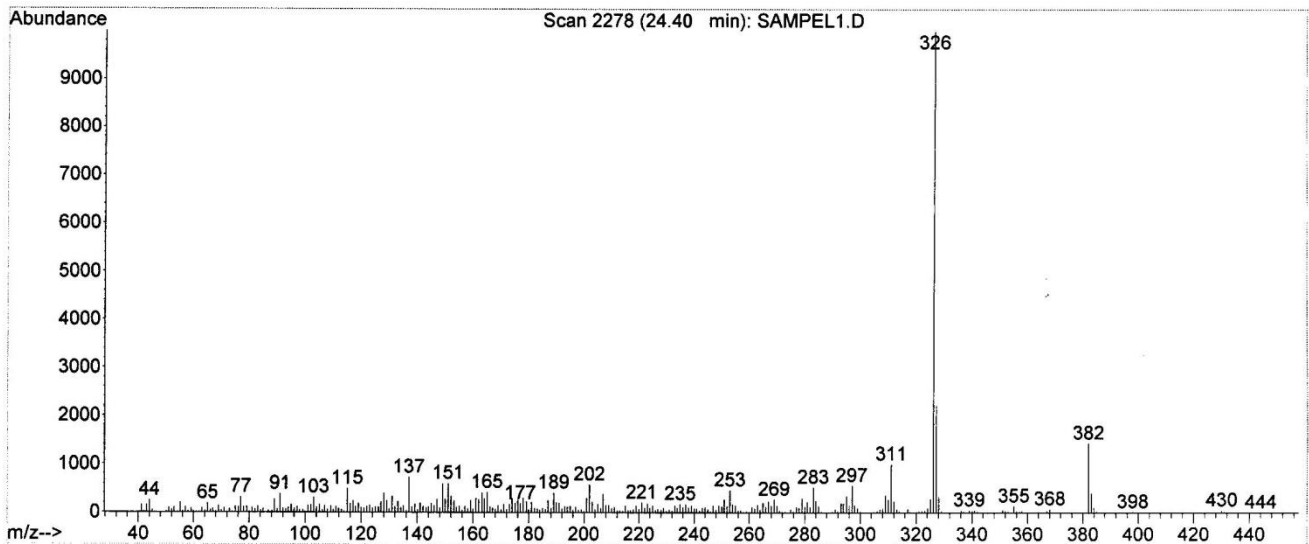
4.3.3. Analisis Dengan Kromatografi Gas Spektrometer Massa

Berdasarkan hasil kromatogram GC (Gambar. 4.14) diperoleh puncak tertinggi pada waktu retensi 24,40 menit.



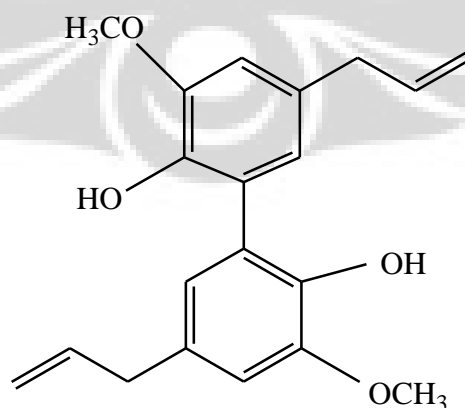
Gambar. 4.14. Kromatogram GCMS senyawa produk reaksi eugenol

Puncak tertinggi kromatogram GC dianalisis lebih lanjut dengan MS dan diperoleh spektrum berikut ini.



Gambar 4.15. Spektrum massa produk reaksi eugenol

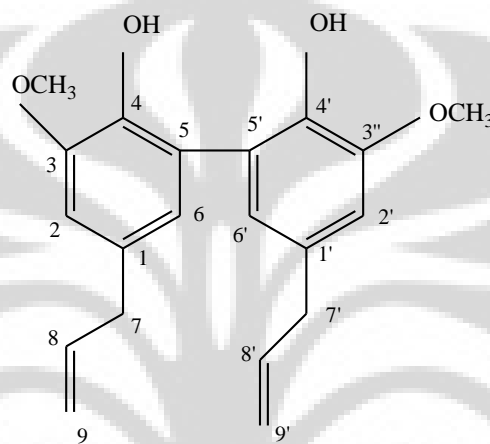
Hasil reaksi kopling eugenol memiliki bobot molekul (m/z) 326, yang menunjukkan terbentuknya kopling antara 2 molekul yang masing-masing kehilangan 1 atom H, dengan perhitungan = 2×164 (bobot molekul eugenol) $- 2H$ = 326. Berdasarkan data Library yang terdapat dalam instrumen GCMS diketahui senyawa tersebut memiliki kesamaan dengan 1,1'-di-2-propenil-4,4'-dihidroksi-3,3'-dimetoksi-5,5'-bifenil (dehidrodieugenol)



Gambar. 4.16. Struktur dehidrodieugenol

4.3.4. Analisis Dengan NMR dan C-NMR

Kepastian bahwa senyawa produk reaksi kopling oksidatif eugenol adalah senyawa dehydrodieugenol dipastikan dengan spektrum $^1\text{H-NMR}$ (Lampiran 7) yang memberikan sinyal-sinyal pergeseran kimia (Tabel 4.3) dengan panduan Gambar 4.16. sebagai berikut:



Gambar 4.17. Struktur senyawa dehidrodieugenol

Puncak pergeseran kimia proton aromatik pada 6,72 ppm (2H, aromatik-CH-) menunjukkan adanya pergeseran kimia proton metin pada gugus aromatik pada posisi C2 dan C2'. Pergeseran kimia proton pada 6,75 ppm (2H, aromatik-CH) menunjukkan pergeseran kimia proton metin pada gugus aromatik pada posisi C6 dan C6'. Puncak pada pergeseran kimia proton pada 3,91 ppm (6H, singlet, $-\text{OCH}_3$) merupakan puncak dari suatu proton gugus metoksi yang simetri. Pergeseran kimia proton pada 3,35 ppm (4H, doublet, $-\text{CH}_2$), menunjukkan adanya pergeseran kimia dari dua proton metilen yang simetri pada posisi C7 dan C7'. Adanya puncak-puncak pergeseran kimia pada 5,05-5,12 ppm (4H, multiplet, $-\text{CH}_2$) yang menunjukkan adanya pergeseran kimia 2 proton metilen yang simetri pada posisi C9 dan C9'. Sedangkan puncak-puncak pergeseran kimia proton pada 5,97-6,01 ppm (2H, multiplet, CH) menunjukkan adanya pergeseran kimia 1 proton metin yang simetri pada posisi C8 dan C8'.

Tabel 4.3. Data $^1\text{H-NMR}$ Produk Reaksi Eugenol (500 MHz, CDCl_3)

δ (ppm)	Multiplisitas	Tipe proton	No. Karbon
3,35	Doublet	4 H	$\text{CH}_2\text{-7, CH}_2\text{-7'}$
3,91	Singlet	6 H	2x OCH_3
5,05-5,12	Multiplet	4 H	$\text{CH}_2\text{-9, CH}_2\text{-9'}$
5,97-6,01	Multiplet	2 H	CH-8, CH-8'
6,72	Doublet	2 H	CH-2, CH-2'
6,75	Doublet	2 H	CH-6, CH-6'

Puncak spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ pada δ 40,18 ppm menunjukkan adanya karbon pada gugus metilen pada posisi C7 dan C-7'. Puncak spektrum pada δ 56,27 ppm menunjukkan adanya karbon pada gugus metoksi. Untuk karbon metin pada posisi C2 dan C2' ditunjukkan pada δ 110,87 ppm, sedangkan δ 115,8 ppm menunjukkan adanya karbon metilen pada posisi C-9 dan C-9'. Puncak karbon metin lainnya pada posisi C-6 dan C-6' memiliki nilai pergeseran kimia δ 123,28 ppm. Puncak karbon kuarterner C-5 dan C-5' memiliki δ 124,5 ppm, sedangkan δ 132,1 ppm menunjukkan adanya karbon kuarterner pada posisi C-1 dan C-1'. Puncak karbon kuarterner C-4 dan C-4' memiliki δ 114,08 ppm dan puncak karbon kuarterner lainnya pada posisi C-3 dan C-3' memiliki δ 147,2 ppm.

Tabel.4.4. Data Spektroskopi ^{13}C -NMR Produk Reaksi Eugenol (125 MHz, CDCl_3)

δ (ppm)	No. Karbon
40,17 (triplet)	C-7, C-7'
56,27 (quartet)	2 x O-CH ₃
110,87 (doublet)	C-2, C-2'
115,9 (triplet)	C-9, C-9'
123,28 (doublet)	C-6, C-6'
124,57 (singlet)	C-5, C-5'
132,11 (singlet)	C-1, C-1'
137,82 (doublet)	C-8, C-8'
141,08 (singlet)	C-4, C-4'
147,4 (singlet)	C-3, C-3'

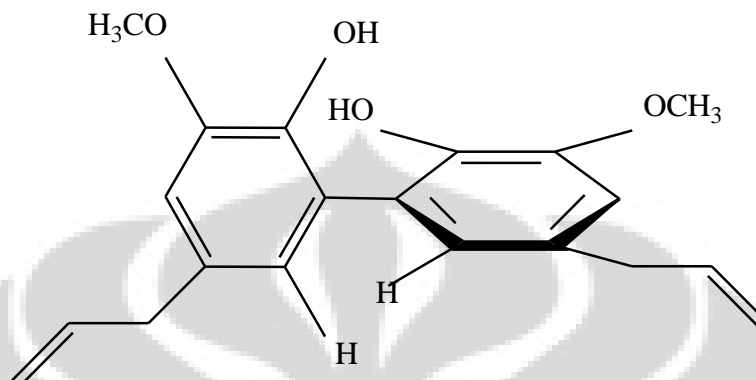
4.3.5. Analisis Dengan Polarimeter

Polarimeter adalah instrumen yang digunakan untuk mengukur sudut putar spesifik dari senyawa optis aktif. Senyawa yang dapat memutar bidang sinar terpolarisasi ke kanan atau sesuai dengan gerak jarum jam didefinisikan sebagai zat putar kanan (dextrorotatory) atau positif (+), sedangkan senyawa yang memutar dalam arah kebalikannya disebut putar ke kiri (levorotatory) atau (-).

Data GCMS menunjukkan dimer eugenol diduga adalah senyawa dehidrodieugenol dimana senyawa ini tidak memiliki atom C kiral. Tetapi berdasarkan hasil pengukuran sudut putar dengan polarimeter diperoleh $\alpha = +0,04$ (Lampiran 11), dan sudut putar spesifik dari senyawa hasil reaksi yaitu $[\alpha]_{\text{D}}^{26} = +133,3^{\circ}$ (c,0.00012, $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$).

Hasil ini menunjukkan bahwa senyawa hasil reaksi dapat memutar bidang polarisasi cahaya ke arah kanan dan memiliki tanda (+), dimana sifat optis aktifnya disebabkan adanya sumbu kiral. Konfigurasi absolut senyawa tersebut

dapat ditulis sebagai (Ra)-(+)-dehidrodieugenol, dengan struktur molekul sebagai berikut:



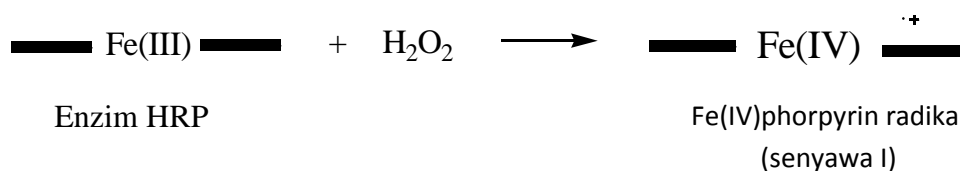
Gambar. 4.18. Struktur (Ra)-(+)-dehidrodieugenol

4. 4. Mekanisme Reaksi Kopling Oksidatif Eugenol Dengan Enzim HRP

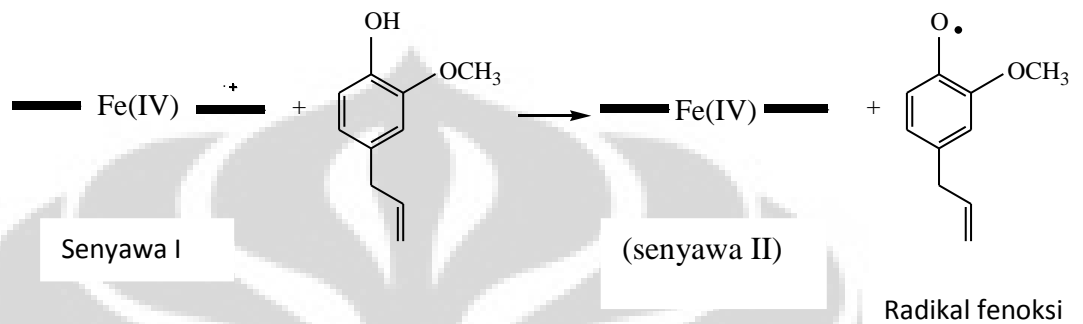
Reaksi kopling oksidatif menggunakan katalis enzim HRP dan H_2O_2 melalui pembentukan radikal fenoksi. Eugenol merupakan donor hidrogen, sedangkan H_2O_2 sebagai akseptor proton serta enzim HRP digunakan sebagai katalis.

Tahap pertama dalam siklus katalitik adalah reaksi antara H_2O_2 dan Fe(III) enzim membentuk ikatan kompleks Fe(III)-hidroperoksi dan akan mereduksi H_2O_2 menjadi H_2O . Atom Fe(III) pada protoporphyrin IX akan teroksidasi menjadi Fe(IV) phorphyrin radikal. Tahap selanjutnya Fe(IV) phorphyrin radikal akan mengikat atom hidrogen dari eugenol dan menghasilkan radikal fenoksi dan oxoferryl (senyawa II). Tahap ketiga, senyawa II bereaksi dengan eugenol membentuk radikal fenoksi dan air. Selanjutnya terjadi penggabungan radikal fenoksi dengan radikal fenoksi lainnya dan menghasilkan produk dimer eugenol. Mekanisme pembentukan senyawa dehidrodieugenol adalah sebagai berikut:

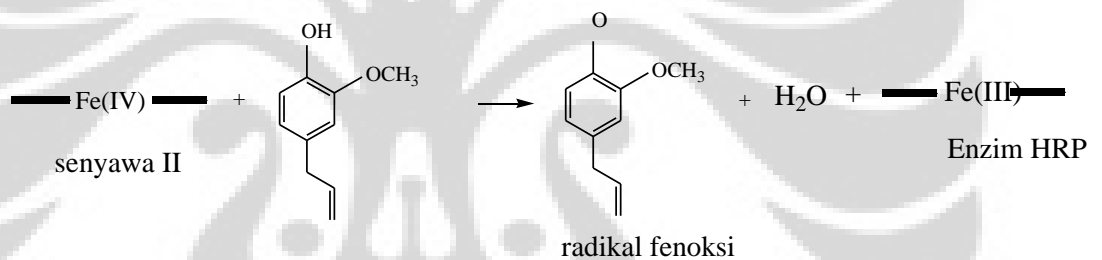
- Tahap pertama : pembentukan senyawa I Fe(IV) phorphyrin radikal



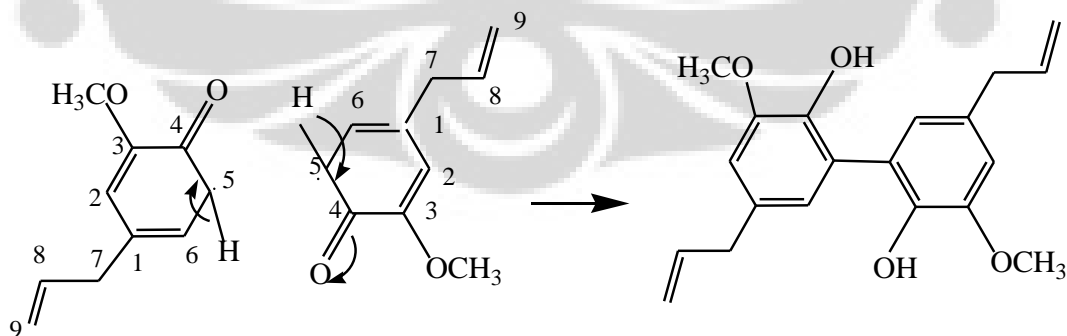
- Tahap kedua : pembentukan senyawa oxo ferril (senyawa II) dan radikal fenoksi



- Tahap ketiga : senyawa II bereaksi dengan eugenol menghasilkan radikal fenoksi



Selanjutnya terjadi penggabungan radikal pada posisi C₅-C₅ menghasilkan dimer eugenol yaitu dehidrodieugenol.



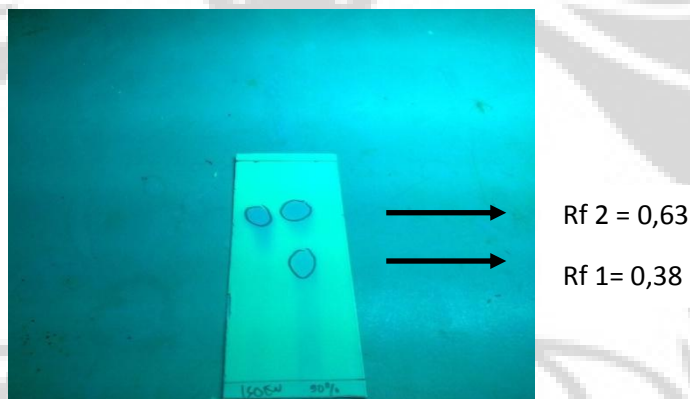
Pembentukan dimer eugenol merupakan reaksi kopleng radikal pada posisi C₅ dan C₅'. Hal ini disebabkan karena pembentukan radikal pada posisi C₅ dan C₅' memiliki rintangan sterik yang lebih kecil.

4.5. Sintesis Reaksi Kopling Oksidatif Isoeugenol dengan Katalis Enzim Horseradishperoksidase

4.5.1. Sintesis Reaksi Kopling Oksidatif Isoeugenol dan HRP

Hasil reaksi yang diperoleh berupa larutan kuning dan diekstraksi dengan etil asetat 50 mL menggunakan corong pisah, sehingga didapatkan 2 fasa yaitu fasa air dan fasa etil asetat. Kemudian fasa etil asetat dipisahkan dan diuapkan sehingga didapatkan larutan kental berwarna kuning.

Untuk mengetahui jumlah komponen yang terdapat dalam senyawa hasil reaksi maka dilakukan pengamatan dengan uji kromatografi lapisan tipis dengan menggunakan larutan pengembang campuran n heksan:etil asetat dengan perbandingan optimum yaitu 4:1. Hasil pengujian KLT dapat dilihat pada Gambar 4.19.



Gambar. 4.19. Hasil KLT sintesis produk isoeugenol

Hasil KLT menunjukkan adanya 2 spot dengan $R_{f1} = 0,38$ dan $R_{f2} = 0,63$. Spot pada R_{f1} diduga merupakan produk utama, sedangkan spot kedua sama dengan spot isoeugenol.

Selanjutnya dilakukan pemisahan melalui KLT preparatif untuk memisahkan komponen-komponen yang terdapat dalam senyawa hasil reaksi. Spot yang diduga produk utama kemudian dikerok dan hasilnya dilarutkan dalam etil asetat. Setelah itu disaring untuk memisahkan senyawa dengan silika yang berasal dari pelat KLT. Kemudian filtrat diuapkan sehingga didapatkan kristal berwarna putih 0,0962 gram (9,52%) dengan titik leleh $132,5^{\circ}\text{C}$.

4.6. Analisis Senyawa Hasil Reaksi Kopleng Oksidatif Isoeugenol Dengan Menggunakan Instrumen

Untuk mengidentifikasi senyawa yang terbentuk dilakukan analisis dengan menggunakan UV-Vis, FTIR, GCMS, H-NMR dan C-NMR dan polarimeter.

4.6.1. Analisis Dengan Spektrofotometer UV-Visible

Hasil pengukuran UV-Vis senyawa hasil reaksi isoeugenol dapat dilihat pada Tabel 4.5

Tabel 4.5. Perbandingan λ_{\max} pada spektrum UV-Vis isoeugenol dan produk reaksi

Senyawa	λ_{\max}
Isoeugenol	270
Hasil reaksi	276

Hasil spektrum UV-Vis senyawa isoeugenol memiliki satu pita serapan maksimum panjang gelombang 270 nm yang diduga terjadi akibat adanya transisi elektronik $\pi \rightarrow \pi^*$. Sedangkan senyawa hasil reaksi memiliki pita serapan pada panjang gelombang 276 nm. Adanya pergeseran panjang gelombang ini membuktikan telah terbentuknya senyawa baru. Pergeseran panjang gelombang yang lebih panjang (efek batokromik) tersebut dihasilkan oleh terbentuknya kromofor baru pada senyawa hasil reaksi.

4.6.2. Analisis Dengan Menggunakan FTIR

Hasil pengukuran dengan menggunakan FTIR (Lampiran 4) diperoleh beberapa pita serapan pada panjang gelombang yang dapat dilihat pada Tabel 4.6.

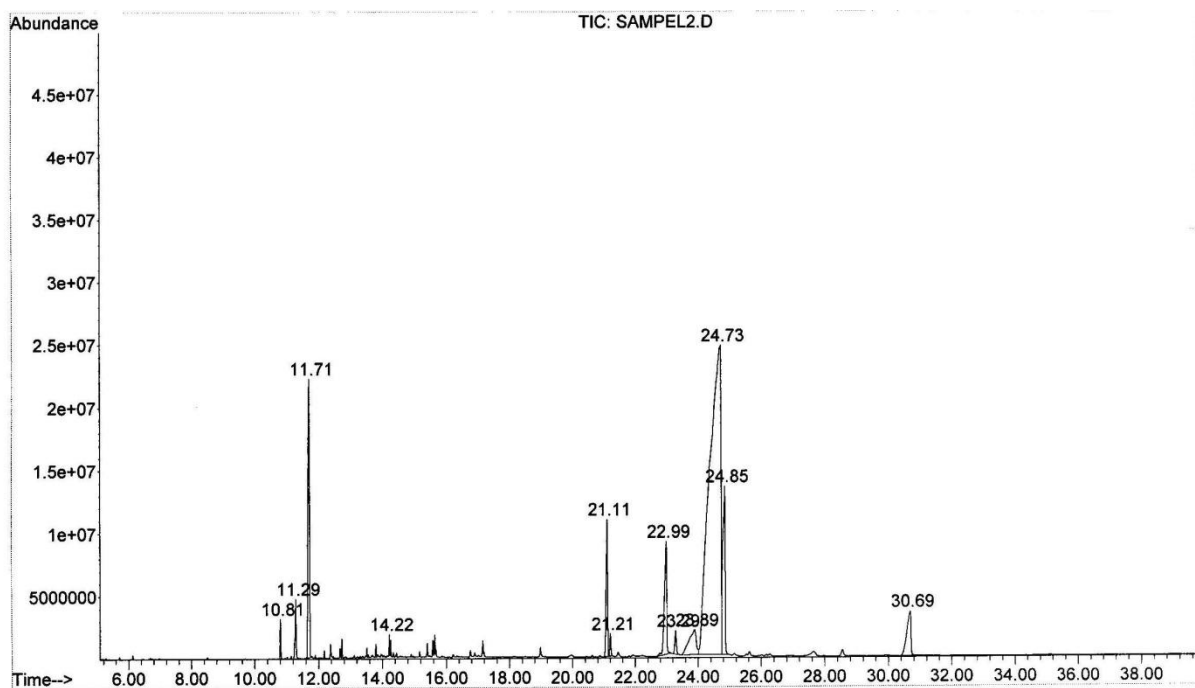
Tabel 4.6. Beberapa pita serapan spektrum FTIR senyawa produk reaksi isoeugenol

Puncak (cm^{-1})	Keterangan
3417	Vibrasi ulur OH
3020	Vibrasi ulur =C-H aromatik
1494	Vibrasi ulur C=C aromatik
1216	Vibrasi ulur C-O-C
1124	Vibrasi ulur C(aromatik)-O-C(aromatik)
1000-600	Vibrasi lentur C(aromatik)-H

Berdasarkan analisis hasil spektrum FTIR diketahui bahwa senyawa produk reaksi kopling oksidatif isoeugenol memiliki gugus hidroksil (OH), gugus aromatik dan ikatan C-O-C aromatik. Gugus baru yang terbentuk yaitu adanya cincin epoksi ditandai dengan munculnya pita serapan pada daerah dekat 1250 cm^{-1} , $950\text{-}810 \text{ cm}^{-1}$ dan pita ketiga muncul pada daerah sekitar $840\text{-}750 \text{ cm}^{-1}$. (Silverstein, 2005)

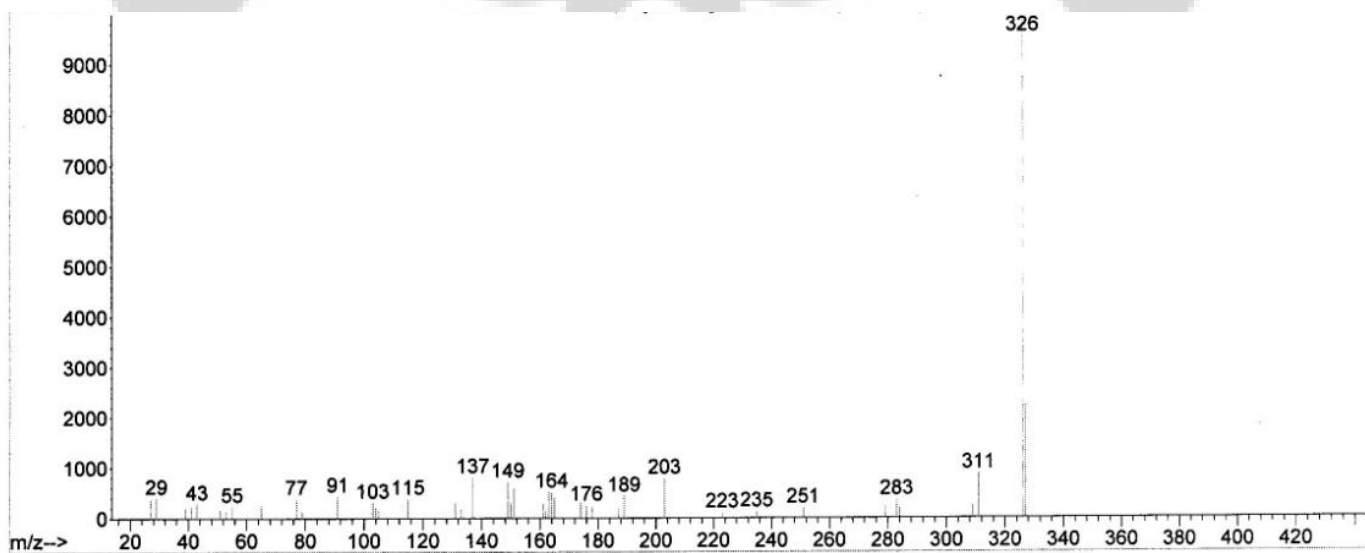
4.6.3. Analisis dengan Menggunakan Kromatografi Gas Spektroskopi Massa (GCMS)

Hasil kromatogram GCMS dari senyawa produk reaksi isoeugenol dapat dilihat pada Gambar. 4.20.



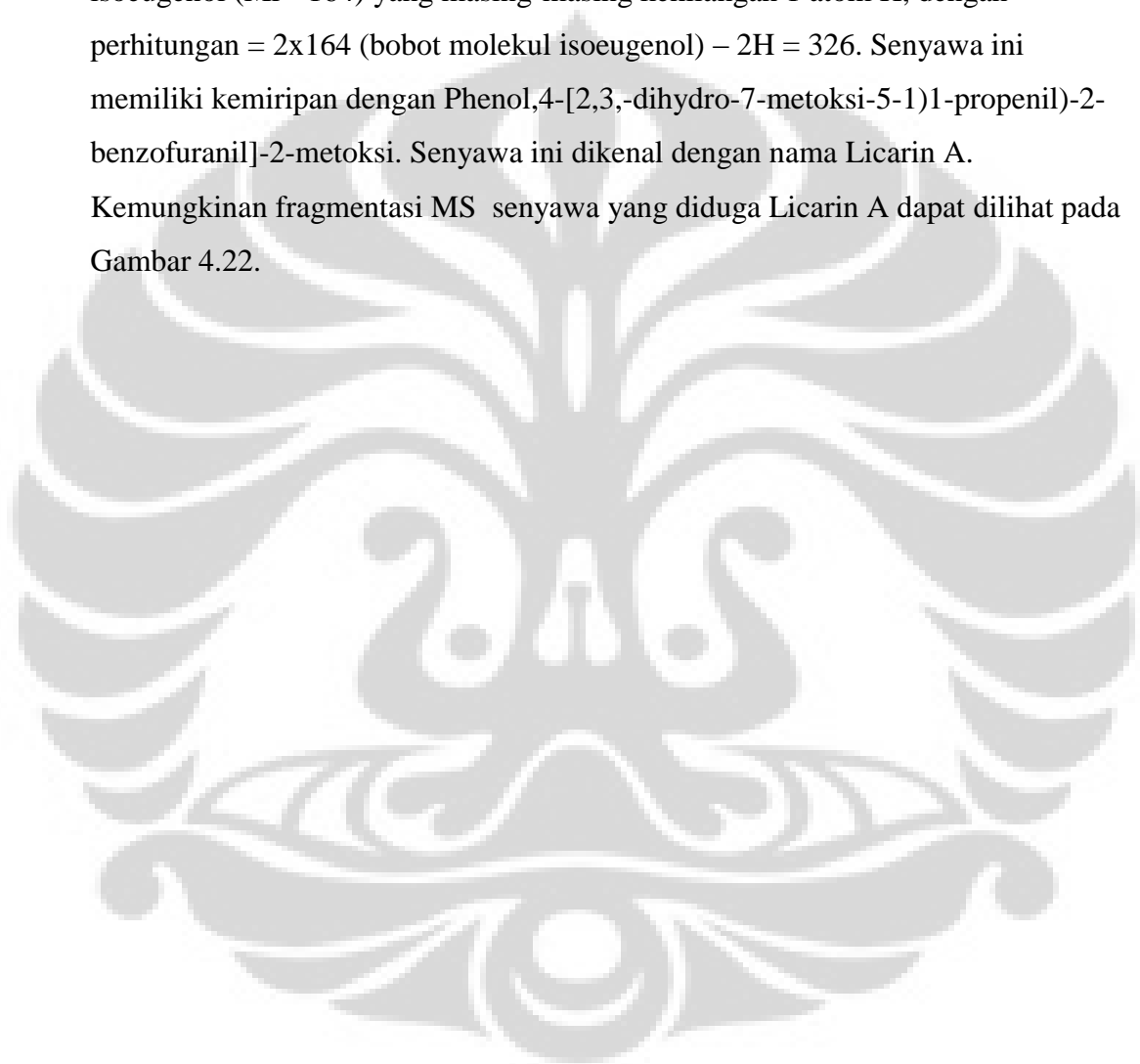
Gambar. 4.20. Kromatogram GCMS senyawa produk reaksi isoeugenol.

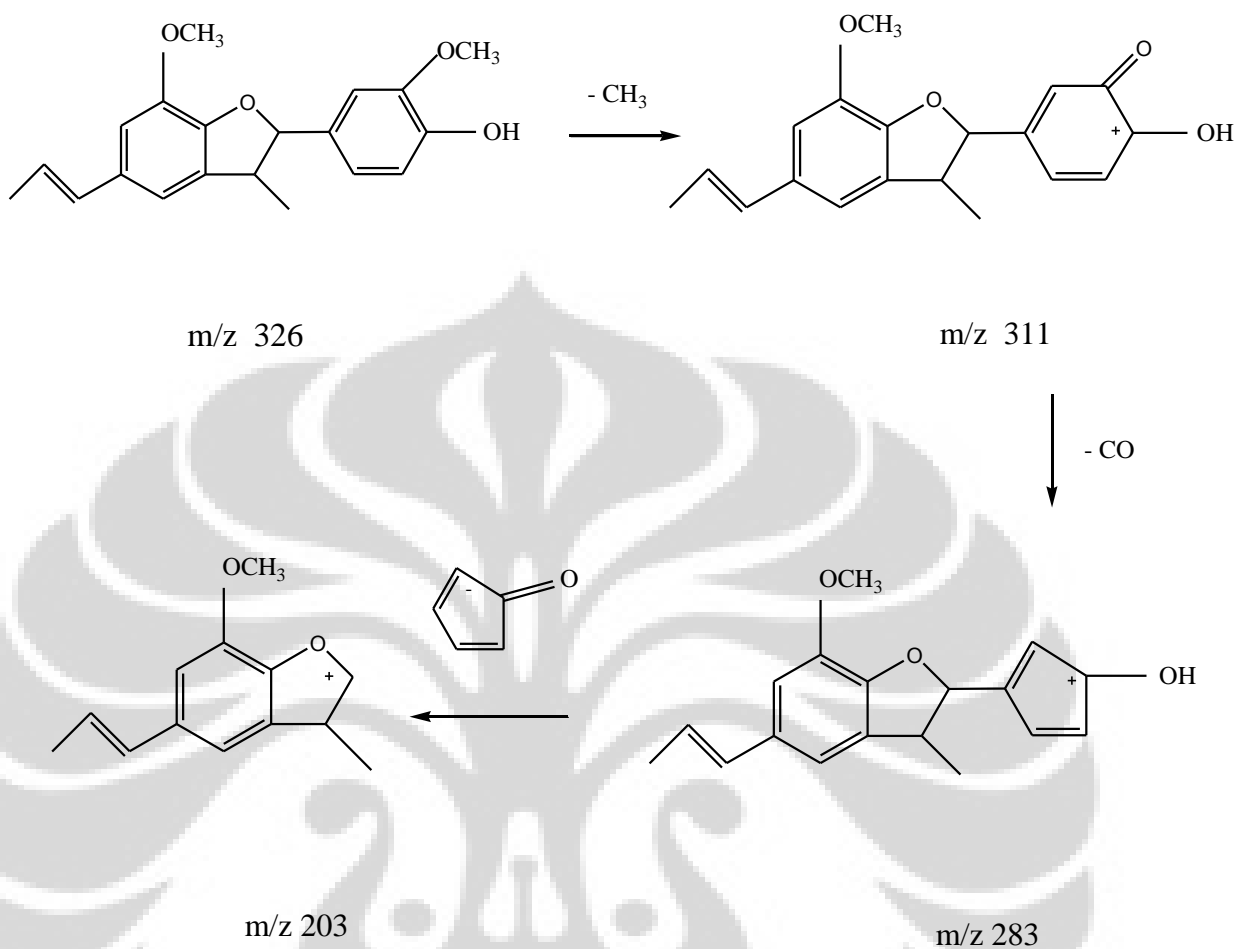
Sedangkan analisis lebih lanjut dengan spektroskopi massa senyawa produk reaksi isoeugenol diperoleh spektrum sebagai berikut



Gambar 4.21. Spektrum massa senyawa hasil reaksi isoeugenol

Berdasarkan analisis dengan GCMS, produk reaksi isoeugenol menghasilkan puncak tertinggi pada waktu retensi 24,73 menit dengan luas area 62,20%. Dari data Library MS diketahui bahwa senyawa tersebut memiliki berat molekul 326, yang menunjukkan terbentuknya kopling antara 2 molekul isoeugenol ($M_r = 164$) yang masing-masing kehilangan 1 atom H, dengan perhitungan = 2×164 (bobot molekul isoeugenol) – $2H = 326$. Senyawa ini memiliki kemiripan dengan Phenol,4-[2,3,-dihydro-7-metoksi-5-1)1-propenil)-2-benzofuranil]-2-metoksi. Senyawa ini dikenal dengan nama Licarin A. Kemungkinan fragmentasi MS senyawa yang diduga Licarin A dapat dilihat pada Gambar 4.22.

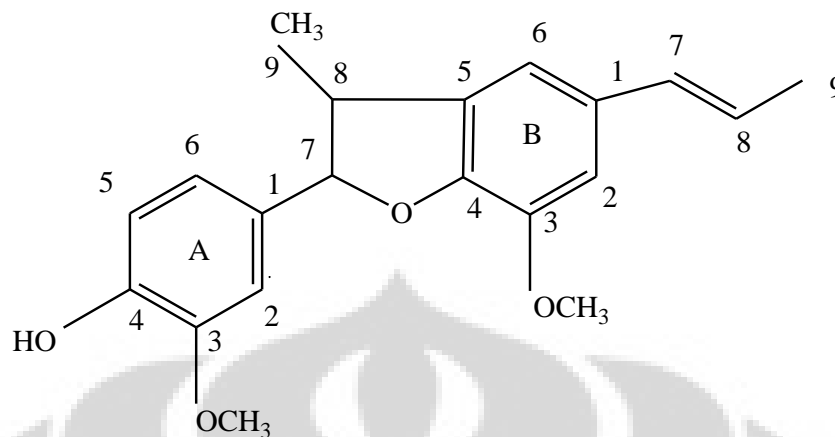




Gambar. 4.22. Fragmentasi spektroskopi massa Licarin A

4.6.4. Analisis Produk Reaksi Isoeugenol Dengan NMR

Penentuan senyawa produk reaksi kopling oksidatif isoeugenol dengan spektrum $^1\text{H-NMR}$ (Lampiran 9) yang memberikan sinyal-sinyal pergeseran kimia (Tabel 4.7) dengan panduan Gambar 4.23 sebagai berikut:



Gambar 4.23. Struktur senyawa Licarin A

Pergeseran kimia δ 1,37 ppm (doublet, 3H) dan 1,86 ppm (doublet, 3H) merupakan pergeseran kimia proton metil pada ${}_A C-9$ dan ${}_B C-9$. Pergeseran kimia proton pada δ 3,43 ppm (multiplet, 1H) menunjukkan pergeseran kimia proton metin pada gugus aromatik pada posisi ${}_A C8$. Gugus metoksi pada ${}_B C3$ dan ${}_A C3$ memberikan serapan singlet pada δ 3,87 ppm dan δ 3,89. Puncak pada pergeseran kimia proton pada δ 5,08 ppm (doublet, 1H) merupakan puncak dari suatu proton gugus metin pada ${}_A CH-7$. Pergeseran kimia proton pada 5,64 ppm menunjukkan adanya pergeseran kimia dari proton yang terisolasi yaitu proton yang terikat pada atom O (OH). Pergeseran kimia proton pada 6,11 ppm (1H, multiplet), menunjukkan adanya proton metin yang terikat pada posisi ${}_B CH-8$. Adanya puncak pergeseran kimia pada 6,34 ppm (1H, doublet, $J=15,5$ Hz, -CH) merupakan proton metin pada posisi ${}_B CH-7$. Tetapan kopling untuk cis: 7-11 Hz, sedangkan tetapan kopling untuk trans: 12-18 Hz. (Williams, Dudley, 1989). Proton ${}_B C-8$ berinteraksi ${}_B C-7$ dengan $J=15,5$ Hz, sehingga konfigurasi adalah trans. Puncak-puncak pergeseran kimia pada 6,76 ppm dan 6,78 ppm (singlet, 1H) yang menunjukkan adanya pergeseran kimia proton metin pada posisi ${}_B CH-6$ dan ${}_B CH-2$. Puncak-puncak pergeseran kimia pada 6,87-6,91 ppm (dd, 1H) adalah pergeseran kimia proton ${}_A CH-5$ dan ${}_A CH-6$. Puncak dengan δ 6,97 ppm (singlet, 1H), merupakan pergeseran kimia proton ${}_A CH-2$.

Tabel 4.7. Data $^1\text{H-NMR}$ Senyawa Licarin A (500 MHz, CDCl_3)

δ (ppm)	Multiplisitas (J^* dalam Hz)	Jumlah proton	No. Karbon
1,37	Doublet	3 H	$^A\text{CH}_3\text{-9}$
1,86	Doublet ($J= 6,5$ Hz)	3 H	$^B\text{CH}_3\text{-9}$
3,43-3,46	Multiplet	1 H	$^A\text{CH-8}$
3,87	Singlet	3 H	$^B\text{OCH}_3\text{-3}$
3,89	Singlet	3 H	$^A\text{OCH}_3\text{-3}$
5.08	Doublet ($J=9,04$ Hz)	1 H	$^A\text{CH-7}$
5.64	Singlet	1 H	OH
6,11	Multiplet	1 H	$^B\text{CH-8}$
6,34	Doublet ($J= 15,5$ Hz)	1 H	$^B\text{CH-7}$
6,76	Singlet	1 H	$^B\text{CH-6}$
6,78	Singlet	1 H	$^B\text{CH-2}$
6.87-6,91	Doublet Doublet	2 H	$^A\text{CH-5}$. $^A\text{CH-6}$
6,97	Singlet	1 H	$^A\text{CH-2}$

J = konstanta kopling

Penentuan senyawa produk reaksi kopling oksidatif isoeugenol dengan spektrum C-NMR (Lampiran 10) yang memberikan puncak spektrum untuk gugus metil muncul pada δ 17,74 ppm, δ 18,54 ppm dan δ 45,79 ppm yang menunjukkan adanya 3 karbon metil pada posisi $^A\text{C-9}$, $^B\text{C-9}$ dan $^A\text{C-8}$. Puncak gugus metoksi terdapat pada δ 56,11 ppm pada posisi $^A\text{MeO-3}$ dan δ 56,16 ppm pada posisi $^B\text{MeO-C-3}$. Sedangkan pergeseran kimia pada δ 93,7 ppm merupakan puncak untuk karbon metilen pada posisi $^A\text{C-7}$.

Puncak-puncak untuk karbon metin ditunjukkan secara berturut-turut pada δ 109,11 ppm ($^A\text{C-2}$), δ 109,41 ppm ($^B\text{C-2}$), δ 113,48 ppm ($^B\text{C-6}$), δ 114,25 ppm ($^A\text{C-5}$), δ 120,14 ppm ($^A\text{C-6}$), δ 123,67 ppm ($^B\text{C-8}$), δ 131,09 ppm ($^B\text{C-7}$) dan δ 132,28 ppm ($^A\text{C-1}$),

Sementara itu puncak-puncak karbon kuartener ditunjukkan masing-masing pada posisi ${}^B\text{C-5}$, ${}^B\text{C-3}$, ${}^A\text{C-4}$, ${}^B\text{C-4}$, ${}^A\text{C-3}$ memiliki pergeseran kimia berturut-turut δ 133.45 ppm, δ 144,32 ppm, δ 145,9 ppm, δ 146,74 ppm dan δ 146,85 ppm.

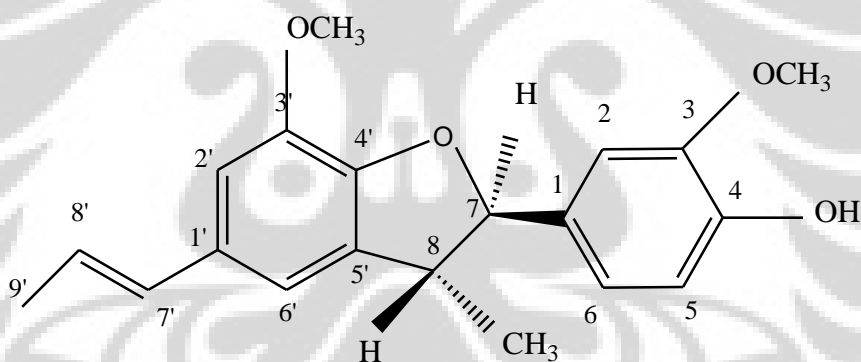
Tabel 4.8. Data pergeseran kimia ${}^{13}\text{C-NMR}$ senyawa Licarin A

δ (ppm)	No. Karbon
17,74	${}^A\text{C-9}$
18,54	${}^B\text{C-9}$
45,79	${}^A\text{C-8}$
56,11	${}^A\text{MeO-3}$
56,16	${}^B\text{MeO-3}$
93,97	${}^A\text{C-7}$
109,11	${}^A\text{C-2}$
109,41	${}^B\text{C-2}$
113,48	${}^B\text{C-6}$
114,25	${}^A\text{C-5}$
120,14	${}^A\text{C-6}$
123,67	${}^B\text{C-8}$
131,09	${}^B\text{C-7}$
132,28	${}^B\text{C-1}$
132,38	${}^A\text{C-1}$
133,45	${}^B\text{C-5}$
144,32	${}^B\text{C-3}$
145,95	${}^A\text{C-4}$
146,74	${}^B\text{C-4}$
146,85	${}^A\text{C-3}$

Dari hasil spektrum NMR diduga produk reaksi kopling oksidatif isoeugenol merupakan senyawa Licarin A yang belum murni, masih terdapat pengotor.

4.6.4. Analisis Dengan Polarimeter

Senyawa produk reaksi isoeugenol yang dianalisis dengan GCMS diduga adalah senyawa licarin A, yang memiliki dua pusat kiral pada atom karbon nomor 7 dan 8. Hasil analisis H-NMR diperoleh tetapan kopling proton C7' dan C8' 15,5 Hz, dengan konfigurasi trans. Berdasarkan hasil pengukuran dengan polarimeter, produk reaksi isoeugenol memutar bidang polarisasi ke arah kanan, $\alpha = +0,02$ dan sudut putar spesifik sebesar $[\alpha]_D^{26} = +66,7^{\circ}$ (c,0.00012, CH₃COOC₂H₅), sehingga dari hasil tersebut senyawa hasil reaksi yang diduga Licarin A dapat memutar bidang polarisasi cahaya ke kanan (+). Senyawa licarin A memiliki dua atom karbon kiral yaitu pada atom karbon no. 7 dan no.8. sehingga konfigurasi absolutnya ditulis sebagai (7R,8R)-(+)-Licarin A yang strukturnya dapat dilihat pada Gambar 4.24. dibawah ini



Gambar. 4.24. Struktur molekul (+) Licarin A

4. 7. Uji Bioaktivitas Senyawa Produk Reaksi Kopling Oksidatif Eugenol dan Isoeugenol

4.7.1. Uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).

Uji aktivitas produk reaksi kopling eugenol dan isoeugenol diawali dengan uji pendahuluan untuk mengetahui efek toksisitas (LC₅₀) senyawa melalui metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Uji BSLT dilakukan terhadap produk reaksi menggunakan konsentrasi 10, 100, 500 dan 1000 ppm dalam media air laut dan

dilakukan dengan 3 kali ulangan dengan menggunakan larva udang *Arthemisa salina* masing-masing sebanyak 10 ekor/konsentras i. Proses penetasan telur *A. salina* Leach membutuhkan waktu 48 jam, dan dimulai dengan penambahan sampel uji terhadap larva udang sampai proses perhitungan membutuhkan waktu 24 jam. Jumlah larva udang yang mati dan yang hidup dihitung untuk kemudian ditentukan persentase kematian dengan cara membagi larva udang yang mati dengan jumlah larva udang yang hidup dikurangi kontrol. Nilai LC_{50} diperoleh melalui regresi linier dengan memplot % kematian larva udang terhadap log konsentrasi dari masing-masing senyawa uji sehingga diperoleh konsentrasi yang dapat menyebabkan kematian 50% larva udang. Hasil uji toksisitas senyawa produk reaksi eugenol dan isoeugenol pada berbagai konsentrasi dapat dilihat pada Lampiran 13.

Menurut Rieser (1996) suatu senyawa yang memiliki nilai $LC_{50} < 250$ $\mu\text{g/mL}$, dinyatakan memiliki potensi aktif, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai toksisitas senyawa tersebut. Dari hasil uji pendahuluan untuk mengetahui efek toksisitas, diketahui senyawa produk reaksi eugenol memiliki $LC_{50} = 301,9$ $\mu\text{g/mL}$, sedangkan produk reaksi isoeugenol memiliki nilai $LC_{50} = 181,9$ $\mu\text{g/mL}$. Hasil ini menunjukkan bahwa senyawa produk isoeugenol memiliki potensi bioaktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa produk eugenol.

4.7.2. Uji Sitotoksik Senyawa Produk Reaksi Kopling Oksidatif Isoeugenol Terhadap Sel Kanker Leukimia P388

Aktivitas biologi senyawa produk reaksi kopling oksidatif isoeugenol diuji terhadap sel kanker Leukimia P388 secara *in vitro*. Uji aktivitas ini dilakukan dengan Metode MTT (3-(4,5-dimetilazo-2-il)2,5-difeniltetrazolium bromide) dengan konsentrasi penambahan senyawa uji dalam beragam konsentrasi. Sebagai kontrol positif digunakan cisplatin dengan ragam konsentrasi yang sama.

Pengujian MTT adalah suatu standar pengujian laboratorium secara kolorimeter (metode pengukuran berdasarkan perubahan warna yang terjadi). Metode ini digunakan untuk mengukur aktivitas sel dengan adanya penambahan reagen MTT. Sel hidup mempunyai kemampuan untuk mengubah warna MTT menjadi berwarna ungu, sebaliknya bagi sel mati, MTT tetap berwarna kuning. Dalam sel hidup, enzim reduktase mitokondria adalah aktif sehingga pewarna kuning MTT dapat direduksi oleh enzim tersebut menjadi formazan ungu yang memiliki panjang gelombang $\lambda=550$ nm.

Hasil uji sitotoksitas senyawa produk reaksi kopling isoeugenol memiliki nilai $IC_{50} = 10,8 \mu\text{g/mL}$ dan cisplatin $IC_{50}=12 \mu\text{g/mL}$. Suatu senyawa hasil sintesis aktivitas sitotoksiknya dinyatakan aktif jika memiliki nilai IC_{50} dibawah $30 \mu\text{g/mL}$. Berdasarkan hasil pengujian, senyawa dimer isoeugenol memiliki aktivitas yang lebih tinggi dalam menghambat pertumbuhan sel kanker Murine Leukimia P388.

Senyawa dimer isoeugenol diduga memiliki potensi sebagai anti kanker melalui penghambatan tubulin. Tubulin adalah protein yang dapat berpolimerisasi membentuk tabung kecil yang disebut dengan mikrotubul. Tabung kecil ini memegang peranan penting pada struktur, integritas, mobilitas sel dan proses pembelahan sel. Bila sudah membelah mikrotubulin ini akan mengalami depolimerisasi menjadi satuan monomer yaitu tubulin. Obat yang dapat mendepolimerisasi pada tubulin dapat menghambat pembelahan sel dan mempunyai potensi digunakan untuk pengobatan kanker. Adanya struktur dehydrobenzofuran yang berbentuk cincin planar akan menghambat polimerisasi pada sisi tubulin. Hilangnya keplanaran cincin dalam pengikatan tubulin akan mengurangi keaktifan sebagai anti kanker. (Pieters, Luc. 1999).

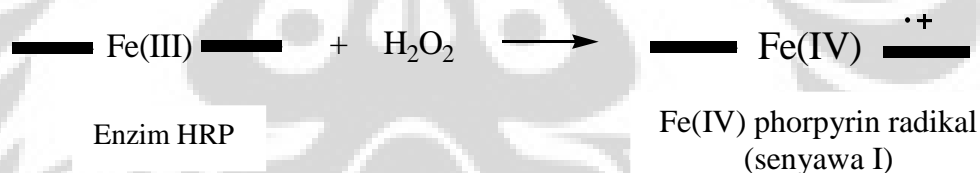
4. 8. Mekanisme Reaksi Kopling Oksidatif Isoeugenol Dengan Enzim HRP

Reaksi kopling oksidatif menggunakan katalis enzim HRP dan H_2O_2 melalui pembentukan radikal fenoksi. Isoeugenol merupakan donor hidrogen, sedangkan H_2O_2 sebagai akseptor proton serta enzim HRP digunakan sebagai katalis.

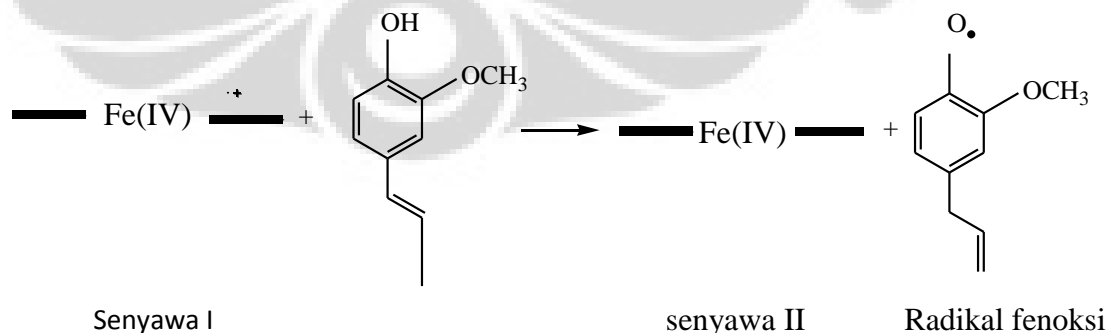
Tahap pertama dalam siklus katalitik adalah reaksi antara H_2O_2 dan Fe(III) enzim membentuk ikatan kompleks Fe(III)-hidroperoksi dan akan mereduksi H_2O_2 menjadi H_2O . Atom Fe(III) pada protoporphyrin IX akan teroksidasi menjadi Fe(IV) phorphyrin radikal. Tahap selanjutnya Fe(IV) phorphyrin radikal akan mengikat atom hidrogen dari isoeugenol dan menghasilkan radikal fenoksi dan oxoferryl (senyawa II). Senyawa II akan bereaksi dengan isoeugenol menghasilkan radikal fenoksi. Selanjutnya terjadi penggabungan radikal fenoksi pada posisi C8-C5.

Mekanisme pembentukan senyawa Licarin A adalah sebagai berikut:

- Tahap pertama : pembentukan senyawa I (Fe(IV) phorpyrin radikal)



- Tahap kedua : pembentukan senyawa oxoferryl (senyawa II) dan radikal fenoksi



- Tahap ketiga : senyawa II bereaksi dengan isoeugenol menghasilkan radikal fenoksi

BAB V

PENUTUP

5.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa:

1. Kondisi optimum reaksi kopling oksidatif pembentukan dimer eugenol diperoleh pada perbandingan eugenol dan H₂O₂ 1:0,5; pH 3, penggunaan *cosolvent* metanol dan 10% metanol.
2. Sintesis dimer eugenol dan H₂O₂ menggunakan katalis enzim Horseradish peroksidase menghasilkan senyawa dehidrodieugenol dengan rendemen 8,52 %.
3. Sintesis dimer isoeugenol dan H₂O₂ menggunakan katalis enzim Horseradish peroksidase menghasilkan senyawa (+) dehidrodiisoeugenol (licarin A) dengan rendemen 9,52%.
4. Hasil pengujian toksisitas terhadap larva udang *A. salina* Leach menunjukkan bahwa senyawa dehidrodieugenol mempunyai aktivitas dengan nilai LC₅₀= 301,9 µg/mL sedangkan senyawa licarin A memiliki nilai LC₅₀= 181,9 µg/mL.
5. Senyawa Licarin A memiliki aktivitas dalam menghambat sel kanker P388 dengan nilai IC₅₀= 10,8 µg/mL.

5.2. Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, saran yang perlu disampaikan untuk penelitian ke depan antara lain:

1. Perlu dilakukan pengujian mekanisme penghambatan senyawa licarin A yang dihasilkan, sehingga dapat diketahui manfaat senyawa tersebut secara maksimal.
2. Perlu dikembangkan lagi pembentukan dimer isoeugenol dengan menggunakan metode reaksi yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Antoniotti, S.; Santhanam, L., Ahuja, D, Hogg, M. G, Dordick, J. S. (2004). Structural diversity of peroxidase-catalyzed oxidation products of o-methoxyphenols. *Org Lett*, 6, 1975-1978.
- Ezio Bolzaehini, Ezio, Gosta Brunow , Simone Meinardi, Marco Orlandi. (1998). Enantioselective Synthesis of a Benzofuranic Neolignan by Oxidative Coupling. *Tetrahedron Letters*, 39, 3291-3294.
- Bortolomeazzi, Renzo, Giancarlo Verardo, Anna Liessi, Alessandro Callea. (2010). Formation of Dehydrodiisoeugenol and Dehydrodieugenol from the Reaction of Isoeugenol and Eugenol with DPPH radical and their role in the radical scavenging activity. *Food Chemistry*. 118 256–265
- Davidenko, TI, OV.Oseyhchuk et al. (2004). Peroxidase Oxidation of Phenols. *J. Biochemistry and Microbiology*. 40 (6): 542-546.
- Elvi, Dewi, (2010). *Sintesis Dimer Eugenol dan Isoeugenol dengan Bantuan enzim peroksidase dari Tumbuhan Horseradish*. Tesis. Departemen Kimia UI. Depok.
- Fessenden, R.J., & Fessenden, J.S, (1991). *Kimia Organik*, Jilid I Ed.ke-3 (Pudjaatmika, A.H., Penerjemah). Jakarta: Erlangga.
- Fujisawa, Seiichiro, Mariko ishihara, et al. (2007). Predicting the Biological Activities of 2-Methoxyphenol Antioxidants: Effects of Dimers. *In Vivo*, 21, 181-188
- Fujisawa, Seiichiro, Toshiko Atsumi, Yukio Murakami, et al. (2005). Dimerization, ROS formation, and biological activity of o-methoxyphenols. *Arch Immunol Ther Exp*, 53, 28–38
- Fujisawa, Seiichiro, Toshiko Atsumi, and Yoshinori Kadoma. (2004). Cytotoxicity, ROS-generation Activity and Radical-scavenging Activity of Curcumin and Related Compounds. *Anticancer Reasearch*. 24: 563-570.
- Hapiot, Philippe, Jean Pinson, Pedat Syr Neta, et al. (1994). Mechanism of Oxidative Coupling Of Coniferyl Alcohol, *Phytochemistry*. Vol. 36, No. 4. 1013-1020.

- Herbert, B., (1995). *Biosintesis Metabolit Sekunder*. Terj dari The Biosynthesis of Secondary Metabolites, IKIP Semarang
- Hiner, Alexander N.P, et al., (2002). Mechanisms of compound I formation in heme peroxidases. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 91, 27–3
- Huixian, Zou. K.E.Taylor., (1994). Products Of Oxidative Coupling of The phenol by horseradish Peroxidase. *Chemosphere*, Vol. 28, No. 10, pp. 1807-1817.
- Hull, Kami L, Erica L. Lanni, and Melanie S. Sanford. (2006). Highly Regioselective Catalytic Oxidative Coupling Reactions: Synthetic and Mechanistic Investigations. *J. Am. Chem. Soc*, 128, 14047-14049
- James A. Nicell and Harold Wright. (1997). A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide. *Enzyme and Microbial Technology*, 21, 302-310.
- Kobayashi, Shiro and Akira Makino. (2009).. Enzymatic Polymer Synthesis: An Opportunity for Green Polymer Chemistry. *Chem. Rev.* 109, 5288–5353.
- Kobayashi, Shiro, Hiroshi Uyama, and Shunsaku Kimura. (2001) Enzymatic Polymerization. *Chem. Rev*, 101, 3793-3818
- Lee, Ji suk, Jinwoong Kim, Young Uck Yu, and Young Choong Kim. (2004) Inhibition of Phospholipase C γ 1 and Cancer Cell Proliferation by Lignans and Flavans from *Machilus thunbergii*. *Arch Pharm Res.* Vol 27, No 10, 1043-1047,
- Meyer, B.N. , et al. (1992). Brine Shrimp : a Convenient General Bioasay For Active Plant Constituent. *Planta Medica*, 45, 31-34
- Mardiana, L. (2009). Sintesis Atropisomer: Bifenol dan Binaftol Melalui Reaksi Kopleng Oksidatif Dengan Menggunakan Enzim Peroksidase (POD) dari Horseradish, Tesis, Departemen Kimia. FMIPA UI.
- Naruyoshi Mita, Shin-ichiro Tawaki. (2003). Laccase-Catalyzed Oxidative Polymerization of Phenols. *Macromol. Biosci.* 3, 253–257.
- Palmer, Trevor., (1991). *Understanding Enzyme*, Ed.3. Ellis Horwood Limited.England.

- Pereira, A.C., L.G. Magalhães a, U.O. Gonçalves, et al. (2011). Schistosomicidal and trypanocidal structure–activity relationships for (±)-licarin A and its (-)- and (+)-enantiomers. *Phytochemistry*. 2011.
- Pereira, David M, Patrícia Valentão and José A. Pereira. (2009). Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*, 14, 2202-2211.
- Pieters, Luc, Stefaan Van Dyck. (1999). Synthesis and Biological Evaluation of Dihydrobenzofuran Lignans and Related Compounds as Potential Antitumor Agents that Inhibit Tubulin Polymerization. *J. Med. Chem*, 42, 5475-5481.
- O'Brien, Peter J. (2000). Peroxidases. *Chemico-Biological Interactions*, 129, 113–139
- Ogata, M. (2000). Antioxidant Activity of Eugenol and related monomeric and dimeric compound. *J. Chem. Pharm. Bull.* 48(10): 1467-1469
- Ralph, John, Knut Lundquist et al. (2004). Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochemistry Reviews*, 3, 29–60.
- Rieser, M. J., Gu, Z.-M., Fang, X.-P., Zeng, L., Wood, K. V., & McLaughlin J. L. (1996). Five novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins from the seeds of *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*, 59, 100-108
- Ryu, K.; Dordick, J. S. (1992) How Do Organic Solvents Affect Peroxidase Structure and Function. *Biochem*, 31, 2588-2598
- Setälä, H. 2008. Regio- and Stereoselectivity of Oxidative Coupling Reactions of phenol,. VTT Publication 689.
- Setälä, H, Aarne Pajunen, Ilkka Kilpeläinen and Gosta Brunow. (1994). Horseradish Peroxidase-catalysed Oxidative Coupling of Methyl Sinapate to give Diastereoisomeric Spiro Dimers. *J. Chem. Soc. Perkin Trans*, 1163-1165.
- Silverstein, R.M., Webster, F.X., & Kiemle, D.J. (2005). Spectrometric Identification of Organic Compound. New York: John Wiley & Sons

- Sok, Dai-Eun, Hui S. Cui and Mee R. Kim. (2009). Isolation and Bioactivities of Furfuran Type Lignan Compounds from Edible Plants. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 1, 87-95.
- Syrjänen, K.; Brunow, G. (2001) Regioselectivity in Oxidative Cross-Coupling of Phenols. Application to The Synthesis of Dimeric Neolignans. *Tetrahedron*, 57, 365-370.
- T. Atsumi, S. Fujisawa b, K. Tonosaki. (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.
- Hiroshi, Uyama, Naoyuki Maruichi, Hiroyuki Tonami, and Shiro Kobayashi. (2002). Peroxidase-Catalyzed Oxidative Polymerization of Bisphenols. *Biomacromolecules*, 3, 187-193.
- Veitch, Nigel C. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65, 249-259
- Williams, D.H., Flemming, I. (1989). *Spectroscopic Method in Organic Chemistry*. Ed.3. United Kingdom. Mc.Graw Hill Book.
- Williamson, TC and J.J. Breen. (March, 1999). *Green Oxidations: Horseradish Peroxidase (HRP) Catalyzed Phenol Coupling With Hydrogen Peroxide*. Papers presented at the meeting of the Division of Environmental Chemistry. ACS.
- Xu, Fangxiang, et al. (2005). Peroxidase Mediated Oxidative Coupling of 1-naphthol: Characterization of polymerization Product. *Water Research*, 39, 2358-2368

([www//health.detik.com/read/2010/04/26/123804/1345485/763/penyebab-kanker-orang-indonesia](http://www.health.detik.com/read/2010/04/26/123804/1345485/763/penyebab-kanker-orang-indonesia)), Januari 19, 2011

Eugenol ., <http://en.wikipedia.org/wiki/eugenol>. Januari 19,2011

Isoeugenol., <http://www.chemicalad21.com/isoegenol>. Januari 19,2011

lignan and neolignan . <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/lignan>. Desember 21, 2010

