

UNIVERSITAS INDONESIA

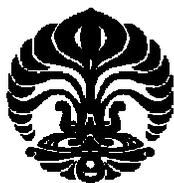
**SINTESIS SENYAWA DIMER EUGENOL DAN
ISOEUGENOL YANG DIKATALISIS OLEH ENZIM
PEROKSIDASE DARI TUMBUHAN HORSERADISH, SERTA
UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN**

TESIS

DEWI ELVI

0806421691

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM PASCASARJANA
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KIMIA
DEPOK
JULI 2010**



UNIVERSITAS INDONESIA

**SINTESIS SENYAWA DIMER EUGENOL DAN
ISOEUGENOL YANG DIKATALISIS OLEH ENZIM
PEROKSIDASE DARI TUMBUHAN HORSERADISH, SERTA
UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN**

TESIS

**Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar Magister
Sains Ilmu Kimia**

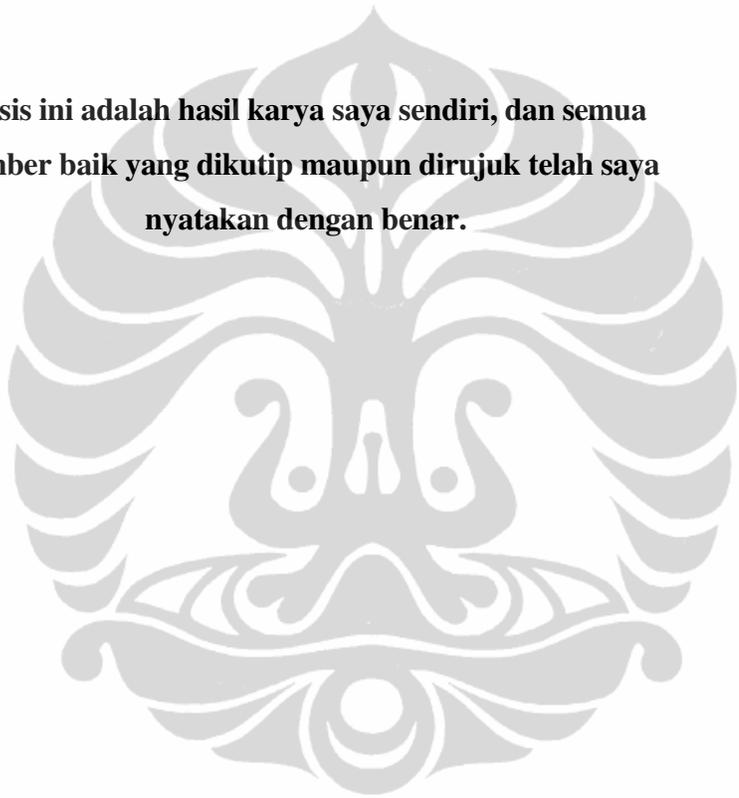
DEWI ELVI

0806421691

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM PASCASARJANA
PROGRSM STUDI MAGISTER ILMU KIMIA
DEPOK
JULI 2010**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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



Nama : DEWI ELVI
NPM : 0806421691
Tanda Tangan :
Tanggal : 16 JULI 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : Dewi Elvi
NPM : 0806421691
Program Studi : Magister Ilmu Kimia
Judul Tesis : Sintesis Senyawa Dimer Eugenol dan Isoeugenol
yang Dikatalisis oleh Enzim Peroksidase dari
Tanaman Horseradish serta Uji Aktivitas
Antioksidan

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : .Prof.Dr. Wahyudi Priyono Suwarso ()
Penguji : Dr. Emil Budianto ()
Penguji : Dr. Herry Cahyana ()
Penguji : Prof. Dr. Soleh Kosela, M.Sc ()
Penguji :Dr. Ivandini Tribidasari A ()

Ditetapkan di : Departemen Kimia, FMIPA Universitas Indonesia
Tanggal : 16 Juli 2010

ABSTRAK

Nama : Dewi Elvi
Program Studi : Magister Sains Ilmu Kimia
Judul : Sintesis Senyawa Dimer dari Eugenol dan Isoeugenol yang Dikatalisis oleh Enzim Peroksidase dari Tanaman Horseradish serta Uji Aktivitas Antioksidan

Sintesis senyawa dimer dari eugenol dan isoeugenol dengan larutan hydrogen peroksida yang dikatalisis oleh enzim peroksidase (EC 1.11.1.7) dari tumbuhan *Horseradish*, telah dilakukan dan menghasilkan senyawa bersifat optis aktif. Enzim peroksidase adalah enzim kelompok oksidoreduktase yang dapat mentransfer atom H dari senyawa fenolik sehingga menghasilkan radikal fenoksi. Dua radikal fenoksi yang bergabung melalui reaksi kopling oksidatif, menghasilkan senyawa dimer. Senyawa yang terbentuk diidentifikasi dengan instrument UV-Vis, FTIR, GC-MS dan Polarimeter Pada radikal fenolik eugenol, terjadi kopling pada posisi *orto-orto* membentuk senyawa atropisomer, (R_a)-(+)-dihidrodieugenol dengan sudut putar spesifik 93,75⁰ dan titik leleh 105,3⁰ C. Sedangkan pada radikal fenoksi isoeugenol terbentuk kopling pada posisi 8-5' yang membentuk senyawa neolignan Licarin A yang bersifat optis aktif dengan sudut putar spesifik -156,25⁰C dan titik leleh 125⁰ C Kedua senyawa hasil sintesis dan substrat asalnya, dibandingkan aktifitas antioksidannya dengan menggunakan metode *radical scavenger* DPPH sehingga diketahui IC₅₀ masing-masing sebesar eugenol : dehidrodieugenol = 6,00 ppm : 2,44 ppm sedangkan isoeugenol : licarin A = 6,22 ppm : 9,30 ppm.

Kata kunci : *Senyawa dimer, eugenol, isoeugenol, enzim peroksidase, dehidrodieugenol, licarin A, sifat optis aktif, aktifitas antioksidan.*

ABSTRACT

Nama : Dewi Elvi
Study Programe : Magister of Chemistry Science
Title : **The Synthesis Dimer Compound from Eugenol and Isoeugenol catalyzed Peroxidase Enzyme from Horseradish plant and antioksidant activity test.**

Synthetizing of dimeric compound which is made from eugenol and isoeugenol and hydrogen peroxide liquid catalyzed by peroxidase (EC 1.11.1.7) from Horseradish plant, has been conducted and it produces an optically active compound. Peroxidase is an enzyme in oksidoreductase group that can move H atoms from phenolic to form radical phenoxi. A unification of two radical phenoxis through an oxidative coupling reaction, forms a dimeric compound. In the eugenol radical phenolic, coupling conducted at the position of orto-orto to form a dimeric, meanwhile in the isoeugenol radical phenoxi, coupling reaction conducted in the position of 8 – 5' to form a neolignan compound. The compound that produced from eugenol and isoeugenol is identified by using instruments of UV – Vis, FTIR, GC – MS and Polarymeter. Atropisomer compound that formed from base material of eugenol origin is identified as (Ra) – (+) – dihidridieugenol with optical distortion angle, $\alpha = 0.30^{\circ}$ and melting temperature point at 105.3° C. While an optically active compound originated from isoeugenol is identified as (7S, 8S) – (-) licorin A which has optical distortion angle, $\alpha = -0.5^{\circ}$ and meling point 125° C. Both synthetic compound products and the base material origin, are assayed their antioxidant activities by using radical scavenger DPPH method to determine their IC_{50} value. The results are as follows respectively, Eugenol : dihidrodieugenol = 6.00 ppm : 2.24 ppm, and isoeugenol : licorine A = 6.22 ppm : 9.30 ppm.

Keywords : atropisomer compound, eugenol, isoeugenol, peroxidase, phenolic compound, dihidrodieugenol, licorine A, antioxidant activity.

Keywords: The dimeric compound, eugenol, isoeugenol, peroxidaseenzyme, optically active , dehidrodieugenol, licarin A, antioxidant activity.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vi
ABSTRAK.....	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiv
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang.....	1
1.2 Tujuan penelitian.....	3
1.3 Hipotesis penelitian.....	3
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Senyawa Optis aktif.....	4
2.2 Tanaman Horseradis (<i>Armoracia rusticana</i>).....	8
2.3 Enzim.....	9
2.3.1 Enzim Peroksidase.....	11
2.3.2 Aktivitas Enzim.....	13
2.4 Senyawa Fenolik.....	13
2.4.1. Eugenol.....	14
2.4.2. Isoeugenol.....	15
2.4.3. Reaksi Kopling Oksidatif Fenol.....	16
2.4.4. Reaksi Kopling Oksidatif Eugenol.....	18
2.4.5. Reaksi Kopling Oksidatif Isoeugenol.....	19
2.5. Polarimeter.....	22
2.6 Analisis Hasil Reaksi.....	23
2.6.1 Analisis Dengan UV-VIS.....	23
2.6.2 Analisis dengan FTIR.....	23
2.6.3 Analisis Dengan GC-MS.....	24
2.6.4 Antioksidan.....	24
3. METODE PENELITIAN.....	28
3.1 Alat dan Bahan.....	28
3.1.1 Alat.....	28
3.1.2 Bahan.....	28
3.2 Cara Kerja.....	29

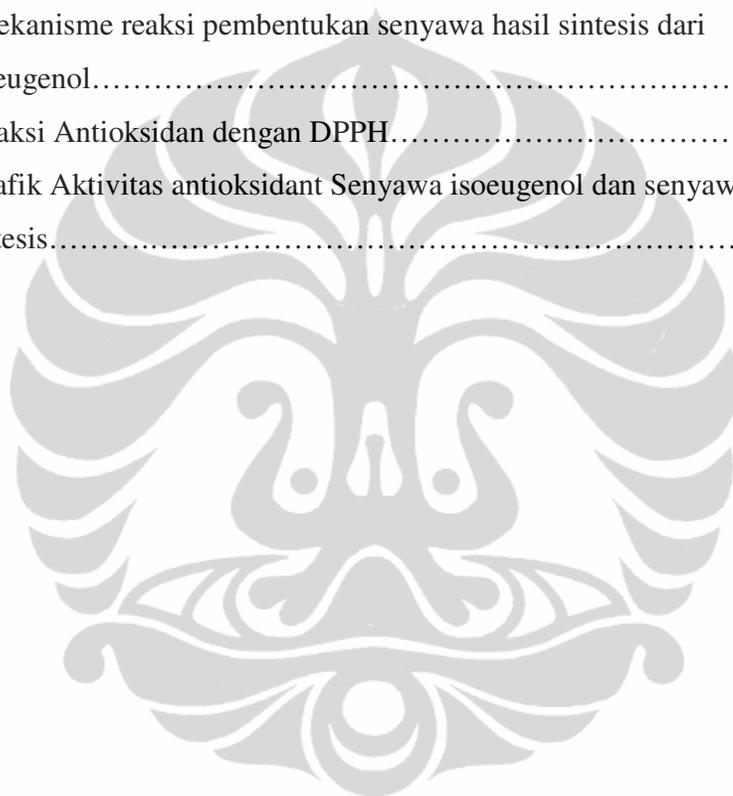
3.2.1 Sintesis Senyawa Dimer dari Eugenol Yang Dikatalis oleh Enzim Peroksidase.....	29
3.2.2 Sintesis Senyawa Dimer dari Isoeugenol yang Dikatalis oleh Enzim Peroksidase.....	30
3.2.3 Uji dan Pemisahan Komponen Hasil Reaksi.....	30
3.2.4 Pengukuran Spektrofotometer UV-Visibel.....	31
3.2.5 Pengukuran Spektrofotometer FTIR.....	31
3.2.6 Pengukuran Kromatografi Gas dan Spektrofotometer massa GC-MS	31
3.2.7 Penentuan Sudut Putar (α) Senyawa Hasil Reaksi dengan Polarimeter.....	31
3.2.8 Uji aktivitas antioksidan metode radical scavenger dalam DPPH	32
3.3 Bagan Kerja.....	33
3.3.1 Sintesis Senyawa Atropisomer dari Bahan Dasar Eugenol Melalui Reaksi Penggabungan Oksidatif Menggunakan Enzim Peroxidase.....	33
3.3.2 Sintesis Senyawa Atropisomer dari Bahan Dasar Eugenol Melalui Reaksi Penggabungan Oksidatif Menggunakan Enzim Peroxidase.....	34
3.3.3 Uji Aktivitas Antioksidan Metode Radical Scavenger dengan DPPH dalam Metanol.....	35
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	36
4.1 Sintesis Senyawa Dimer dari eugenol yang Dikatalis Enzim Peroxidase.....	36
4.1.1 Analisis Senyawa Dimer dari Hasil Reaksi Eugenol.....	38
4.1.1.1 Analisis Dengan UV-VIS.....	38
4.1.1.2 Analisis Dengan FTIR.....	39
4.1.1.3 Analisis Dengan Polarimeter.....	41
4.1.1.4 Analisis dengan GC-MS.....	42
4.1.2 Mekanisme Reaksi Pembentukan Senyawa Dehidrodieugenol dari Eugenol.....	46
4.1.3 Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Eugenol dan Senyawa Hasil Sintesis	48
4.2 Sintesis Senyawa Dimer dari Isoeugenol yang Dikatalis oleh Enzim Peroxidase.....	50
4.2.1 Analisis Senyawa Dimer dari Isoeugenol dengan Instrumentasi.....	52

4.2.1.1 Analisis dengan UV-Vis.....	52
4.2.1.2 Analisis dengan FTIR.....	53
4.2.1.3 Analisis dengan Polarimeter.....	55
4.2.1.4 Analisis dengan GC-MS.....	55
4.2.2 Mekanisme Reaksi Pembentukan Senyawa Dimer Dehidroisoeugenol dari Isoeugenol.....	59
4.2.3 Uji Aktifitas Antioksidan Seyawa Isoeugenol Dan Senyawa Hasil Sintesis	60
5. KESIMPULAN DAN SARAN	64
5.1 Kesimpulan.....	64
5.2 Saran	65
DAFTAR PUSTAKA.....	66

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Isomer Optis Aktif.....	5
Gambar.2.2 Tumbuhan Horseradish (<i>Amaracia rusticana</i>) dan bagian akarnya ...	9
Gambar 2.3 Siklus katalitik dari enzim peroksidase yang mengandung heme ³¹ ..	11
Gambar2.4 Struktur Eugenol.....	14
Gambar 2.5 Struktur Molekul Cis dan Trans isoeugenol.....	15
Gambar 2.6 Reaksi kopling oksidatif fenolik.....	17
Gambar 2.7 Resonansi radikal eugenol dan dimerisasi eugenol.....	18
Gambar 2.8 Reaksi kopling oksidatif eugenol.....	19
Gambar 2.9 Resonansi radikal isoeugenol.....	20
Gambar 2.10 Reaksi kopling oksidatif isoeugenol.....	21
Gambar 2.11 DPPH (1,1 diphenyl 2, picril hidrazil).....	26
Gambar 4.1 Hasil reaksi kopling oksidatif eugenol dan hasil ekstraksi dengan etil asetat.....	37
Gambar 4.2 Hasil pemekatan produk reaksi dan hasil uji KLT	37
Gambar 4.3 Spektrum UV-VIS Eugenol dan senyawa hasil reaksi.....	39
Gambar 4.4 Spektrum FTIR senyawa dimer dari eugenol.....	41
Gambar 4.5 Kromatogram GC senyawa dimer dari eugenol.....	43
Gambar 4.6 Spektrum massa senyawa dimer dari eugenol.....	44
Gambar 4.7 Struktur dehidrodieugenol.....	45
Gambar 4.8 Struktur (Ra)-(+)-dehidrodieugenol dan cara penentuannya.....	46
Gambar 4.9 Mekanisme reaksi pembentukan senyawa atropisomer dari eugenol...	47
Gambar 4.10 Reaksi Antioksidan dengan DPPH.....	48
Gambar 4.11 Grafik Aktifitas Antioksidant Eugenol dan Senyawa Atropisomer...	49
Gambar 4.12 Hasil reaksi isoeugenol setelah 60 menit, setelah didiamkan selama ± 24 jam dan setelah kristal ditambahkan etil asetat.....	51
Gambar 4.13 Hasil KLT isoeugenol dan hasil reaksi isoeugenol.....	52
Gambar 4.14 Spektrum UV-Vis isoeugenol dan hasil reaksi.....	53
Gambar 4.15 Spektrum FTIR senyawa hasil sintesis dari isoeugenol.....	54

Gambar 4.16 Spektrum GC senyawa hasil sintesis dari .Isoeugenol.....	56
Gambar 4.17 Spektrum massa senyawa hasil reaksi isoeugenol dan data base rumus struktur dari Phenol, 4-[2,3-dihydro-7-methoxy-5-1(1- propenyl)-2-benzofuranyl]-2-methoxy.....	57
Gambar 4.18 Struktur -(-)-licarin A.....	58
Gambar 4.19 Mekanisme reaksi pembentukan senyawa hasil sintesis dari isoeugenol.....	60
Gambar 4.20 Reaksi Antioksidan dengan DPPH.....	61
Gambar 4.21 Grafik Aktivitas antioksidant Senyawa isoeugenol dan senyawa hasil sintesis.....	62



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Klasifikasi Enzim	10
Tabel 4.1 Perbandingan λ_{\max} pada pektrum UV-Vis Eugenol dan Hasil Reaksi.....	38
Tabel 4.2 Data spektrum FTIR senyawa dimer dari eugenol.....	40
Tabel 4.3 Perbandingan antara spektrum massa hasil sintesis senyawa dimer dari eugenol dengan hasil penelitian Miyazawa dan Hisama.....	45
Tabel 4.4 Nilai % RSA dari Eugenol dan Senyawa Atropisomer hasil reaksi.....	49
Tabel 4.5 Perbandingan λ_{\max} antara Isoeugenol dan hasil reaksi spot 1 dan 2.....	52
Tabel 4.6 Beberapa pita serapan pada spektrum FTIR senyawa hasil sintesis (spot 1) dari isoeugenol.....	54
Tabel 4.7 Hasil analisis GC-MS senyawa hasil sintesis dari isoeugenol.....	56
Tabel 4.8 Nilai % RSA dari isoeugenol dan senyawa hasil reaksi.....	61

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Senyawa organik bahan alam sebagian besar adalah senyawa – senyawa turunan aromatik. Ciri dari senyawa aromatik alami secara umum biasanya sekurang-kurangnya mengandung satu rantai samping alifatik yang terikat pada cincin aromatik. Sebagian besar asam aromatik alami mengandung gugus fenol. Di antara aneka ragam kandungan senyawa kimia dalam tumbuhan, terdapat senyawa yang berasal dari golongan senyawa fenolik. Senyawa ini tersebar luas dalam spesies tumbuh – tumbuhan yang ada di alam. Beberapa senyawa fenolik yang sering dijumpai dan bermanfaat antara lain eugenol, isoeugenol , katekin, cinnamaldehyda dan lain-lain.

Senyawa fenolik adalah senyawa bahan alam yang cukup luas penggunaannya saat ini. Kemampuannya sebagai senyawa biologis aktif, memberikan suatu peran yang besar terhadap kepentingan manusia. Sudah banyak penelitian diarahkan pada pemanfaatan senyawa fenolik dalam bidang industri. Pada industri makanan dan minuman, senyawa fenolik berperan dalam memberikan aroma yang khas pada produk makanan dan minuman. Pada industri farmasi dan kesehatan, senyawa fenolik berperan sebagai antioksidan, antimikroba, antikanker, penghilang rasa sakit dan lain-lain; sebagai contoh obat antikanker (podofilotoksan), antimalaria (kuinina) dan banyak digunakan sebagai insektisida serta fungisida ¹.

Senyawa fenolik mempunyai struktur yang khas, yaitu memiliki satu atau lebih gugus hidroksil yang terikat pada satu atau lebih cincin aromatik benzena, sehingga senyawa ini juga memiliki sifat yang khas, yaitu dapat teroksidasi². Kemampuannya membentuk radikal fenoksi yang stabil pada proses oksidasi menyebabkan senyawa ini banyak digunakan sebagai antioksidan.

Sintesis polimer fenolik bioaktif dengan proses yang relatif aman terhadap lingkungan (tidak beracun), dapat dilakukan melalui reaksi kopling oksidatif fenolik

secara enzimatik, yaitu dengan bantuan biokatalis berupa enzim. Keuntungan penggunaan enzim sebagai biokatalis adalah sifatnya yang ramah lingkungan, karena berasal dari makhluk hidup, 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 fenol dan amina aromatik, sehingga penggunaannya di dalam industri menjadi terbatas.

Salah satu cara yang sering digunakan dalam mengoksidasi senyawa fenolik, yaitu menggunakan bantuan katalis enzim peroksidase. Enzim peroksidase merupakan kelompok enzim oksidoreduktase³ yang mampu mengkatalisis reaksi oksidasi oleh hidrogen peroksida dari sejumlah substrat yang merupakan donor hidrogen dari fenol, anilin dan sebagainya. Enzim peroksidase dalam organisme hidup, dapat mengkatalisis senyawa substratnya, sedangkan H₂O₂ berfungsi untuk menginisiasi biosintesis beberapa metabolit sekunder yang diperlukan pada proses pertumbuhan. Oksidasi fenolik oleh enzim peroksidase dengan substrat H₂O₂ menghasilkan reaksi kopling oksidatif, sehingga terbentuk senyawa dimer yang bersifat optis aktif. Sifat optis aktif^{2,7} adalah kemampuan suatu senyawa untuk memutar bidang polarisasi suatu cahaya. Sifat optis aktif dapat terjadi pada senyawa yang memiliki atom C* kiral atau pada senyawa atropisomer.

Oksidasi yang dilakukan oleh enzim peroksidase terhadap senyawa fenolik menyebabkan terbentuknya suatu radikal fenoksi, dimana radikal ini mampu melakukan struktur resonansi pada posisi *orto* dan *para* terhadap cincin aromatiknya, dan selanjutnya akan bergabung dengan radikal fenoksi yang lain membentuk senyawa baru polifenol. Cara ini sering dikenal sebagai polimerisasi secara enzimatik⁵.

Pada tanaman, zat polifenol yang berasal dari senyawa turunan fenilalanin melalui proses dimerisasi yang dikenal sebagai monolignol membentuk lignan dengan bantuan enzim peroksidase. Senyawa lignan dikenal sebagai antioksidan, antimicrobial dan antikanker⁶.

Pada penelitian sebelumnya⁴ telah dilakukan reaksi kopling oksidatif eugenol dan isoeugenol dengan bantuan enzim peroksidase, dari tumbuhan Horseradish. Metode yang digunakan adalah mencampurkan semua pereaksi dalam reaktor tanpa memperhatikan kenaikan suhu reaksi yang terjadi. Pada penelitian ini metode reaksinya diubah dengan cara menjaga suhu reaksi, karena reaksi kopling oksidatif menghasikan energi. Agar enzim peroksidase yang digunakan tidak rusak akibat kenaikan suhu pada saat reaksi berlangsung, substrat ditambahkan perlahan-lahan dan digunakan pendingin air.

1.2. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mensintesis senyawa dimer dari eugenol dan isoeugenol, melalui reaksi kopling oksidatif yang dikatalisis oleh enzim *Peroksidase* (POD), dari tanaman Horseradish.
2. Menentukan sifat antioksidan senyawa dimer yang terbentuk, dibandingkan dengan senyawa dasarnya.

1.3. Hipotesis Penelitian

Enzim *Peroksidase* bersama pasangan pereaksi hidrogen peroksida (H_2O_2), akan mampu melakukan reaksi penggabungan (coupling) oksidatif antar sesama radikal fenoksi dari bahan dasar eugenol dan isoeugenol. Hasil kopling oksidatif radikal fenoksi ini bersifat optis aktif.

Senyawa dimer yang terbentuk dari eugenol maupun isoeugenol memiliki aktivitas sebagai antioksidan, seperti substratnya karena memiliki gugus fenoksi.

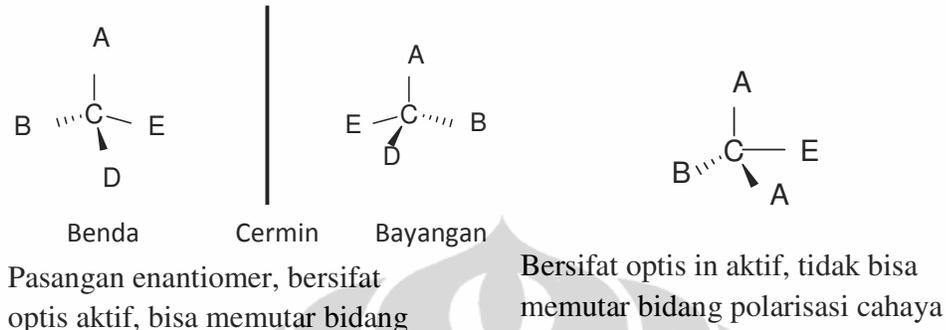
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Senyawa Optis Aktif^{2,7,8}

Senyawa optis aktif adalah senyawa yang mempunyai kemampuan memutar bidang polarisasi cahaya, bila memutarnya ke kanan/searah jarum jam (sudut putar optis, $\alpha = +$), dan bila arah memutarnya ke kiri/berlawanan arah jarum jam (sudut putar optis, $\alpha = -$).

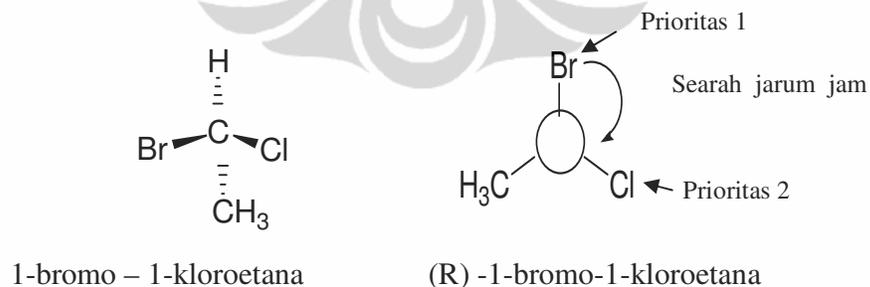
Apabila suatu atom karbon dikelilingi langsung oleh 4 buah atom yang berbeda, dengan tipe CABDE, maka atom karbon tersebut disebut sebagai atom karbon asimetrik (C'), atau dengan perkataan lain bahwa senyawa yang mengandung atom karbon asimetrik tersebut dikatakan mempunyai pusat khiral (*chirality centre*) atau disebut juga senyawa khiral. Kata khiral (chiral) berasal dari bahasa Yunani, yang artinya kedua telapak tangan kita. Senyawa yang khiral akan mampu memutar bidang polarisasi cahaya atau disebut senyawa optis aktif (mempunyai sudut putar optis, α). Apabila suatu senyawa yang mempunyai atom karbon asimetrik bisa membentuk pasangannya dalam bentuk benda dan bayangan (diandaikan antara benda dan bayangannya tersebut ada cermin), yang apabila antara benda dan bayangannya tersebut didekatkan satu sama lain tidak saling menutupi, maka pasangan senyawa tersebut disebut sebagai pasangan enantiomer atau pasangan antipoda, dan bersifat optis aktif (akhiral). Sedangkan apabila antara benda dan bayangannya bila didekatkan satu sama lain saling menutupi, maka pasangan senyawa enantiomer tersebut bersifat optis inaktif. Dalam hal ini, sepasang tangan-tangan ikatan antar atom tersebut membentuk suatu bidang.



Gambar 2.1 Isomer Optis Aktif

Arah pemutaran bidang polarisasi cahaya dapat dinyatakan oleh (+) dan (-), sedangkan konfigurasi bagaimana gugus-gugus diletakkan disekitar atom C* (khiral), yang disebut sebagai konfigurasi mutlak, diatur dalam sistem R (*rectus* = kanan) dan S (*sinister* = kiri) atau sistem *Chan-Ingold-Prelog*. Dalam sistem ini gugus gugus diberi urutan prioritas dengan menggunakan peraturan *Chan-Ingold-Prelog*. Kemudian proyeksi molekul diatur sehingga gugus paling rendah prioritasnya ada dibelakang, setelah itu ditarik anak panah dari atom prioritas tinggi menuju atom prioritas tertinggi kedua. Jika anak panah searah jarum jam, maka konfigurasi itu adalah (R). Jika arah panah berlawanan dengan jarum jam, konfigurasi itu (S).

Contoh :



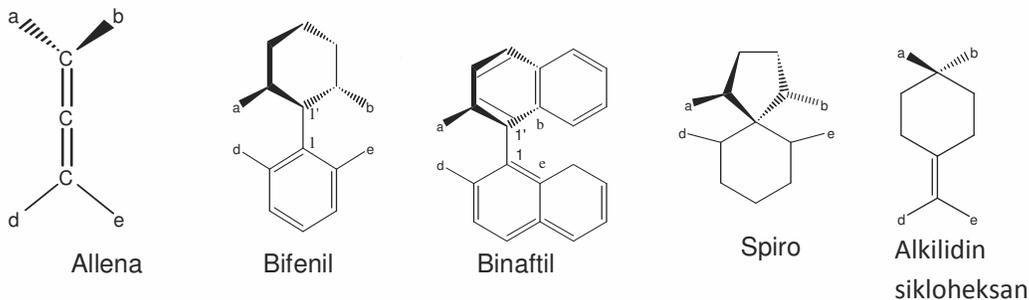
Pada senyawa yang bersifat optis aktif tetapi tidak memiliki atom C khiral (asimetrik), maka senyawa-senyawa tersebut disebut atropisomer. Senyawa atropisomer disebabkan oleh adanya sumbu khiral, bidang khiral dan heleksitas:

1. Sumbu (axis) khiral : *Ra* dan *Sa*

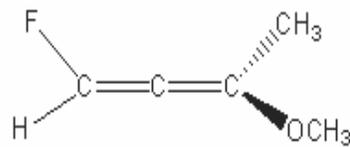
Pada keoptisaktifan yang disebabkan oleh sumbu khiral (axis), pada penentuannya, maka harus dicari bagian molekul yang mengandung sumbu mendatar atau horizontal, sebagai pokok utama pengamatan dan sumbu tegak atau vertical. Posisi pengamat harus tepat di depan bagian molekul yang mengandung sumbu mendatar. Selanjutnya digambarkan sumbu mendatar yang dipotong oleh sumbu tegak, dan pada masing-masing sumbu ditentukan, mana atom/gugus/substituent yang dianggap prioritas atau nomor atomnya lebih besar, diberi nomor 1h dan yang diprioritaskan atau nomor atomnya lebih kecil diberi nomor 2h. Demikian juga pada sumbu vertikal juga diberi nomor yang sama, seperti halnya pada sumbu tegak, yaitu 1v dan 2v.



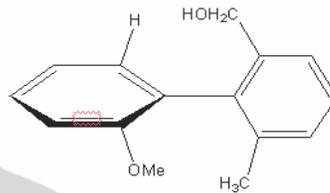
Molekul yang mempunyai sumbu khiral, menyusun gugus substitusinya seperti tetrahedral yang memanjang, seperti contoh struktur dibawah ini :



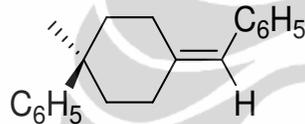
Contoh :



(*S_a*)-1-Fluoro-3-metoksi-3'-metilallena



(*R_a*)-2-(Hidroksimetil)-2'-metoksi-6-metilbiphenil



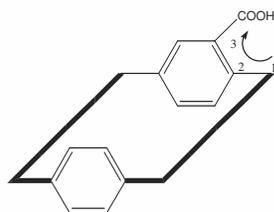
(*R_a*)-(-) Benzalidin-4-phenilsikloheksana



(*S_a*)-(+)-Spiro-[3,3]-hepta-1,5-diena

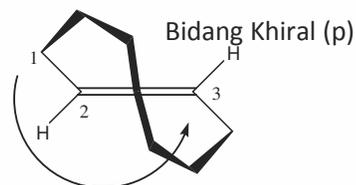
2. Bidang (plane) khiral : *R_p* dan *S_p*

Pada penentuan bidang khiral, maka harus dicari bagian molekul yang mengandung bidang khiral (mengidentifikasi bidang khiral). Langkah selanjutnya melibatkan atom yang terikat pada bidang khiral, atom ini menerima prioritas pertama (atom 1), dan prioritas kedua (atom 2) diberikan kepada atom yang terikat secara langsung pada atom 1, sedangkan prioritas ketiga (atom 3) ditentukan dengan cara yang sama.



Bidang Khiral (p)

R_p-3-parasiklofan karboksilat

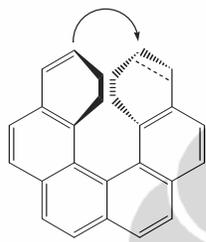


Bidang Khiral (p)

S_p-trans-siklookтена

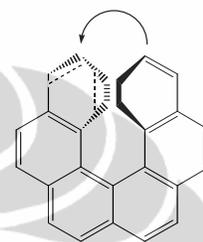
3. Heleksitas M,P

Prinsip penentuan khiralitas ini didasarkan pada pembukaan sekrup (screw plane), bila arahnya seperti membuka sekrup diberi sebutan M ($\sim R$) dan bila arahnya seperti memasukan sekrup disebut P ($\sim S$)



M-Heleksena

arah membuka skrup



P-Heleksena

arah memasukan skrup

2.2 Tanaman Horseradish (*Amoracia rusticana*)⁹

Horseradish (*Amoracia rusticana*, syn, *Cochlearia armoracia*) adalah tanaman setahun dari famili Brassicaceae, yang termasuk mustard, wasabi dan kubis. Tanaman ini berasal dari Eropa bagian Tenggara dan Asia bagian Barat, yang sedang populer di dunia saat ini. Sebagian besar tumbuh di iklim sedang, dan beberapa di antaranya tumbuh di iklim antartik. Ciri umum dari family Brassicaceae, yaitu memiliki rasa getir. Tanaman ini dapat tumbuh hingga 1,5 meter. Akar horseradish yang utuh tidak mempunyai aroma, tetapi jika dipotong akarnya memiliki aroma yang sangat kuat. Horseradish mengandung potassium, kalsium, magnesium dan fosfor, dan juga minyak yang mudah menguap seperti minyak mustard, yang memiliki khasiat antibiotik. Dalam keadaan segar, horseradish mengandung rata-rata 79,31 mg vitamin C per 100 g horseradish mentah.

Enzim horseradish peroksidase yang ditemukan dalam tanaman, digunakan secara luas dalam biologi molekuler, antara lain untuk mendeteksi antibodi. Dalam penelitian lainnya, enzim ini juga banyak digunakan sebagai katalis untuk

pembentukan senyawa dimer, trimer bahkan polimer melalui mekanisme pembentukan radikal bebas pada beberapa senyawa aromatik seperti fenol, acetaminophen dan lain-lain.



Gambar.2.2 Tumbuhan Horseradish (*Armoracia rusticana*) (a) dan bagian akarnya (b)

Taksonomi tanaman horseradish :

Kingdom : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Orde : Brassicales
Famili : Brassicaceae
Genus : *Armoracia*
Spesies : *Armoracia rusticana*

2.3. Enzim^{3,10,11,12}

Enzim adalah satu atau beberapa gugus polipeptida (protein) yang berfungsi sebagai katalis biologis (senyawa yang mempercepat proses reaksi tanpa habis bereaksi) dan pengarah reaksi biokimia dalam suatu reaksi kimia. Enzim bekerja dengan cara menempel pada permukaan molekul zat-zat yang bereaksi, dan dengan demikian mempercepat proses reaksi. Percepatan terjadi karena enzim menurunkan

energi pengaktifan, yang dengan sendirinya akan mempermudah terjadinya reaksi. Sebagian besar enzim bekerja secara spesifik, yang artinya setiap jenis enzim hanya dapat bekerja pada satu macam senyawa atau reaksi kimia. Hal ini disebabkan perbedaan struktur kimia tiap enzim yang bersifat tetap.

Kerja enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, terutama adalah substrat, suhu, keasaman, kofaktor dan inhibitor. Tiap enzim memerlukan suhu dan pH (tingkat keasaman) optimum yang berbeda-beda, karena enzim adalah protein, yang dapat mengalami denaturasi jika suhu dan keasaman berubah. Di luar suhu atau pH yang sesuai, enzim tidak dapat bekerja secara optimal atau strukturnya akan mengalami kerusakan. Hal ini akan menyebabkan enzim kehilangan fungsinya sama sekali.

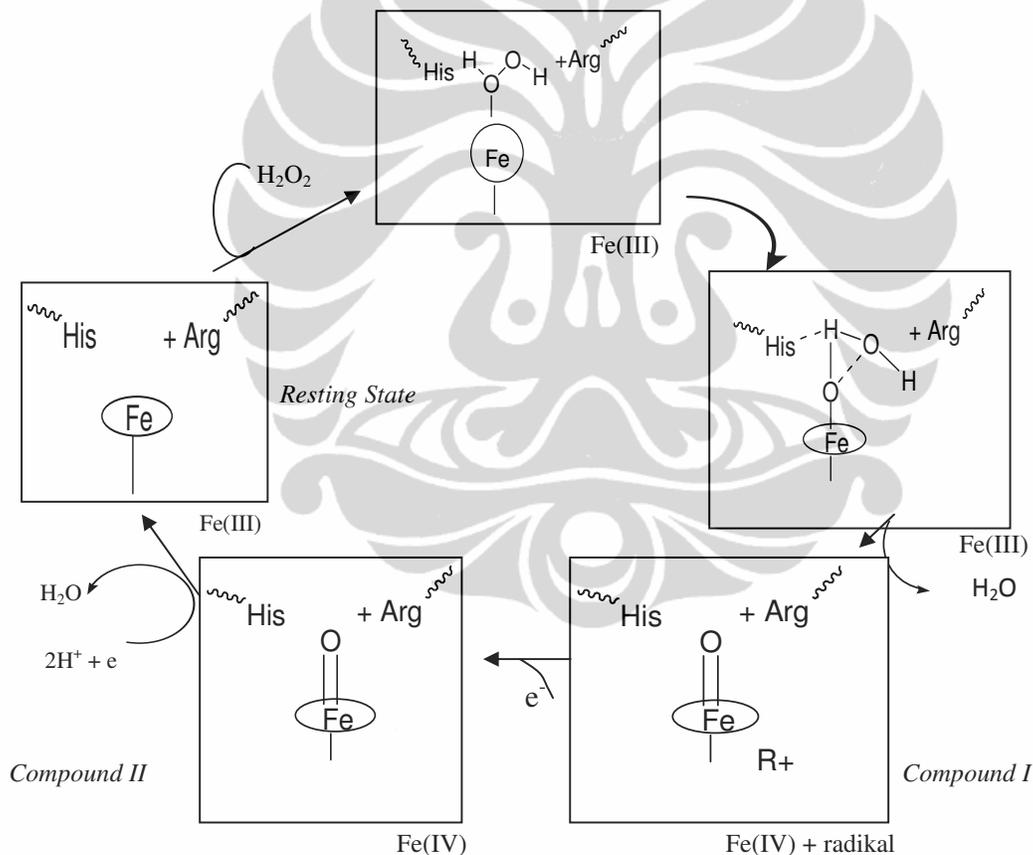
Menurut komisi enzim, International Union of Biochemistry (IUB), enzim diklasifikasikan menjadi 6 kelas besar, berdasarkan reaksi total yang dikatalisis, seperti Tabel 2.1 berikut ini

Tabel 2.1 Klasifikasi Enzim^{3,11}

Digit Pertama	Kelas Enzim	Jenis Reaksi yang Dikatalisis
1	Oksidoreduktase	Reaksi redoks (transfer electron atau proton).
2	Transferase	Transfer atom atau gugus dari satu 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 isomerasi.
6	Ligase	Pembentukan ikatan C-C, C-S, C-O dan C-N diikuti dengan pembentukan isofosfat dari ATP.

2.3.1 Enzim Peroksidase^{13,14}

Enzim Peroksidase (EC 1.11.1.7) merupakan salah satu enzim yang termasuk dalam kelas enzim oksidoreduktase. Enzim ini mengkatalisis transfer atom H, atom O atau elektron dari satu substrat ke substrat lainnya. Peroksidase merupakan enzim yang mengandung kofaktor “heme” pada sisi aktifnya, yang dapat mengkatalisis reaksi oksidasi dari berbagai senyawa organik ataupun anorganik dengan adanya H_2O_2 sebagai akseptor elektron.



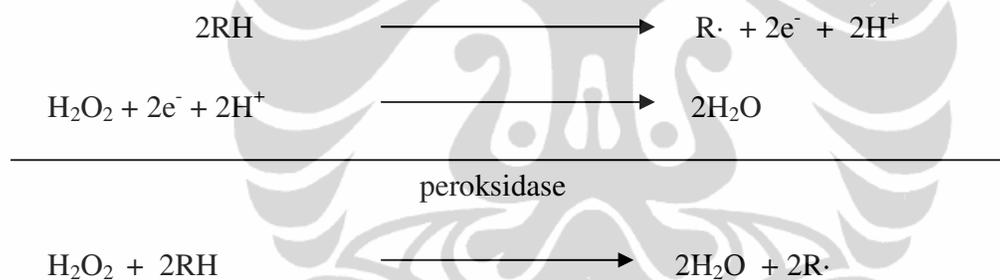
Gambar 2.3 Siklus katalitik dari enzim peroksidase yang mengandung heme³¹

Siklus katalis dimulai dari bentuk Fe^{+3} . Molekul H_2O_2 berikatan koordinasi dengan ion Fe^{+3} dan sudut histidine menjadi perantara transfer proton sehingga kedua atom H ditempatkan pada atom O. Polarisasi ikatan secara serempak oleh rantai samping guanidinium menghasilkan pemutusan heterolitik ikatan O-O. sebagian

membentuk H₂O dan sisanya terikat dengan Fe menghasilkan intermediet dengan bilangan oksidasi tinggi.

Enzim horseradish peroksidase dan H₂O₂ sering digunakan sebagai katalis pada reaksi polimerisasi secara radikal dan reaksi kopling untuk membentuk senyawa poliphenol^{22,32}. Enzim ini juga dapat digunakan untuk mengkatalisis senyawa-senyawa dari golongan amina aromatik.

Enzim peroksidase dalam metabolisme makhluk hidup dan beberapa substrat lainnya berfungsi mempercepat konversi H₂O₂ yang bersifat racun menjadi molekul netral dengan adanya substrat yang bertindak sebagai donor hidrogen, sehingga sel hidup tidak mengalami kerusakan. Persamaan reaksinya dapat ditulis sebagai berikut:



Keterangan : RH = substrat yang bertindak sebagai donor hidrogen

Enzim peroksidase umumnya terdapat dalam sel hewan maupun tanaman. Pada tanaman, dapat ditemukan pada tanaman horseradish, kedelai, kentang, turnip, tomat, wortel, pisang, strawberi dan sebagainya. Horseradish peroxidase (HRP) secara luas digunakan dalam riset untuk imunohistokimia pelabelan bagian jaringan, misalnya dengan melakukan biopsi subjek yang diduga mengidap kanker. Biasanya banyak molekul enzim yang secara kovalen terikat pada antibody yang spesifik disukai untuk antibody yang lain yang mengakui penanda tertentu dinyatakan dalam sel-sel yang berisi bagian jaringan. Yang mana HRP akan mengkonversi 3,3-diaminobenzidin (DAB), yang selanjutnya ditambahkan ke bagian, untuk sebuah senyawa yang tidak terpecahkan coklat kekuningan. Senyawa ini kemudian terlihat dalam sebuah foton atau elektron mikroskop.

2.3.2 Aktivitas Enzim^{3,11}

Satu unit enzim adalah jumlah enzim yang mampu mengkatalisis 1 μmol substrat per menit pada kondisi tertentu (optimal). Aktivitas spesifik enzim didefinisikan sebagai beberapa unit enzim yang terdapat pada satu mg protein. Berdasarkan definisi tersebut, maka aktivitas spesifik enzim menunjukkan kemurnian suatu enzim, dengan demikian semakin besar aktivitas spesifiknya, menunjukkan bahwa kemurnian enzim tersebut semakin tinggi. Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain suhu, pH, kofaktor dan beberapa faktor lain. Peningkatan suhu, seperti pada katalis biasa, maka akan meningkatkan laju reaksi, tetapi kaitannya dengan struktur enzim yang berupa protein, maka ada batas suhu yang memungkinkan struktur enzim tetap terjaga, yaitu suhu optimum. Di atas suhu optimum, maka struktur enzim akan terganggu dan bahkan bisa rusak (denaturasi), dengan demikian aktivitasnya pun akan menurun. Demikian juga halnya dengan perubahan pH, maka pada pH tertentu akan memberikan aktivitas optimum, dan di atas atau di bawah pH tersebut aktivitasnya lebih rendah.

2.4 Senyawa Fenolik^{1,15,16}

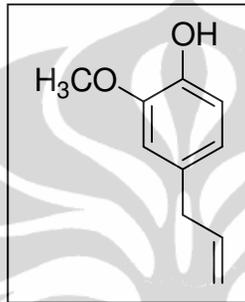
Senyawa fenolik merupakan senyawa yang terbentuk dari cincin aromatik, yang sekurang-kurangnya tersubstitusi oleh satu gugus hidroksil. Contoh yang paling sederhana fenol. Senyawa fenolik merupakan metabolit sekunder yang banyak terdapat di alam, dan biasanya berada dalam bentuk polimernya ataupun terikat pada beberapa gugus fungsi membentuk eter, ester, glikosida, serta sebagian besar termasuk ke dalam golongan flavanoida. Ada beberapa senyawa fenolik yang bersifat mudah menguap, misalnya eukaliptol, eugenol.

Aktivitas fisiologis senyawa fenolik yang ada pada tumbuhan sangat beragam. Senyawa fenol sederhana terlibat transport elektron pada fotosintesis dan dalam pengaturan enzim tertentu. Beberapa senyawa tertentu yang tergolong senyawa flavanoida, berperan dalam merangsang atau menarik serangga agar membantu penyerbukan bunga. Ada juga beberapa senyawa fenolik yang bersifat racun terhadap herbivora (hewan pemakan tumbuhan). Selain itu, senyawa fenolik tertentu juga

dimanfaatkan manusia sebagai antikanker, antioksidan, antimikroba, herbisida dan lain-lainnya.

2.4.1 Eugenol^{17,18,19}

Struktur, sifat kimia dan sifat fisika dari eugenol sebagai berikut :



Gambar2.4 Struktur Eugenol

Nama trivial	: Eugenol
Nama IUPAC	: 1-hidroksi-2-metoksi-4-(2-propenil) benzene
Rumus molekul	: C ₁₀ H ₁₂ O ₂
Bentuk fisik	: Cairan tak 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 alcohol, eter, kloroform, dan asam asetat.

Eugenol adalah senyawa guaikol yang tersubstitusi oleh gugus alil dan merupakan turunan fenil propana (C₆C₃). Senyawa eugenol adalah senyawa beraroma dan bersifat sebagai antioksidan, antimikrobia tidak bersifat toksik maupun mutagenik, stabil pada suhu ruang, namun sensitif terhadap cahaya. Eugenol merupakan komponen utama dari 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.

Eugenol banyak dimanfaatkan sebagai pewangi dan parfum, pemberi rasa dan aroma pada produk farmasi dan pasta gigi, zat penarik serangga, antiseptik dan analgesik. Kandungan eugenol terbesar diperoleh dari kuncup bunga tanaman cengkeh (*Eugenia caryophyllata*), family Myrtaceae yang banyak ditemukan di kepulauan Maluku. Di daerah ini terdapat tanaman cengkeh tertua di dunia dan merupakan produsen cengkeh terbesar dunia.

2.4.2 Isoeugenol^{19,20}

Isoeugenol pada tanaman, berasal dari senyawa turunan fenilpropana (C₆C₃), dimana senyawa ini bersama dengan senyawa turunan fenilpropana lain seperti eugenol dan metileugenol dalam tanaman digunakan sebagai pertahanan terhadap serangan hewan dan mikroorganisme serta sebagai penarik serangga dalam penyerbukan bunga.

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



Gambar 2.5 Struktur Molekul Cis dan Trans isoeugenol

Nama trivial	: Isoeugenol
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

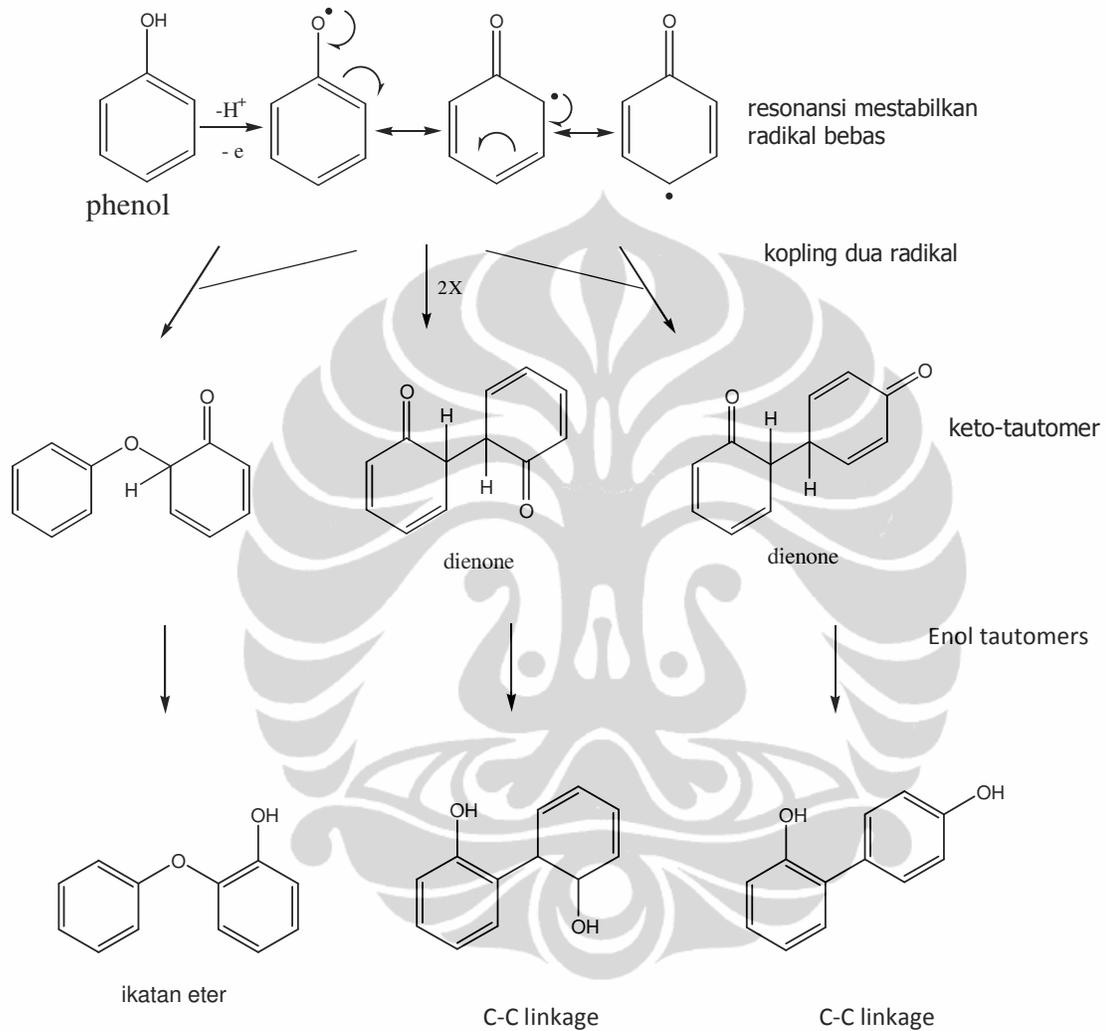
Titik leleh	: -10 ⁰ C
Titik didih	: 266-268 ⁰ C
Titik nyala	; 112 ⁰ C
Indeks bias (20 ⁰ C)	: 1,5410
Kelarutan	: Tidak larut dalam air, tetapi sangat larut dalam eter dan etanol.

Isoeugenol digunakan sebagai bahan utama pewangi pada parfum, pemberi rasa dan aroma, minyak essensial dan dalam bidang pengobatan (antiseptik dan analgesik lokal). Isoeugenol terdapat pada minyak cengkeh dan biji pala. Di dalam minyak cengkeh, senyawa ini bersama dengan metileugenol memiliki komposisi sekitar 5-15%, sisanya adalah eugenol. Selain diperoleh secara alami, isoeugenol juga dapat diperoleh melalui jalur sintesis. Di industri, sintesis isoeugenol dilakukan melalui reaksi reaksi isomerasi eugenol dengan menggunakan basa kuat seperti KOH dan NaOH.

2.4.3 Reaksi Kopling Oksidatif Fenol^{4,21,22}

Reaksi kopling oksidatif 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 H₂O₂, akan menghasilkan produk radikal, dimana radikal tersebut akan mengalami penggabungan dengan senyawa lain yang memiliki radikal. Oleh karena itu, enzim peroksidase sering kali digunakan sebagai katalis pada reaksi polimerisasi dan reaksi kopling pada senyawa fenolik.



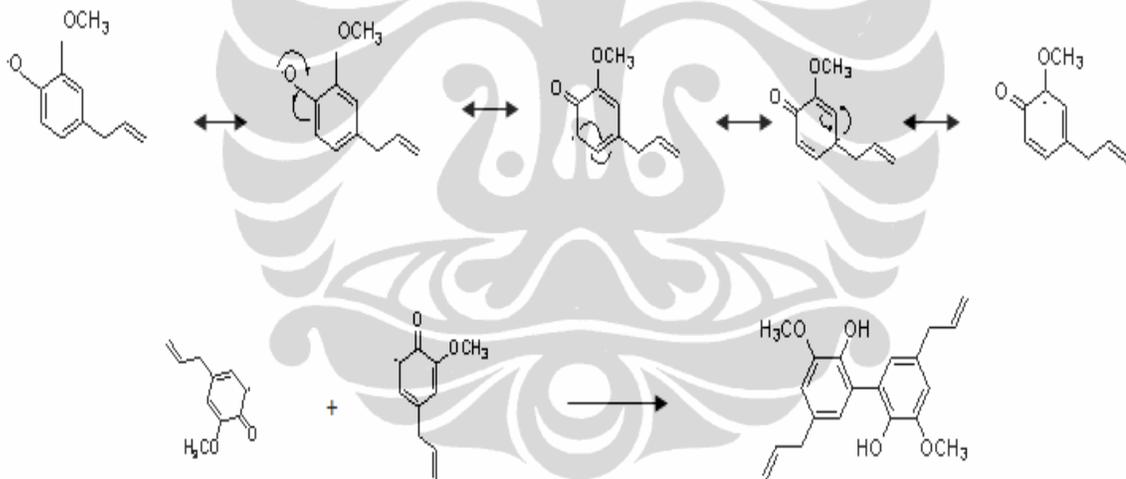
Gambar 2.6 Reaksi kopling oksidatif fenolik

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

2.4.4 Reaksi Kopling Oksidatif Eugenol.

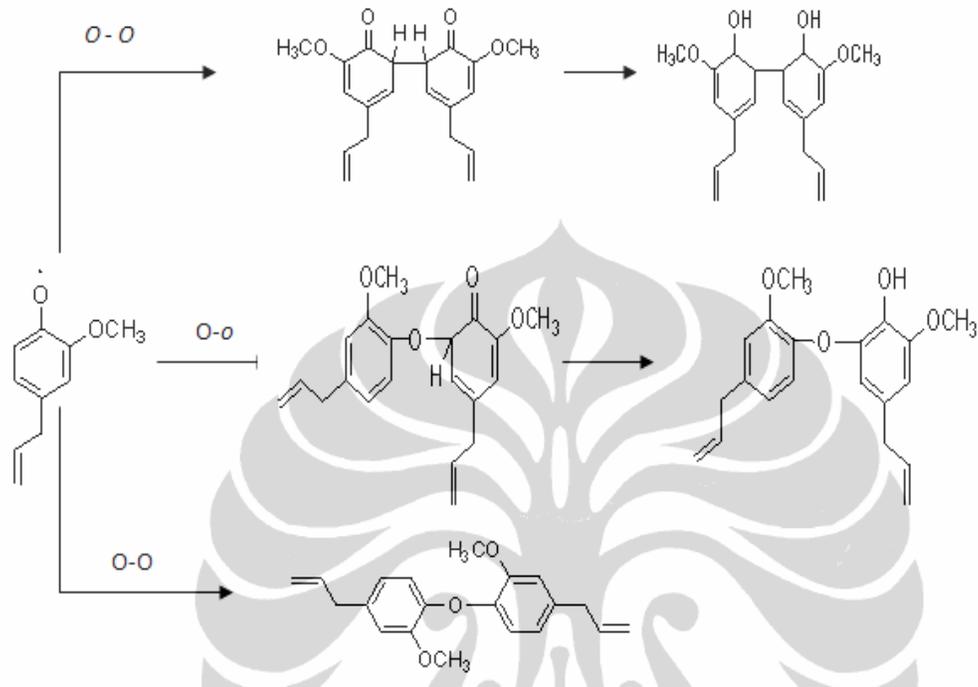
Senyawa eugenol dapat mengalami proses kopling oksidatif yang sama dengan senyawa fenolik. Pembentukan radikal eugenol dapat terjadi dengan bantuan enzim peroksidase yang merupakan enzim jenis oksidoreduktase, yang dapat mengoksidasi eugenol menjadi bentuk radikal. Kemudian radikal eugenol akan beresonansi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

Produk dimer yang banyak terbentuk merupakan kopling pada posisi *orto-orto*. Hal ini dikarenakan kestabilan radikalnya lebih tinggi dibandingkan pada posisi lainnya dan juga halangan steriknya yang lebih kecil.



Gambar 2.7 Resonansi radikal eugenol dan dimerisasi eugenol

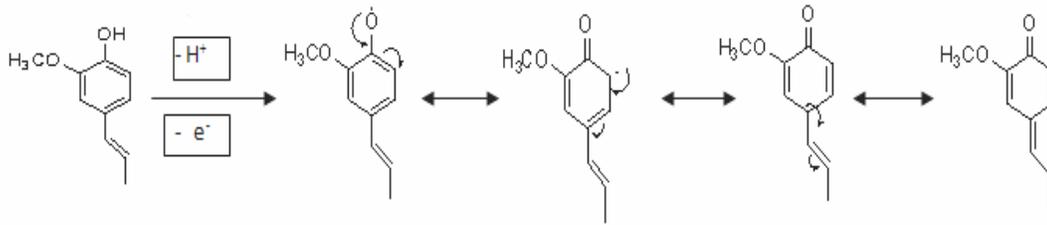
Dari kemungkinan resonansi radikal fenoksi eugenol tersebut, maka dapat diduga kemungkinan-kemungkinan kopling oksidatif yang dapat terbentuk antara sesama radikal fenoksi eugenol. Kemungkinan dimer yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 2.8 berikut ini :



Gambar 2.8 Reaksi kopling oksidatif eugenol

2.4.5 Reaksi Kopling Oksidatif Isoeugenol

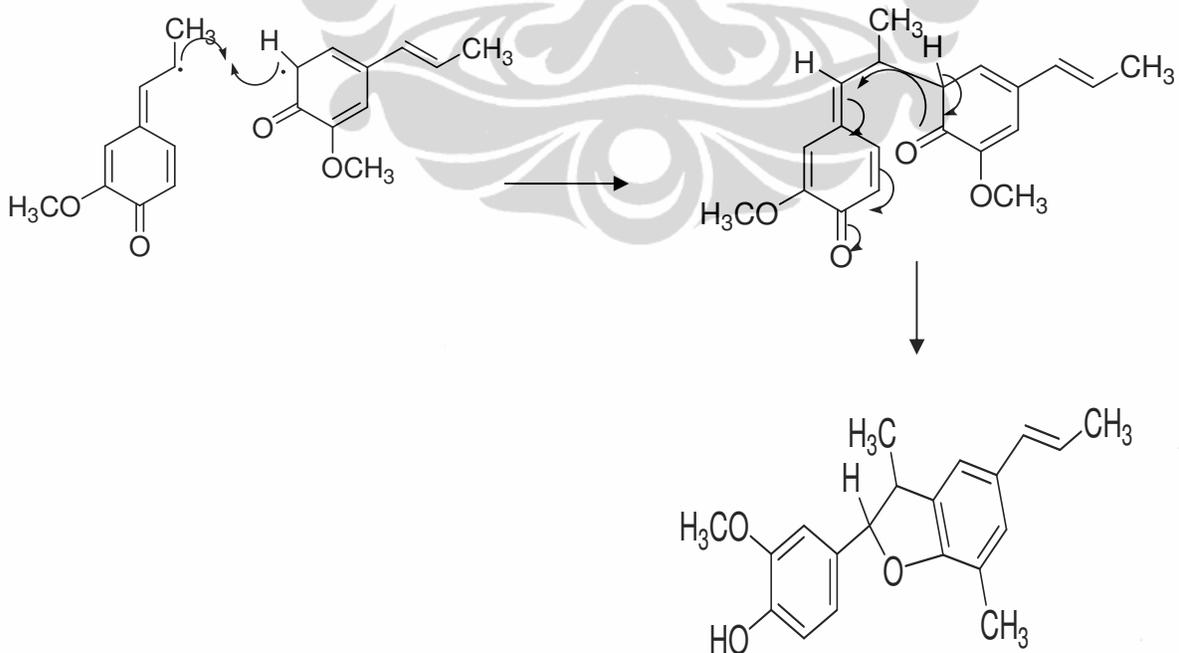
Reaksi yang dikatalisis oleh enzim peroksidase dengan adanya H_2O_2 akan menghasilkan produk radikal, dimana radikal tersebut akan mengalami penggabungan dengan senyawa lain yang memiliki radikal. Senyawa isoeugenol dapat mengalami proses kopling oksidatif yang sama dengan senyawa fenolik. Resonansi radikal fenoksi dari isoeugenol dapat dilihat pada Gambar 2.9



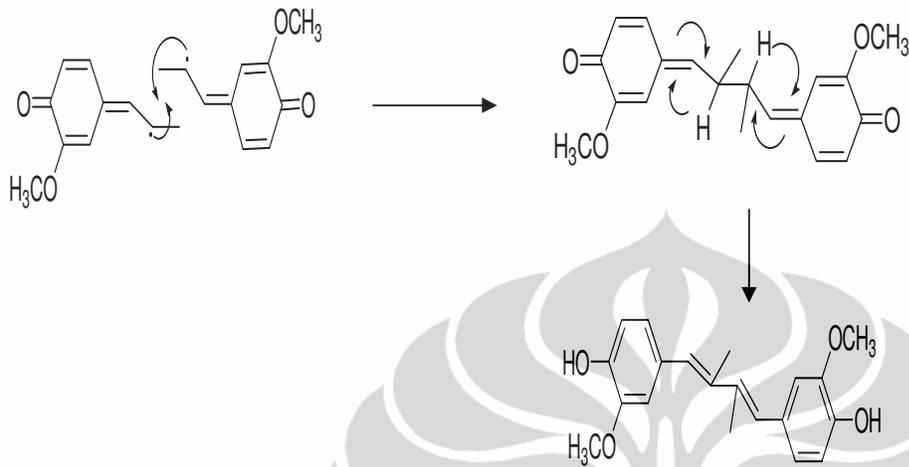
Gambar 2.9 Resonansi radikal isoeugenol

Dari kemampuan struktur resonansi radikal fenoksi isoeugenol tersebut, maka dapat diduga kemungkinan-kemungkinan kopling oksidatif yang dapat terbentuk antara sesama radikal fenoksi isoeugenol. Kemungkinan dimer yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 2.9

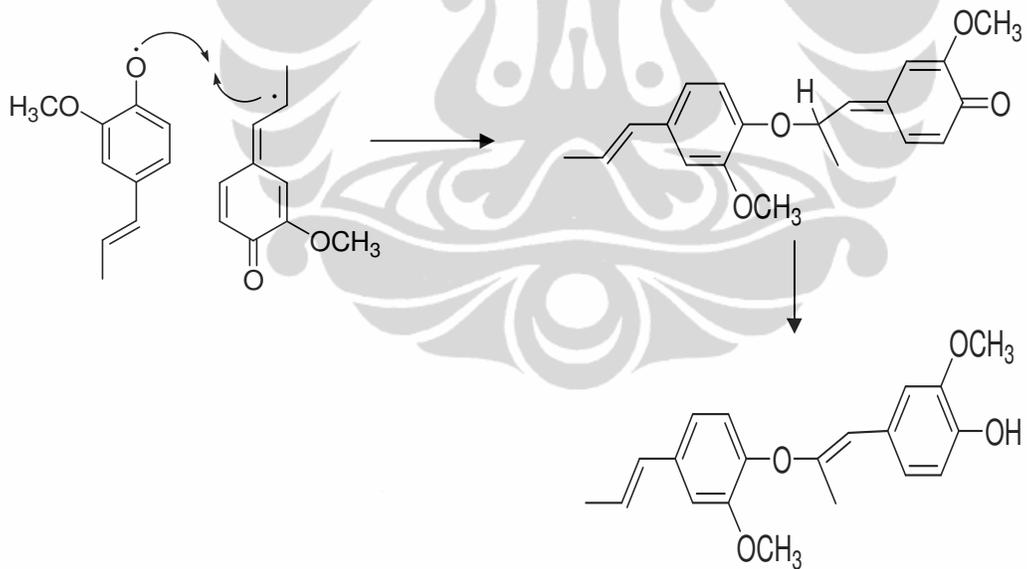
1. Penggabungan 8-5'



2. Penggabungan 8-8'



3. Penggabungan 8-O-4'



Gambar 2.10 Reaksi kopling oksidatif isoeugenol

2.5 Polarimeter^{2,7,8}

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 1 mL 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 $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$. Sudut putar spesifik untuk suatu senyawa (misalnya pada 25°C) dapat dihitung dari sudut putar diamati dengan menggunakan rumus :

$$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = \frac{\alpha}{LC}$$

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

α = Sudut putar teramati pada 25°C

L = panjang tabung dalam dm

C = konsentrasi larutan sampel dalam g/mL

2.6 Analisis Hasil Reaksi

Senyawa dimer yang terbentuk dari eugenol dan isoeugenol dapat diamati secara kualitatif dengan UV-Vis, FTIR dan GC-MS. Untuk mengetahui sudut putar $[\alpha]$ menggunakan polarimeter dan aktivitas antioksidannya dapat diukur dengan metode *radical Scavenger* dengan menggunakan larutan DPPH (1,1 difenil-2-pikril hidrazil).

2.6.1 Analisis Dengan UV-Vis^{23,24}

Spektrum UV dan cahaya tampak digunakan untuk identifikasi 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} .

2.6.2 Analisis Dengan FTIR^{23,25}

Spektrofotometer Fourier Transform Infrared (FTIR) pada dasarnya sama dengan Spektrofotometer Infra merah dispersi, yang membedakan hanyalah sistim optik yang digunakan untuk meneruskan cahaya sebelum mengenai sampel. Cermin yang digunakan pada FTIR ada dua yaitu cermin yang bergerak lurus dan cermin yang diam. Dengan demikian akan menimbulkan perbedaan jarak yang ditempuh menuju cermin bergerak dan menuju cermin diam. Perbedaan jarak tempuh ini disebut retardasi, dan hubungan antara intensitas radiasi IR dengan retardasi tersebut disebut interferogram.

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.

2.6.3 Analisis Dengan GC-MS^{23,26}

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 kekuatannya diabsorpsi atau dielusikan 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.

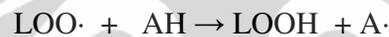
2.6.4 Antioksidan³⁰

Kerusakan senyawa-senyawa dalam rangka karbon, pada umumnya disebabkan oleh reaksi dengan oksigen di udara bebas. Senyawa kimia yang dapat menunda atau menghambat proses oksidasi ini disebut antioksidan.

Antioksidan adalah zat yang dengan konsentrasi rendah, dibandingkan dengan substrat yang mudah teroksidasi, secara signifikan dapat menunda atau menghambat oksidasi terhadap substrat tersebut.

Berdasarkan fungsinya, antioksidan dibagi dalam 2 kelompok yaitu :

1. Antioksidan primer, adalah antioksidan yang berfungsi memutuskan ikatan. Antioksidan primer, AH, kehadirannya dapat menunda atau menghambat tahap inisiasi dengan cara bereaksi dengan radikal lipid atau menghambat tahap propagasi dengan cara bereaksi dengan peroksil atau alkoksi radikal :



Radikal bebas antioksidan selanjutnya mengganggu reaksi propagasi rantai dengan membentuk senyawa antioksidan peroksida:



Antioksidan primer dapat berupa senyawa alami atau senyawa sintesis.

2. Antioksidan sekunder, adalah antioksidan yang berfungsi mencegah atau menahan laju reaksi oksidasi. Hal ini dapat dilakukan dengan beberapa cara termasuk membersihkan substrat atau oksigen singlet.

Berdasarkan sumbernya, antioksidan dibagi dalam dua kelompok yaitu :

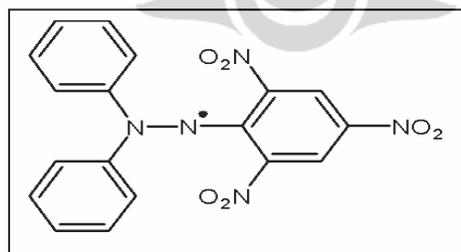
1. Antioksidan sintetis

Adalah antioksidan yang diperoleh melalui reaksi kimia sintesis yang dapat diproduksi secara besar-besaran. Antioksidan sintetis secara luas digunakan dalam industri makanan. Beberapa contoh antioksidan sintesis yang banyak dipakai adalah BHA (*butylated hydroxyanisole*) dan BHT (*butylated hydroxytoluene*).

2. Antioksidan alami

Adalah senyawa yang dihasilkan dari ekstraksi tanaman. Senyawa antioksidan alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol dan asam-asam organik polifungsional. Antioksidan alami telah dikenal lebih aman dari pada antioksidan sintetis.

Metode yang umum dipakai untuk menguji aktifitas antioksidan senyawa bahan alam adalah metode DPPH (1,1 diphenyl 2, picril hidrazil)³³.



Gambar 2.11 DPPH (1,1 diphenyl 2, picril hidrazil)

Metode DPPH assay berdasarkan reduksi warna larutan DPPH dalam metanol oleh penangkapan radikal bebas. Pengukuran penurunan absorbansi DPPH pada panjang gelombang maksimal (λ_{\max}) 515 nm, sebanding dengan

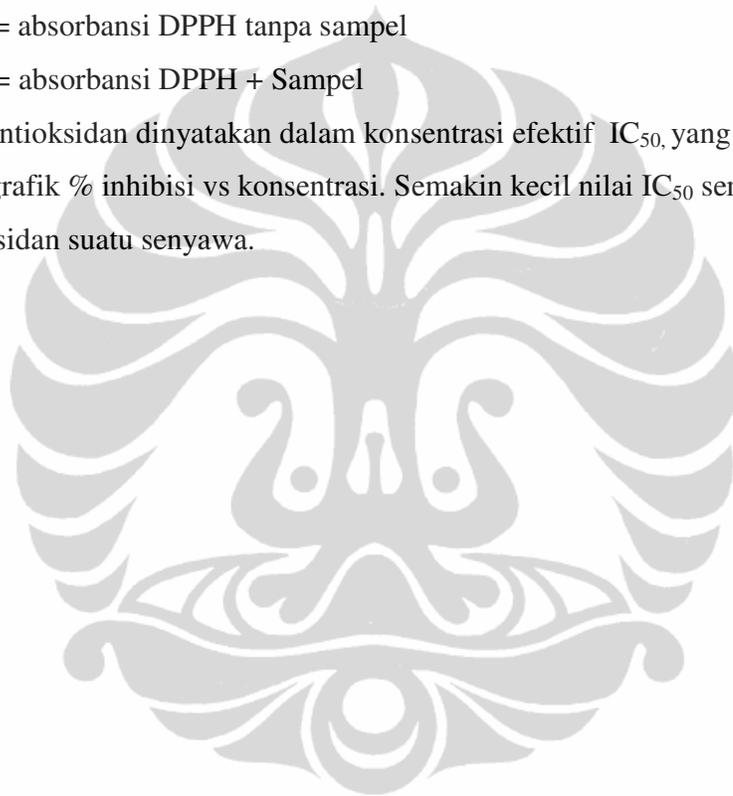
konsentrasi radikal bebas yang ditambahkan dalam larutan DPPH. Dari penurunan absorbansi itu dapat dihitung % inhibisi atau % RSA dengan rumus :

$$\% \text{ RSA} = [(A_0 - A_b) / A_0] \times 100\%$$

Ket : A_0 = absorbansi DPPH tanpa sampel

A_b = absorbansi DPPH + Sampel

Aktifitas antioksidan dinyatakan dalam konsentrasi efektif IC_{50} , yang dapat ditentukan dari grafik % inhibisi vs konsentrasi. Semakin kecil nilai IC_{50} semakin aktif sifat antioksidan suatu senyawa.



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- ✓ Neraca Analitik
- ✓ Gelas Ukur
- ✓ Batang Pengaduk
- ✓ Gelas Beaker
- ✓ Lemari Pendingin
- ✓ Magnetic Stirrer
- ✓ Tabung Reaksi
- ✓ Labu Erlenmeyer
- ✓ Termometer
- ✓ Pipet Tetes
- ✓ Labu Ukur
- ✓ Pipet Ukur
- ✓ Spatula
- ✓ Bulb
- ✓ GC-MS
- ✓ Cawan Porselen
- ✓ Labu Ekstraksi
- ✓ pH Meter
- ✓ Kertas Saring
- ✓ Plat KLT
- ✓ Polarimeter
- ✓ KLT Preparatif
- ✓ Spektrofotometer UV-Vis
- ✓ Spektrofotometer FTIR

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah :

- ✓ *n*- heksana
- ✓ Etil asetat
- ✓ Buffer Kalium-fosfat 0,2 M
pH 7
- ✓ Na₂SO₄ Anhidrat
- ✓ Aquades
- ✓ H₂O₂ 30%
- ✓ Horseradish Peroksidase
- ✓ Eugenol
- ✓ Isoeugenol

✓ Silika Gel 60 F254

✓ DPPH

✓ Etanol

✓ Metanol

3.2 Cara Kerja

3.2.1 Sintesis Senyawa Dimer dari Eugenol yang Dikatalis oleh Enzim

Peroksidase

Dalam labu bulat dengan 2 leher yang ukurannya 100 mL, dimasukkan enzim peroksidase (15 mg dalam 2 mL buffer kalium-phospat 0,2 M pH 7,0) dan 6,7 mmol H₂O₂ 30%, kemudian ditambahkan 13,4 mmol eugenol perlahan-lahan dengan menggunakan pipet tetes dan sambil dikontrol suhunya (tidak melebihi 37⁰C). Reaksi berlangsung melalui proses pengadukan dengan magnetic stirrer pada suhu ruang, sampai semua eugenol tercampur. Keberhasilan reaksi diamati secara kualitatif dengan terjadinya perubahan warna campuran reaksi. Kemudian campuran hasil reaksi diekstraksi dengan menggunakan pelarut etil asetat. Didapat fasa organik (etil asetat) dan fasa air. Fasa air dipisahkan, dan sisa air yang masih terdapat pada fasa organik dihilangkan dengan cara menambahkan Na₂SO₄ anhidrat. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan cara menguapkan pelarutnya. Untuk memeriksa produk reaksi yang terbentuk, selanjutnya dilakukan pengecekan dengan Kromatografi lapis Tipis (TLC), dimana sebagai pembanding digunakan larutan eugenol dalam etil asetat. Bila hasil samping (*by product*) tidak terlalu banyak, dapat langsung dilakukan rekristalisasi dengan dua pelarut yang berbeda kepolaranya. Tetapi jika hasil samping (*by product*) cukup banyak, maka perlu dilakukan pemurnian melalui kromatografi kolom. Selanjutnya kristal murni hasil reaksi, ditimbang.

3.2.2 Sintesis Senyawa Dimer dari Isoeugenol yang Dikatalis oleh Enzim

Peroksidase

Dalam labu bulat dengan 2 leher yang ukurannya 100 mL, dimasukkan enzim peroksidase (10 mg dalam 2 mL buffer kalium-phospat 0,2 M pH 7,0) dan 6,7 mmol H₂O₂ 30%, kemudian ditambahkan 13,4 mmol isoeugenol perlahan-lahan dengan menggunakan pipet tetes dan sambil dikontrol suhunya (tidak melebihi 37⁰C). Reaksi berlangsung dengan pengadukan selama 60 menit menggunakan magnetic stirrer pada suhu ruang. Keberhasilan reaksi diamati secara kualitatif dengan terjadinya perubahan warna campuran reaksi. Kemudian campuran hasil reaksi yang berupa endapan dan larutan, didiamkan selama 24 jam, dan didekantasi untuk memisahkan endapan. Endapan yang diperoleh dilarutkan dalam etil asetat. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan cara menguapkan pelarutnya. Untuk memeriksa produk reaksi yang terbentuk, selanjutnya dilakukan pengecekan dengan Kromatografi lapis tipis (TLC), dimana sebagai pembanding digunakan larutan isoeugenol dalam etil asetat. Bila hasil samping (*by product*) tidak terlalu banyak, dapat langsung dilakukan rekristalisasi dengan dua pelarut yang berbeda kepolaranya. Tetapi jika hasil samping (*by product*) cukup banyak, maka perlu dilakukan pemurnian melalui kromatografi kolom. Selanjutnya Kristal murni hasil reaksi, ditimbang.

3.2.3 Uji KLT dan Pemisahan Komponen Hasil Reaksi

Untuk mengetahui jumlah komponen yang terdapat di dalam senyawa hasil reaksi, maka dilakukan uji KLT. Uji KLT dilakukan dengan menggunakan pelarut *n*-heksana : etil asetat dengan perbandingan yang paling optimum. Untuk eugenol dan hasil reaksinya menggunakan perbandingan *n*-heksana : etil asetat = 4 : 1, sedangkan untuk isoeugenol dan hasil reaksinya di gunakan perbandingan *n*-heksana : etil asetat = 5 : 1 . Hasil uji KLT digunakan untuk mengidentifikasi secara kualitatif berapa banyak komponen yang terdapat didalam senyawa hasil reaksi. Selanjutnya dilakukan pemisahan komponen dengan KLT preparatif dan, kemudian hasilnya

dianalisis lebih lanjut menggunakan instrumentasi spektrofotometer UV-Vis, kromatografi gas dan spektrometer massa (GC-MS) dan sudut putar optisnya (α).

3.2.4 Pengukuran Spektrofotometer UV-Visibel

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

3.2.5 Pengukuran Spektrofotometer FTIR

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

3.2.6 Pengukuran Kromatografi Gas dan Spektrometer Massa (GC-MS)

Kromatografi gas menggunakan instrument dari Agilent seri 6890 dan spectrometer massa seri 5973. Metode yang digunakan pada pengukuran kromatografi gas dan spectrometer masa (GC-MS) adalah metode 6890, menggunakan kolom kapiler model Agilent 19091J-433 (HP-5, 0,25 mm * 30 m * 0,25 μm), fasa gerak adalah gas helium dan fasa diam adalah campuran fenil dan polimer dimetilsiloksana 5 : 95. Model aliran 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 spectrometer massa. Hasil kromatografi dan spectrometer massa dikeluarkan dalam bentuk puncak senyawa (GC) dan dilanjutkan dengan bentuk – bentuk fragmentasi senyawa tersebut (MS).

3.2.7 Penentuan Sudut putar [α] Senyawa Hasil Reaksi Dengan Polarimeter.

Sebanyak 0,04 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, [α].

3.2.8 Uji aktivitas antioksidan metode radical scavenger dengan menggunakan larutan DPPH dalam metanol

Disiapkan sampel yang masing-masing terdiri dari larutan eugenol, isoeugenol dan senyawa hasil reaksi dengan konsentrasi 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm dan 0,1 ppm dalam methanol, dan juga di siapkan larutan larutan DPPH 1.10^{-3} M dalam methanol. Pertama kali diukur absorbansi larutan DPPH, sebagai kontrol (A_0) dengan menggunakan spectrometer UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm. Pengukuran absorbansi dilakukan setiap 5 menit selama 30 menit.

Sebanyak 2 mL larutan sampel 100 ppm ditambahkan 2 mL larutan DPPH kemudian diaduk segera hingga bereaksi sempurna, dan diukur absorbansinya (A_b) setiap 5 menit, sampai dengan menit ke-30. Pengukuran absorbansi suatu sampel dengan DPPH pada konsentrasi yang sama, dilakukan dua kali.

Pengukuran diulangi dengan menggunakan larutan sampel dengan konsentrasi berbeda. Aktivitas antioksidan diukur sebagai penurunan serapan campuran larutan DPPH dan sampel, akibat adanya aktivitas antioksidan dari sampel. Aktifitas antioksidan dapat dihitung berdasarkan % inhibisi dengan rumus

$$\% \text{ RSA} = [(A_0 - A_b) / A_0] \times 100\%$$

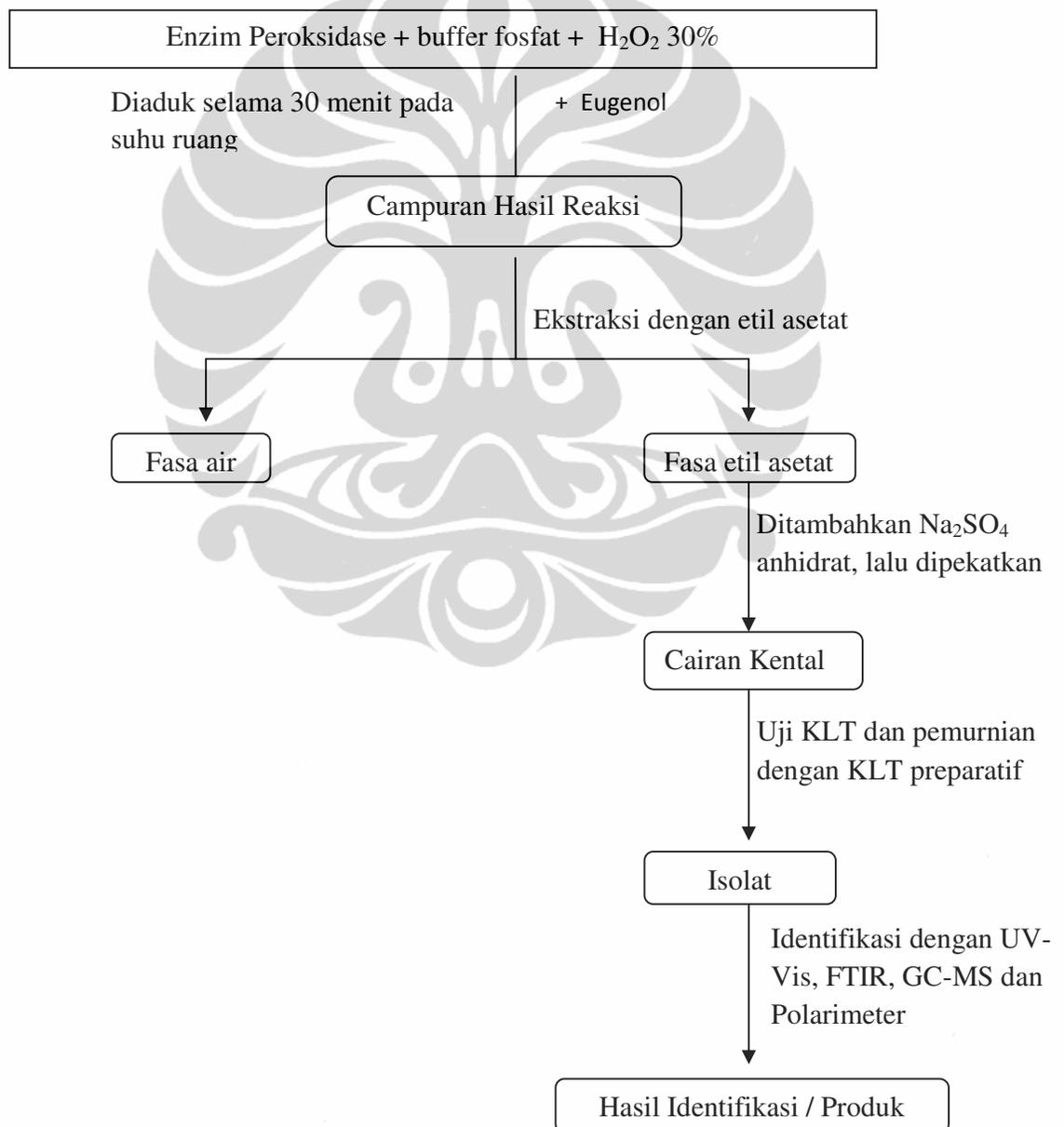
Berdasarkan % inhibisi yang didapat dari perhitungan dapat ditentukan nilai IC_{50} dari sampel dengan menggunakan grafik % inhibisi vs konsentrasi.

3.3 Bagan Kerja

3.3.1 Sintesis Senyawa Dimer dari Eugenol yang Dikatalis oleh Enzim

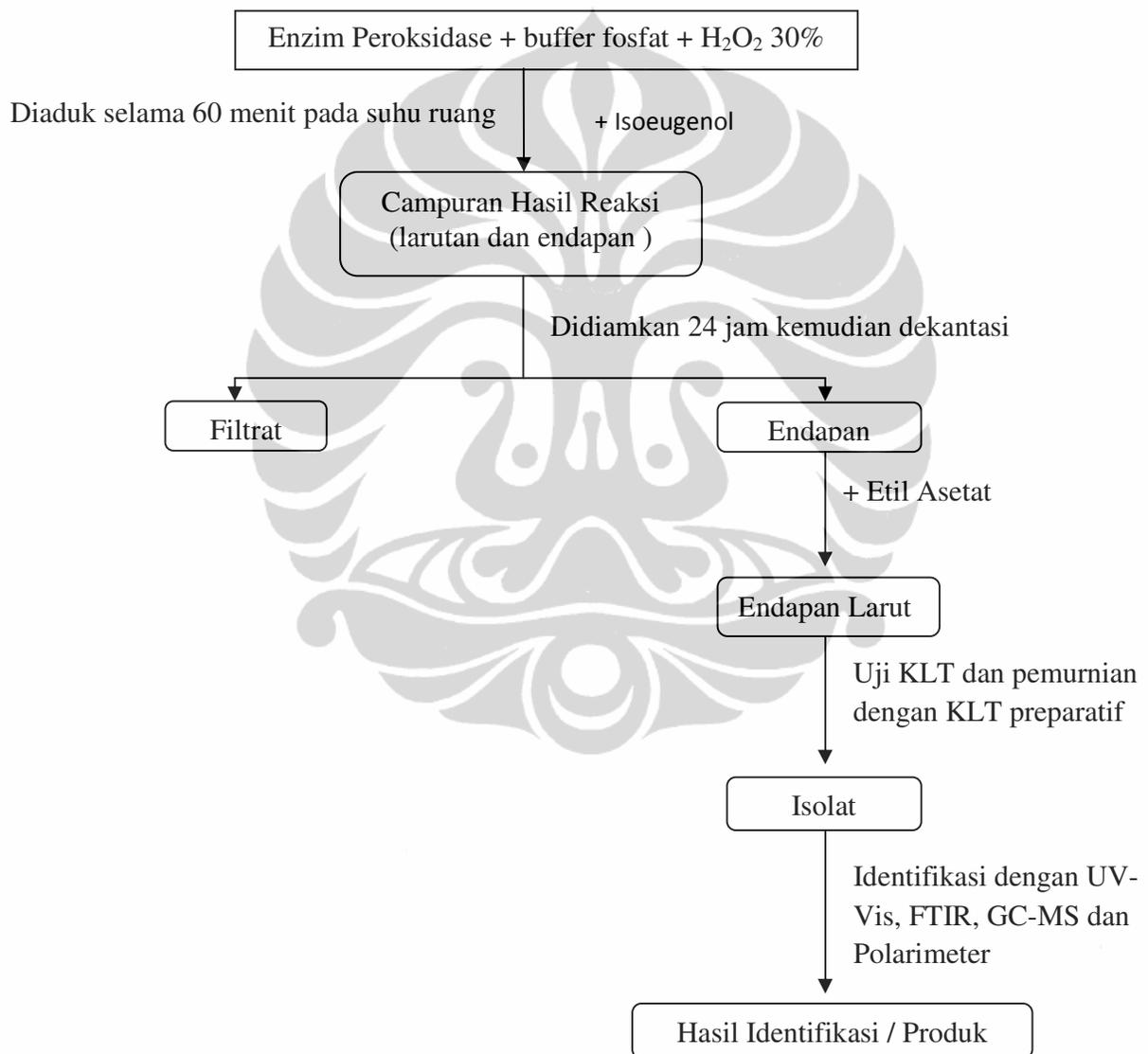
Peroksidase.

Bagan kerja dari sintesis senyawa atropisomer dari bahan dasar eugenol adalah sebagai berikut :



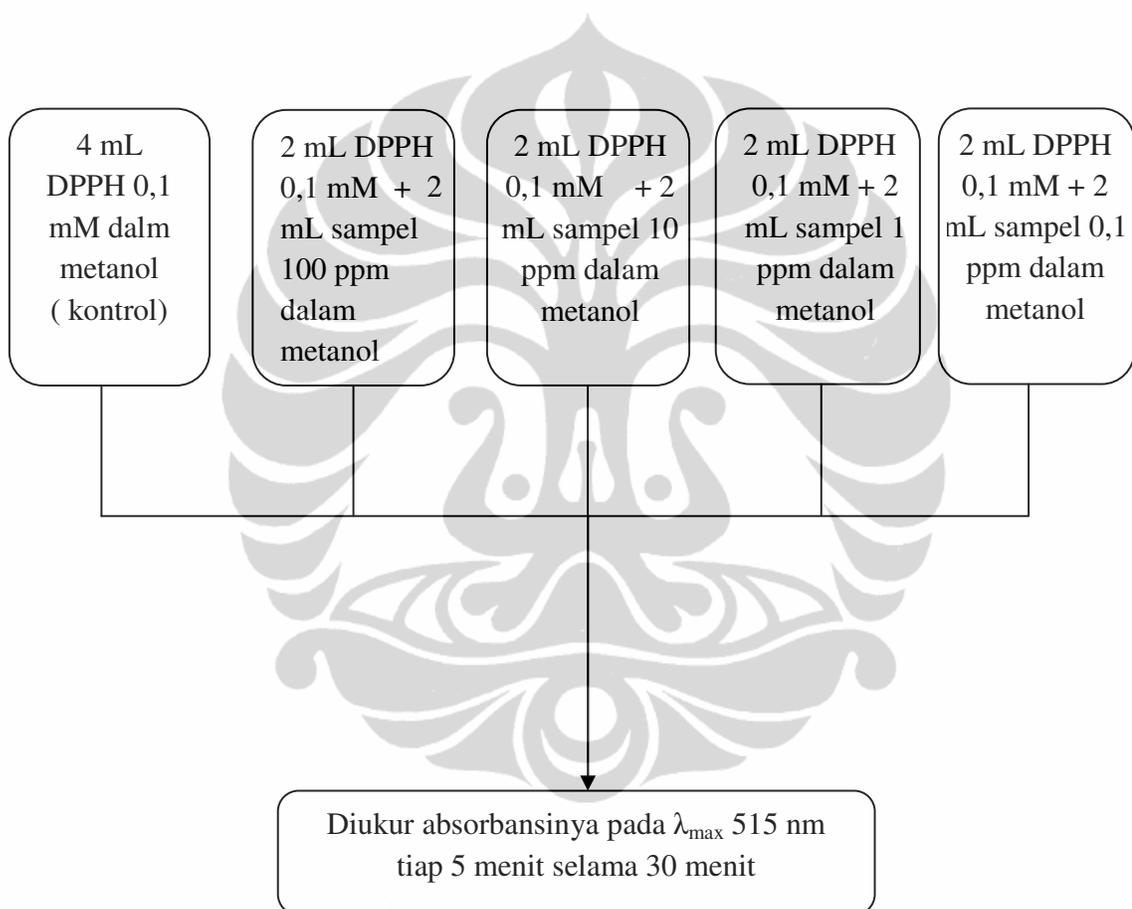
3.3.2 Sintesis Senyawa Dimer dari Isoeugenol yang Dikatalis oleh Enzim Peroksidase

Bagan kerja dari sintesis senyawa dimer dari isoeugenol adalah sebagai berikut :



3.3.3 Uji Aktivitas Antioksidan Metode Radical Scavenger dengan Larutan DPPH dalam Metanol

Bagan kerja dari uji aktifitas antioksidan dengan menggunakan metode radical scavenger adalah sebagai berikut :



Bab 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Sintesis senyawa dimer dari eugenol yang dikatalis oleh enzim peroksida

Senyawa eugenol yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari minyak atsiri cengkeh yang berwujud cair dan tidak berwarna. Eugenol adalah senyawa fenolik yang mampu menyumbangkan proton dari gugus fenolnya jika direaksikan dengan larutan H_2O_2 , yang bertindak sebagai akseptor proton. Enzim peroksidase digunakan dalam penelitian ini berfungsi sebagai biokatalisator. Bentuk enzimnya padatan dan berasal dari tumbuhan Horseradish dengan aktivitas spesifik sebesar 100 U/mg. Setelah enzim ini dilarutkan dalam larutan buffer fosfat 2 M dengan pH = 7, kemudian direaksikan terlebih dahulu dengan larutan H_2O_2 30 % pada suhu kamar, dan pada akhirnya ditambahkan eugenol secara perlahan sambil dikontrol kenaikan suhu yang terjadi.

Eugenol dan H_2O_2 dengan perbandingan mol 2 : 1 direaksikan selama 30 menit, terjadi perubahan warna dengan menghasilkan larutan kuning dan terjadi kenaikan suhu sekitar $5^{\circ}C$. Untuk menjaga agar enzim tidak rusak karena kenaikan suhu, reaksi dilakukan dalam pendingin air. Larutan kuning yang terbentuk ditambahkan etil asetat dalam corong pisah untuk mengekstraksi hasil reaksi yang larut didalam etil asetat tersebut. Didapat dua fasa, fasa air dibagian bawah dan fasa etil asetat dibagian atas. Fasa etil asetat diuapkan sehingga terbentuk cairan kental seperti minyak berwarna kuning lebih tua dengan massa 1,9050 g.



(a)

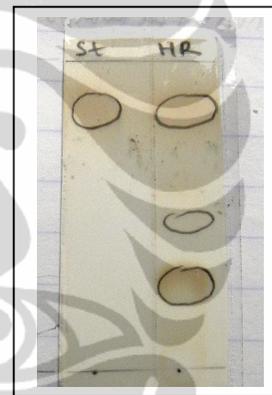


(b)

Gambar 4.1 Hasil reaksi kopling oksidatif eugenol (a) dan hasil ekstraksi dengan etil asetat (b)



a



b

Gambar 4.2 Hasil pemekatan produk reaksi (a) dan hasil uji KLT (b)

Untuk mengetahui jumlah senyawa yang terdapat pada hasil reaksi eugenol, maka dilakukan uji KLT. Menggunakan lembar plat silikagel yang berukuran $2 \times 8 \text{ cm}^2$ dan sebagai larutan pengembang digunakan campuran *n*-heksana : etil asetat = 4:1. Dari pengujian tersebut terdapat 3 spot yang terdiri dari: spot 1, $R_f=0,91$ (spot ini sama dengan spot eugenol, berarti menunjukkan bahwa masih ada eugenol yang belum bereaksi), spot 2, R_f sama dengan 0,6 (berukuran lebih kecil dibandingkan spot ketiga, berarti menunjukkan hasil reaksi samping, *by product*). Spot ketiga $R_f=0.45$ (berukuran lebih besar dibandingkan spot kedua, berarti menunjukkan hasil reaksi utama, *main product*).

Setelah diketahui hasil reaksi yang akan diambil dilakukan KLT Preparative menggunakan plat KLT berukuran 20 x 10 cm². Menggunakan pelarut *n*-heksana : etil asetat= 4:1. Hasil reaksi pada plat KLT kemudian dikerok, dilarutkan dalam etil asetat, lalu disaring, kemudian didapat larutan berwarna kekuningan. Setelah larutan diuapkan dihasilkan kristal berwarna kuning sebesar 0,0306 g (1,4%) dan mempunyai rata-rata titik leleh 105,3 °C. Untuk mengidentifikasi struktur molekul dari senyawa yang diperoleh dilakukan pengukuran dengan menggunakan instrument UV-Vis, FTIR, GC-MS dan Polarimeter.

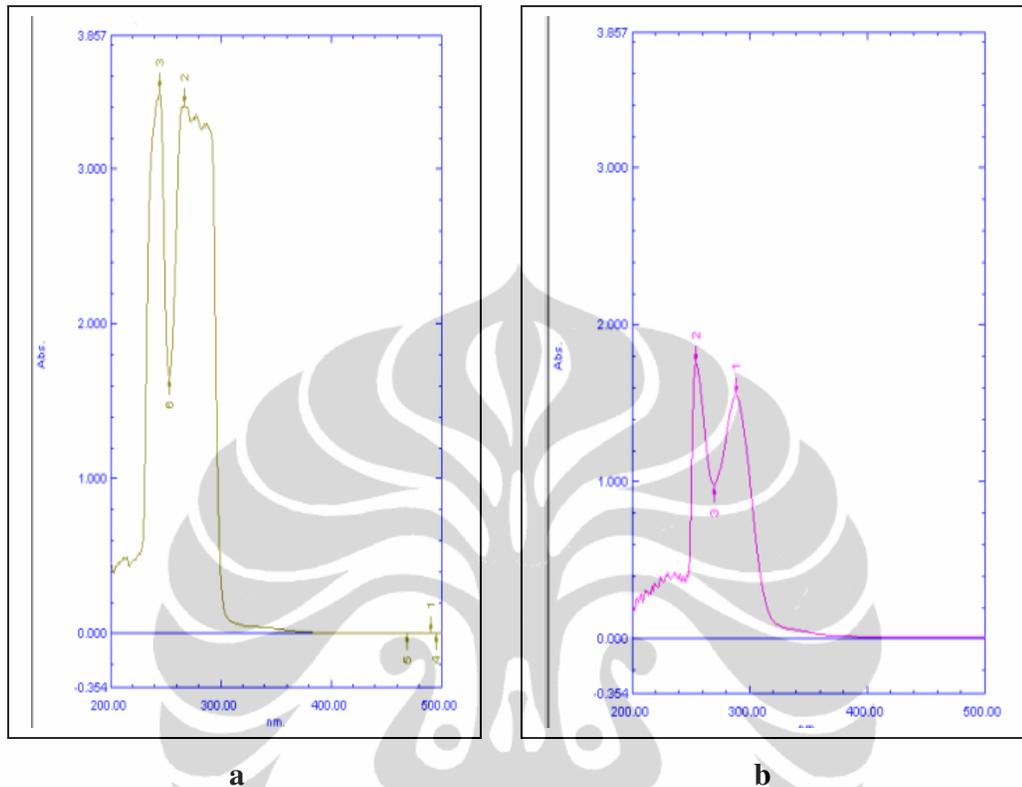
4.1.1 Analisis Senyawa Dimer dari Hasil Reaksi Eugenol

4.1.1.1 Analisis Dengan UV-Vis

Spektrum UV dan cahaya tampak digunakan untuk identifikasi 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} .

Tabel 4.1 Perbandingan λ_{\max} pada spektrum UV-Vis Eugenol dan Hasil Reaksi

Senyawa	λ_{\max} (nm)	
	Puncak 1	Puncak 2
Eugenol	245	267
Hasil Reaksi	255	285



Gambar 4.3 Spektrum UV-VIS Eugenol(a) dan senyawa hasil reaksi(b)

Eugenol menghasilkan dua puncak karena adanya ikatan rangkap terisolasi, satu ikatan di luar cincin benzen dan ikatan rangkap di dalam benzene. Hasil reaksi menunjukkan spektrum yang mirip dengan eugenol hal ini menunjukkan struktur dasar eugenol sama dengan struktur dasar hasil reaksi. Adanya pergeseran panjang gelombang hasil reaksi dari bahan dasar eugenol membuktikan telah terbentuk senyawa baru yang mengandung ikatan rangkap terkonjugasi lebih banyak. Pergeseran serapan maksimum ke panjang gelombang yang lebih besar disebut efek batokromik.

4.1.1.2 Analisis Dengan FTIR

Spektrofotometer Fourier Transform Infrared (FTIR) dapat mengidentifikasi gugus fungsi dalam sebuah molekul dengan menghasilkan spektrum serapan sinar infra merah. FTIR meneruskan scan spektrum infra merah dari suatu sampel yang

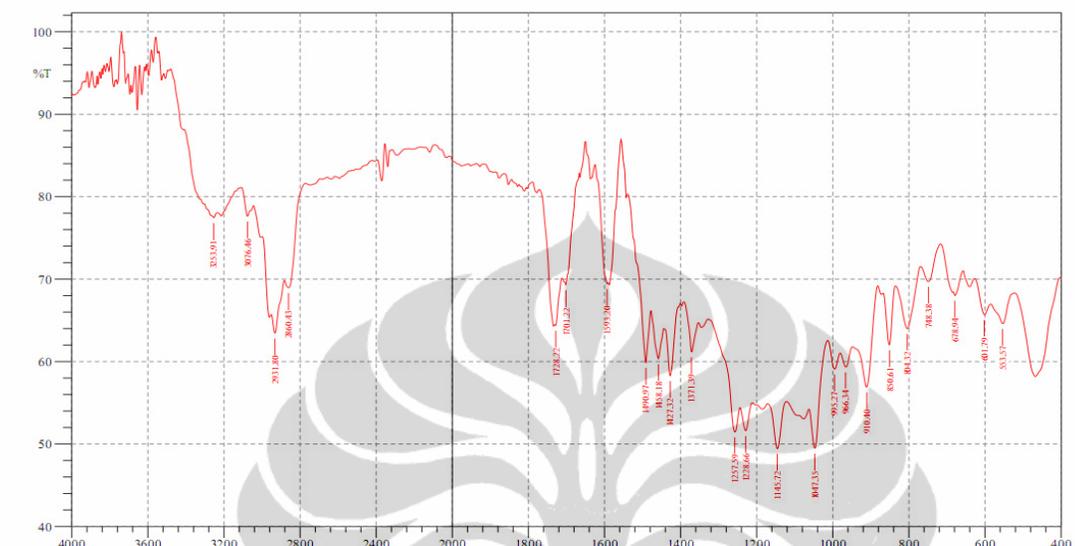
menyerap sinar infra merah. Radiasi infra merah dalam rentang bilangan gelombang (ν) $10.000 - 100 \text{ cm}^{-1}$ diserap dan dikonversikan oleh molekul organik menjadi vibrasi molekul. Frekuensi atau panjang gelombang dari serapan tergantung pada masa atom relatif, konstanta gaya ikatan dan geometri atom.

Berdasarkan data spektrum infra merah dari senyawa atropisomer hasil sintesis dari bahan dasar eugenol terdapat puncak –puncak :

Tabel 4.2 Data spektrum FTIR senyawa dimer dari eugenol

Puncak (cm^{-1})	Keterangan
3253.91	Gugus O-H
3076.46	Uluran C – H aromatik
2931.80 – 2860.43	Regangan C – H Metilena
1275.95	Uluran C-O-C tak simetrik
1047,35	Uluran C-O-C simetrik
1427 – 1371.35	Getaran tekuk O-H pada bidang

Dari data diatas, dapat di ketahui bahwa senyawa dimer hasil sintesis dari bahan dasar eugenol masih mempunyai gugus fungsi OH, adanya ikatan C-O-C dan adanya gugus aromatik.



Gambar 4.4 Spektrum FTIR senyawa dimer dari eugenol.

4.1.1.3 Analisis dengan Polarimeter

Polarimeter adalah instrument yang digunakan untuk mengukur sudut putar optis dari senyawa atropisomer. 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 (-).

Bedasarkan hasil pengukuran dengan Polarimeter, senyawa hasil reaksi eugenol dengan konsentrasi 0,04 g/ 25 mL etil asetat, memutar bidang kearah kanan sebesar, $\alpha = +0,3$ dan sesuai perhitungan pada Lampiran 5, maka diperoleh sudut putar spesifik dari senyawa hasil reaksi yaitu: $93,75^0$

$[\alpha]_D^{25} = + 93,75^0$ (c, 0.0016, $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$). Dari hasil ini, maka dapat dikatakan senyawa hasil reaksi dapat memutar bidang polarisasi cahaya ke kanan, karena memiliki tanda (+).

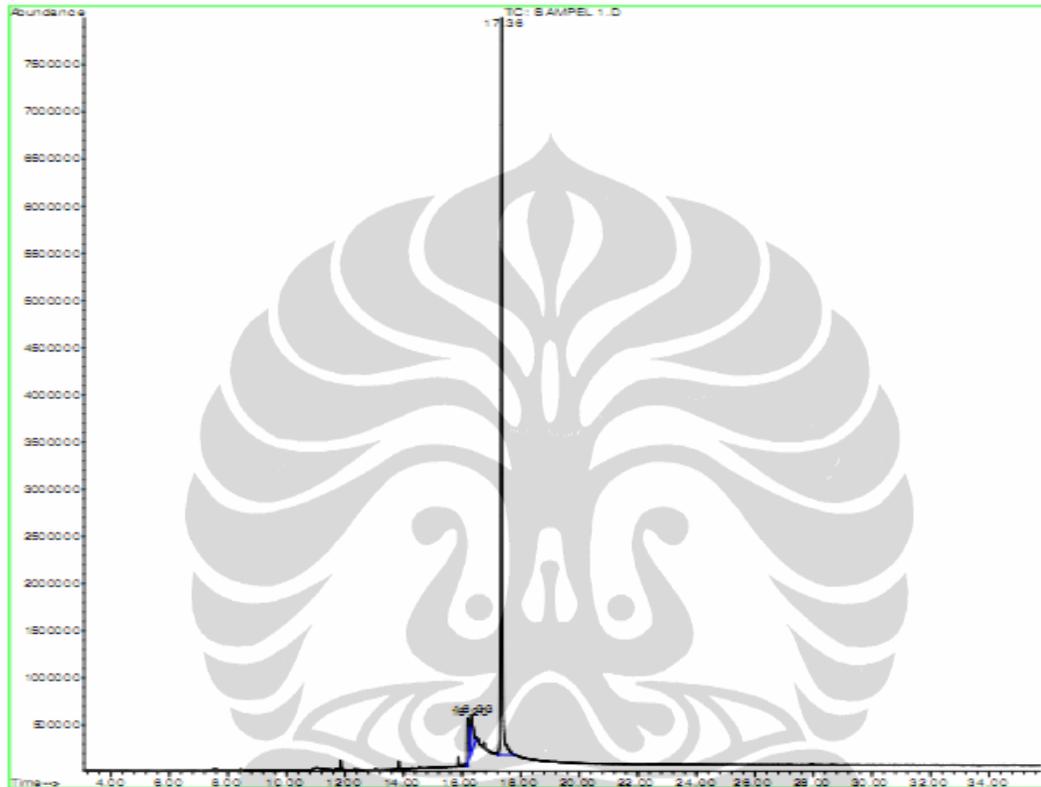
4.1.1.4 Analisis dengan GC-MS

GC-MS adalah metode yang menggabungkan kromatografi gas (pemisahan senyawa) dan spektrometer massa untuk mengidentifikasi zat-zat yang terdapat dalam sampel dan menentukan berat molekulnya serta pola fragmentasinya, untuk mengetahui struktur molekul suatu senyawa. Dalam penelitian ini, digunakan instrument Agilent 6890 GC Shimadzu versi N 0505 yang terdapat pada Puslabfor POLRI. Saat sampel diinjeksikan dalam injector GC, kemudian sampel diubah menjadi gas pada suhu tinggi. Gas yang terbentuk dibawa oleh fasa gerak ,gas Nitrogen, melewati kolom kapiler model Agilent 19091J-433 (HP-5,0,25mm*30m*0,25 μ m) yang berisi fasa diam. Zat yang memiliki afinitas lebih rendah terhadap fasa diamnya akan keluar terlebih dahulu sehingga waktu retensinya rendah. Sebaliknya zat yang memiliki afinitas lebih besar akan keluar lebih lama sehingga waktu retensinya tinggi.

Setelah zat terpisah dalam GC, dalam bentuk aliran gas akan masuk ke dalam separator jet, yang akan mempercepat momentum molekul analit yang berat, sedangkan atom nitrogen yang ringan sebagai fasa mobil, akan dibelokkan oleh pompa vakum. Molekul analit akan masuk dan ditembak oleh sumber ion dalam spectrometer massa, sehingga terbentuk spektrum massa berbagai puncak dalam bentuk fragmen-fragmen. Setelah pemisahan selesai, rekonstruksi spektrum masa untuk tiap puncak dapat ditampilkan pada komputer.

Senyawa hasil sintesis yang terbentuk dianalisis dengan GC ,menghasilkan kromatogram berikut ini :

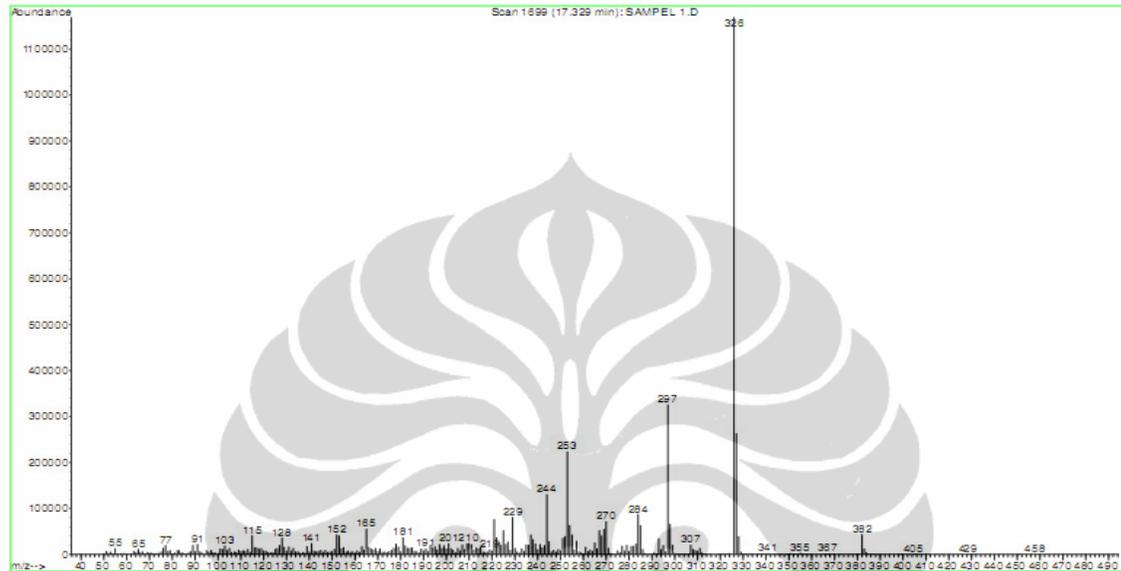
File : C:\MSDCHEM\1\data\SAMPEL 1.D
Operator : DEWI ELVI
Acquired : 21 Apr 2010 9:31 using AcqMethod UMUM.M
Instrument : GCMS
Sample Name : REAKSI SENYAWA EUGENOL
Misc Info : 22 UI
Vial Number: 1



Gambar 4.5 Kromatogram GC senyawa dimer dari eugenol

Berdasarkan hasil GC di atas diperoleh puncak tertinggi pada waktu retensi 17,36 menit dan luas area 84,68%. Puncak tertinggi pada kromatogram GC dianalisis lebih lanjut dengan MS dan diperoleh spektrum berikut ini:

File : C:\MSDCHEM\1\data\SAMPEL 1.D
 Operator : DEWI ELVI
 Acquired : 21 Apr 2010 9:31 using AcqMethod UNUM.M
 Instrument : GCMS
 Sample Name: REAKSI SENYAWA EUGENOL
 Misc Info : S2 UI
 Vial Number: 1



Gambar 4.6 Spektrum massa senyawa dimer dari eugenol

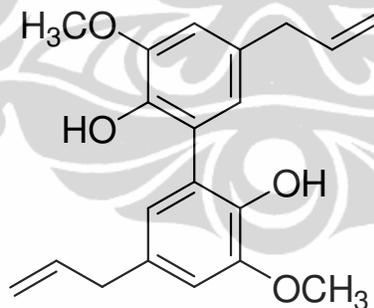
Data m/z terbesar adalah 326 yang menunjukkan terbentuk kopling dari 2 molekul eugenol yang masing-masing kehilangan 1 atom H, dengan perhitungan : $2 \times (\text{Mr Eugenol}) - 2\text{H} = (2 \times 164) - 2 = 326$

Kromatogram massa yang dihasilkan dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Miyazawa dan Hisama²⁶ tentang senyawa dihidrodieugenol atau dimer eugenol pada posisi (*orto – orto*). Ternyata terdapat persamaan antara nilai m/z dari senyawa atropisomer yang terbentuk dengan m/z senyawa hasil penelitian Miyazawa dan Hisama, seperti ditunjukkan pada tabel berikut ini :

Tabel 4.3 Perbandingan antara spektrum massa hasil sintesis senyawa dimer dari eugenol dengan hasil penelitian Miyazawa dan Hisama(2003)²⁶

Spektrum massa senyawa hasil reaksi (m/z)	Spektrum massa penelitian Miyazawa dan Hisama (m/z)
326	326
297	297
284	284
253	253
244	244
229	229
221	221

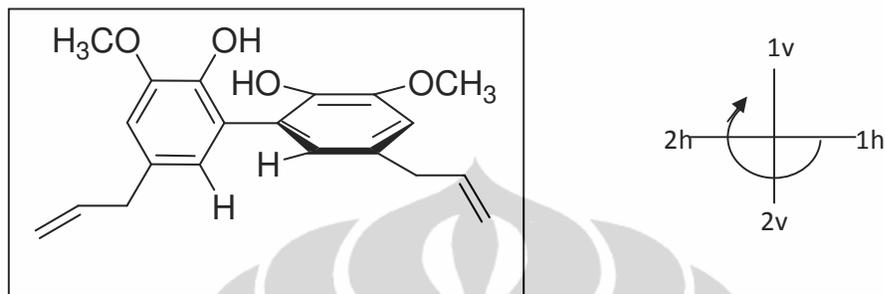
Dalam penelitian Miyazawa dan Hisama, senyawa tersebut diidentifikasi sebagai 1,1'-di-2-propenil-4,4'-dihidroksi-3,3'-dimetoksi-5,5'-bifenil.



Gambar 4.7 Struktur dehidrodieugenol²⁶

Berdasarkan struktur molekulnya, pada senyawa dehidrodieugenol tidak terdapat atom C khiral, tetapi berdasarkan pengukuran sudut putar senyawa dengan polarimeter diketahui senyawa yang terbentuk dapat memutar bidang polarisasi cahaya kearah kanan dan memiliki tanda (+). Hal ini berarti senyawa dihidrodieugenol adalah senyawa atropisomer dimana sifat optis aktifnya dikarenakan adanya bidang khiral, dengan struktur seperti bifenil⁷. Maka dapat disimpulkan

konfigurasi absolut senyawa tersebut dapat ditulis sebagai (R_a)- (+) –dehidro dieugenol, dengan struktur molekul sebagai berikut :



Gambar 4.8 Struktur (R_a)-(+)-dehidrodieugenol dan cara penentuannya

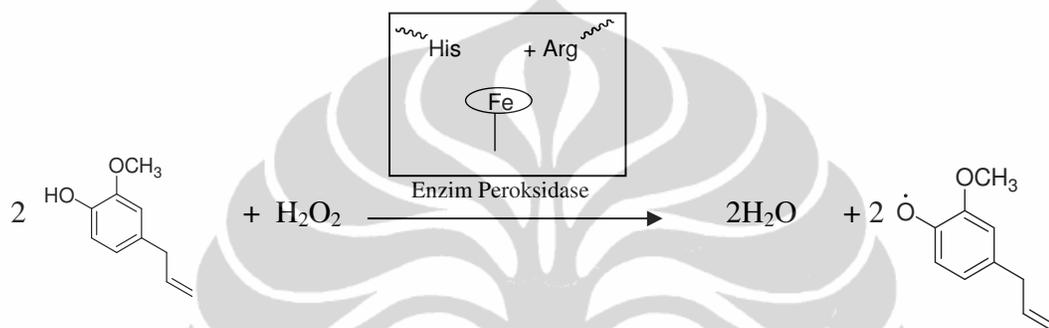
Pada bidang horizontal sebagai perioritas pertama adalah gugus metoksi dan perioritas kedua adalah propena. Pada bidang vertikal sebagai prioritas pertama adalah gugus hidroksi sedangkan prioritas kedua adalah atom hidrogen. Jika ditarik garis dari gugus perioritas pertama pada posisi horizontal menuju posisi perioritas pertama pada posisi vertikal, terlihat searah perputaran jarum jam (R_a).

4.1.2 Mekanisme Reaksi Pembentukan Senyawa Dehidrodieugenol dari Eugenol.

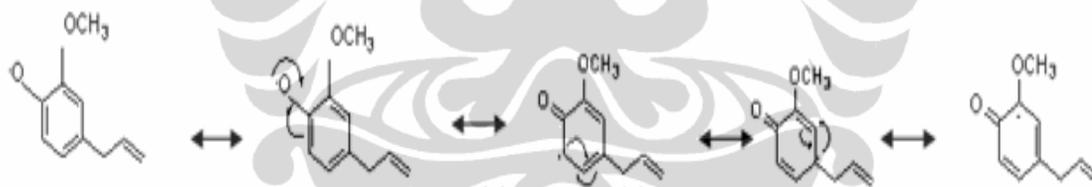
Pembentukan senyawa atropisomer yang berasal dari bahan dasar eugenol berdasarkan reaksi kopling oksidatif dengan mekanisme melalui zat antara radikal bebas , eugenol bertindak sebagai donor proton, dan H₂O₂ sebagai akseptor proton serta sebagai biokatalis digunakan enzim peroksidase. Enzim peroksidase adalah salah satu enzim yang dapat mengkatalisis reaksi oksidasi-reduksi, dan termasuk dalam kelas oksidoreduktase. Peroksidase mereduksi hidrogen peroksida menjadi air dan sekaligus menghasilkan radikal bebas yang akan bereaksi dengan eugenol. Gugus fenolik dari eugenol akan teroksidasi sehingga berubah menjadi radikal fenolik. Selanjutnya gugus radikal fenolik akan melakukan reaksi kopling dengan gugus radikal fenolik dari molekul eugenol yang lain.

Senyawa atropisomer yang terbentuk pada reaksi ini merupakan reaksi kopling antara posisi *orto-orto* karena mempunyai halangan sterik paling kecil, dibandingkan posisi yang lainnya. Di bawah ini diberikan mekanisme reaksi pembentukan senyawa atropisomer dihidrodieugenol.

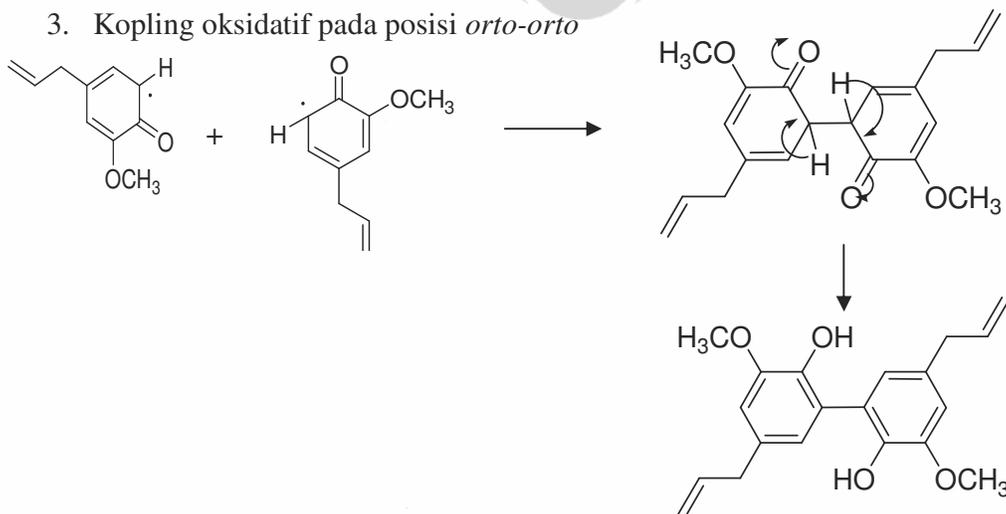
1. Pembentukan radikal fenoksi



2. Resonansi radikal fenoksi



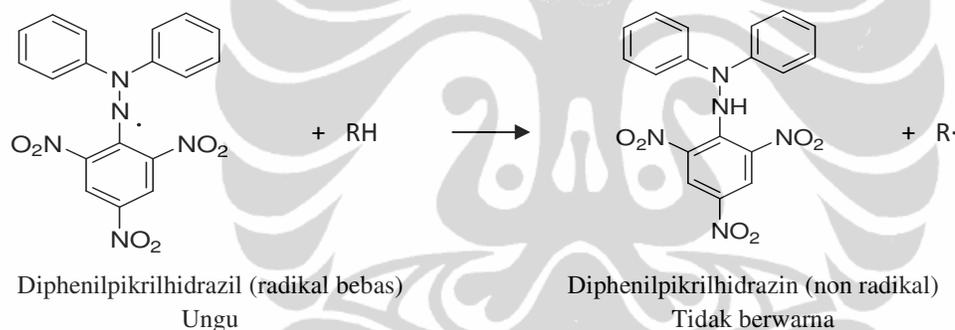
3. Kopling oksidatif pada posisi *orto-orto*



Gambar 4.9 Mekanisme reaksi pembentukan senyawa atropisomer dari eugenol

4.1.3 Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Eugenol dan Senyawa Hasil Sintesis

Senyawa eugenol yang mengandung gugus fenolik telah dikenal bersifat sebagai antioksidan, sedangkan senyawa atropisomer yang disintesis dari bahan dasar eugenol pun masih mempunyai gugus fenolik. Karena itu, pada penelitian ini ingin dibandingkan aktivitas antioksidan antara substrat dengan senyawa hasil sintesis. Pengujian antioksidan yang dilakukan menggunakan metode Radical Scavenger dengan menggunakan larutan DPPH 0,1 mM dalam metanol. Larutan DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) bertindak sebagai radikal bebas yang akan menerima dari zat penyedia hidrogen atau zat antioksidan. Reaksi yang terjadi antara antioksidan dengan DPPH sebagai berikut :



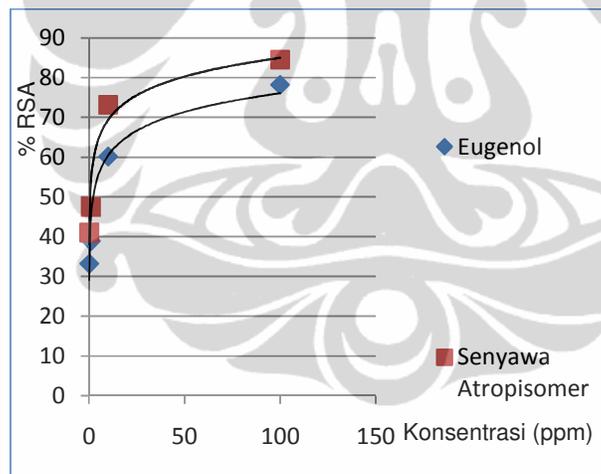
Gambar 4.10 Reaksi Antioksidan dengan DPPH

Larutan DPPH 0,1 mM berwarna ungu dan memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang, $\lambda = 515$ nm. Larutan eugenol dan senyawa atropisomer yang akan diuji dibuat dengan konsentrasi masing-masing 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm dan 0,1 ppm. Saat DPPH direaksikan dengan eugenol dan senyawa atropisomer sebagai antioksidan, terjadi reaksi yang ditandai dengan hilangnya warna ungu dari DPPH. Semakin besar konsentrasi antioksidan, semakin pudar warna ungu, menunjukkan semakin berkurangnya konsentrasi radikal stabil DPPH. Perubahan absorbansi warna DPPH ini diukur pada panjang gelombang 515 nm setiap 5 menit sekali sampai menit ke-30. Setelah diketahui absorbansi pada menit ke-30 masing-masing konsentrasi, kemudian dihitung persen inhibisi dengan rumus :

$$\% \text{ RSA} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Tabel 4.4 Nilai % RSA dari Eugenol dan Senyawa Atropisomer hasil reaksi

Konsentrasi (ppm)	% RSA	
	Eugenol	Dehidrodieugenol
100	78,22	84,52
10	60,15	73,11
1	38,86	47,49
0,1	33,17	41,00



Gambar 4.11 Grafik Aktifitas Antioksidan Eugenol dan Senyawa Atropisomer

Setelah % RSA diketahui dari masing-masing konsentrasi, maka dapat dihitung nilai IC_{50} dari grafik aktivitas diatas, dengan menggunakan persamaan grafik yang tgerbentuk. Nilai IC_{50} adalah angka yang menunjukkan konsentrasi suatu senyawa untuk menghambat atau menginhibisi radikal bebas sebesar 50 %. Semakin besar nilai IC_{50} berarti semakin banyak konsentrasi senyawa tersebut dalam menghambat radikal bebas, yang berarti juga semakin lemah sifat antioksidant. Kebalikannya,

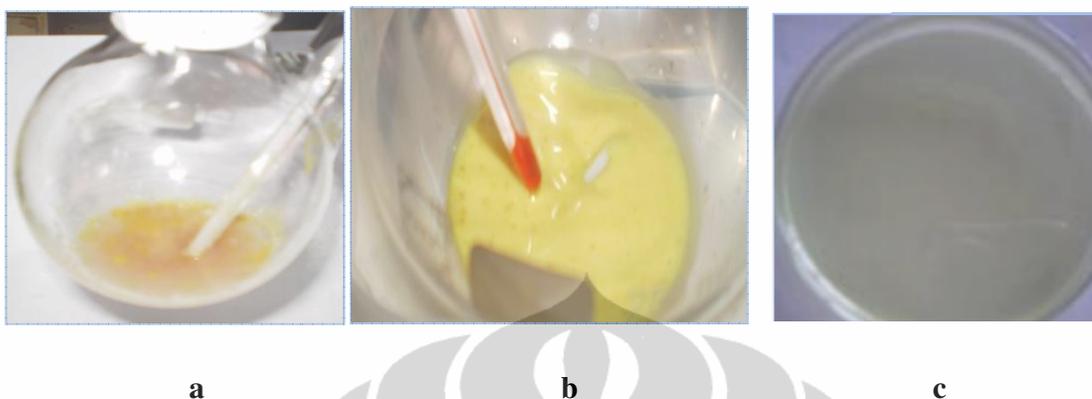
semakin kecil nilai IC_{50} berarti semakin sedikit konsentrasi senyawa yang dibutuhkan untuk menghambat radikal bebas, yang berarti juga semakin kuat sifat antioksidannya.

Dari perhitungan berdasarkan data % RSA, didapat nilai IC_{50} untuk eugenol sebesar 6.00 ppm sedangkan senyawa atropisomer sebesar 2.44 ppm. Ini menunjukkan senyawa atropisomer hasil sintesis dari bahan dasar eugenol memiliki sifat antioksidan yang lebih kuat dibandingkan substratnya, eugenol. Hal ini dimungkinkan karena pada struktur senyawa atropisomer, dihidrodieugenol, terjadi penambahan satu gugus fenolik dan pemanjangan ikatan rangkap terkonjugasi, jika dibandingkan dengan eugenol sebagai bahan dasarnya.

4.2 Sintesis senyawa dimer dari isoeugenol

Sintesis senyawa atropisomer yang kedua menggunakan bahan dasar isoeugenol dengan konfigurasi berupa trans maupun cis. Senyawa isoeugenol yang digunakan dalam penelitian berwujud cair, lengket beraroma khas cengkeh dan berwarna agak kekuningan. Perbedaan antara eugenol dengan isoeugenol terletak pada letak ikatan rangkap pada gugus alkil. Seperti eugenol, isoeugenol juga merupakan senyawa fenolik yang mampu menyumbangkan proton dari gugus fenolnya, jika direaksikan dengan H_2O_2 , dan enzim peroksidase sebagai biokatalisator. Bentuk enzimnya padatan dan berasal dari tumbuhan Horseradish dengan aktivitas spesifik sebesar 100 U/mg.

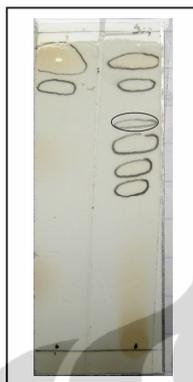
Isoeugenol dan H_2O_2 dengan perbandingan mol 2 : 1 direaksikan selama 60 menit, terjadi perubahan warna dan kenaikan suhu sekitar $5^{\circ}C$. Untuk menjaga agar enzim tidak rusak karena kenaikan suhu, reaksi dilakukan dalam pendingin air. Setelah 60 menit reaksi terbentuk larutan kuning yang kental. Setelah dibiarkan selama ± 24 jam, terbentuk endapan kuning dengan massa 1,080 g. Setelah endapan dipisahkan dengan dekantasi, kemudian ditambahkan etil asetat untuk melarutkan kristal yang terbentuk dan kemudian diuji komponen senyawa yang terbentuk dengan uji KLT.



Gambar 4.12 Hasil reaksi isoeugenol setelah 60 menit (a), setelah didiamkan selama \pm 24 jam (b) dan setelah kristal ditambahkan etil asetat (c)

Uji KLT dengan menggunakan pengembang campuran *n*-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 5 : 1, pada isoeugenol terdapat 2 spot dengan nilai R_f masing-masing 0,92 dan 0,89, yang diduga merupakan dua bentuk isomer : cis dan trans. Pada senyawa hasil reaksi menghasilkan 6 spot dengan nilai R_f masing-masing: 0,92 ; 0,89 ; 0,73 ; 0,67 ; 0,60 dan 0,43. Berdasarkan perbandingan isoeugenol dengan hasil reaksi maka diduga hasil reaksi adalah spot ke-3 sampai ke-6. Dari spot hasil tersebut, spot yang paling besar adalah spot paling atas ($R_f=0,73$), yang dianggap sebagai produk utama. Selebihnya dianggap produk samping reaksi.

Selanjutnya dilakukan pemisahan melalui KLT preparatif untuk memisahkan senyawa-senyawa hasil reaksi. KLT preparative menggunakan plat berukuran 10 X 20 cm dan larutan pengembang *n*-heksana : etil asetat = 5:1. Larutan hasil reaksi dalam etil asetat terlebih dahulu dipisahkan sehingga menghasilkan cairan minyak kental berwarna kuning, barulah ditotolkan pada plat KLT. Setelah dielus sampai semuanya terurai dengan baik, spot yang diduga produk utama dikerok. Hasil kerokan dilarutkan dalam etil asetat untuk memisahkan senyawa dengan silika yang berasal dari plat KLT. Setelah disaring, filtrat diuapkan sehingga terdapat kristal berwarna kekuningan dengan massa 0,025 g, dengan rata – rata titik leleh 125° C. Untuk mengidentifikasi senyawa hasil sintesis yang terbentuk dilakukan analisis instrumentasi dengan menggunakan UV-VIS, FTIR, Polarimeter dan GC-MS.



Gambar 4.13 Hasil KLT isoeugenol dan hasil reaksi isoeugenol

4.2.1 Analisis senyawa dimer dari bahan dasar isoeugenol dengan Instrumentasi.

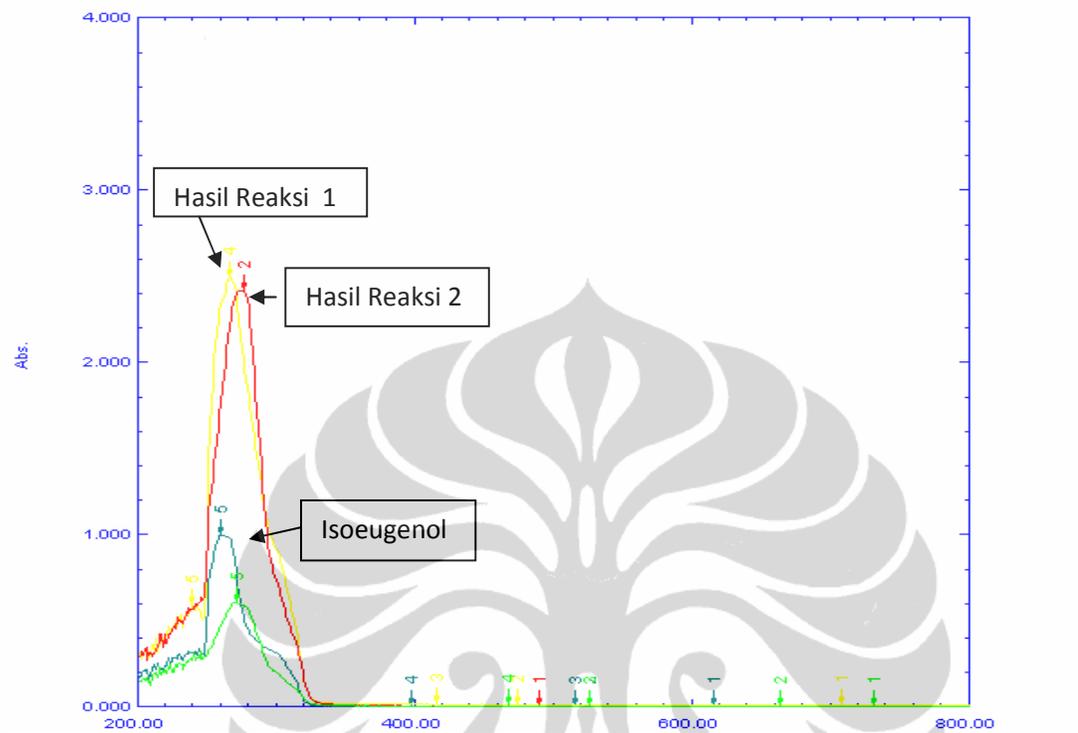
4.2.1.1 Analisis dengan UV-Vis

Senyawa hasil sintesis yang dihasilkan diidentifikasi dengan spektrum UV-Vis dan dibandingkan dengan bahan dasar isoeugenol.

Tabel 4.5 Perbandingan λ_{\max} antara Isoeugenol dan hasil reaksi spot 1 dan 2

Senyawa	λ_{\max} (nm)
Isoeugenol	260
Hasil Reaksi 1	267
Hasil Reaksi 2	273

Berdasarkan hasil spektrum yang diperoleh, terlihat adanya pergeseran panjang gelombang antara isoeugenol dan hasil reaksi, hal ini menunjukkan telah terbentuk senyawa baru. Adanya pergeseran panjang gelombang ini disebabkan oleh pembentukan gugus kromofor baru pada senyawa hasil reaksi. Pergeseran serapan maksimum ke panjang gelombang yang lebih besar disebut efek batokromik



Gambar 4.14 Spektrum UV-Vis isoeugenol dan hasil reaksi

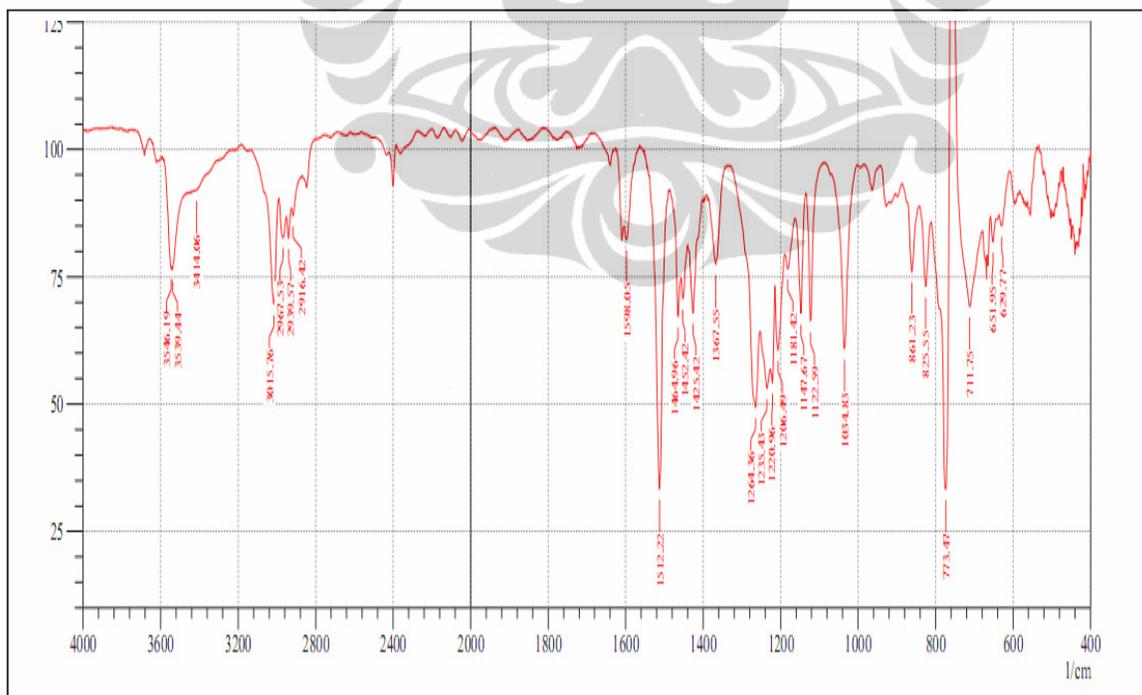
4.2.1.2 Analisis dengan FTIR

Berdasarkan spektrum hasil analisis FTIR terhadap senyawa hasil sintesis dari bahan dasar isoeugenol, terdapat beberapa puncak :

Tabel 4.6 Beberapa pita serapan pada spektrum FTIR senyawa hasil sintesis (spot 1) dari isoeugenol

Puncak (cm^{-1})	Keterangan
3546.30	Gugus OH
3015.61	Regangan C-H aromatik
1598	Uluran cincin C ----- C
1260 , 773	Cincin epoksi
1122	Uluran C-O-C tidak simetri

Berdasarkan pita serapan yang muncul pada senyawa dimer dari isoeugenol, dapat disimpulkan bahwa pada senyawa hasil sintesis masih terdapat gugus OH, aromatik dan ikatan C-O-C tidak simetri. Sedangkan gugus baru yang terbentuk yaitu adanya cincin epoksi, yang ditandai dengan munculnya pita serapan pada daerah di dekat 1250 cm^{-1} , daerah sekitar $950 - 810 \text{ cm}^{-1}$ dan pita ketiga muncul pada daerah sekitar $840 - 750 \text{ cm}^{-1}$



Gambar 4.15 Spektrum FTIR senyawa hasil sintesis dari bahan dasar isoeugenol

4.2.1.3 Analisis dengan Polarimeter

Polarimeter adalah instrument yang digunakan untuk mengukur sudut putar spesifik dari senyawa optis aktif. 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 (-).

Bedasarkan hasil pengukuran dengan Polarimeter, senyawa hasil reaksi isougenol memutar bidang kearah kiri sebesar, $\alpha = -0,5^0$ dan sesuai pehitungan pada Lampiran 5, maka diperoleh sudut putar spesifik dari senyawa hasil reaksi yaitu -156.25^0 : $[\alpha]_{D}^{25} = -156,25^0$ (c, 0.0016, $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$). Dari hasil ini, maka dapat dikatakan senyawa hasil reaksi dapat memutar bidang polarisasi cahaya ke kiri, karena memiliki tanda (-).

4.2.1.4 Analisis dengan GC-MS

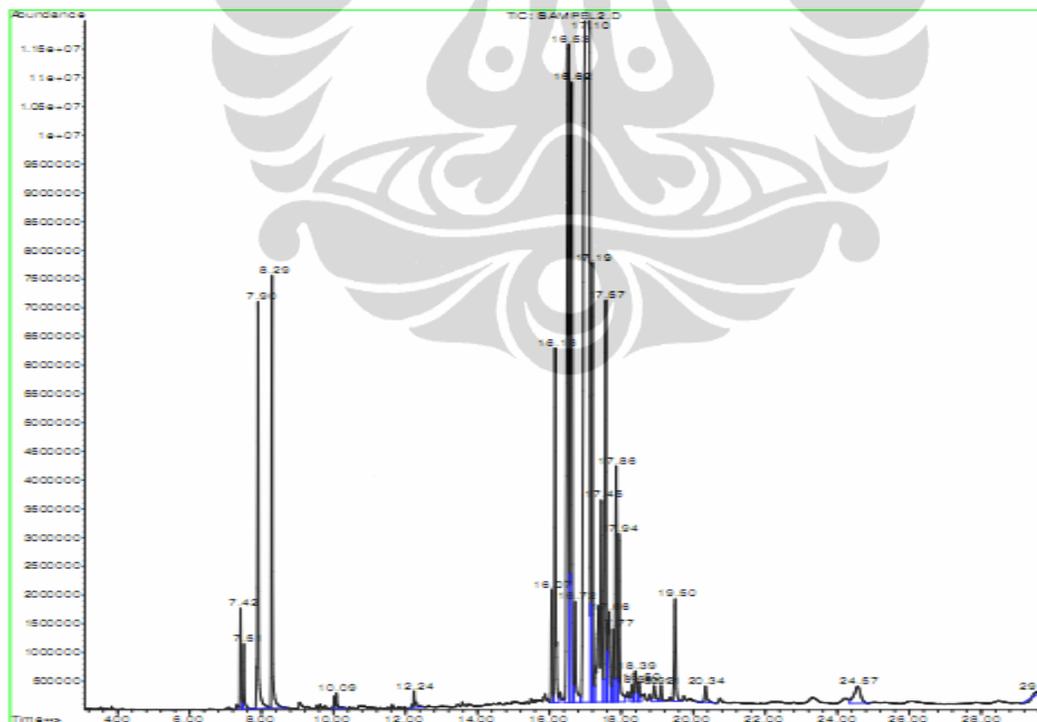
Berdasarkan analisis dengan GC-MS, hasil reaksi dengan bahan dasar isoeugenol menghasilkan kromatogram dengan puncak tertinggi pada waktu retensi 17.11 menit dengan luas area 35,15% , seperti terlihat pada tabel dan gambar berikut ini :

Tabel 4.7 Hasil analisis GC-MS senyawa hasil sintesis dari isoeugenol

Waktu (menit)	Luas Area (%)	m/z
7,91	3,93	164
8,29	11,12	164
16,16	3,15	181
16,53	11,02	181
16,62	7,54	208
17,11	35,13	326
17,20	4,18	326
17,57	4,70	326

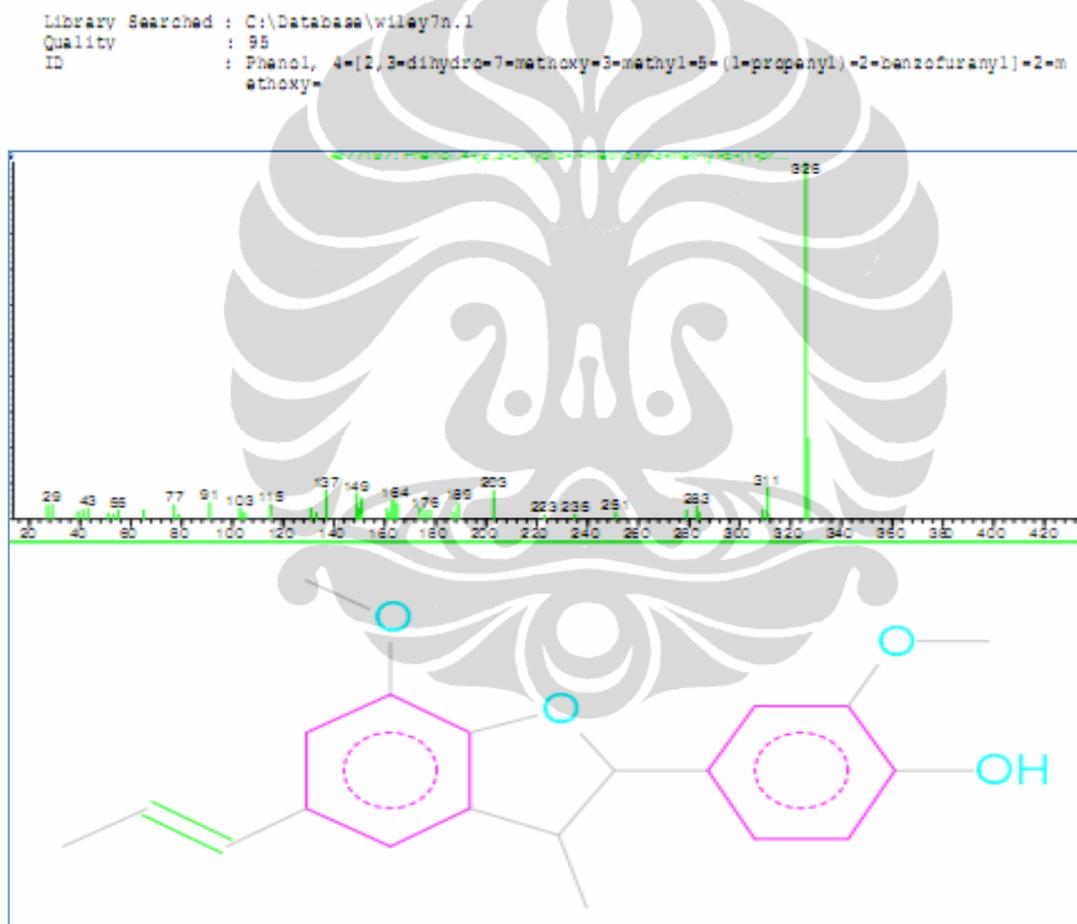
```

File          : C:\MSDCHEM\1\data\SAMPLE2.D
Operator      : DEWI ELVI
Acquired      : 26 May 2010  9:16      using AcqMethod NON PY UMUM.M
Instrument     : GCMS
Sample Name    : ISOEUGENOL CIS SPOT 1
MSD info      : 82 bit
Vial Number    : 1
    
```



Gambar 4.16 Spektrum GC senyawa hasil sintesis dari Isoeugenol

Setelah dianalisis lebih lanjut dengan menggunakan data library MS, diketahui pada waktu retensi 17.11 menit terdapat senyawa dengan berat molekul 326 dan fragmen m/s seperti Gambar 4.16 di bawah ini. Berdasarkan data library yang dimiliki oleh instrument GCMS yang terdapat pada Laboratorium PUSLABFOR POLRI, diketahui senyawa tersebut mirip dengan Phenol, 4-[2,3-dihydro-7-methoxy-5-1(1-propenyl)-2-benzofuranyl]-2-methoxy dengan quality 95%.



Gambar 4.17 Spektrum massa senyawa hasil reaksi isoeugenol dan data base rumus struktur dari Phenol, 4-[2,3-dihydro-7-methoxy-5-1(1-propenyl)-2-benzofuranyl]-2-methoxy

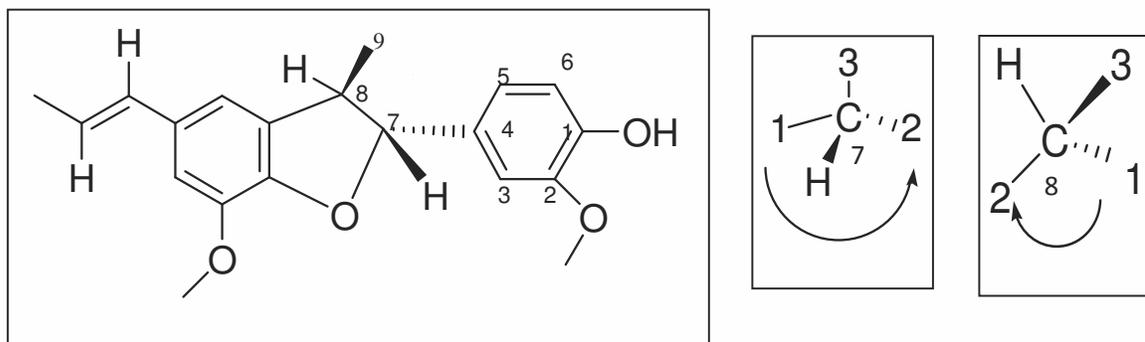
Dari rumus struktur diatas terlihat bahwa senyawa hasil sintesis yang terbentuk merupakan dimer dari isoeugenol ($M_r = 164$) dengan perhitungan :

(2 X Mr Isoeugenol) - 2.H = (2 X 164) - 2 = 326. Berdasarkan data GC-MS menunjukkan dimer dari isoeugenol ini merupakan senyawa licarin A, dimana senyawa ini mempunyai dua atom C* (atom C-asimetrik) sebagai pusat khiral, yaitu atom C ke-7 dan ke-8.

Senyawa dehidroisoeugenol yang terbentuk berdasarkan literatur PubChem³⁴ dan hasil analisis polarimeter, maka konfigurasi mutlak dari (-)-Licarin A seperti yang ditunjukkan dalam gambar 4.17. Hal ini menunjukkan bahwa pada atom C* asimetrik terjadi penyusunan sebagai berikut :

1. Pada atom C ke 7, gugus dengan perioritas pertama adalah atom C yang mengikat langsung atom oksigen. Sedangkan prioritas kedua adalah atom C yang berikatan rangkap dengan atom C lain. Jika diputar arah dari gugus prioritas pertama ke gugus prioritas kedua maka akan terlihat berlawanan arah dengan jarum jam (S), tetapi atom hidrogen tidak berada dibelakang maka konfigurasi dibalik menjadi (R).
2. Pada atom C ke-8, gugus dengan prioritas pertama adalah atom C yang mengikat O. Sedangkan prioritas kedua adalah atom C yang berikatan rangkap dengan atom C yang lain. Jika ditarik arah dari prioritas pertama ke prioritas kedua maka akan terlihat searah jarum jam (R).

Berdasarkan struktur absolut kedua atom C* diatas, senyawa licarin A dapat digambarkan sebagai berikut :



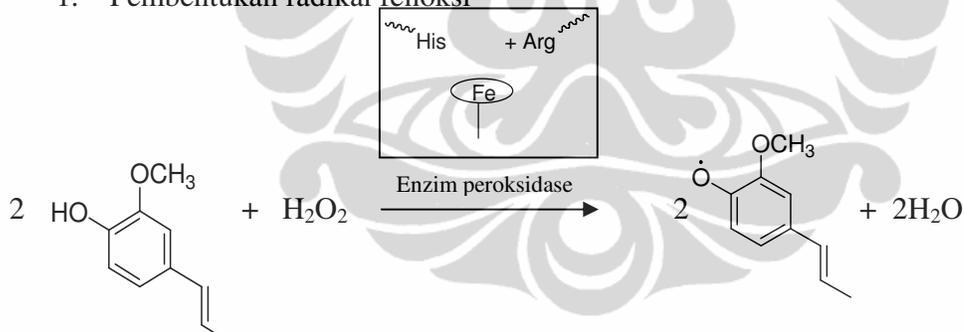
Gambar 4.18 Struktur (-)-licarin A

4.2.2 Mekanisme Reaksi Pembentukan Senyawa Dehidroisoeugenol dari Isoeugenol.

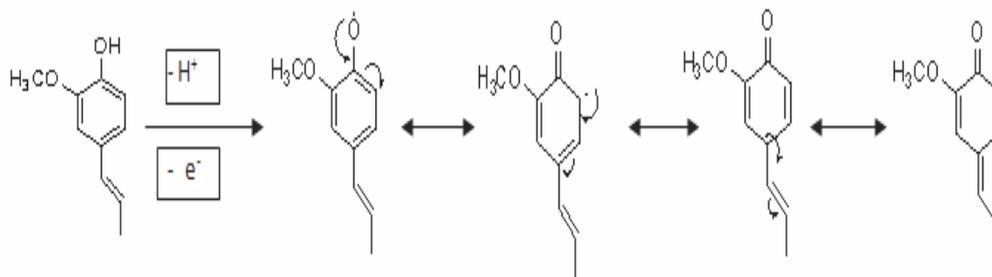
Pembentukan senyawa optis aktif yang berasal dari bahan dasar isoeugenol berdasarkan reaksi kopling oksidatif dengan mekanisme melalui zat antara radikal bebas. Isoeugenol bertindak sebagai donor proton dan H_2O_2 sebagai akseptor proton dan sebagai biokatalis digunakan enzim peroksidase.

Gugus fenolik dari isoeugenol akan teroksidasi sehingga berubah menjadi radikal fenolik. Selanjutnya gugus radikal fenolik akan melakukan reaksi kopling dengan gugus radikal fenolik dari molekul isoeugenol yang lain, dengan penggabungan pada posisi 8-5'. Hal ini dikarenakan energi aktivasi pada posisi tersebut relatif lebih kecil dari pada penggabungan pada posisi lain. Dibawah ini diberikan mekanisme reaksi pembentukan senyawa yang terjadi :

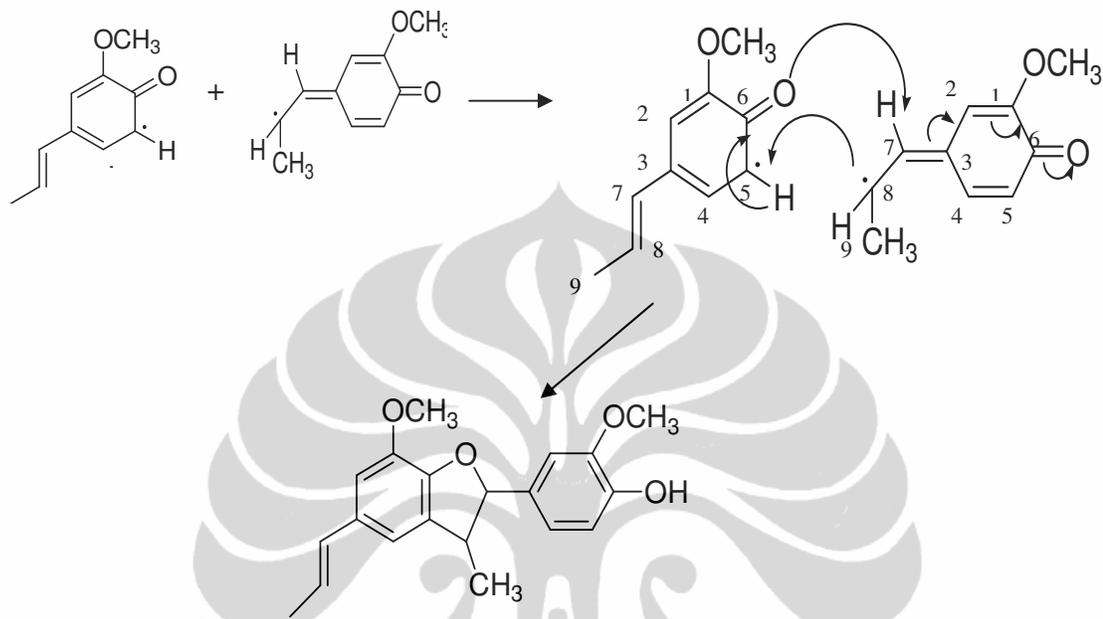
1. Pembentukan radikal fenoksi



2. Resonansi radikal fenoksi



3. Kopling oksidatif pada posisi 8 – 5'

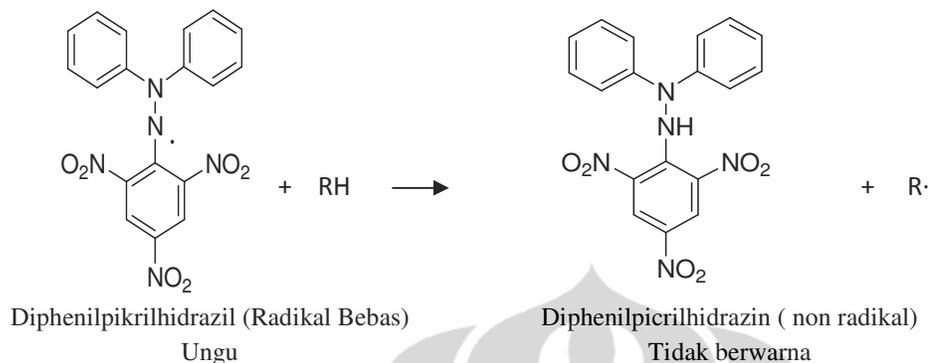


Gambar 4.19 Mekanisme reaksi pembentukan senyawa hasil sintesis dari isoeugenol.

Berdasarkan mekanisme reaksi diatas, terbentuk penggabungan atau kopling dari 2 unit C_6C_3 dengan ikatan antar C-8 dengan C-5 serta melibatkan oksigen, sehingga terbentuk senyawa baru yang merupakan golongan neolignan.

4.2.3 Uji Aktifitas Antioksidan Senyawa Isoeugenol Dan Senyawa Hasil Sintesis

Senyawa isoeugenol yang mengandung gugus fenolik telah dikenal bersifat sebagai antioksidan. Pada penelitian ini dilakukan pengujian untuk membandingkan aktivitas antioksidan antara substrat (isoeugenol) dengan senyawa hasil sintesis. Pengujian antioksidan yang dilakukan menggunakan metode Radical Scavenging dengan menggunakan larutan DPPH 0,1 mM dalam metanol. Larutan DPPH (1,1 difenil-2-pikril hidrazil) bertindak sebagai radikal bebas yang akan menerima hidrogen dari zat penyedia hidrogen atau zat antioksidan. Reaksi yang terjadi antar anti oksidan dengan DPPH sebagai berikut :



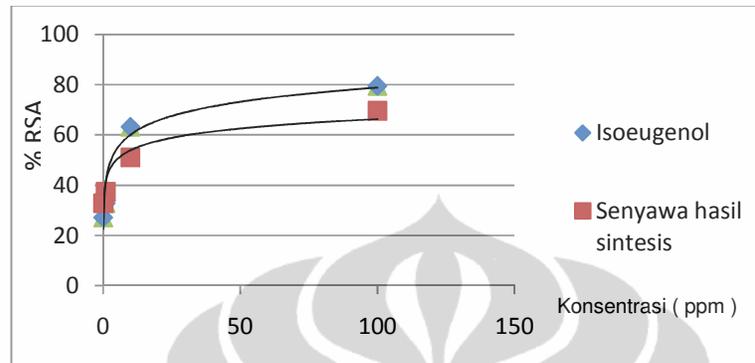
Gambar 4.20 Reaksi Antioksidan dengan DPPH

Larutan DPPH 0,1 mM berwarna ungu dan memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 515 nm. Larutan isoeugenol dan senyawa hasil sintesis yang akan diuji dibuat dengan konsentrasi masing-masing 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm dan 0,1 ppm. Saat DPPH direaksikan dengan isoeugenol dan senyawa hasil reaksi sebagai antioksidan, terjadi reaksi yang ditandai dengan hilangnya warna ungu dari DPPH. Semakin besar konsentrasi antioksidan, semakin pudar warna ungu, menunjukkan semakin berkurangnya konsentrasi radikal stabil DPPH. Perubahan absorbansi warna DPPH ini diukur pada panjang gelombang 515 nm setiap 5 menit sekali sampai menit ke-30. Setelah diketahui absorbansi pada menit ke-30 masing-masing konsentrasi, kemudian dihitung persen inhibisi dengan rumus :

$$\% \text{ RSA} = \frac{\text{Absorbansi control} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi control}} \times 100\%$$

Tabel 4.8 Nilai % RSA dari isoeugenol dan senyawa hasil reaksi

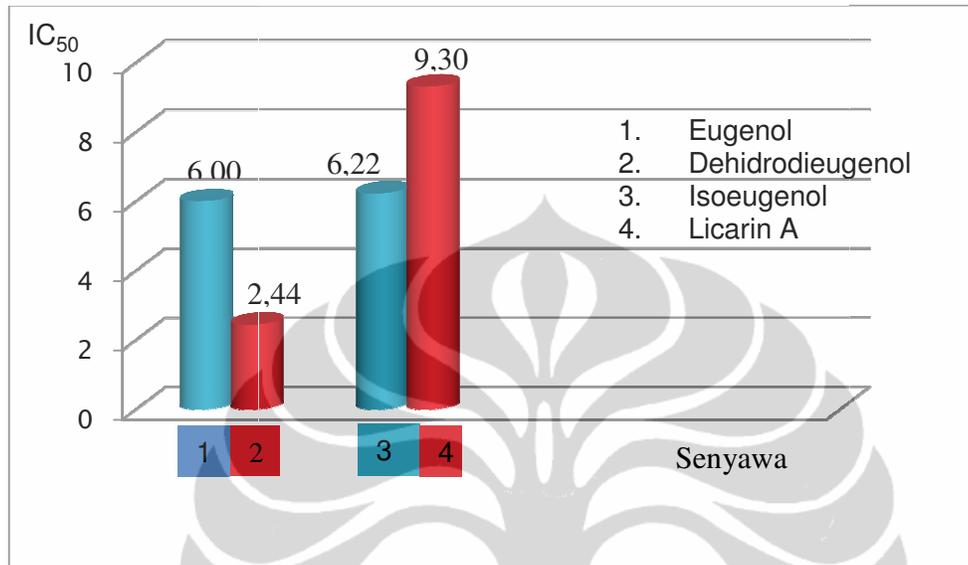
Konsentrasi (ppm)	% RSA	
	Isoeugenol	Licarin A
100	79.51	69.56
10	63.23	51.05
1	32.90	37.35
0,1	27.16	32.82



Gambar 4.21 Grafik Aktivitas antioksidan Senyawa isoeugenol dan senyawa hasil sintesis

Setelah % RSA diketahui dari masing-masing konsentrasi, maka dapat dihitung nilai IC_{50} , dengan menggunakan persamaan grafik yang terbentuk. Nilai IC_{50} adalah angka yang menunjukkan konsentrasi suatu senyawa untuk menghambat atau menginhibisi radikal bebas sebesar 50 %. Semakin besar nilai IC_{50} berarti semakin banyak konsentrasi senyawa tersebut dalam menghambat radikal bebas, yang berarti juga semakin lemah sifat antioksidan. Kebalikannya, semakin kecil nilai IC_{50} berarti semakin sedikit konsentrasi senyawa yang dibutuhkan untuk menghambat radikal bebas, yang berarti juga semakin kuat sifat antioksidannya.

Dari data % RSA didapat nilai IC_{50} untuk isoeugenol sebesar 6.22 ppm sedangkan senyawa atropisomer sebesar 9.30 ppm. Hal ini menunjukkan senyawa hasil sintesis dari bahan dasar isoeugenol memiliki sifat antioksidan yang lebih lemah dibandingkan substratnya. Hal ini dimungkinkan karena pada gugus fenolik yang terdapat pada isoeugenol mempunyai ikatan rangkap yang terkonjugasi lebih banyak (4 ikatan rangkap), dibandingkan pada senyawa licarin A (3 ikatan rangkap).



Gambar 4.20 Grafik perbandingan IC₅₀ antara substrat dan senyawa hasil sintesis

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antioksidan antara senyawa eugenol dibandingkan dengan senyawa dimer eugenol, dan senyawa isoeugenol dengan senyawa dimer isoeugenol, terlihat perbandingan seperti grafik diatas. Maka dapat disimpulkan bahwa senyawa substrat dan senyawa hasil sintesis mempunyai sifat antioksidan karena terdapatnya gugus fenolik dan ikatan rangkap terkonjugasi.

Bab 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, dapat disimpulkan bahwa :

1. Senyawa dimer dari eugenol berhasil disintesis dengan katalis enzim peroksidase dari tumbuhan Horseradish.
2. Senyawa dimer yang terbentuk merupakan senyawa atropisomer, melalui mekanisme reaksi kopling radikal eugenol pada posisi *orto-orto* dan mempunyai massa 0,0306 g, titik leleh 105,3⁰ C dan sudut putar spesifik, $[\alpha]_D^{25} = +93,75^0$ (c 0,0016, CH₃COOC₂H₅).
3. Berdasarkan hasil analisis UV-Vis, FTIR dan GC-MS diketahui senyawa atropisomer yang terbentuk adalah dihidrodieugenol dengan konfigurasi absolutnya ditulis sebagai (Ra)-(+)-dehidrodieugenol.
4. Senyawa dihidrodieugenol mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih kuat dari eugenol dengan perbandingan IC₅₀ dihidrodieugenol : eugenol adalah = 2.44 ppm : 6.00 ppm.
5. Senyawa dimer dari isoeugenol berhasil disintesis dengan katalis enzim peroksidase dari tumbuhan Horseradish.
6. Senyawa dimer yang terbentuk mempunyai massa 0,015 g, titik leleh 125⁰ C dan sudut putar spesifik, $[\alpha]_D^{25} = -156,25^0$ (c 0,0016, CH₃COOC₂H₅).
7. Berdasarkan hasil analisis UV-Vis, FTIR dan GC-MS diketahui senyawa yang terbentuk adalah licarin A yang merupakan dimer dari isoeugenol pada posisi 8-5' dengan konfigurasi absolutnya (7R, 8R)-(-)-licarin A.
8. Senyawa licarin A mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih lemah dibandingkan isoeugenol dengan perbandingan IC₅₀ licarin A : isoeugenol = 9.30 ppm : 6.22 ppm.

5.2 Saran

1. Belum maksimalnya hasil yang diperoleh dari sintesis senyawa dimer eugenol dan isoeugenol yang telah dilakukan maka disarankan untuk melakukan penelitian lanjut dengan melakukan optimasi terhadap perbandingan substrat , H_2O_2 dan enzim yang dipakai, serta optimasi kondisi reaksi yang berlangsung.
2. Perlu dilakukan pemurnian kristal yang diperoleh sehingga bisa dianalisis dengan instrument NMR, dan akan mendapatkan struktur molekul yang lebih baik.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui aktifitas hasil reaksi dari bahan dasar eugenol dan isoeugenol sehingga diketahui manfaat senyawa senyawa tersebut secara maksimal dalam kehidupan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Croteau, R. *et al* . 2000. *Natural Product (Secondary Metabolits)* American Society of Plant Physiologist
2. Fessenden dan Fessenden. 1998. *Kimia Organik*. Edisi ketiga. Terjemahan dari *Organic Chemistry* oleh Aloysius Hadyana Pudjaatmaka. Penerbit Erlangga : Jakarta
3. Hudiyono, PWS. S. 1998. *Teori Dasar Enzim*. Jurusan Kimia FMIPA UI. Depok
4. Lindiyah, 2008. *Studi Reaksi Kopling Oksidatif Eugenol dan Isoeugenol Oleh Enzim Peroksidase Dari Horseradish*. Skripsi Departemen Kimia FMIPA UI. Depok.
5. Potter, Dwight W. Miller and Jack A.H, 1985, *Identification of Acetaminophen polymerization Products Catalyzed by Horseradish Peroxidase*, *The Journal of Biological Chemistry*, 12174-12180.
6. Lignan. <http://en.wikipedia.org/wiki/Lignan>. 18 Juni 2010 17.00
7. Eusebio Juaristi, 1991 *Stereochemistry and Conformational Analysis*. Penerbit : John Wiley & Sons, Inc. New York
8. Wahyudi, P.S. 2006 *Stereokimia*. Bahan Kuliah Stereokimia. Laboratorium Kimia Organik Departemen Kimia FMIPA UI. Depok.
9. Horseradish. <http://en.wikipedia.org/wikipedia.org/wiki/Enzim>. 20 Januari 2010. 14.00
10. Enzim. <http://id.wikipedia.org/wiki/Enzim>. 20 Januari 2010. 14.25
11. Trevor, Palmer. 1991. *Understanding Enzymes*. Third Edition. Elus Horwood
12. Enzyme Catalyzed Reactions. www.oneonta.edu. 20 Januari 2010 14.35
13. Peroxidase. <http://en.wikipedia.org/wiki/Peroxidase>. 20 Januari 2010 14.10
14. Peroxidase. <http://www.worthington-biochem.com/HPO/>. 20 Januari 14.17
15. Mann, J. 1986. *Secondary Metabolism. Second Edition*. Oxford University Press Inc : New York.

16. Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Terjemah dari *The Organic Constituent of Higher Plants* oleh Kosasih Padmawita. Penerbit ITB : Bandung.
17. Eugenol. <http://en.wikipedia.org/wiki/Eugenol>. 21 Januari 2010 09.00
18. Safety data for Eugenol. <http://physchem.ox.ac.uk/> 21 Januari 2010 09.15
19. Takao, Koeduka, Eyal, Fridman, et al., 2006, Eugenol And Isoeugenol, Characteristic Aromatic Constituents Of Spices, Are Biosynthesized Via Reduction Of Coniferyl Alcohol Ester. 26: 10128-10133.
20. Isoeugenol. <http://www.chemicalad21.com/Isoeugenol/>. 21 Januari 2010 09.35
21. Dewick, P. 1997. *Medicinal Natural Product : A Biosynthetic Approach*. John Wiley & Sons Ltd : Inggris.
22. Mardiana, L. 2009. Sintesis Atropisomer : Bifenol dan Binaftol Melalui Reaksi Penggabungan (Kopling) Oksidatif Dengan Menggunakan Enzim Peroksidase (POD) dari Horseradish, Tesis, Departemen Kimia FMIPA UI. Depok.
23. Robert M. Silverstein, Francis X. Webster & David J. Kiemley, 2005. *SPECTROMETRIC IDENTIFICATION OF ORGANIC COMPOUNDS*, Penerbit : John Wiley & sons, Inc., New York
24. Underwood, A.L. Day, R.A. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Edisi keenam. Terjemahan dari *Quantitative Analysis* oleh Aloysius Hadyana Pudjaatmaka. Penerbit Erlangga : Jakarta.
25. FTIR: http://id.wikipedia.org/wiki/Spektrofotometer_Inframerah_Transformasi_Fourier, 15 Juni 2010 11.00
26. Miyazawa, M., 2003, Antimutagenic Activity of Phenylpropanoids from Clove. *J. Agric, Food Chem.* 51: 6413-6422.
27. Gas Chromatography Mass Spectroscopy in CVD Precursor Analysis . www.epichem.com. 21 Januari 2010 09.40.
28. International Union of Pure And Applied Chemistry , International Union Of Biochemistry and Molecular Biology Joint Commission Of Biochemical

Nomenclatur, *Nomenclatur Of Lignans And Neolignans*, IUPAC Recommendation 200

29. *Univesitas Indonesia (2009), Departement Kimia, Lecture Notes, BIOSAY.*
30. Sastrohamidjojo, H. 2005. *Kimia Organik*. Gadjah Mada University Press : Yoyakarta.
31. Shriver & Atkins, 2006, *Inorganic Chemistry*, Fourth edition, Oxford University Press.
32. Hiroyushi Tonami, *et al*, 2000 Chemoselective Oxidative Polymerization of *m*-Ethylnlphenol by Peroksidase Catalyst to a new Reactive Polyphenol, *Bio Macromolecules*, American Chemical Society
33. Molyneux, Philip, 2004, The use of stable free radical diphenylpicryl hydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin J.Sci. Technol*, 26(2) : 211-219.
34. Licarin A : <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, 26 Juni 2010 20.00

Lampiran 1

Tabel Pengamatan Reaksi Dimerisasi Eugenol

No	Kegiatan	Keterangan
1	Enzim HRP + H ₂ O ₂ + eugenol	Larutan tidak berwarna berubah menjadi kuning dan suhu naik > 5 ⁰ C
2	Perbandingan mol eugenol dan H ₂ O ₂	Massa eugenol yang dipakai = 2,17 gram , Volume H ₂ O ₂ 30 % yang dipakai 0,76 mL. Perbandingan mol = 13,4 mmol : 6,7 mmol = 2 : 1
3	Hasil reaksi yang didapat	Minyak kental dan masanya 1,9050 gr
4	Hasil pemisahan dengan menggunakan KLT preparatif	Tedapat 2 Spot. Spot ke-2 yang merupakan produk utama menghasilkan kristal kuning dengan masa 0,0306 g (1,4%)
5	Hasil pengujian titik leleh	Dari 3 percobaan didapat rata-rata titik leleh = 105,3 ⁰ C
6	Hasil pengujian Polarimeter	Memutar kearah kanan sebesar 0,3

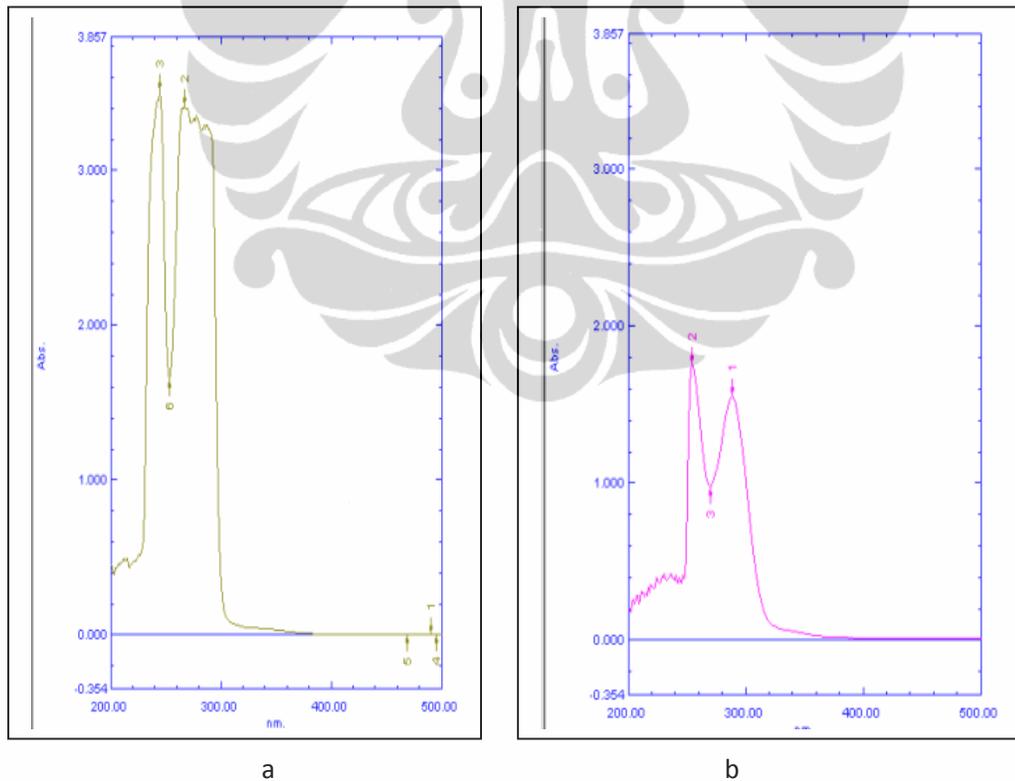
Tabel Pengamatan Reaksi Dimerisasi Isoeugenol

No	Kegiatan	Keterangan
1	Enzim HRP + H ₂ O ₂ + isoeugenol	Larutan tidak berwarna berubah menjadi kuning dan suhu naik > 5 ⁰ C
2	Perbandingan mol isoeugenol dan H ₂ O ₂	Massa isoeugenol yang dipakai = 2,17 gram , Volume H ₂ O ₂ 30 % yang dipakai 0,76 mL. Perbandingan mol = 13,4 mmol : 6,7 mmol = 2 : 1
3	Endapan hasil reaksi yang dipisahkan	Endapan kuning keruh dan lengket dengan massa 1,080
4	Hasil pemisahan dengan menggunakan KLT preparatif	Terdapat 6 buah spot. Dari spot 1 didapat kristal kuning dengan masa 0,025 g (1,1%)
5	Hasil pengujian titik leleh	Kristal spot 1 mempunyai rata-rata titik leleh = 125 ⁰ C
6	Hasil pengujian Polarimeter	Memutar kearah kiri sebesar 0,5

Lampiran 2. **HASIL PENGUJIAN DENGAN INSTRUMEN UV-Vis**

Tabel 4.1 Perbandingan λ_{\max} pada pektrum UV-Vis Eugenol dan Hasil Reaksi

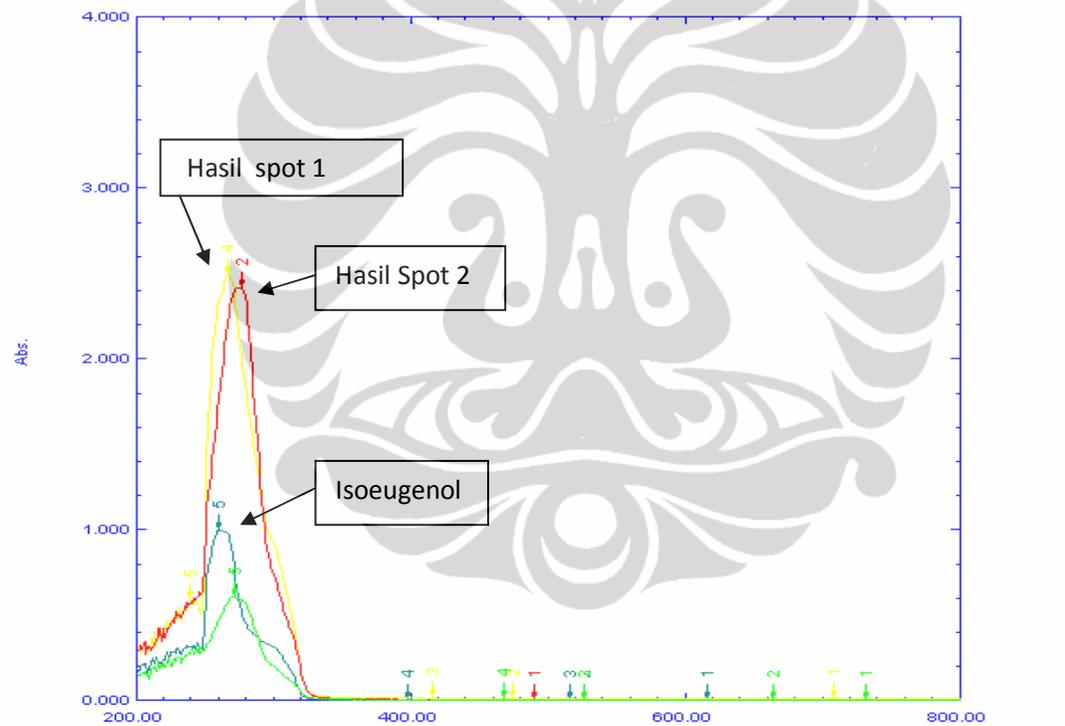
Senyawa	λ_{\max} (nm)	
	Puncak 1	Puncak 2
Eugenol	245	267
Hasil Reaksi	255	285



Gambar 4.3 Spektrum UV-VIS Eugenol(a) dan senyawa hasil reaksi(b)

Tabel 4.5 Perbandingan λ_{\max} antara Isoeugenol dan hasil reaksi spot 1 dan 2

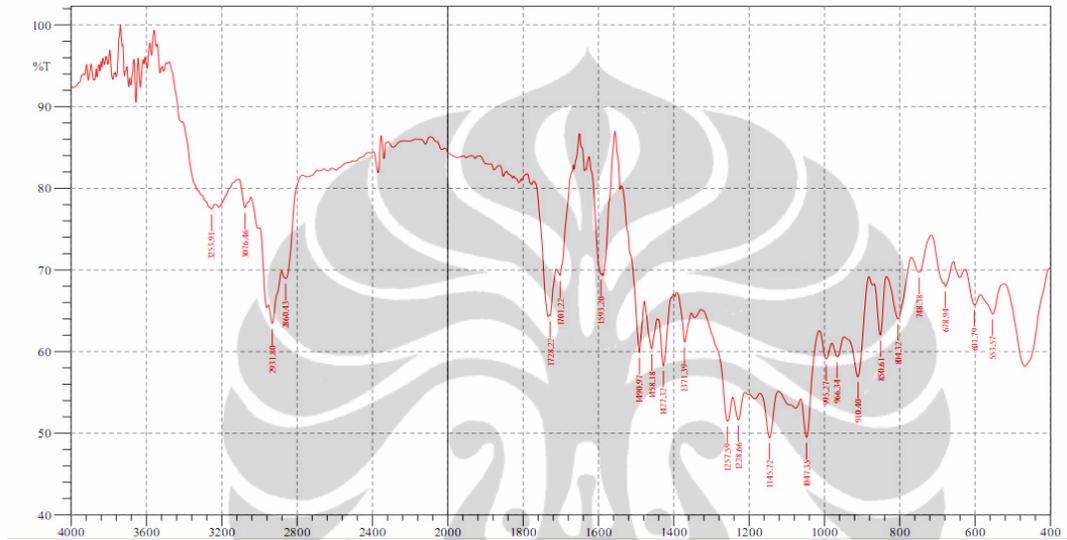
Senyawa	λ_{\max} (nm)
Isoeugenol	260
Hasil Reaksi 1	267
Hasil Reaksi 2	273



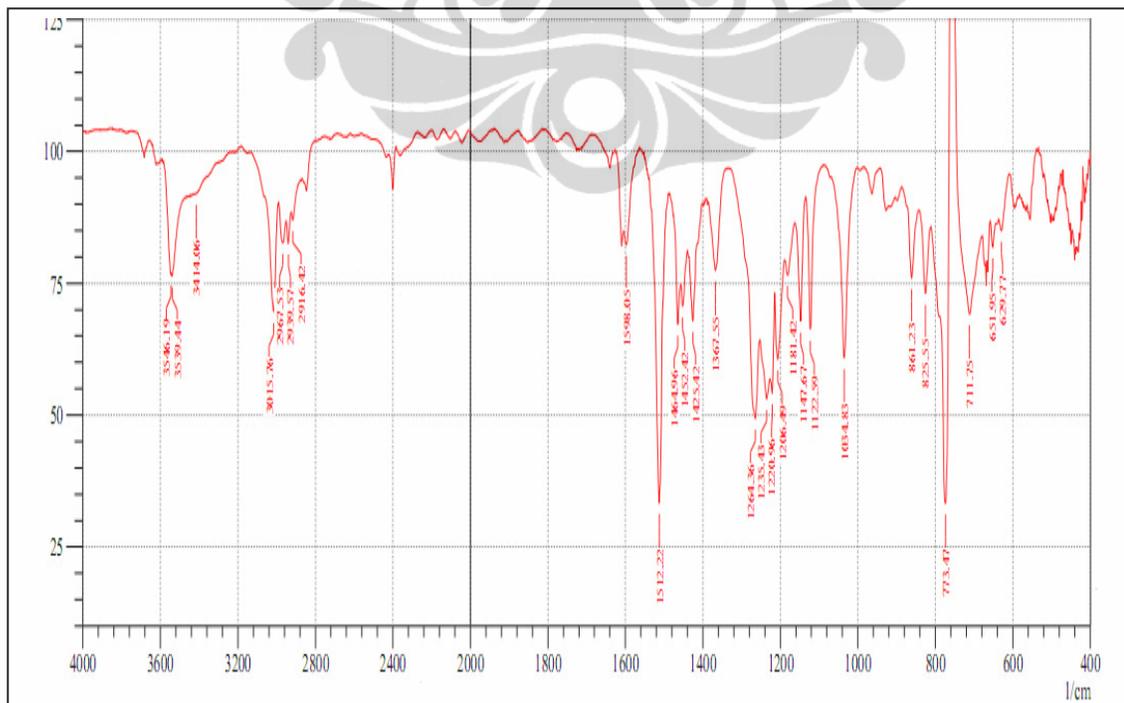
Gambar 4.13 Spektrum UV-Vis isoeugenol dan hasil reaksi

Lampiran 3. Hasil Pengujian dengan instrument FTIR

SHIMADZU

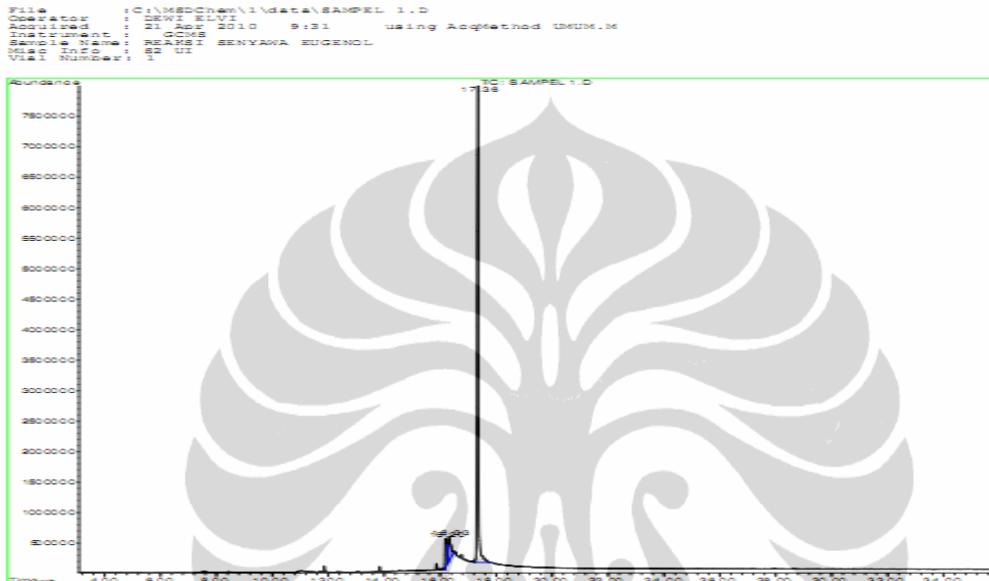


Gambar 4.4 Spektrum FTIR senyawa hasil sintesis dari substrat eugenol.

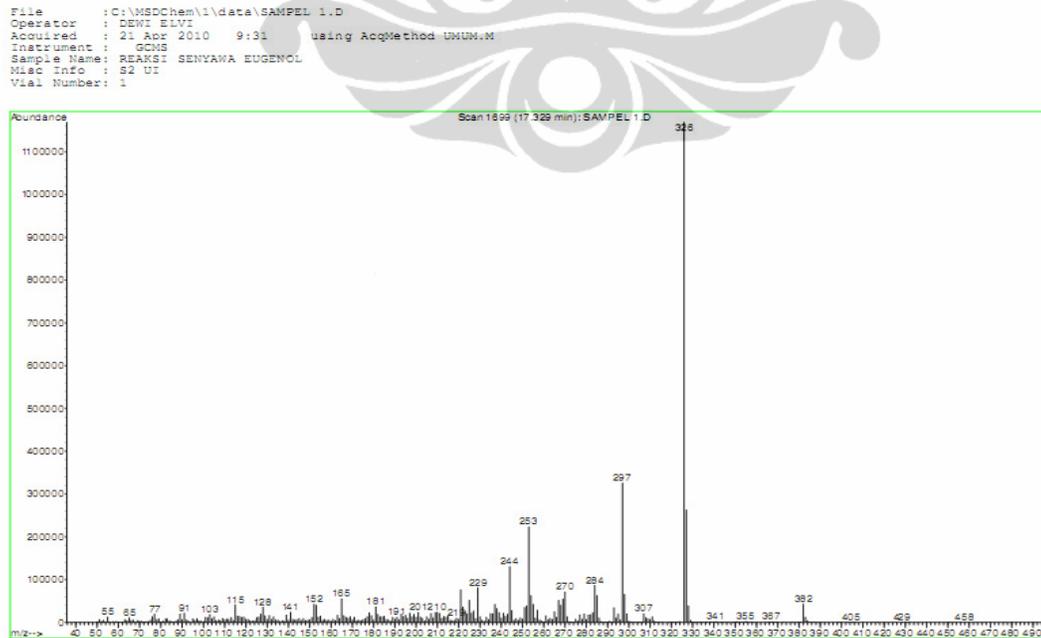


Gambar 4.14 Spektrum FTIR senyawa hasil sintesis dari substrat isoeugenol

Lampiran 4. Hasil Pengukuran Dengan GC-MS



Gambar 4.5 Kromatogram GC senyawa hasil reaksi eugenol



Gambar 4.6 Spektrum massa senyawa hasil reaksi eugenol

Lampiran 5. Perhitungan sudut putar spesifik, α

1. Sudut putar spesifik senyawa hasil sintesis dari eugenol.

Konsentrasi sampel	Panjang tabung	Pelarut	Sudut putar hasil pengukuran	Sudut putar spesifik hasil perhitungan
0,04 g /25 mL = 0,0016	2 dm	Etil Asetat	+0,3 ⁰	+ 93,75 ⁰

$$\text{Perhitungannya } [\alpha]_D^{25} = \frac{\alpha}{L.C} = \frac{0,3}{0,0016 \times 2} = 93,75$$

$$[\alpha]_D^{25} = +93,75^0 \text{ (c,0,0016, CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5 \text{)}$$

2. Sudut putar spesifik senyawa hasil sintesis dari isoeugenol.

Konsentrasi sampel	Panjang tabung	Pelarut	Sudut putar hasil pengukuran	Sudut putar spesifik hasil perhitungan
0,04 g/25 mL = 0,0016	2 dm	Etil Asetat	-0,5 ⁰	-156,25 ⁰

$$\text{Perhitungannya } [\alpha]_D^{25} = \frac{\alpha}{L.C} = \frac{-0,5}{0,0016 \times 2} = -156,25$$

$$[\alpha]_D^{25} = -156,25^0 \text{ (c,0,0016, CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5 \text{)}$$

Lampiran 6. Pengukuran aktivitas antioksidan

Tabel Hasil pengukuran absorbansi pada saat 30 menit

Sampel	Absorbansi pada 515 nm pada saat 30 menit				
	DPPH 0,1 mM (kontrol)	DPPH 0,1mM + Sanpel 100 ppm	DPPH 0,1mM + Sampel 10 ppm	DPPH 0,1mM + Sampel 1 ppm	DPPH 0,1mM + Sampel 0,1 ppm
Eugenol	0,404	0,088	0,161	0,247	0,270
Dihidrodieugenol	0,478	0,074	0,1285	0,251	0,282
Isoeugenol	0,427	0,0875	0,157	0,2865	0,311
Licarin A	0,478	0,1455	0,234	0,2675	0,309

Perhitungan % inhibisi senyawa hasil sintesis dan substratnya.

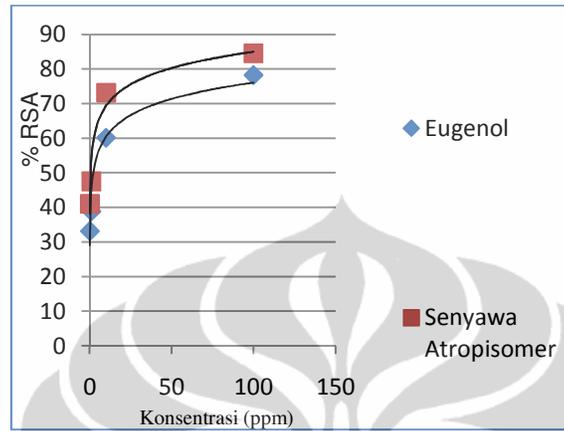
$$\% \text{ RSA} = \frac{A_0 - A_b}{A_0} \times 100\%$$

A_0 = absorbansi DPPH 0,1 mM tanpa sampel
 A_b = absorbansi DPPH + sampel

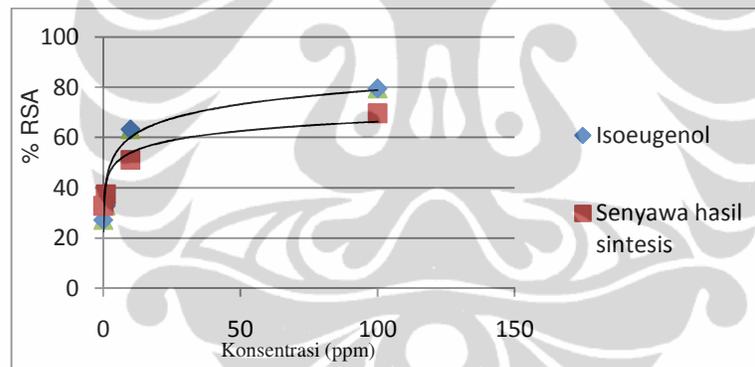
Dari rumus diatas didapat nilai % RSA masing masing sampel

Tabel Hasil perhitungan % inhibisi masing-masing sampel

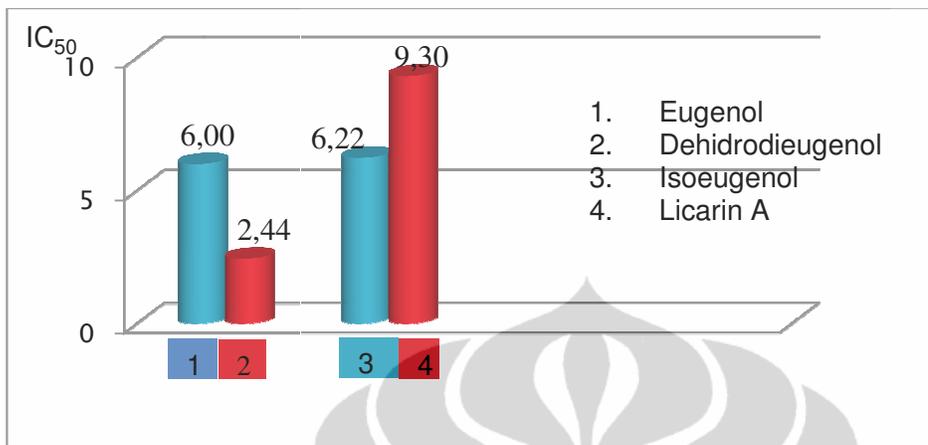
Konsentrasi (ppm)	% RSA			
	Eugenol	Dehidrodieugenol	Isoeugenol	Licarin A
100	78,22	84,52	79.51	69.56
10	60,15	73,11	63.23	51.05
1	38,86	47,49	32.90	37.35
0,1	33,17	41,00	27.16	32.82



Gambar 4.10 Grafik Aktifitas Antioksidant Eugenol dan Senyawa Atropisomer



Gambar 4.19 Grafik Aktivitas antioksidant Senyawa isoeugenol dan senyawa hasil sintesis



Gambar 4.20 Grafik perbandingan IC_{50} antara substrat dan senyawa hasil sintesis