



UNIVERSITAS INDONESIA

**SINTESIS SENYAWA DIMER ISOEUGENOL
MENGUNAKAN ENZIM PEROKSIDASE DARI KULIT
BAWANG BOMBAY (*ALLIUM CEPA L.*) SERTA UJI
AKTIVITAS ANTIOKSIDAN**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains

Winda Sutrisno

NPM. 1006787060

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
MAGISTER ILMU KIMIA**

DEPOK

2012

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Winda Sutrisno

NPM : 1006787060

Tanda Tangan : 

Tanggal : 2 Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
 Nama : Winda Sutrisno
 NPM : 1006787060
 Program Studi : Magister Ilmu Kimia
 Judul Tesis : Sintesis Senyawa Dimer Isoeugenol Menggunakan Enzim Peroksidase dari Kulit Bawang Bombay (*Allium Cepa L.*) 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 1 : Dr. A. Herry Cahyana

Pembimbing 2 : Dr. Widajanti Wibowo

Penguji : Prof. Dr. Endang Asijati, M.Sc.

Penguji : Dr. Emil Budianto

Penguji : Dr. Endang Saepudin

Penguji : Prof. Dr. Soleh Kosela, M.Sc.

Ditetapkan di : Departemen Kimia, FMIPA Universitas Indonesia
 Tanggal : 2 Juli 2012

KATA PENGANTAR

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

Dalam penyusunan tesis ini, saya telah dibantu oleh berbagai pihak baik berupa dukungan materi maupun moril yang sangat berarti bagi penyelesaian tesis ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Dr. Antonius Herry Cahyana dan Dr.rer.nat. Widajanti Wibowo selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran dalam penyusunan tesis ini.
2. Dr. Endang Saepudin selaku Ketua Program Studi Magister Kimia
3. Teman-teman S2 angkatan 2010
4. Orang tua dan adikku yang telah memberikan bantuan dukungan dan dorongan semangat kepada penulis

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

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

Jakarta, Juni 2012

Penulis

Abstrak

Nama : Winda Sutrisno
Program Studi : Kimia Hayati
Judul : Sintesis Senyawa Dimer Isoeugenol Menggunakan Enzim Peroksidase dari Kulit Bawang Bombay (*Allium Cepa L.*) serta Uji Aktivitas Antioksidan

Penelitian ini dilakukan untuk melakukan sintesis senyawa dimer isoeugenol melalui reaksi kopling oksidatif menggunakan enzim peroksidase yang berasal dari kulit bawang bombay (*Allium cepa L.*). Kondisi optimum reaksi yang diperoleh adalah pada perbandingan isoeugenol dan H_2O_2 1:0,5, pH 3,0 dan penambahan 10% metanol sebagai cosolvent. Identifikasi senyawa yang dihasilkan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, LC-MS, dan GC-MS. Reaksi kopling oksidatif isoeugenol menghasilkan senyawa yang lebih dikenal sebagai dehidroisoeugenol atau Licarin A. Yang merupakan kopling pada posisi ikatan C8 dan C5'. Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode DPPH. Hasil dari metode DPPH tersebut menunjukkan bahwa senyawa dimer isoeugenol dapat bersifat sebagai antioksidan dengan nilai $IC_{50} = 235,3$ ppm.

Kata Kunci : Isoeugenol, peroksidase, reaksi kopling oksidatif, DPPH
xiii + 70 halaman : 24 gambar, 5 tabel, dan 8 lampiran
Daftar Pustaka : 31(1981-2011)

Abstract

Name : Winda Sutrisno
Program Study : Kimia Hayati
Title : Sintesis Senyawa Dimer Isoeugenol Menggunakan Enzim Peroksidase dari Kulit Bawang Bombay (*Allium Cepa L.*) And Activity Antioxidant Test

The aim of this research was to synthesis dimerization product of isoeugenol by oxidative coupling reaction which is catalyzed by peroxidase from shell of onion (*Allium cepa L.*). The optimum reaction condition were obtained by varying mol ratio of isoeugenol and H₂O₂ 1:0,5, pH 3, and 10% methanol as cosolvent. The structure of compounds were identified by spectrometer UV-Vis, LC-MS, and GC-MS. Oxidative coupling reaction of isoeugenol were identified as dehydrodiisoeugenol or licarin A which is coupling at C8 and C5'. The activity of antioxidant was tested with DPPH method. The result of DPPH method showed that dimerization product of isoeugenol can act as antioxidant with value of IC₅₀ = 235,3 ppm.

Key words : Isoeugenol, peroxidase, oxidative coupling reaction, DPPH
xiii + 70 pages: 24 pictures, 5 tables, and 8 appendixs
Bibliography : 31(1981-2011)

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

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

Nama : Winda Sutrisno
NPM : 1006787060
Program Studi : Kimia Hayati
Departemen : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Tesis

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

Sintesis Senyawa Dimer Isoeugenol Menggunakan Enzim Peroksidase dari Kulit Bawang Bombay (*Allium Cepa L.*) serta Uji Aktivitas Antioksidan.

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 2 Juli 2012
Yang Menyatakan



(Winda Sutrisno)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	v
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1.Latar Belakang	1
1.2.Rumusan Masalah	2
1.3.Tujuan	2
1.4.Hipotesis	3
1.5.Ruang Lingkup Penelitian	3
1.6.Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Senyawa Fenolik	4
2.2. Lignan	5
2.3. Isoeugenol	6
2.4. Enzim	8
2.5. Klasifikasi Enzim	8
2.6. Aktivitas Enzim	9
2.7. Pemisahan dan Pemurnian Enzim	10
2.7.1. Isolasi dan Ekstraksi Enzim	10
2.7.2. Sentrifugasi	12
2.7.3. Salting Out	12
2.8. Enzim Peroksidase	13

2.9. Reaksi Kopling Oksidatif Fenol	14
2.10. Reaksi Kopling Oksidatif Isoeugenol	16
2.11. Analisis Hasil Reaksi	19
2.11.1. Analisis dengan UV-Vis	19
2.11.2. Analisis dengan LC-MS	20
2.11.3. Analisis dengan GC-MS	20
2.12. Antioksidan	20
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	23
3.2. Alat dan Bahan	23
3.2.1. Bahan Penelitian	23
3.2.2. Peralatan Penelitian	23
3.3. Cara Kerja	23
3.3.1. Isolasi Enzim Peroksidase dari Kulit Bawang Bombay	23
3.3.2. Pemurnian dengan Ammonium Sulfat	24
3.3.3. Penentuan Aktivitas Peroksidase	25
3.3.4. Penentuan Kadar Protein	25
3.3.5. Optimasi Reaksi Kopling Oksidatif Isoeugenol	26
3.3.6. Sintesis Dimer Isoeugenol	27
3.3.7. Uji Aktivitas Antioksidan	28
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1. Isolasi Enzim Peroksidase	34
4.2. Penentuan Aktivitas Peroksidase dan Kadar Protein	35
4.3. Optimasi Enzim Peroksidase	38
4.3.1. Optimasi Perbandingan Isoeugenol dan H ₂ O ₂	38
4.3.2. Optimasi pH Reaksi	40
4.3.3. Optimasi Jenis Cosolvent	41
4.3.4. Optimasi Jumlah Cosolvent	42
4.4. Reaksi Dimerisasi Isoeugenol dengan Enzim Peroksidase	43
4.5. Analisis Senyawa Hasil Reaksi Dimerisasi	44
4.5.1. Analisis dengan Spektrofotometer UV-Vis	44

4.5.2. Analisis dengan Menggunakan LC-MS	44
4.5.3. Analisis dengan Menggunakan GC-MS	47
4.6. Mekanisme Reaksi Kopling Oksidatif Isoeugenol	52
4.7. Uji Antioksidan dengan Metode DPPH	53
BAB V PENUTUP	
5.1. Kesimpulan	56
5.2. Saran	56
DAFTAR PUSTAKA	57

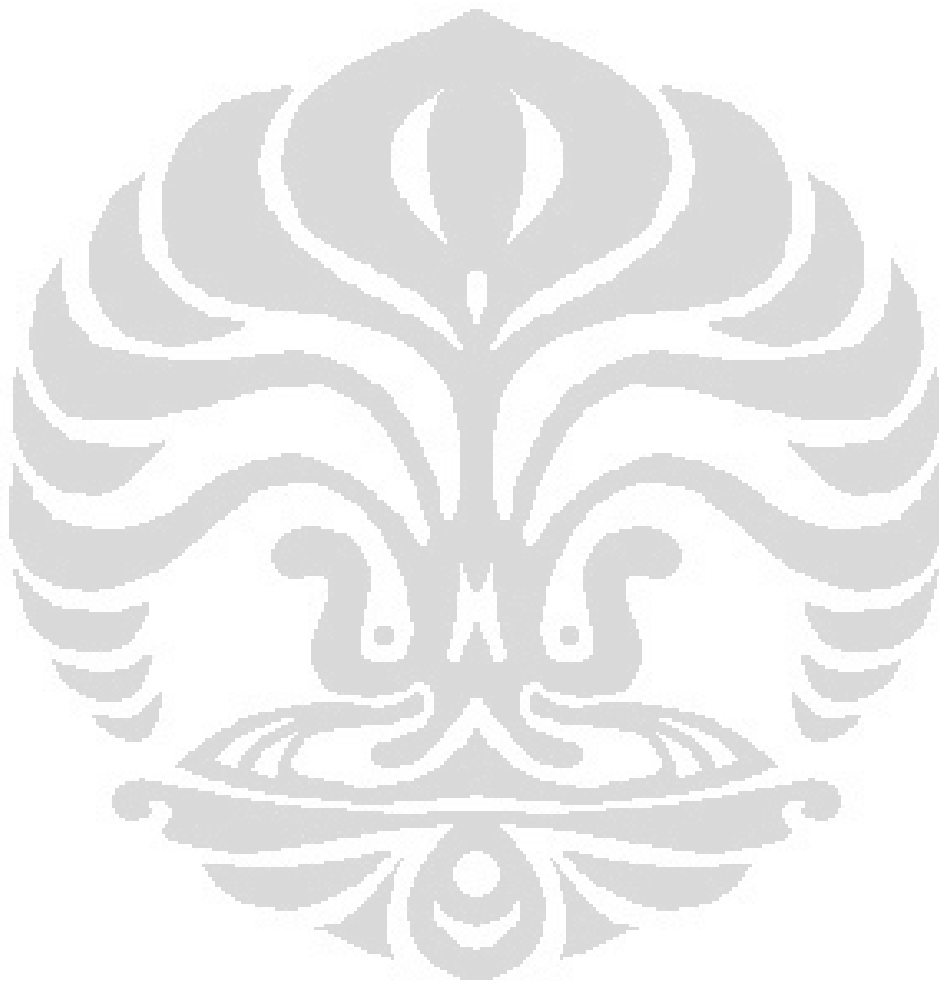


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Senyawa Fenolik	5
Gambar 2.2. Dasar Penomoran Atom Karbon Monolignol dan Lignan	5
Gambar 2.3. Senyawa Golongan Neolignan	6
Gambar 2.4. Senyawa Golongan Oxineolignan	6
Gambar 2.5. Reaksi Kopling Oksidatif Fenolik	15
Gambar 2.6. Resonansi Radikal Isoeugenol	16
Gambar 2.7. Senyawa DPPH	22
Gambar 3.1. Bawang Bombay	24
Gambar 4.1. Ekstrak Kasar Enzim Peroksidase	34
Gambar 4.2. Endapan Hasil Fraksionasi	35
Gambar 4.3. Reaksi Pembentukan Quinoneimine	36
Gambar 4.4. Grafik Serapan UV-Vis Perbandingan Isoeugenol dan H ₂ O ₂	39
Gambar 4.5. Grafik Serapan UV-Vis pada Variasi pH	40
Gambar 4.6. Grafik Serapan UV-Vis pada Variasi Pelarut	41
Gambar 4.7. Grafik Serapan UV-Vis pada Variasi Jumlah Pelarut	42
Gambar 4.8. Reaksi Sintesis Senyawa Dimer Isoeugenol	43
Gambar 4.9. Hasil KLT produk Dimerisasi Isoeugenol	43
Gambar 4.10. Kromatogram LC-MS Senyawa Dimer Isoeugenol	45
Gambar 4.11. Spektrum Massa Senyawa Dimer Isoeugenol	46
Gambar 4.12. Kromatogram GC-MS Senyawa Produk Reaksi Isoeugenol	47
Gambar 4.13. Spektrum Massa Senyawa Hasil Reaksi Isoeugenol	48
Gambar 4.14. Struktur Senyawa Licarin A	48
Gambar 4.15. Posisi Ikatan Reaksi Kopling Oksidatif Isoeugenol	50
Gambar 4.16. Reaksi Antioksidan dengan DPPH	53
Gambar 4.17. Grafik Aktivitas Antioksidan	54
Gambar 4.18. Grafik Perbandingan IC ₅₀	55

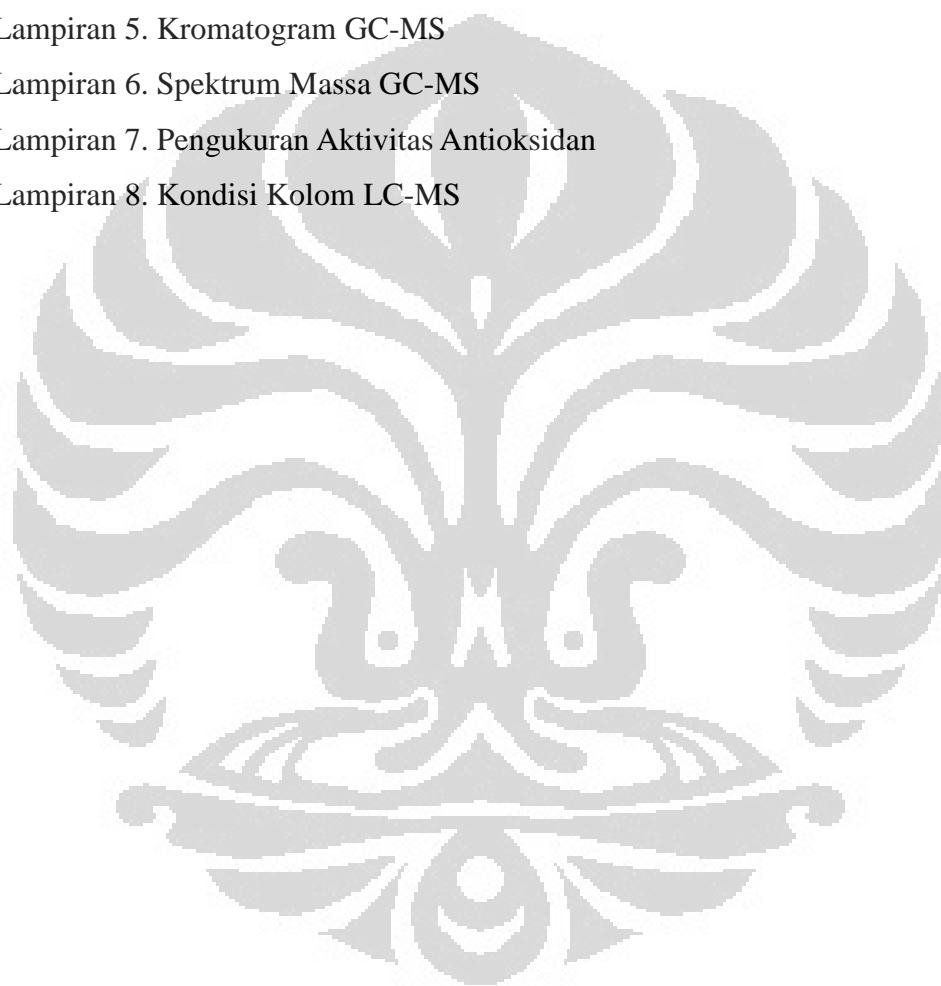
DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Aktivitas Spesifik Peroksidase Kulit Bawang Bombay	37
Tabel 4.2. Aktivitas Spesifik Peroksidase <i>Raphanus Sativa L.</i>	37
Tabel 4.3. Aktivitas Spesifik Peroksidase Brokoli	38
Tabel 4.4. Perbandingan λ_{max} pada Spektrum UV-Vis Produk Dimer	44
Tabel 4.5. Persentase <i>Scavenging Activity</i> Produk Dimer dan Isoeugenol	54



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Pengukuran Aktivitas Spesifik Enzim Peroksidase	60
Lampiran2. Spektrum Serapan UV-Visible Isoeugenol dan Produk Reaksi Dimerisasi	63
Lampiran 3. Kromatogram LC-MS	64
Lampiran 4. Spektrum Massa LC-MS	65
Lampiran 5. Kromatogram GC-MS	66
Lampiran 6. Spektrum Massa GC-MS	67
Lampiran 7. Pengukuran Aktivitas Antioksidan	68
Lampiran 8. Kondisi Kolom LC-MS	70



BAB I

Pendahuluan

1.1. Latar belakang

Sebagian besar senyawa organik bahan alam adalah senyawa-senyawa aromatik. Diantara beraneka ragam kandungan senyawa kimia dalam tumbuhan terdapat senyawa yang berasal dari golongan senyawa fenolik. Senyawa ini tersebar dalam spesies tumbuh-tumbuhan yang ada di alam. Beberapa senyawa fenolik yang sering dijumpai dan bermanfaat antara lain eugenol, isoeugenol, katekin, dan cinnamaldehida.

Senyawa fenolik dianggap memiliki potensi sebagai antioksidan untuk dapat melindungi sel terhadap kerusakan yang diakibatkan serangan oksidatif, mengurangi resiko penyakit degeneratif yang disebabkan oleh oxidative stress seperti penyakit jantung, osteoporosis, diabetes mellitus, dan penyakit neurodegeneratif (Sonia Moussoni, 2009). Di lain pihak, jumlah sampah atau limbah baik cair ataupun padat diproduksi setiap tahun oleh industri makanan. Pada prinsipnya, material sampah tersebut mengandung materi organik yang bersifat biodegradable yaitu dapat diolah kembali dan adanya penumpukan sampah dapat menimbulkan masalah lingkungan. Dari keadaan tersebut dapat diteliti penggunaan enzim yang berasal dari sampah untuk digunakan pada sintesis senyawa kimia.

Pembentukan dimer dari senyawa isoeugenol dapat dilakukan melalui reaksi kopling oksidatif secara enzimatis yaitu dengan bantuan biokatalis berupa enzim. Ada sebuah kemungkinan penggunaan enzim yang berasal dari ekstrak kasar (tanpa tahap pemurnian yang lama) dari bawang bombay. Seperti diketahui bahwa peroksidase yang berasal horseradish, sawi hijau, dan tembakau telah banyak diteliti sebagai reagen untuk sintesis organik dan biotransformasi. Adapun keuntungan penggunaan enzim pada reaksi ini adalah ketersediaan enzim yang sangat berlimpah di alam, sifatnya yang ramah lingkungan, dan menghasilkan produk yang tidak berbahaya. Tetapi penggunaan enzim pada reaksi ini juga

mempunyai beberapa kerugian yaitu enzim yang bersifat selektif, hanya dapat mengkatalisis senyawa-senyawa dari golongan fenol dan amina aromatik, sehingga penggunaannya di dalam industri polimer menjadi terbatas.

Pada reaksi kopling oksidatif ini, enzim peroksidase akan mengoksidasi senyawa fenolik yang menyebabkan terbentuknya suatu radikal fenoksi, radikal ini mampu melakukan resonansi pada posisi *orto* dan *para* pada cincin aromatiknya dan selanjutnya akan bergabung dengan radikal fenoksi yang lain membentuk senyawa polifenol baru. Cara ini dikenal sebagai polimerisasi secara enzimatis.

Pada penelitian ini, diharapkan enzim peroksidase yang berasal dari ekstrak kulit bawang bombay dapat menghasilkan senyawa dimer melalui reaksi kopling oksidatif dengan menggunakan substrat isoeugenol. Dan setelah terbentuknya senyawa dimer tersebut, dapat diteliti aktivitas antioksidan dari senyawa polifenol yang dihasilkan.

1.2. Rumusan Masalah

Penggunaan senyawa fenolik saat ini yang cukup besar dalam bidang industri membuat banyak penelitian yang ditujukan untuk mensintesis senyawa fenolik. Proses sintesis senyawa fenolik ini dilakukan dengan menggunakan reaksi kopling oksidatif dengan bantuan enzim peroksidase yang berasal dari ekstrak bawang bombay. Pada penelitian ini diharapkan dapat dibuat suatu senyawa dimer dari isoeugenol dengan menggunakan enzim peroksidase tersebut dan dapat diteliti aktivitas antioksidan dari senyawa dimer yang dihasilkan tersebut.

1.3. Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah untuk membuat senyawa dimer dari isoeugenol dengan menggunakan bantuan enzim peroksidase yang berasal dari ekstrak kulit bawang bombay dan mengetahui aktivitas antioksidan dari senyawa dimer tersebut.

1.4. Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah dapat dibuat senyawa dimer dari isoeugenol dengan bantuan enzim peroksidase yang berasal dari ekstrak kulit bawang bombay dan terdapat aktivitas antioksidan dari senyawa dimer yang dihasilkan tersebut.

1.5. Ruang Lingkup Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan senyawa dimer yang berasal dari senyawa isoeugenol dengan menggunakan bantuan enzim peroksidase yang berasal dari ekstrak kulit bawang bombay. Dan setelah senyawa dimer terbentuk, senyawa dimer tersebut akan diteliti aktivitas antioksidannya dengan menggunakan senyawa DPPH. Dimerisasi dari senyawa isoeugenol dengan bantuan enzim peroksidase ini dilakukan melalui reaksi kopling oksidatif. Pada reaksi kopling oksidatif, enzim peroksidase akan mengoksidasi senyawa isoeugenol yang menyebabkan terbentuknya senyawa radikal isoeugenol. Senyawa radikal ini dapat beresonansi dengan posisi *orto* dan *para* pada cincin aromatiknya dan selanjutnya akan bergabung dengan radikal yang lain membentuk senyawa dimer baru.

1.6. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah dapat memberikan informasi dan kajian ilmiah mengenai sintesis senyawa dimer isoeugenol dari ekstrak kulit bawang bombay. Selain itu, diharapkan senyawa yang dihasilkan juga memiliki aktivitas antioksidan.

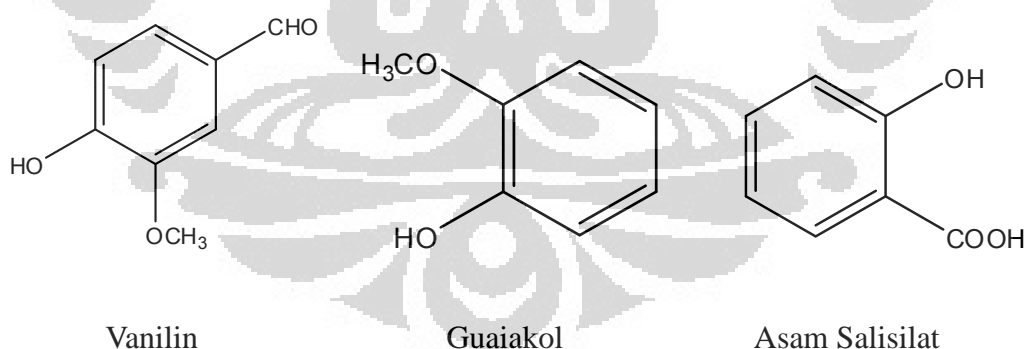
BAB II

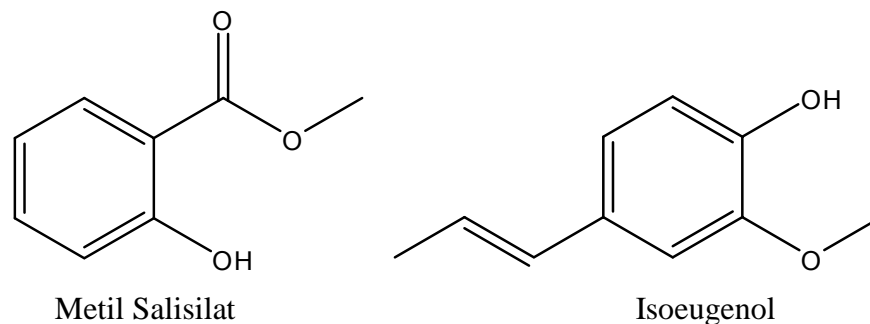
Tinjauan Pustaka

2.1. Senyawa Fenolik

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

Aktivitas fisiologis senyawa fenolik yang ada pada tumbuhan sangat beragam. Senyawa fenol sederhana terlibat dalam pembawa elektron pada fotosintesis dan dalam pengaturan enzim tertentu. Beberapa senyawa tertentu yang tergolong senyawa flavonoid berperan dalam merangsang atau menarik serangga agar membantu penyerbukan ke bunga. Adapula beberapa senyawa fenolik yang bersifat racun terhadap hewan pemangsa tanaman.

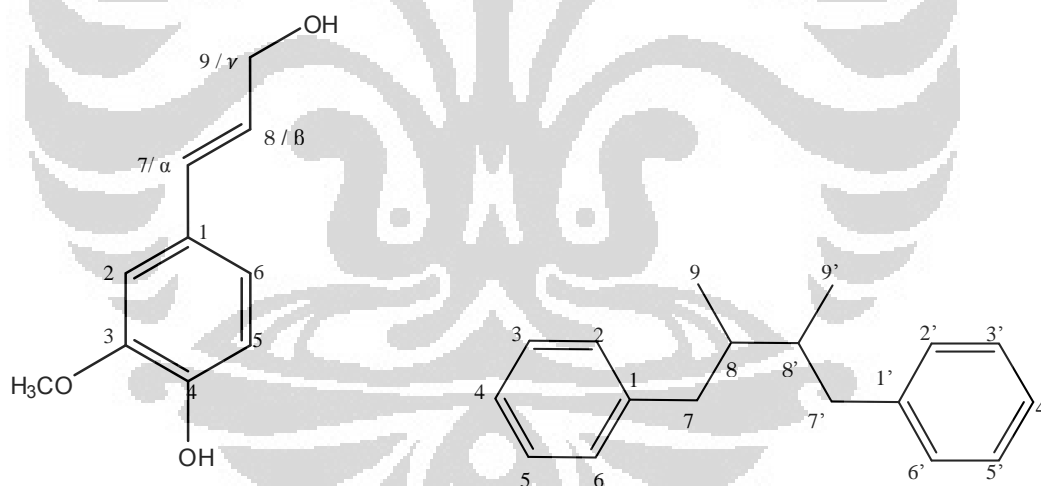




Gambar 2.1. Senyawa Fenolik

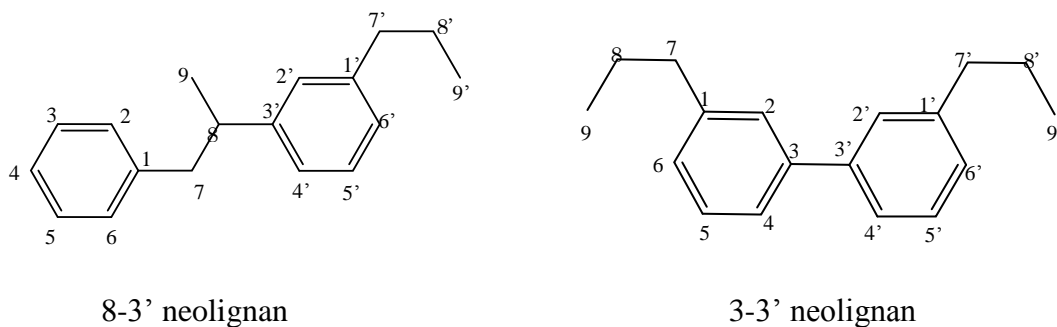
2.2. Lignan

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

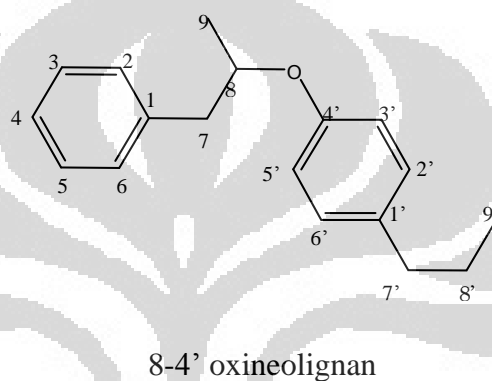


Gambar 2.2. Dasar penomoran atom karbon senyawa monolignol dan lignan

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



Gambar 2.3. Senyawa golongan neolignan



Gambar 2.4. Senyawa golongan oxineolignan

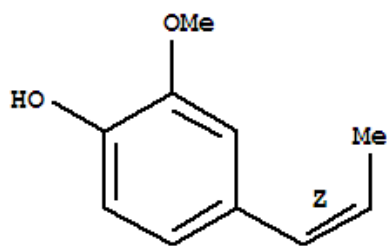
Senyawa lignan memiliki banyak modifikasi pada struktur induknya antara lain dapat menghasilkan penambahan cincin, penambahan atau penghilangan atom C dan sebagainya. Senyawa ini tersebar luas di dunia tumbuhan dan banyak digunakan sebagai antioksidan dan sebagai komponen sinergistik dalam inteksida. Selain itu, lignan merupakan komponen aktif dalam obat tertentu (Muryeti, 2011). Salah satu senyawa golongan lignan yaitu podophylotoxin diketahui dapat menghambat tumor.

2.3. Isoeugenol

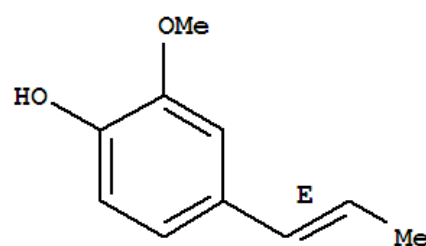
Isoeugenol berasal dari senyawa turunan fenilpropanoida. Senyawa ini bersama dengan senyawa turunan fenilpropanoida lain seperti eugenol dan metil eugenol di dalam tanaman digunakan sebagai pertahanan terhadap serangan hewan dan mikroorganisme serta sebagai penarik serangga dalam mengadakan

penyerbukan bunga.

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



Cis-isoeugenol



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	: $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$
Titik didih	: $266\text{-}268\text{ }^{\circ}\text{C}$
Titik nyala	: $112\text{ }^{\circ}\text{C}$
Indeks bias	: 1,5410
Kelarutan	: Tidak larut dalam air tetapi sangat larut dalam eter dan ethanol

Isoeugenol banyak digunakan sebagai pewangi pada parfum, pemberi rasa, dan aroma minyak esensial dan dalam bidang pengobatan (antiseptik dan analgesik lokal). Isoeugenol terdapat pada minyak cengkeh dan biji pala. Di dalam minyak cengkeh, senyawa ini bersama dengan metil eugenol memiliki komposisi sekitar 5-15% sedangkan sisanya 85-95% adalah eugenol. Selain diperoleh secara alami, isoeugenol juga dapat diperoleh secara sintesis. Di industri, sintesis isoeugenol dilakukan dengan menggunakan basa kuat seperti KOH atau NaOH.

2.4. Enzim

Enzim merupakan katalis biologi, umumnya berupa senyawa protein yang dapat meningkatkan kecepatan reaksi kimia yang terjadi dalam sel hidup dengan sangat efisien tanpa mengalami perubahan apapun pada dirinya sendiri. Dalam reaksi enzimatik, enzim berikatan dengan substrat yang akan diubah menjadi produk dan kemudian enzimnya akan dibebaskan kembali. Setiap enzim bersifat spesifik terhadap substratnya untuk menghasilkan produk tertentu.

Pada umumnya enzim memerlukan suatu kofaktor yang bukan protein dan yang dapat berikatan agak longgar ataupun terikat secara kuat dengan enzim yang disebut sebagai gugus prostetik. Banyak enzim yang memerlukan kofaktor berupa ion logam seperti Mn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} atau berupa molekul organik yang dikenal sebagai koenzim. Bagian protein dari enzim disebut sebagai apoenzim sedangkan enzim keseluruhannya disebut haloenzim.

Molekul enzim memiliki berat berkisar antara 12000 hingga lebih dari 1 juta dalton. Oleh karena itu, enzim berukuran sangat besar jika dibandingkan dengan substrat atau gugus fungsional targetnya.

2.5. Klasifikasi Enzim

Menurut *International Commission of Enzymes*, secara sistematis enzim diklasifikasikan menjadi enam kelompok besar yaitu:

No.	Kelas	Jenis reaksi yang dikatalisis
1	Oksidoreduktase	Pemindahan elektron antara dua sistem redoks (Reaksi Oksidasi/Reduksi)
2	Transferase	Transfer atom atau gugusan antara dua molekul
3	Hidrolase	Reaksi Hidrolisis (pemindahan gugus fungsional ke air)
4	Liase	Pelepasan gugus fungsi dari substrat (tidak melalui hidrolisis)
5	Isomerase	Pemindahan gugus di dalam molekul menghasilkan bentuk isomer (Reaksi isomerisasi)
6	Ligase	Penambahan ikatan C-C, C-N, C-S, dan C-O oleh

		reaksi kondensasi yang berkaitan dengan penguraian ATP (Sintesis penggabungan dua molekul disertai dengan peutusan ikatan pirofosfat dalam suatu nukleosida triposfat)
--	--	--

2.6. Aktivitas Enzim

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

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

Aktivitas enzim dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain:

1. Konsentrasi substrat

Agar suatu reaksi enzimatik berlangsung harus terdapat hubungan atau kontak antara enzim dan substrat. Oleh karena ukuran enzim lebih besar dari substrat maka tidak seluruh bagian enzim mengadakan kontak dengan substrat. Kontak antara substrat dengan enzim terjadi pada sisi aktif enzim. Kontak ini hanya mungkin terjadi apabila sisi aktif enzim memiliki ruang yang tepat untuk menampung substrat yang sesuai. Substrat yang konformasinya tidak cocok dengan sisi aktif enzim tidak dapat mengadakan kontak dengan enzim. Hal ini mengakibatkan enzim tidak dapat berfungsi terhadap substrat tersebut. Kontak antara enzim dengan substrat menyebabkan terjadinya suatu kompleks enzim substrat. Kompleks ini akan terurai lagi menjadi produk dan reaktan.

2. Pengaruh pH

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

3. Pengaruh temperatur

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

4. Pengaruh aktivator

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

5. Pengaruh inhibitor

Inhibitor adalah suatu senyawa yang cenderung menurunkan laju suatu reaksi enzimatik. Inhibitor terbagi menjadi dua yaitu inhibitor reversibel dan inhibitor irreversibel. Inhibitor reversibel berikatan dengan enzim secara reversibel, inhibitor ini dapat dilepas kembali dengan proses dialisis atau bahkan hanya dengan pengenceran sehingga aktivitas enzim bisa didapatkan kembali. Inhibitor irreversibel berikatan secara kuat dengan enzim dan tidak dapat dilepaskan kembali karena biasanya ikatan yang terbentuk adalah ikatan kovalen.

2.7. Pemisahan dan Pemurnian Enzim

2.7.1. Isolasi dan Ekstraksi Enzim

Isolasi enzim adalah proses pelepasan enzim dari sel penghasilnya. Sel penghasil enzim dapat berasal dari hewan, mikroba atau tanaman. Pada saat ekstraksi, dinding dan membran sel dipecahkan enzim bersama-sama zat lain akan dikeluarkan dari sel ke dalam medium dan saling berinteraksi akibatnya aktivitas enzim dapat menurun. Untuk memperkecil penurunan aktivitas enzim biasanya pada medium ditambahkan β -merkaptotanol, thioglikolat, senyawa sulfhidril lainnya atau agen pengikat logam yang akan meningkatkan hasil ekstraksi, aktivitas, dan stabilitas enzim.

Untuk isolasi enzim-enzim intraseluler perlu dilakukan pemecahan dinding sel penghasil enzim tersebut. Untuk maksud ini dapat dilakukan berbagai cara baik secara fisika maupun secara kimia. Pemecahan dinding sel secara fisika dapat dilakukan dengan cara:

- 1) Dengan alat *homogenizer*. Alat ini dapat berupa *waring* blender atau pencacah yang lain. Hasil yang paling baik diperoleh bila digunakan

jaringan yang masih muda dalam mempercepat pemecahan sel tersebut sehingga pengaruh oksidasi oleh oksigen dan pemanasan yang dapat mengurangi aktivitas enzim dapat dikurangi.

- 2) *Sonikasi*. Sel dalam medium cair diberikan getaran di atas frekuensi batas pendengaran manusia (di atas 20 kHz). Getaran medium bunyi menimbulkan perapatan dan peregangan dalam medium tersebut yang menyebabkan timbulnya perubahan periodik tekanan dalam cairan medium dan plasma sel yang sedemikian cepat. Sementara itu gas hasil respirasi membentuk rongga udara dalam cairan. Akibat perubahan periodik cepat di atas, rongga ini membentuk suatu gelombang kejut memberikan efek pemecahan dinding sel tersebut.
- 3) Pembekuan dan pencairan, jika pasta sel sebelum digunakan disimpan lebih dulu pada suhu -20°C maka ia akan mengalami kerusakan dinding sel. Akibat sifat anomali air yang menunjukkan pemuaian volume pada saat pendinginan 0°C yang menyebabkan sekitar 50% protein periplasma akan dilepaskan ke dalam medium tapi hanya sekitar 10% dari protein yang dapat melarut kembali.
- 4) Kejutan Osmosa. Bila mula-mula bakteri diletakkan dalam media dengan tekanan osmosa tinggi, misal dengan sukrosa 20% sampai tercapai keadaan setimbang kemudian dipindahkan ke dalam media air maka akan timbul aliran air yang kuat dari media ke dalam sel sehingga menyebabkan pecahnya dinding sel.
- 5) Agitasi dan abrasi. Pasta sel ditempatkan dalam wadah yang mengandung butiran-butiran gelas dan digetarkan dengan cepat sehingga timbul gaya gesek akibat gradien kecepatan oleh tumbukan antar butiran dan antara butiran dengan mikroorganisme.

Ekstraksi enzim dapat pula dilakukan dengan ekstraksi kimia yaitu dengan

cara:

- 1) Deterjen

Pada kondisi pH dan kekuatan ion yang sesuai, deterjen akan berinteraksi dengan lipoprotein membentuk misel. Karena itu lipoprotein yang merupakan konstituen membran dapat larut sehingga enzim dapat dikeluarkan.

2) Enzim litik

Merupakan cara yang efektif dan hati-hati dalam pemecahan dinding sel. Enzim litik yang umum dikenal adalah enzim lizozim yang diperoleh dari putih telur. Enzim ini memecahkan ikatan β -1,4 glikosida dari polisakarida penyusun dinding sel.

3) Alkali

Penempatan sel pada medium dengan dengan pH 11-12,5 selama 20 menit menyebabkan pecahnya dinding sel.

2.7.2. Sentrifugasi

Sentrifugasi dipilih untuk memisahkan molekul-molekul enzim dari zat-zat yang lebih besar seperti seperti sisa-sisa jaringan, sel-sel mati atau serpihan sel. Laju dari beberapa enzim untuk mengendap tergantung pada beberapa faktor yaitu ukuran, berta molekul, dan viskositas larutan. Telah diketahui secara umum bahwa semakin besar berat molekul semakin besar pula kecepatan pengendapan. Pemisahan akan lebih cepat tercapai jika diameter partikel besar, perbedaan massa jenis partikel dan larutan yang besar dan viskositas larutan yang rendah. Selain itu kecepatan angular yang tinggi, radius putaran yang besar, lapisan cairan yang tipis juga dapat mempercepat proses. Sentrifugasi sangat luas digunakan untuk memisahkan endapan atau material tidak terlarut dalam proses isolasi seperti untuk memisahkan sel *dibris* setelah *homogenisasi* atau untuk mengumpulkan enzim setelah diendapkan dengan penambahan ammonium sulfat.

2.7.3. Salting-Out

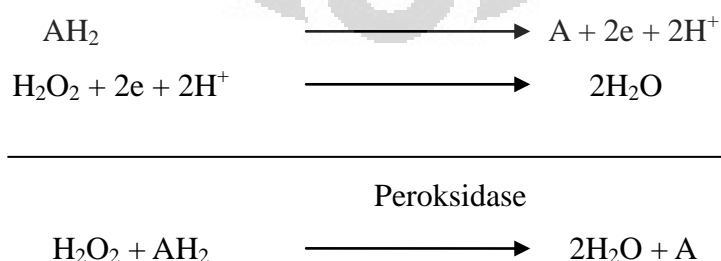
Molekul-molekul besar dan bermuatan umumnya sukar larut dalam air murni karena kekuatan ionnya rendah. Penambahan ion akan meningkatkan kelarutan dengan memencarkan muatan molekul besar tersebut (*salting-in*). Jika kekuatan ion dinaikkan terus maka molekul-molekul ini akan mengendap (*salting-out*). Hal ini terjadi karena pada konsentrasi ion yang tinggi terjadi persaingan antara solvasi pelarut terhadap molekul terlarut dan solvasi pelarut terhadap ion.

Karena ion-ion yang ditambahkan jauh mudah larut dibandingkan dengan molekul besar itu maka terjadi pengendapan molekul-molekul yang besar tersebut. Zat yang paling umum digunakan untuk *salting-in* atau *salting-out* terhadap larutan protein adalah ammonium sulfat. Garam ini sering dipilih karena murah, sangat mudah larut, mempunyai molaritas yang cukup tinggi yang dapat menyebabkan pengendapan bagi sebagian besar protein, mengurangi pertumbuhan bakteri, dan yang terpenting adalah sebagian besar enzim tidak rusak dengan adanya garam ini. Ammonium sulfat dapat mengendapkan hampir semua protein yang larut pada semua temperatur bahkan juga pada temperatur es yang mendekati titik beku air.

2.8. Enzim Peroksidase

Enzim peroksidase (EC 1.11.1.7) merupakan salah satu enzim yang termasuk ke dalam kelas enzim oksidoreduktase. Enzim ini mengkatalisis transfer atom H, atom O atau elektron dari satu substrat ke lainnya. Peroksidase merupakan protein yang mengandung “heme” yang dapat mengkatalisis reaksi oksidasi dari berbagai senyawa organik ataupun senyawa anorganik dengan adanya H_2O_2 sebagai akseptor elektron. Peroksidase sering digunakan untuk mengkatalisis senyawa-senyawa dari golongan fenol dan amina aromatik.

Enzim peroksidase dalam metabolisme tubuh makhluk hidup dan beberapa substrat lainnya berfungsi mempercepat konversi H_2O_2 yang bersifat racun menjadi molekul H_2O yang netral dengan adanya substrat yang bertindak sebagai donor hidrogen sehingga sel hidup tidak mengalami kerusakan. Persamaan reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut:



AH₂ adalah substrat yang bertindak sebagai donor elektron

Enzim peroksidase umumnya berada dalam sel hewan maupun tanaman. Pada tanaman, dapat ditemukan pada horseradish, kedelai, kentang, tomat, wortel, pisang, strawberry, dan lain-lain.

Dari hasil penelitian diketahui bahwa peroksidase memiliki peranan dalam proses lignifikasi, cross-linking struktur protein pada dinding sel, katabolisme auksin, dan pertahanan diri terhadap patogen (Hiraga et al., 2001).

Peroksidase pada tumbuhan mengandung dua ion kalsium (Ca²⁺) yang sangat penting untuk stabilitas struktural dan stabilitas termal dari enzim agar sama seperti aktivasi in vitro ketika analisis (Manu and Prasada Rao, 2009 and Sticher et al., 1981). Peroksidase secara luas digunakan pada laboratorium kesehatan dan industri sebagai aplikasi untuk konservasi lingkungan.

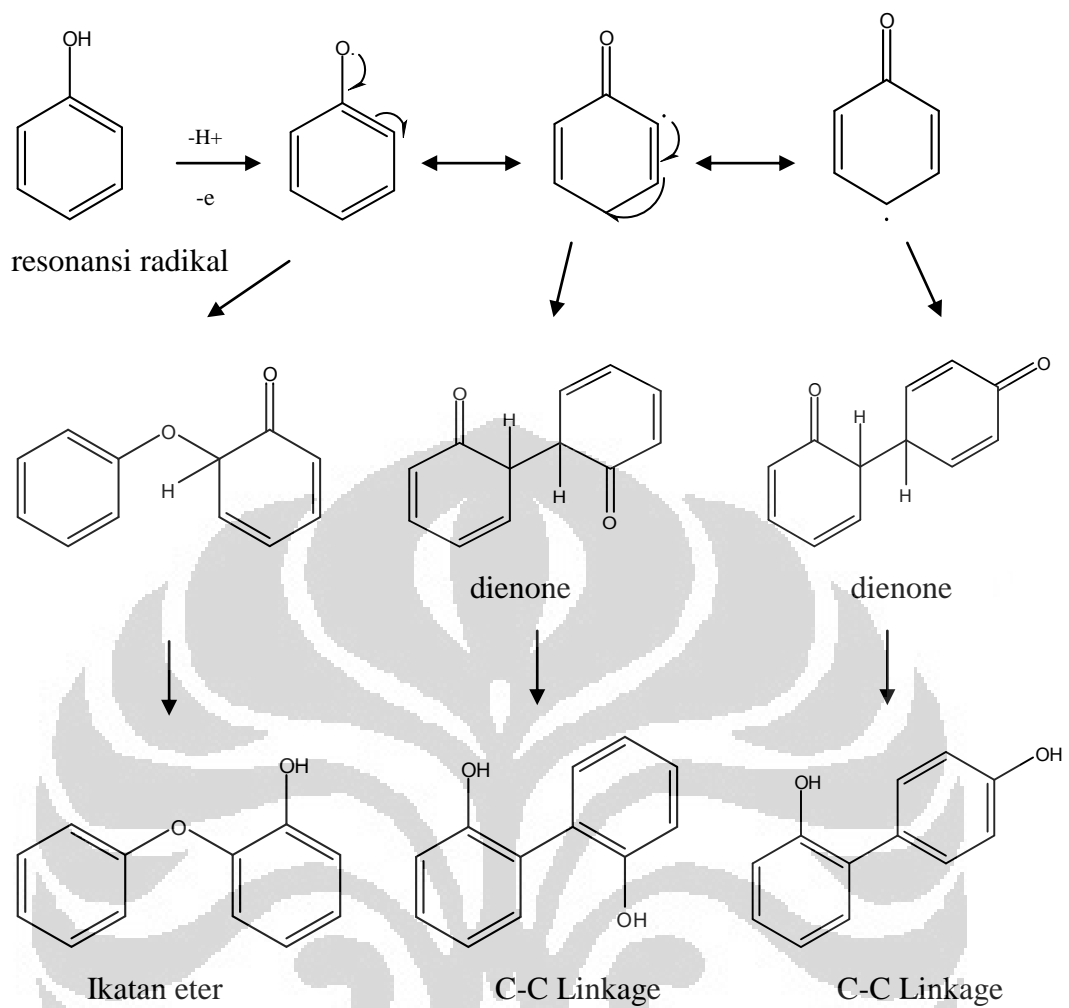
Enzim peroksidase dibagi menjadi tiga kelas berdasarkan sumber urutan asam amino dan didukung oleh bentuk struktur tiga dimensi dari masing-masing tipe enzim yaitu:

1. Enzim yang berasal dari *Yeast Cytochrom c Peroxidase (CCP)*, contohnya gen duplikat bakterial peroksidase
2. Enzim yang berasal dari fungi seperti *Lignin Peroxidase*
3. Enzim yang berasal dari tumbuhan seperti *Onion Peroxidase and Horseradish Peroxidase*

2.9. Reaksi Kopling Oksidatif Fenol

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

Reaksi yang dikatalisis oleh enzim peroksidase dengan adanya H₂O₂ akan menghasilkan produk radikal dimana radikal tersebut akan mengalami penggabungan dengan senyawa lain yang memiliki radikal. Intermediet radikal yang terbentuk lebih stabil pada atom C-8, C-5, dan atom O.



Gambar 2.5. Reaksi kopleng oksidatif senyawa fenolik

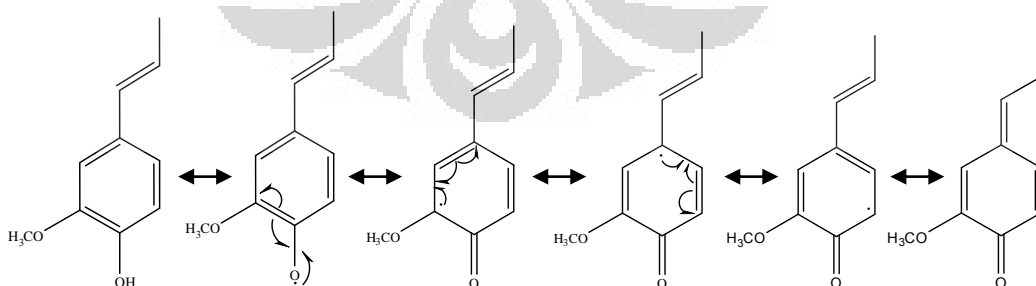
Hasil kopling radikal dapat membentuk dimer fenol baik pada posisi orto-orto maupun orto-para. Selain itu, juga terdapat kemungkinan penggabungan O-para, O-orto, dan O-O.

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

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

2.10. Reaksi Kopling Oksidatif Isoeugenol

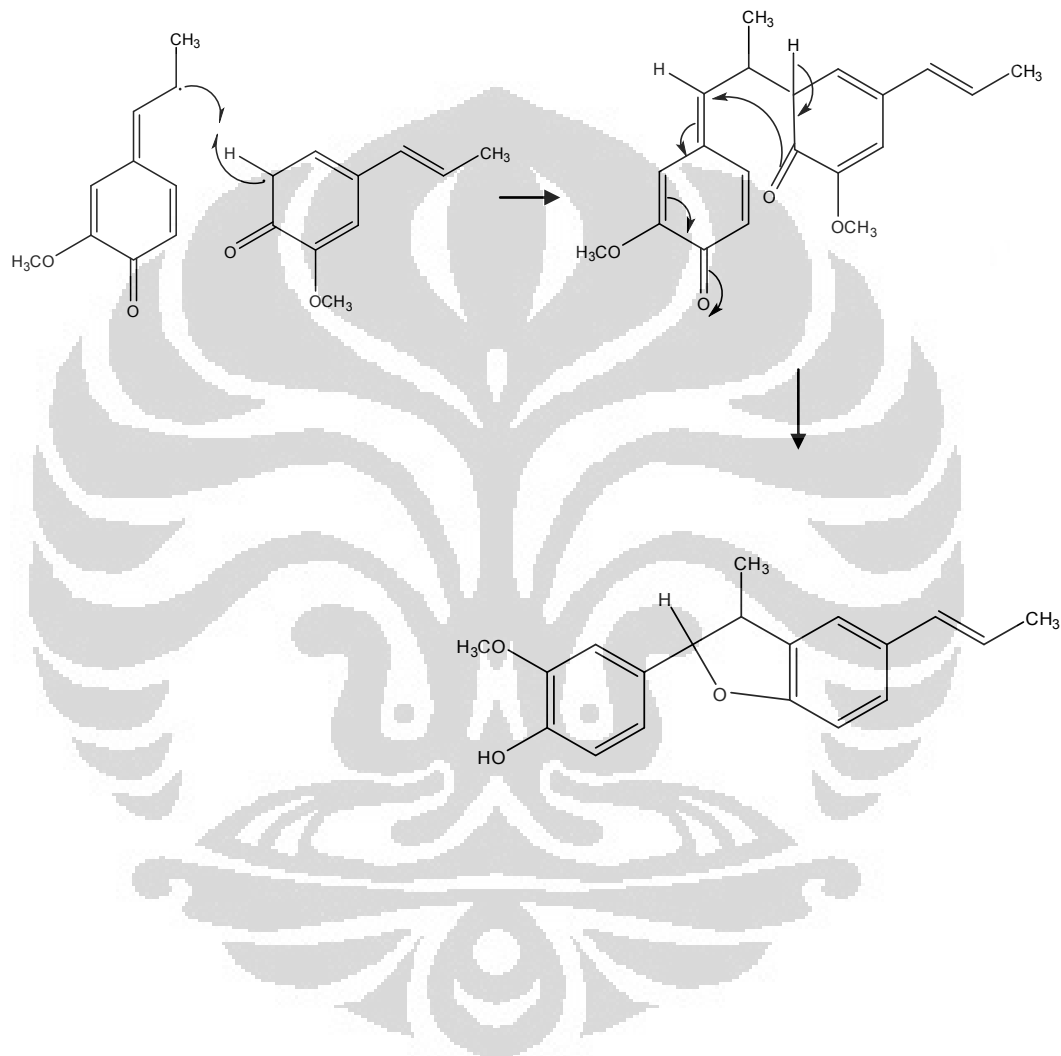
Reaksi yang dikatalisis dengan menggunakan enzim peroksidase dengan adanya H_2O_2 akan menghasilkan produk radikal dimana radikal tersebut akan mengalami penggabungan dengan senyawa lain yang memiliki radikal. Senyawa isoeugenol dapat mengalami proses kopling oksidatif yang sama dengan senyawa fenolik. Resonansi radikal dari isoeugenol dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



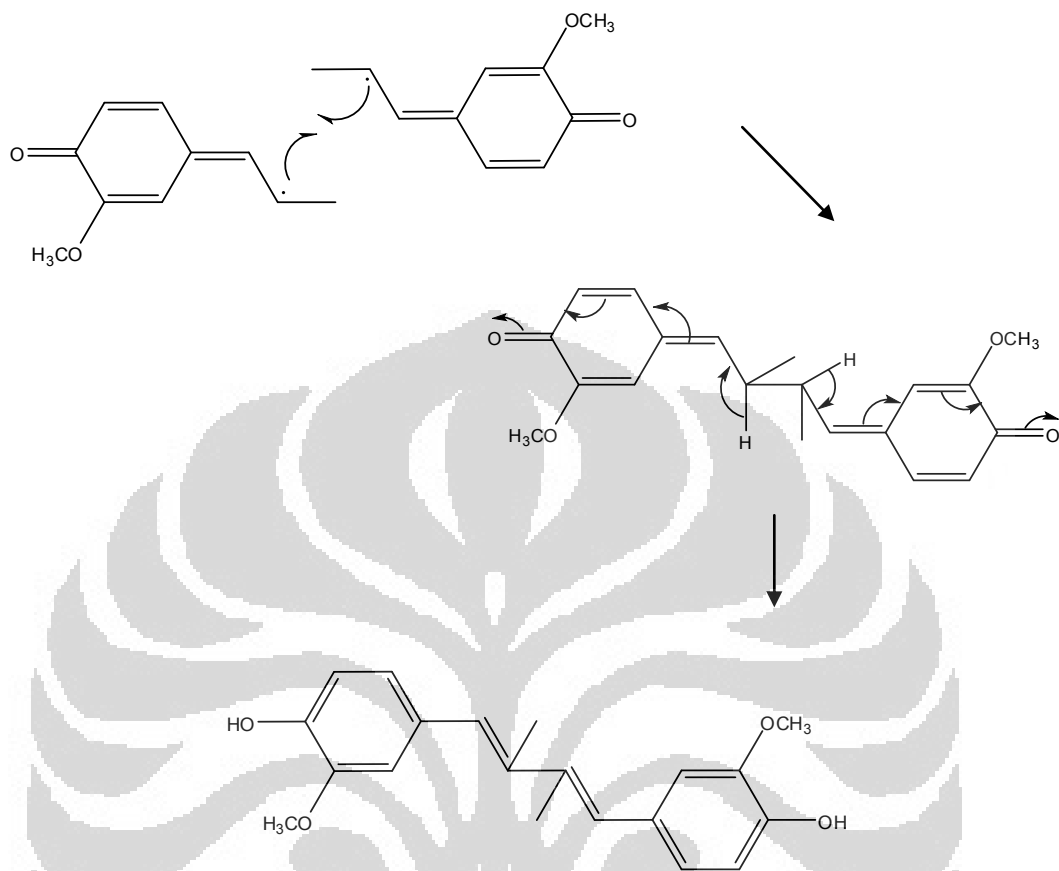
Gambar 2.6. Resonansi radikal isoeugenol

Dari kemampuan resonansi radikal isoegenol tersebut maka dapat diduga kemungkinan-kemungkinan kopling oksidatif yang dapat terbentuk antara sesama radikal fenoksi isoegenol. Kemungkinan dimer yang terbentuk dapat dilihat pada gambar di bawah ini.

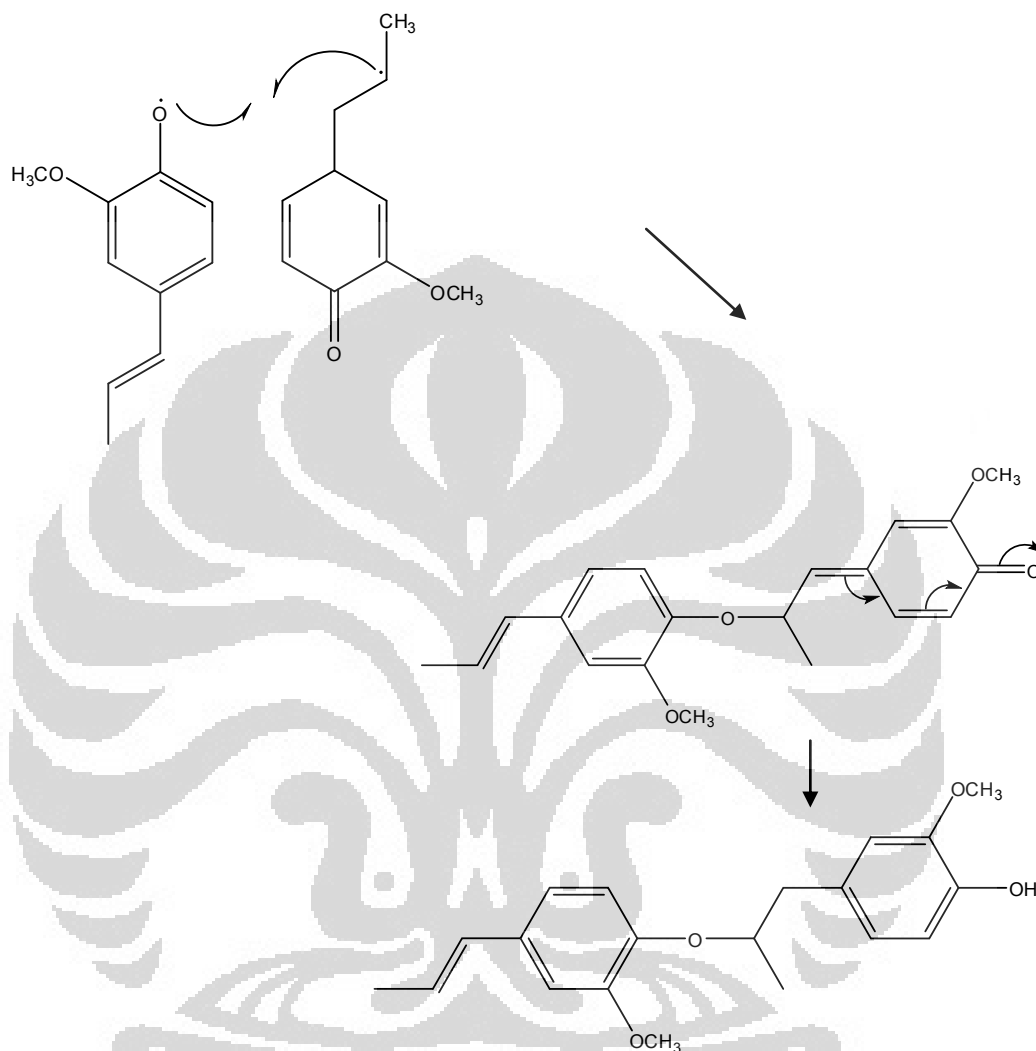
1. Penggabungan 8-5'



2. Penggabungan 8-8'



3. Penggabungan 8-O-4'



2.11. Analisis Hasil Reaksi

Senyawa dimer yang dihasilkan dari isoeugenol dapat diamati secara kualitatif dengan Kromatografi Lapis Tipis, UV-Vis dan LC-MS.

2.11.1. Analisis dengan UV-Vis

Spektrum yang UV dan cahaya tampak digunakan untuk mengidentifikasi suatu senyawa. Penyerapan sinar UV (200-400 nm) oleh suatu molekul akan menghasilkan transisi diantara tingkat energi elektronik molekul tersebut. Oleh

karena itu, serapan cahaya oleh sampel dalam daerah spektrum UV tergantung pada struktur elektronik dari senyawa tersebut. Panjang gelombang dari absorbansi maksimum adalah nilai karakteristik suatu serapan oleh senyawa sampel dinyatakan sebagai λ_{max} .

2.11.2. Analisis dengan LC-MS

Liquid Chromatography – mass spectroscopy adalah dua alat yang digabungkan menjadi satu, dimana berfungsi untuk memisahkan beberapa senyawa atau campuran senyawa berdasarkan kepolarannya dimana setelah campuran senyawa tersebut terpisah, maka senyawa yang murni tersebut akan diidentifikasi berat molekulnya.

2.11.3. Analisis dengan LC-MS

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

2.12. Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat spesies oksigen reaktif/spesies nitrogen reaktif (ROS/RNS) dan juga radikal bebas sehingga antioksidan dapat mencegah penyakit-penyakit yang dihubungkan dengan radikal bebas seperti karsinogenesis, kardiovaskuler dan penuaan. Antioksidan sintetik seperti BHA, (butil hidroksi anisol), BHT (butil hidroksi toluen), PG (propil

galat), dan TBHQ (*tert*-butil Hidrokuinon) dapat meningkatkan terjadinya karsinogenesis sehingga penggunaan antioksidan alami mengalami peningkatan. Beberapa studi epidemiologi menunjukkan bahwa peningkatan konsumsi antioksidan fenolik alami yang terdapat dalam buah, sayur mayur, dan tanaman serta produk-produknya mempunyai manfaat besar terhadap kesehatan yakni dapat mengurangi resiko terjadinya penyakit jantung koroner. Hal ini disebabkan karena adanya kandungan beberapa vitamin (A,C,E dan folat), serat, dan kandungan kimia lain seperti polifenol yang mampu menangkap radikal bebas. Senyawa-senyawa polifenol seperti flavonoid dan galat mampu menghambat reaksi oksidasi melalui mekanisme penangkapan radikal (*radical scavenging*) dengan cara menyumbangkan satu elektron pada elektron yang tidak berpasangan dalam radikal bebas sehingga banyaknya radikal bebas menjadi berkurang. Secara *in vitro*, flavonoid merupakan inhibitor yang kuat terhadap peroksidasi lipid, sebagai penangkap spesies oksigen atau nitrogen yang reaktif, dan juga mampu menghambat aktivitas enzim lipooksigenase dan siklooksigenase.

Berdasarkan mekanismenya, antioksidan dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu:

a. Antioksidan primer

Antioksidan primer mengikuti mekanisme pemutusan rantai reaksi radikal dengan mendonorkan atom hidrogen secara cepat pada suatu lipid yang radikal, produk yang dihasilkan lebih stabil dari produk inisial. Contoh antioksidan ini adalah flavonoid, tokoferol, senyawa thiol, yang dapat memutus rantai reaksi propagasi dengan menyumbang elektron pada peroksi radikal dalam asam lemak.

b. Antioksidan sekunder

Antioksidan ini dapat menghilangkan penginisiasi oksigen maupun nitrogen radikal atau bereaksi dengan komponen atau enzim yang menginisiasi 8 reaksi radikal antara lain dengan menghambat enzim pengoksidasi dan menginisiasi enzim pereduksi atau mereduksi oksigen tanpa membentuk spesies radikal yang reaktif. Contoh antioksidan sekunder: sulfid, vitamin C, betakaroten, asam urat, bilirubin, dan albumin.

Berdasarkan sumbernya, antioksidan dibagi dalam dua kelompok yaitu:

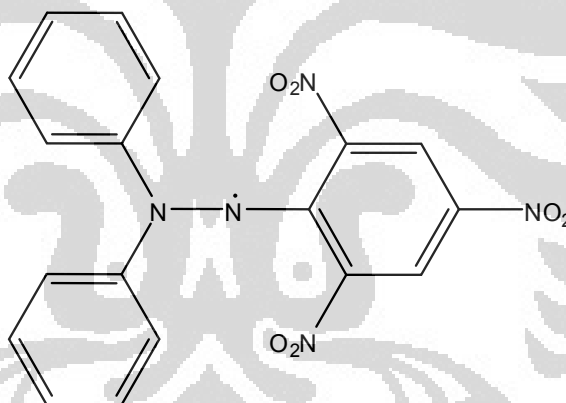
a. Antioksidan alami

Adalah antioksidan yang dihasilkan dari ekstrak tanaman. Senyawa antioksidan alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, coumarin, tokoferol, dan lainnya. Antioksidan alami dikenal lebih aman dibandingkan dengan antioksidan sintetis.

b. Antioksidan sintetis

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

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



Gambar 2.7. Senyawa DPPH

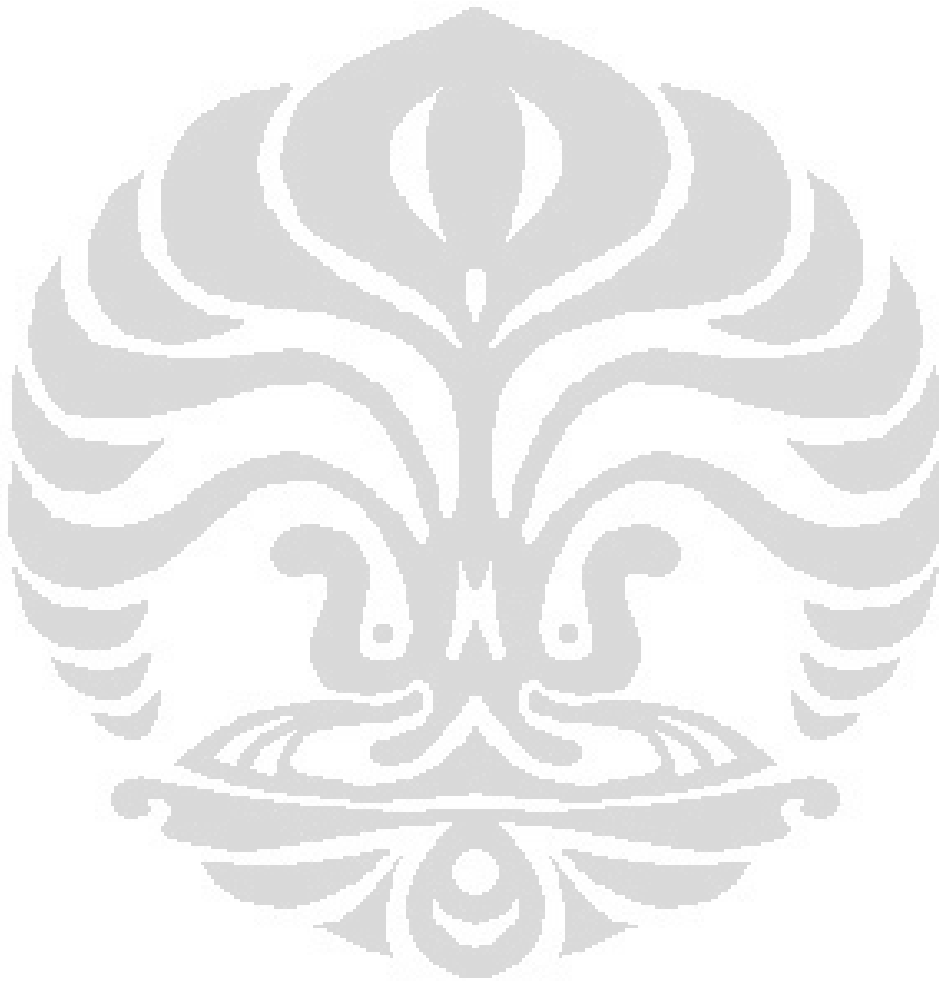
Metode DPPH ini didasarkan pada reduksi warna larutan DPPH dalam larutan metanol oleh penangkapan radikal bebas. Pengukuran penurunan absorbansi DPPH pada panjang gelombang maksimal (λ_{\max}) 517 nm sebanding dengan konsentrasi radikal bebas yang ditambahkan dalam larutan DPPH. Dari penurunan absorbansi itu dapat dihitung dengan % inhibisi atau % RSA dengan rumus :

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

Keterangan : A_o = Absorbansi DPPH larutan tanpa sampel (Absorbansi Kontrol)

A_b = Absorbansi DPPH dengan sampel

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



BAB III

Metodologi Penelitian

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai bulan September 2011 sampai bulan Mei 2012 di Laboratorium Penelitian Kimia FMIPA Universitas Indonesia.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah:

- Bawang Bombay
- Ammonium Sulfat
- Methanol, Sigma-Aldrich
- H₂O₂ 30%, Merck
- Ethanol, Sigma-Aldrich
- Ethyl Acetate, Merck
- Natrium Sulfat anhidrat, Sigma-Aldrich
- Air destilasi
- Asam Klorida 37%, Riedel-de-Haën
- FeCl₃. 6H₂O
- Asam sitrat monohidrat, Merck

3.2.2. Peralatan Penelitian

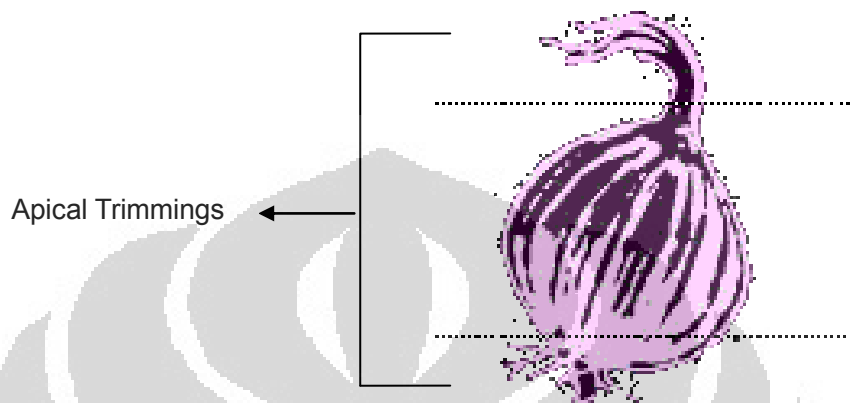
Peralatan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas yang ada di laboratorium kimia seperti labu, gelas kimia, gelas ukur, corong pisah, batang pengaduk, pipet tetes, termometer, stirer, magnetic bar. Sedangkan instrumentasi yang digunakan antara lain spektrofotometer UV-Vis

3.3. Cara Kerja

3.3.1. Isolasi Enzim Peroksidase Kasar dari Bawang Bombay

Sebanyak 250 gram potongan kulit bawang bombay yang terdiri dari *apical trimming* digunakan untuk mendapatkan ekstrak enzim peroksidase.

Kemudian bawang bombay tersebut diblender dalam larutan buffer Na-fosfat pH 7,0 pada suhu dingin (0-5°C) lalu disaring dengan kain katun. Filtrat yang diperoleh disentrifugasi selama 6 menit dengan kecepatan 3400 rpm. Supernatan yang diperoleh kemudian dilakukan pemurnian secara bertahap dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.



Gambar 3.1. Bawang bombay yang digunakan sebagai sumber enzim peroksidase

3.3.2. Pemurnian dengan Ammonium Sulfat

Ekstrak enzim kasar (supernatan) yang diperoleh dimurnikan dengan penambahan garam $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dengan tingkat kejenuhan berturut-turut 0-30%, 30-50%, dan 50-70% (b/v).

Ammonium sulfat yang ditambahkan ke dalam larutan dengan tingkat kejenuhan S1-S2% dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Jumlah } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ (gram)} = \frac{533 (S2-S1)}{100-0,3 S2} \times \frac{V \text{ supernatan (mL)}}{1000 \text{ mL}}$$

Supernatan dalam beaker glass yang dilengkapi dengan ice salt bath ditambahkan ammonium sulfat 0-30% sedikit demi sedikit pada suhu 0-5°C lalu diaduk selama 2 jam. Kemudian larutan dibiarkan mengendap selama 1 malam di lemari pendingin. Selanjutnya larutan disentrifugasi pada 3400 rpm selama 6 menit pada suhu ruang.

Hal yang sama juga dilakukan untuk penambahan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30-50% dan 50-70%. Pada penambahan garam dengan kejenuhan 50-70% endapan yang diperoleh melalui sentrifugasi kemudian disuspensikan dalam larutan buffer Na-

fosfat pH 7,0. Suspensi ini (enzim fraksi 3) lalu ditentukan aktivitas enzim dan kadar protein.

3.3.3. Penentuan Aktivitas Peroksidase

Substrat yang digunakan :

- Larutan H₂O₂ 0,0017 M dalam buffer Na-fosfat 0,2 M pH 7,0 :
1 mL larutan H₂O₂ 30% dilarutkan dengan air bidestilasi hingga volumenya 100 mL. Sebanyak 1 mL dari larutan ini dilarutkan ke dalam buffer Na-fosfat 0,2 M pH 7,0 hingga volumenya 50 mL.
- Larutan 4-aminoantipyrine 0,0025 M dalam fenol 0,17 M:
Sebanyak 810 mg fenol dilarutkan ke dalam 40 mL air bidestilasi lalu ditambahkan 25 mg 4-aminoantipyrine dan dilarutkan dengan air bidestilasi hingga volumenya 50 mL.

Langkah kerja :

1,4 mL larutan 4-aminoantipyrine dan 1,5 mL H₂O₂ 1,7 mM dicampur ke dalam tabung reaksi. Kemudian diambahkan 0,1 mL enzim dan dibiarkan bereaksi selama 1 menit. Reaksi dihentikan setelah 1 menit dengan memanaskan larutan tersebut ke dalam penangas air mendidih (100°C) selama 3 menit. Sebagai kontrol digunakan larutan blanko yaitu dengan mengganti larutan enzim dengan aquabides.

Pengukuran aktivitas dilakukan secara spektrofotometri pada λ 510 nm berdasarkan pembentukan produk dari substrat yang teroksidasi. Aktivitas spesifik enzim dihitung dengan menggunakan persamaan *Wortington Manual Enzyme* yang dimodifikasi :

$$\text{Aktivitas Spesifik} = \frac{\Delta A_{510}/\text{menit}}{6,58 \times \text{kadar protein} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)}$$

3.3.4. Penentuan Kadar Protein

Pereaksi Lowry yang digunakan:

- 2 g Na₂CO₃ dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1N
- 0,25 g CuSO₄.5H₂O dilarutkan dalam 50 mL K-Na Tartarat 1%
- Campuran 50 mL larutan A dan 1 mL larutan B
- Pereaksi Follin Ciocalteau 1N

Sebanyak 1 mL enzim direaksikan dengan 5 mL larutan C kemudian diaduk dan didiamkan selama 10 menit. Selanjutnya ke dalam campuran tadi ditambahkan 0,5 mL pereaksi follin ciocalteau, diaduk kembali dan didiamkan selama 30 menit. Absorbansi larutan diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ 750 nm.

Larutan standar yang digunakan adalah larutan BSA (Bovine Serum Albumin) dengan variasi konsentrasi 0,0625; 0,125; 0,2; 0,5; 0,75; 1 (mg/mL). Pada larutan blanko, larutan enzim diganti dengan air bidestilasi.

3.3.5. Optimasi Reaksi Kopling Oksidatif Isoeugenol yang dikatalisis Enzim

Peroksidase

- Penentuan perbandingan isoeugenol dan H_2O_2
Variasi perbandingan mol isoeugenol dan H_2O_2 yang digunakan adalah 1:0,25; 1:0,5; 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5; 1:6; 1:7; 1:8; 1:9
Sebanyak 0,5 gram isoeugenol dan H_2O_2 sesuai dengan perbandingan tertentu dimasukkan ke dalam labu bulat dua leher. Selanjutnya ditambahkan 0,5 mL enzim dan diaduk dengan menggunakan stirer. Reaksi berlangsung selama 30 menit dan temperatur dijaga agar tidak melebihi $35^\circ C$. Kemudian campuran diekstraksi dengan menggunakan etil asetat sehingga didapatkan fasa etil asetat dan fasa air. Fasa etil asetat hasil pemisahan dilakukan pengukuran dengan UV-Vis pada panjang gelombang 510 nm.
- Penentuan pH reaksi
Variasi pH yang digunakan adalah 2, 3, 4, 5, 6, 7, dan 8.
Ke dalam labu bulat dua leher dimasukkan isoeugenol dan H_2O_2 sesuai dengan perbandingan optimal dan ditambahkan dengan 0,5 mL enzim. Selanjutnya ditambahkan larutan buffer pada berbagai pH sebanyak 10 mL dan diaduk dengan menggunakan stirer. Reaksi berlangsung selama 30 menit dan temperatur dijaga agar tidak melebihi $35^\circ C$. Kemudian campuran diekstraksi dengan menggunakan etil asetat sehingga didapatkan fasa etil

asetat dan fasa air. Fasa etil asetat hasil pemisahan dilakukan pengukuran dengan UV-Vis pada panjang gelombang 510 nm.

- Penentuan jenis cosolvent

Variasi jenis cosolvent yang digunakan adalah aseton, etanol, metanol, dan etil asetat. Ke dalam labu bulat dua leher dimasukkan isoeugenol dan H₂O₂ sesuai dengan perbandingan optimal, 0,5 mL enzim, dan larutan buffer dengan pH reaksi optimal dan cosolvent, kemudian diaduk dengan menggunakan stirer. Reaksi berlangsung selama 30 menit dan temperatur dijaga agar tidak melebihi 35°C. Kemudian campuran diekstraksi dengan menggunakan etil asetat sehingga didapatkan fasa etil asetat dan fasa air. Fasa etil asetat hasil pemisahan dilakukan pengukuran dengan UV-Vis pada panjang gelombang 510 nm.

- Penentuan jumlah cosolvent

Variasi jumlah cosolvent yang digunakan adalah 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, dan 90%. Ke dalam labu bulat dua leher dimasukkan isoeugenol dan H₂O₂ sesuai dengan perbandingan optimal, 0,5 mL enzim, dan larutan buffer dengan pH reaksi optimal dan 10 mL cosolvent, kemudian diaduk dengan menggunakan stirer. Reaksi berlangsung selama 30 menit dan temperatur dijaga agar tidak melebihi 35°C. Kemudian campuran diekstraksi dengan menggunakan etil asetat sehingga didapatkan fasa etil asetat dan fasa air. Fasa etil asetat hasil pemisahan dilakukan pengukuran dengan UV-Vis pada panjang gelombang 510 nm.

3.3.6. Sintesis Dimer Isoeugenol Melalui Reaksi Kopling Oksidatif

Menggunakan Enzim Peroksidase pada Kondisi Optimum

Sebanyak 2,02 gram isoeugenol ditambahkan dengan 0,6 mL H₂O₂ 30% dalam gelas kimia kemudian direaksikan dengan 7 mL enzim, 40 mL buffer pH 3 dan 40 mL metanol 10%. Reaksi berlangsung selama 1 jam dengan menggunakan stirer dan suhunya dikontrol agar tidak melebihi 35°C. Keberhasilan reaksi diamati secara kualitatif dengan terjadinya perubahan warna reaksi. Setelah 1 jam

campuran hasil reaksi diekstraksi dengan menggunakan etil asetat dalam corong pisah. Fasa etil asetat dipisahkan dari fasa air, sisa air yang terdapat dalam fasa organik dihilangkan dengan menambahkan 5 gram Na₂SO₄ anhidrat. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan cara menguapkan pelarutnya dengan menggunakan rotary evaporator. Lalu senyawa yang diperoleh diidentifikasi dengan uji kromatografi lapis tipis (KLT) dan sebagai pembandingnya digunakan larutan isoeugenol dalam etil asetat, UV-Vis, serta LC-MS.

3.3.7. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Menggunakan DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

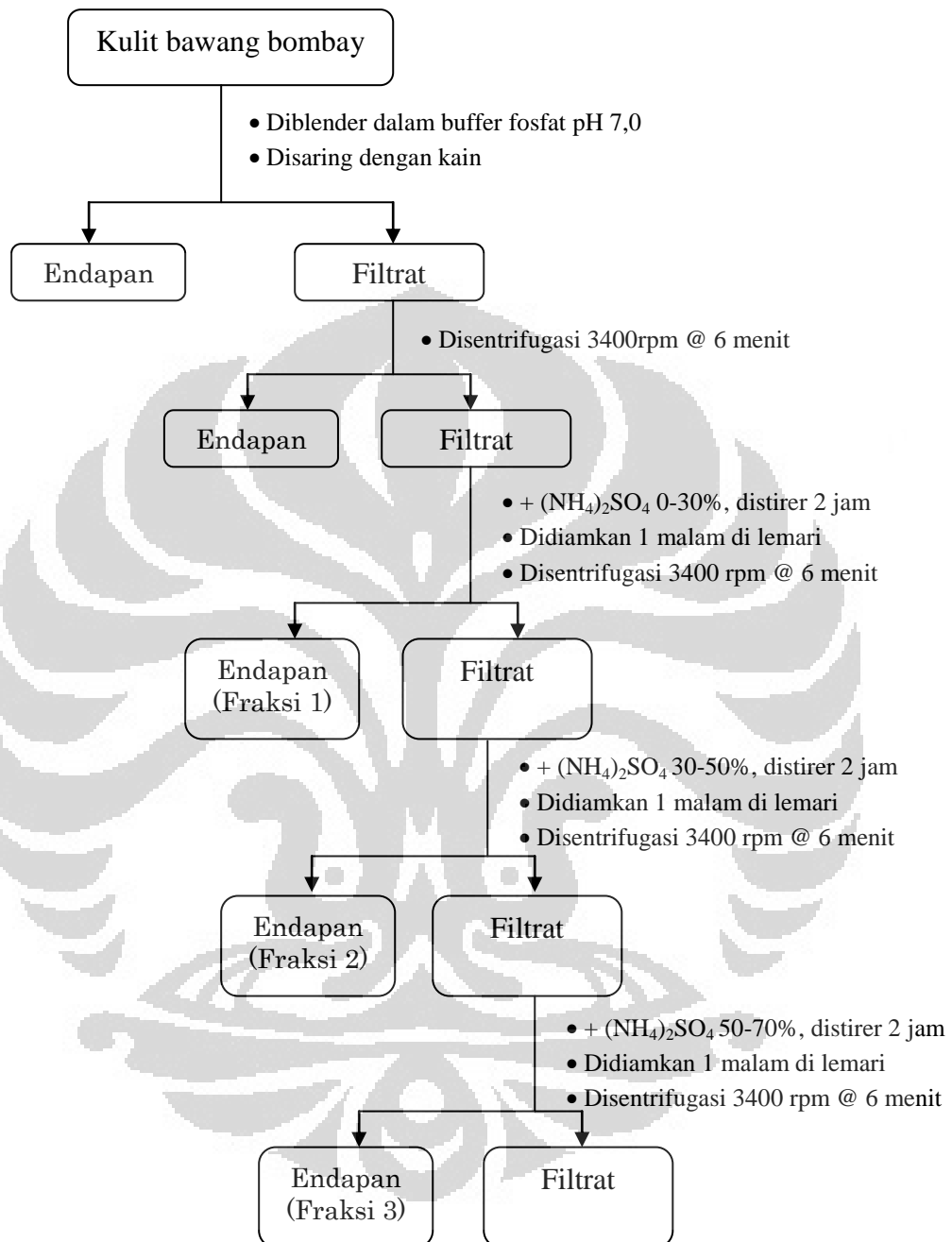
Pada uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan DPPH diperlukan persiapan terlebih dahulu sebelum dilakukan pengujian. Pada tahap persiapan yang perlu dilakukan adalah menguapkan sampel sehingga sampel bebas dari pelarut setelah sampel diuapkan, sampel dilarutkan dalam metanol sehingga diperoleh konsentrasi sampel 1000 ppm. Setelah diperoleh sampel dengan konsentrasi 1000 ppm, sampel diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi 100, 75, dan 50 ppm.

Setelah tahap persiapan selesai, tahap selanjutnya adalah tahap pengujian. 2 mL sampel dari setiap konsentrasi direaksikan dengan 1 mL DPPH, kemudian divortex dan didiamkan pada tempat gelap selama 30 menit. Lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Sedangkan untuk larutan kontrol digunakan 2 mL metanol. Persentase *radical scavenging activity* (daya antioksidan) dihitung dengan cara

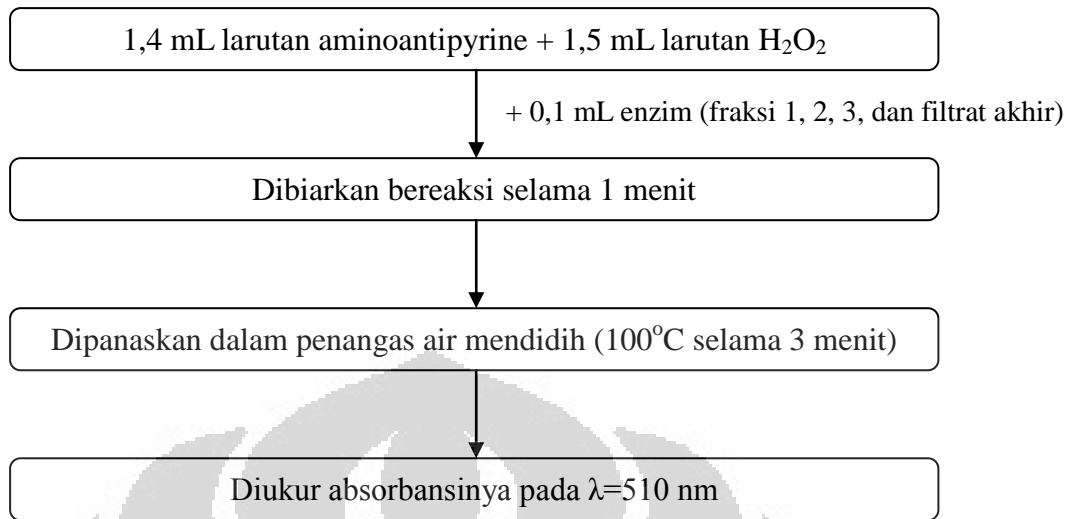
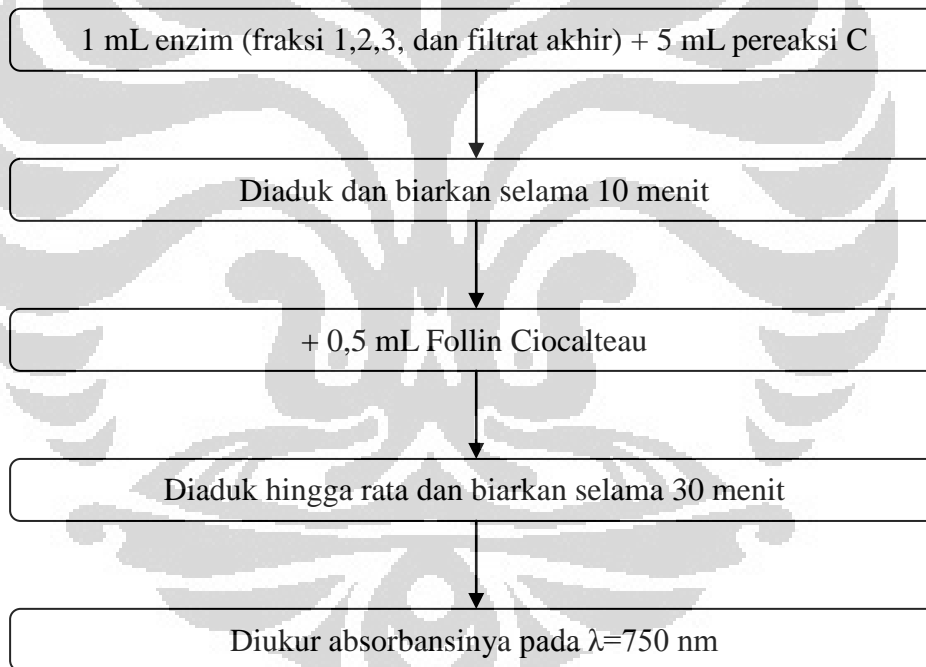
$$\% \text{ Radical Scavenging Activity} = \frac{\text{Abs kontrol} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs Kontrol}} \times 100 \%$$

BAGAN KERJA

A. Isolasi Enzim Peroksidase dari Kulit Bawang Bombay

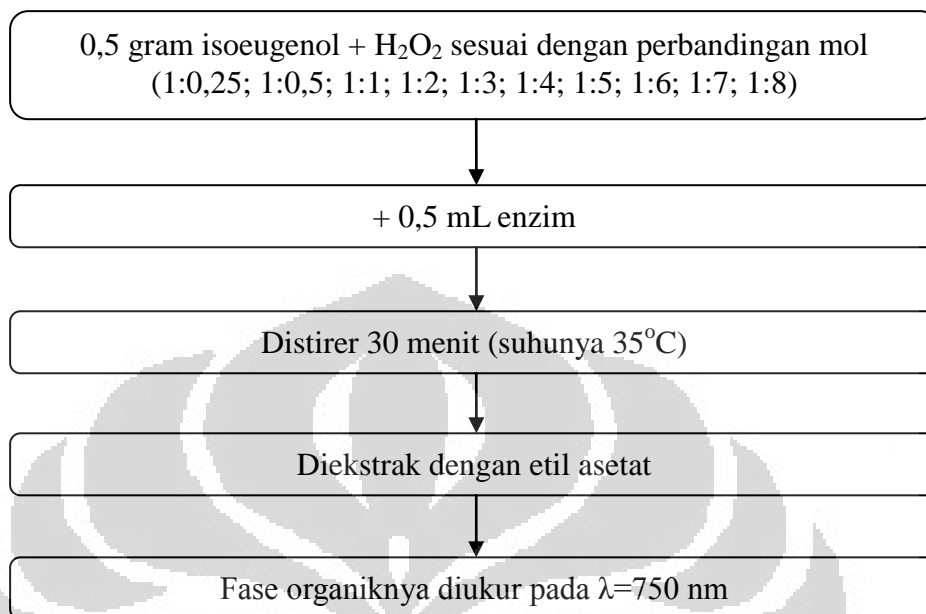


Fraksi 1, fraksi 2, dan fraksi 3 disuspensikan ke dalam larutan buffer Na-fosfat pH 7.

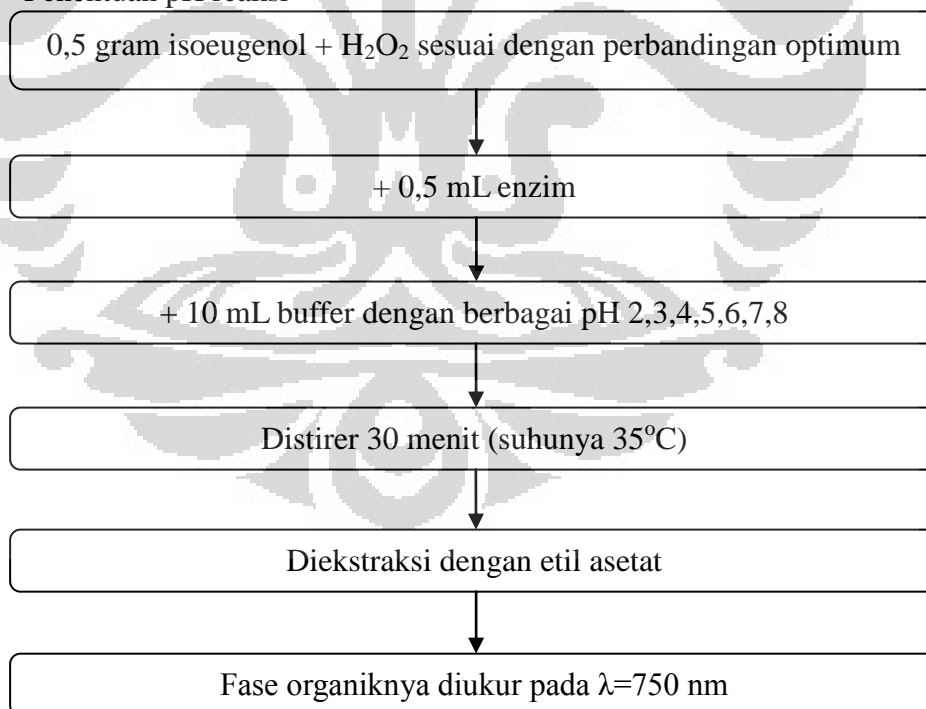
B. Penentuan Aktivitas Peroksidase**Kadar Protein Peroksidase**

C. Optimasi Reaksi Kopling Oksidatif Isoeugenol dengan Enzim Peroksidase

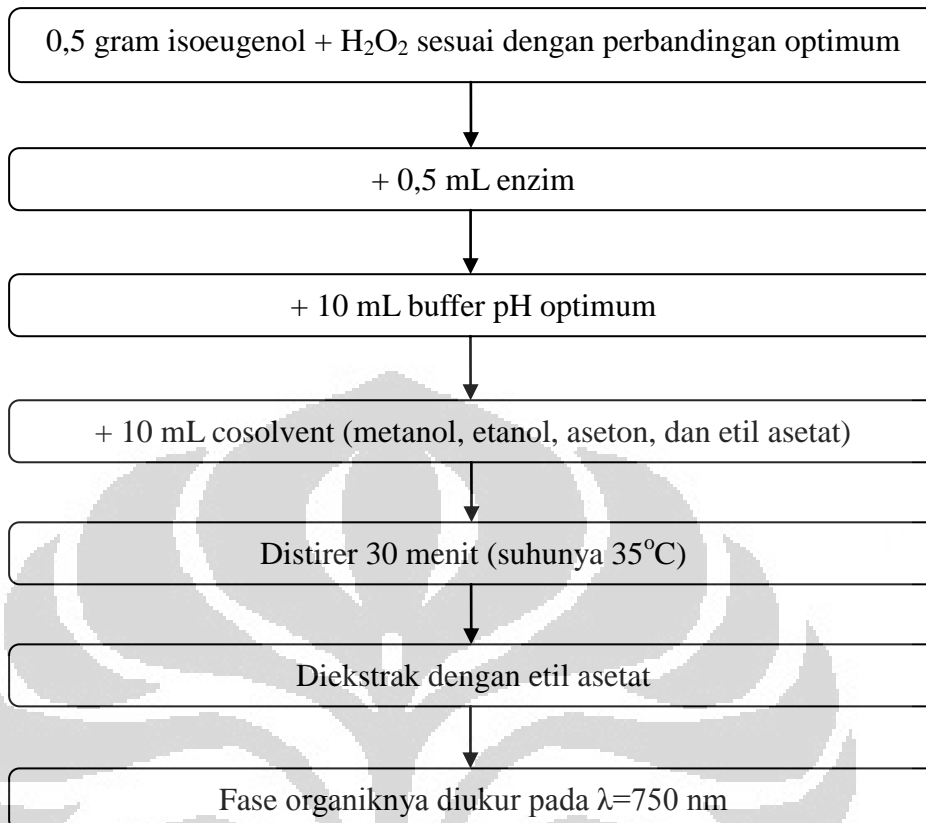
- Penentuan Perbandingan Isoeugenol dan H₂O₂



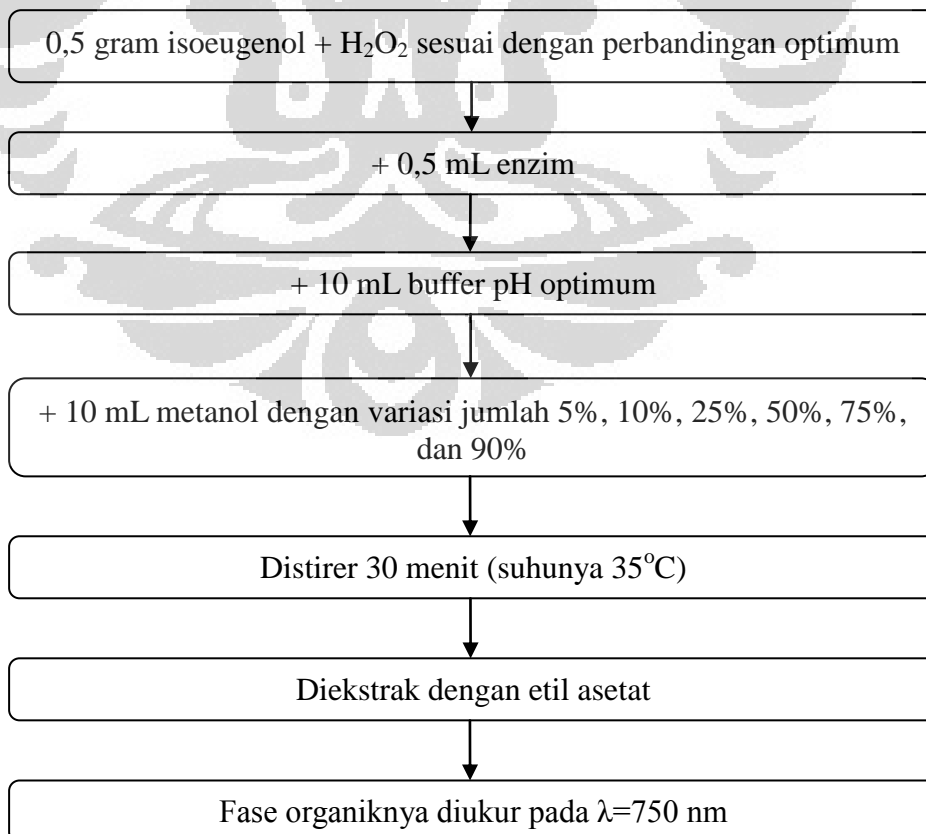
- Penentuan pH reaksi



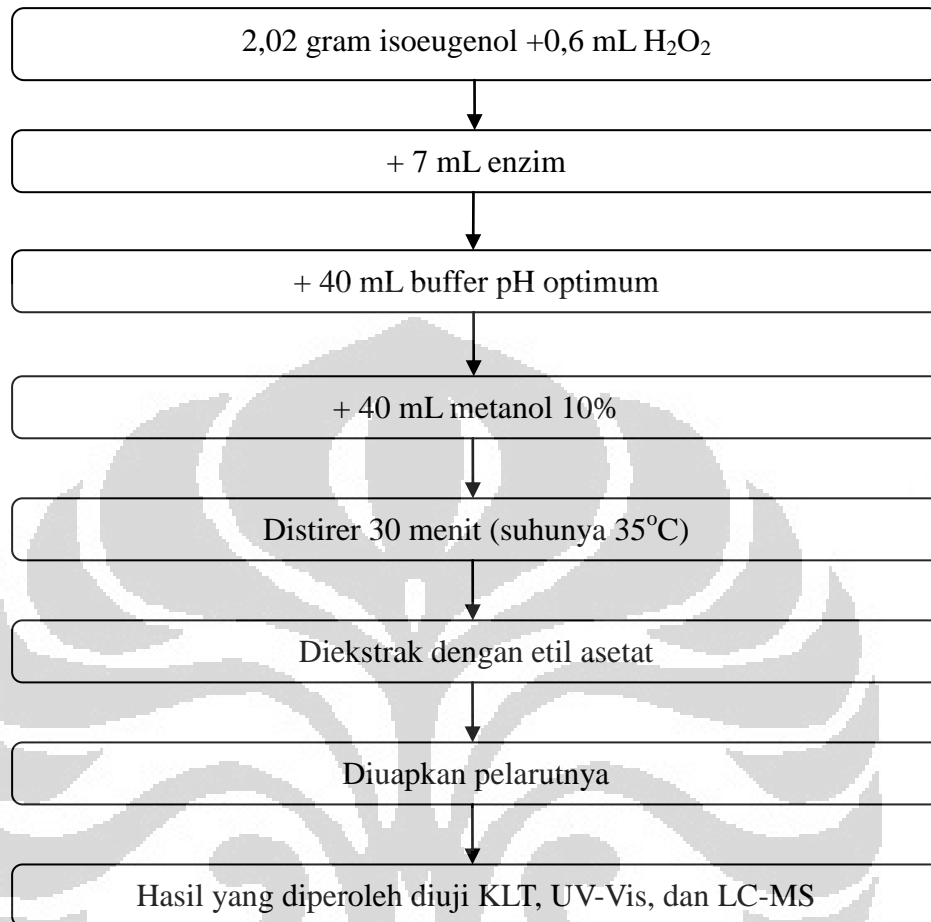
▪ Penentuan Jenis Cosolvent



▪ Penentuan Jumlah Cosolvent



D. Reaksi Dimerisasi Isoeugenol dengan Enzim Peroksidase pada Keadaan Optimal



E. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Menggunakan Metode DPPH

▪ Persiapan

Pembuatan Sampel 1000 ppm menggunakan pelarut metanol kemudian diencerkan menjadi 100, 75, dan 50 ppm serta pembuatan DPPH 0,2 mM dalam metanol

▪ Pengujian

2 mL sampel dari setiap konsentrasi + 1 mL DPPH 0,2 mM

- Dicampurkan
- Divortex
- Didiamkan di tempat gelap 30 menit

Campuran diukur absorbansi pada $\lambda = 517 \text{ nm}$

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Isolasi Enzim Peroksidase

Pada penelitian ini, enzim peroksidase diperoleh dari bawang bombay (*Allium cepa L.*). Bagian yang digunakan sebagai sumber enzim peroksidase adalah bagian kulit yang sudah tidak terpakai lagi. Hal ini sesuai dengan latar belakang dari penelitian yaitu ketersediaan enzim peroksidase dari materi sampah yang dapat digunakan untuk melakukan sintesis dimer isoeugenol.

Tahap pertama yang dilakukan pada isolasi enzim peroksidase adalah menghancurkan potongan kulit bawang bombay yang ditambahkan dengan larutan buffer Na-fosfat pH 7 dalam keadaan dingin dengan menggunakan blender. Hal ini dilakukan untuk memecah dinding sel kulit bawang bombay dan untuk mengekstrak peroksidase yang ada di dalam kulit bawang bombay. Penggunaan larutan buffer pH 7 dalam keadaan dingin dimaksudkan untuk mencegah terjadinya degradasi proteolitik oleh aktivitas enzim protease terhadap protein enzim yang akan diisolasi.

Homogenat yang diperoleh kemudian disaring dan disentrifugasi dengan kecepatan 3400 rpm selama 6 menit. Supernatan yang diperoleh selanjutnya disebut sebagai ekstrak enzim kasar.



Gambar 4.1. Ekstrak Kasar Enzim Peroksidase dari Kulit Bawang Bombay

Tahap selanjutnya adalah pemurnian melalui fraksinasi dengan menggunakan garam ammonium sulfat. Garam ini dipilih karena memiliki beberapa kelebihan yaitu kelarutannya tinggi, memiliki kemampuan pengendapan yang tinggi, dan memiliki efek denaturasi terhadap protein yang rendah. Penambahan garam ini bertujuan untuk mengendapkan enzim berdasarkan berat molekulnya. Protein enzim dengan berat molekul yang lebih besar akan terendapkan terlebih dahulu yang kemudian akan diikuti oleh protein enzim dengan berat molekul yang lebih rendah pada fraksi-fraksi berikutnya.

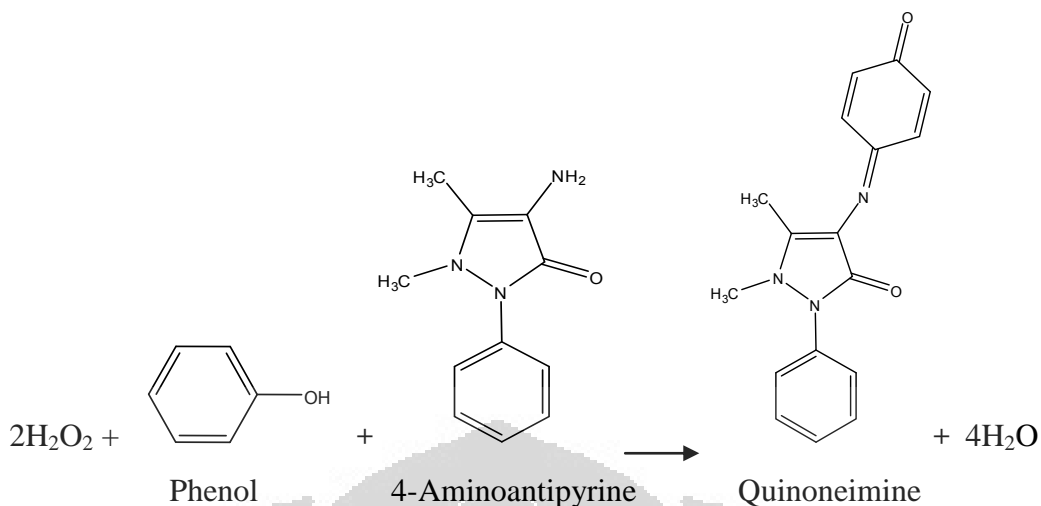
Penambahan ammonium sulfat dengan jumlah 0-30% akan dapat mengendapkan protein enzim dengan berat molekul yang besar. Dan penambahan ammonium sulfat dengan jumlah yang lebih banyak selanjutnya yaitu 30-50% dan 50-70% diharapkan dapat mengendapkan protein enzim dengan berat molekul yang lebih rendah. Sehingga dapat diperoleh enzim yang murni. Selanjutnya tiap endapan yang diperoleh dari setiap fraksi kemudian disuspensikan kembali dalam buffer Na-fosfat pH 7.



Gambar 4.2. Endapan Hasil Fraksinasi

4.2. Penentuan Aktivitas Peroksidase dan Kadar Protein

Setelah diperoleh endapan dari setiap fraksi yang disuspensikan dalam buffer Na-fosfat pH 7, setiap endapan ini diuji aktivitas enzim peroksidase dengan menggunakan H_2O_2 dan 4-aminoantipyrine dalam fenol. H_2O_2 merupakan oksidator kuat dan akan berikatan dengan enzim membentuk radikal hidroksi yang akan dilepaskan sebagai air. Reaksi ini dapat diamati karena akan menghasilkan perubahan warna merah karena terbentuknya quinoneimine. Dan reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut



Gambar 4.3. Reaksi Pembentukan Quinoneimine
(Kusnaningsih, 2011)

Selain dilakukan pengukuran aktivitas enzim peroksidase, endapan enzim peroksidase dari kulit bawang bombay juga dilakukan pengukuran terhadap kadar protein dengan menggunakan metode Lowry. Pengukuran ini didasarkan pada pembentukan warna biru pada larutan uji. Warna biru ini terjadi akibat adanya reaksi antara gugus-gugus aromatik yang terkandung dalam protein dengan campuran pereaksi CuSO_4 dengan follin ciocalteau. Larutan standar yang digunakan adalah larutan BSA (Bovine Serum Albumine) dengan berbagai konsentrasi. Dengan mengalurkan nilai absorbansi pada panjang gelombang 750 nm dengan konsentrasi larutan standar maka akan diperoleh kurva larutan standar yang dapat dilihat pada lampiran.

Dari hasil pengukuran aktivitas peroksidase, kadar protein, dan kurva larutan standar maka diperoleh data bahwa fraksi III (50-70%) memiliki aktivitas spesifik peroksidase tertinggi dengan nilai aktivitas spesifik 0,521 U/mg protein seperti yang terlihat pada tabel di bawah ini.

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

Tahap	Sampel	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)
Fraksionasi dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	• Fraksi I (0-30%)	0,1335	0,181
	• Fraksi II (30-50%)	0,0848	0,244
	• Fraksi III (50-70%)	0,0362	0,521
	• Filtrat Akhir	0,0159	0,124

Aktivitas spesifik enzim didefinisikan sebagai jumlah unit enzim per mg protein maka berdasarkan definisi tersebut, aktivitas spesifik enzim menunjukkan kemurnian suatu enzim. Semakin besar nilai aktivitas spesifik enzim maka semakin tinggi tingkat kemurnian suatu enzim.

Aktivitas spesifik enzim peroksidase yang berasal dari bawang bombay ini hanya menunjukkan nilai 0,521 U/mg. Angka ini lebih kecil jika dibandingkan dengan aktivitas spesifik enzim peroksidase yang berasal dari tanaman lain seperti dapat dilihat pada tabel di bawah ini

Tabel 4.2. Aktivitas spesifik peroksidase *Raphanus Sativa L.* Oleh Kusnaningsih

Tahap	Sampel	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)
Fraksionasi dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	• Fraksi I (0-30%)	5,46775	0,7737
	• Fraksi II (30-50%)	4,86925	5,9065
	• Fraksi III (50-70%)	1,62700	14,7434
	• Filtrat Akhir	0,61575	1,7385

Tabel 4.3. Aktivitas spesifik peroksidase brokoli oleh Idoh

Tahap	Sampel	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)
Fraksionasi dengan (NH ₄) ₂ SO ₄	• Fraksi I (0-30%)	0,18	0,50
	• Fraksi II (30-50%)	0,16	1,40
	• Fraksi III (50-70%)	0,11	2,25
	• Filtrat Akhir	0,13	0,06

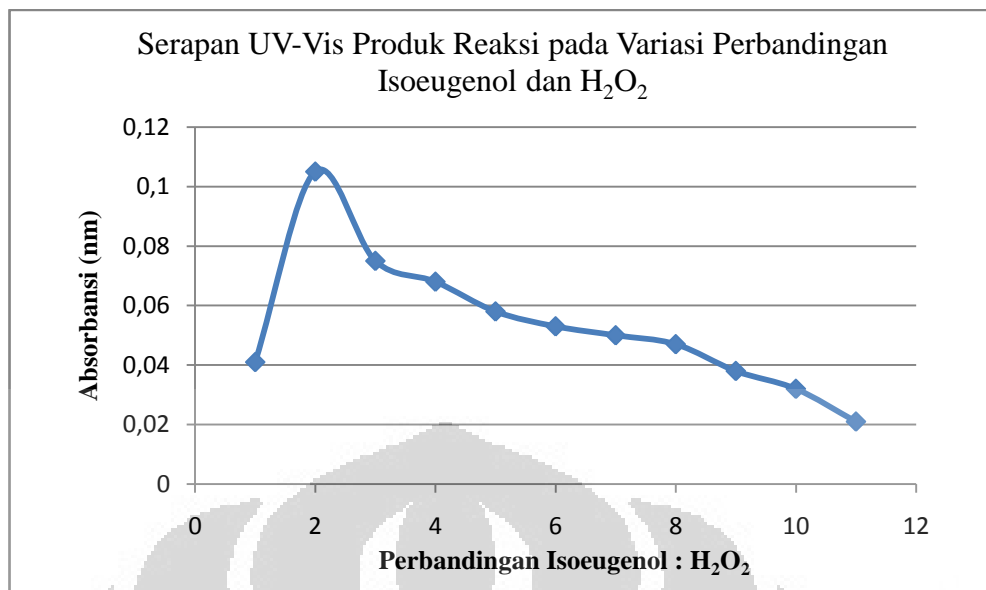
Nilai yang kecil untuk aktivitas spesifik enzim peroksidase dari kulit bawang bombay dapat disebabkan karena enzim peroksidase yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari kulit bawang bombay yang merupakan sampah. Sehingga kandungan materi organiknya lebih kecil dibandingkan dengan yang lain.

4.3. Optimasi Enzim Peroksidase

Reaksi dimerisasi isoeugenol dengan menggunakan enzim peroksidase yang berasal dari kulit bawang bombay melalui reaksi kopling oksidatif dipengaruhi oleh beberapa faktor. Untuk mendapatkan produk yang optimal maka pada penelitian ini dilakukan pengujian reaksi terhadap pengaruh perbandingan jumlah isoeugenol dan H₂O₂, pH, jenis pelarut (cosolvent), dan jumlah pelarut (cosolvent).

4.3.1. Optimasi perbandingan jumlah isoeugenol dan H₂O₂

Pembentukan dimer isoeugenol melalui reaksi kopling oksidatif dengan berbagai perbandingan jumlah isoeugenol dengan H₂O₂ dengan bantuan katalis enzim peroksidase kulit bawang bombay menghasilkan larutan berwarna kuning dan kemudian diekstraksi dengan etil asetat. Fase etil asetat yang diperoleh kemudian diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 510 nm. Hasil pengukuran dapat dilihat pada gambar di bawah ini



Gambar 4.4. Grafik Serapan UV-Vis Produk Reaksi pada Variasi Perbandingan Isoeugenol dan H₂O₂

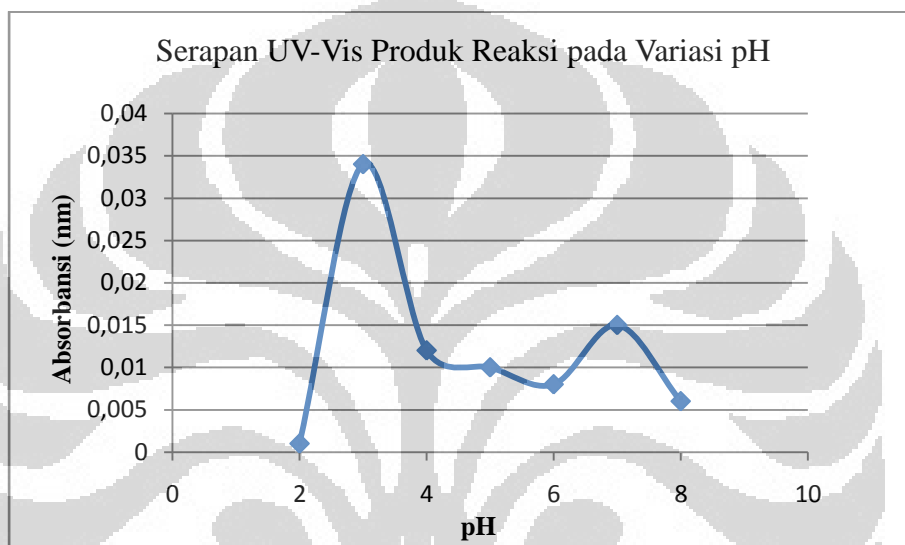
Dari hasil pengukuran dengan UV-Vis menunjukkan bahwa pada perbandingan 1: 0,5 absorbansi maksimum. Hal ini berkaitan dengan laju reaksi pembentukan produk akan optimal pada perbandingan jumlah isoeugenol dan H₂O₂ 1: 0,5. Dan hal ini menunjukkan telah terbentuk kompleks enzim substrat. Selanjutnya pembentukan produk semakin berkurang yang ditandai dengan terjadinya penurunan absorbansi dengan semakin meningkatnya perbandingan jumlah isoeugenol dengan H₂O₂. Pada kondisi ini tidak ada lagi enzim bebas sehingga penambahan H₂O₂ tidak akan meningkatkan laju reaksi.

Pengukuran perbandingan mol antara isoeugenol dan H₂O₂ ini bertujuan untuk mencari jumlah H₂O₂ yang sesuai karena H₂O₂ ini berfungsi sebagai oksidator dalam reaksi kopling oksidatif isoeugenol. Sehingga dapat dihasilkan produk dimer isoeugenol dengan jumlah optimum. Dari hasil grafik serapan UV-Vis di atas dapat dilihat bahwa setelah mencapai perbandingan 1:0,5 nilai absorbansi mengalami penurunan. Penurunan ini menunjukkan bahwa semakin banyak jumlah H₂O₂ yang ditambahkan tidak akan menaikkan jumlah produk dimer isoeugenol melainkan akan menyebabkan efek inhibitor pada reaksi kopling oksidatif isoeugenol.

4.3.2. Optimasi pH reaksi

Salah satu faktor yang mempengaruhi reaksi kopling oksidatif dengan enzim adalah pH. pH yang digunakan sangat bergantung pada substrat yang mengalami reaksi kopling oksidatif. Tingkat keasaman (pH) akan menentukan produk reaksi yang dihasilkan dalam bentuk dimer, trimer, oligomer, atau bahkan polimer.

Hasil pengukuran UV-Vis dari sintesis reaksi kopling oksidatif dengan menggunakan perbandingan jumlah isoeugenol dan H_2O_2 1: 0,5 dengan berbagai pH dapat dilihat pada gambar di bawah ini

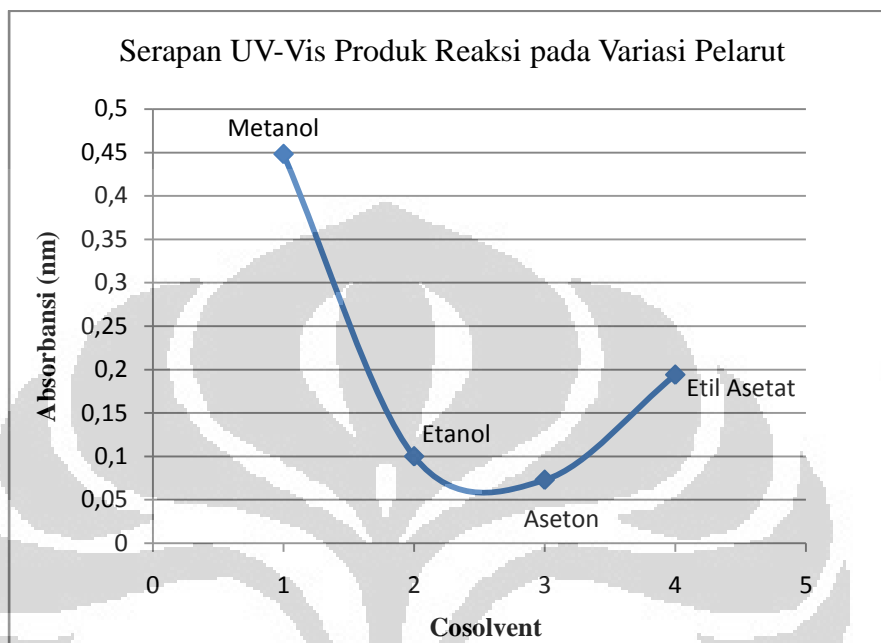


Gambar 4.5. Grafik Serapan UV-Vis Produk Reaksi pada Variasi pH

Dari hasil grafik serapan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 510 nm, menunjukkan absorbansi tertinggi pada pH 3,0. Sintesis dimer senyawa fenolik berlangsung dalam kondisi asam (pH 3-4), hal ini disebabkan oleh intermediet radikal fenoksi yang dihasilkan akan lebih stabil pada kondisi asam (Ayman El Agha dkk, 2008). Sedangkan pembentukan trimer, tetramer, ataupun polimer lainnya akan berlangsung pada pH netral. (Antoniotti, Sylvain dalam Muryeti. 2011). Selain itu, pembentukan dimer pada pH netral akan menghasilkan rendemen (*yield*) yang rendah (Brunow dalam Muryeti. 2011). Oleh karena itu dalam penelitian ini, pH reaksi yang digunakan dalam reaksi sintesis dimer isoeugenol berlangsung pada pH 3,0.

4.3.3. Optimasi jenis cosolvent

Hasil pengukuran UV-Vis produk reaksi kopling oksidatif isoeugenol dengan berbagai jenis *cosolvent* pada panjang gelombang 510 nm dapat dilihat pada gambar di bawah ini



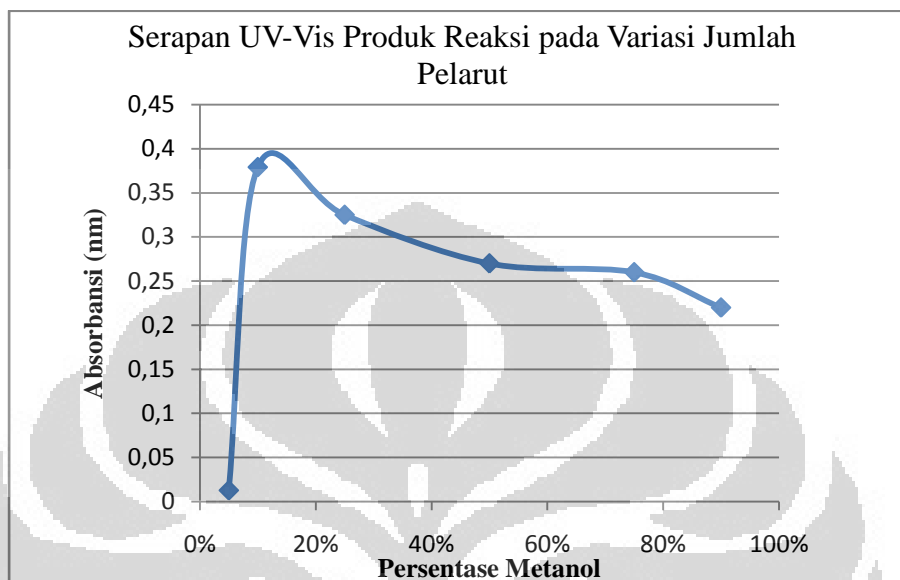
Gambar 4.6. Grafik Serapan UV-Vis Produk Reaksi pada Variasi Pelarut

Dari hasil pengukuran spektrofotometer, diperoleh nilai absorbansi tertinggi pada saat penggunaan metanol sebagai pelarut jika dibandingkan dengan pelarut lainnya yaitu etanol, aseton, dan etil asetat. Penggunaan *cosolvent* pelarut organik mempengaruhi struktur dari enzim peroksidase tapi tidak mengakibatkan rusaknya struktur sekunder dan sisi aktif enzim (Palmer, Trevor, 1991). Penggunaan *cosolvent* dalam reaksi kopling oksidatif tergantung dari jenis substrat yang digunakan.

Penggunaan *cosolvent* memiliki peranan dalam reaktivitas intermediet radikal fenoksi yang dihasilkan. *Cosolvent* ini akan menstabilkan intermediet radikal fenoksi yang dihasilkan. Sehingga kemungkinan terbentuknya dimer akan lebih besar.

4.3.4. Optimasi jumlah cosolvent

Hasil pengujian pengaruh jumlah *cosolvent* dengan menggunakan UV-Vis pada panjang gelombang 510 nm dapat dilihat pada gambar di bawah ini



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

Pada gambar di atas dapat dilihat bahwa absorbansi produk akan meningkat dengan bertambahnya % jumlah metanol dan mencapai absorbansi maksimum pada penambahan 10% metanol. Hal ini menunjukkan bahwa laju reaksi akan meningkat dan mencapai keadaan optimal pada penambahan 10% metanol. Kandungan air yang lebih banyak pada 10% metanol diperlukan oleh enzim peroksidase untuk mempertahankan konformasi strukturnya dan meningkatkan aktivitas katalitiknya. Pada penambahan metanol dengan konsentrasi lebih besar dari 10% akan menurunkan nilai absorbansi produk. Hal ini disebabkan karena penambahan metanol di atas 10% akan mengurangi kandungan air yang akan berpengaruh pada turunnya aktivitas enzim sehingga mengakibatkan jumlah produk yang terbentuk akan berkurang. Dan pada penambahan metanol 90% diperoleh nilai absorbansi produk terkecil. Hal ini menunjukkan kemungkinan enzim peroksidase akan mengalami perubahan struktur atau terdenaturasi sehingga aktivitas enzim akan turun atau hilang sama sekali.

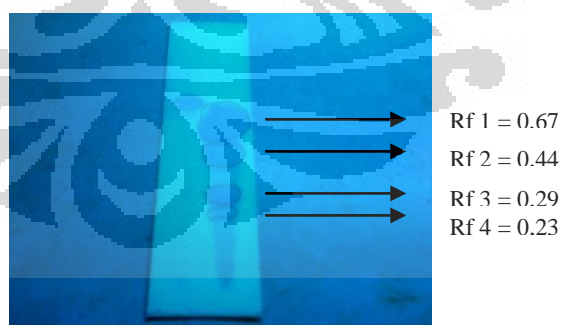
4.4. Reaksi Dimerisasi Isoeugenol dengan Enzim Peroksidase

Reaksi dimerisasi dilakukan dengan menimbang senyawa isoeugenol kemudian dicampurkan dengan metanol dan larutan buffer Na-fosfat pH 3 lalu distirer selama 30 menit. Hasil reaksi yang diperoleh berupa larutan kuning dan diekstraksi dengan etil asetat 50 mL menggunakan corong pisah sehingga diperoleh dua fasa yaitu fasa air dan fasa etil asetat. Kemudian fasa etil asetat dipisahkan diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator sehingga diperoleh larutan kental berwarna kuning kecoklatan.



Gambar 4.8. Reaksi sintesis senyawa dimer isoeugenol

Untuk mengetahui jumlah komponen yang terdapat dalam senyawa hasil reaksi maka dilakukan pengamatan melalui kromatografi lapis tipis dengan menggunakan larutan pengembang n-heksana : etil asetat = 1:1. Hasil pengujian KLT dapat dilihat pada gambar di bawah ini



Gambar 4.9. Hasil KLT produk dimerisasi isoeugenol

Hasil KLT menunjukkan adanya 4 spot dengan $Rf_1 = 0,67$. Spot pada Rf_1 diduga merupakan isoeugenol sedangkan spot pada Rf_2 , Rf_3 , Rf_4 merupakan

produk reaksi yang dihasilkan.

4.5. Analisis Senyawa Hasil Reaksi Dimerisasi Isoeugenol dengan Menggunakan Instrumentasi

Selanjutnya produk sintesis dimerisasi isoeugenol diidentifikasi lebih lanjut dengan menggunakan UV-Vis dan LC-MS.

4.5.1. Analisis dengan Spektrofotometer UV-Vis

Hasil pengukuran dengan menggunakan UV-Vis senyawa dimer isoeugenol dapat dilihat pada tabel di bawah ini

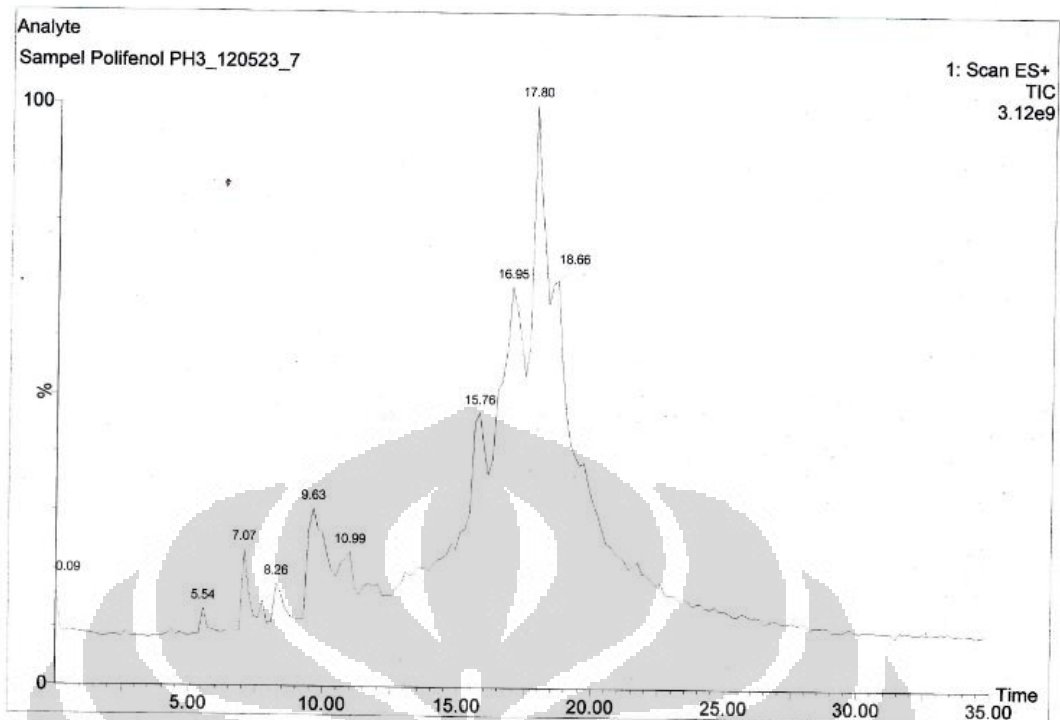
Tabel 4.4 . Perbandingan λ_{\max} pada Spektrum UV-Vis Isoeugenol dan Produk Reaksi

Senyawa	λ_{\max}
Trans Isoeugenol	318 nm
Hasil Reaksi	321 nm

Dari hasil spektrum UV-Vis senyawa trans isoeugenol memiliki panjang gelombang maksimum 318 nm. Sedangkan senyawa hasil reaksi memiliki panjang gelombang 321 nm. Adanya pergeseran panjang gelombang ini membuktikan telah terbentuknya senyawa baru. Pergeseran panjang gelombang ke arah yang lebih panjang (efek batokromik) tersebut dihasilkan oleh terbentuknya gugus kromofor baru pada senyawa hasil reaksi.

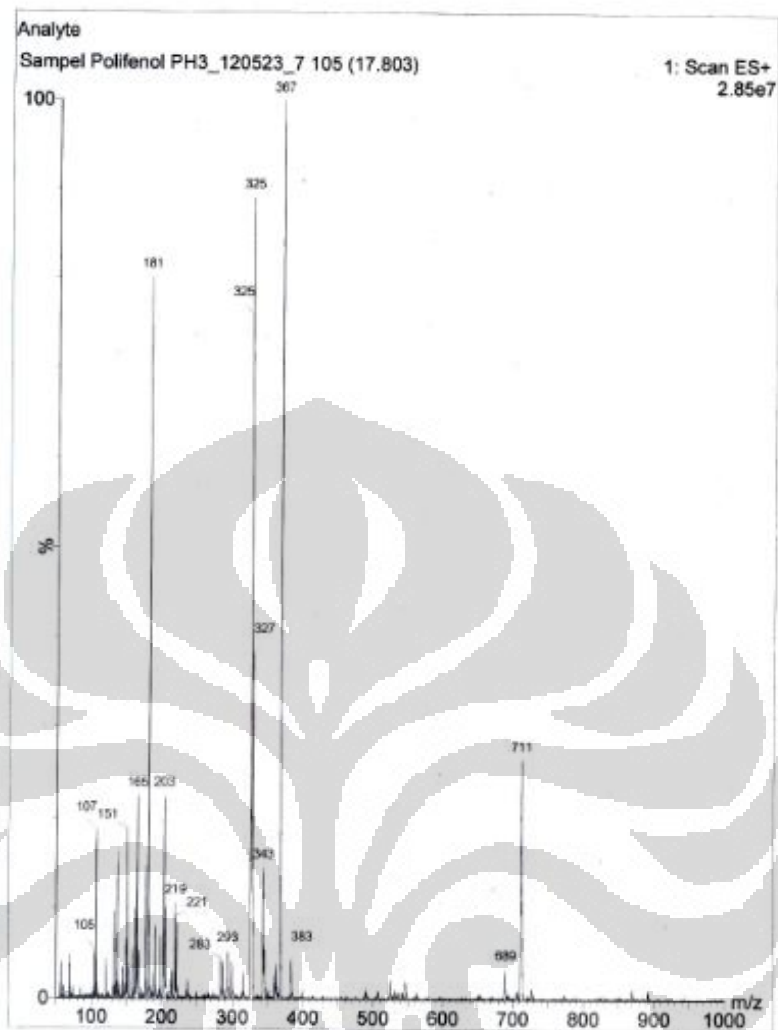
4.5.2. Analisis dengan Menggunakan Liquid Chromatography Mass Spectroscopy (LC-MS)

Hasil kromatogram LC-MS dari senyawa produk dimer isoeugenol dapat dilihat pada gambar di bawah ini



Gambar 4.10. Kromatogram LC-MS senyawa dimer isoeugenol

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

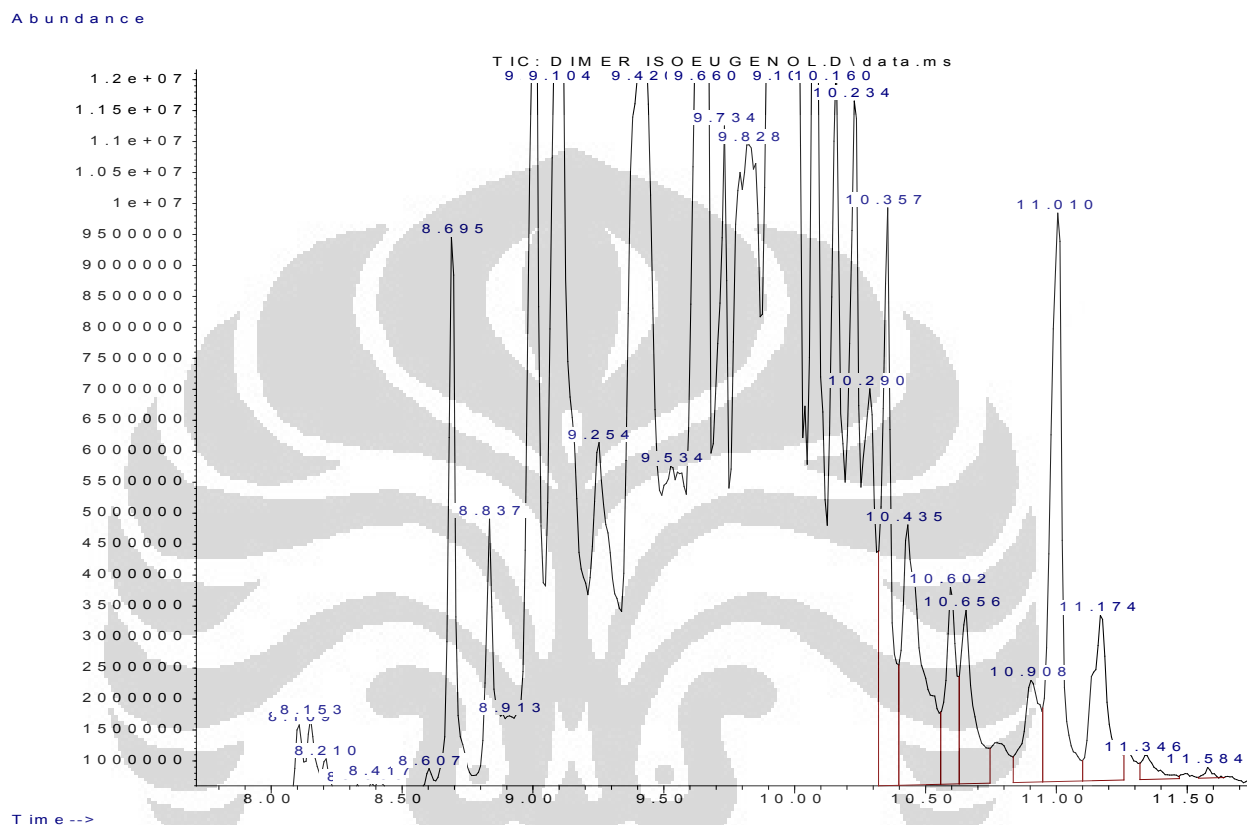


Gambar 4.11. LC-MS Senyawa Dimer Isoeugenol

Berdasarkan analisis dengan LC-MS tersebut dapat dilihat bahwa terdapat puncak yang memiliki berat molekul 327 yang merupakan $M+H = 327$, sehingga $M = 327 - H = 327 - 1 = 326$. Dengan Mr 326 ini dapat diketahui bahwa telah terbentuk kopling antara 2 molekul isoeugenol (Mr = 164) yang masing-masing kehilangan 1 atom H dengan perhitungan = 2×164 (berat molekul isoeugenol) - $2H = 326$.

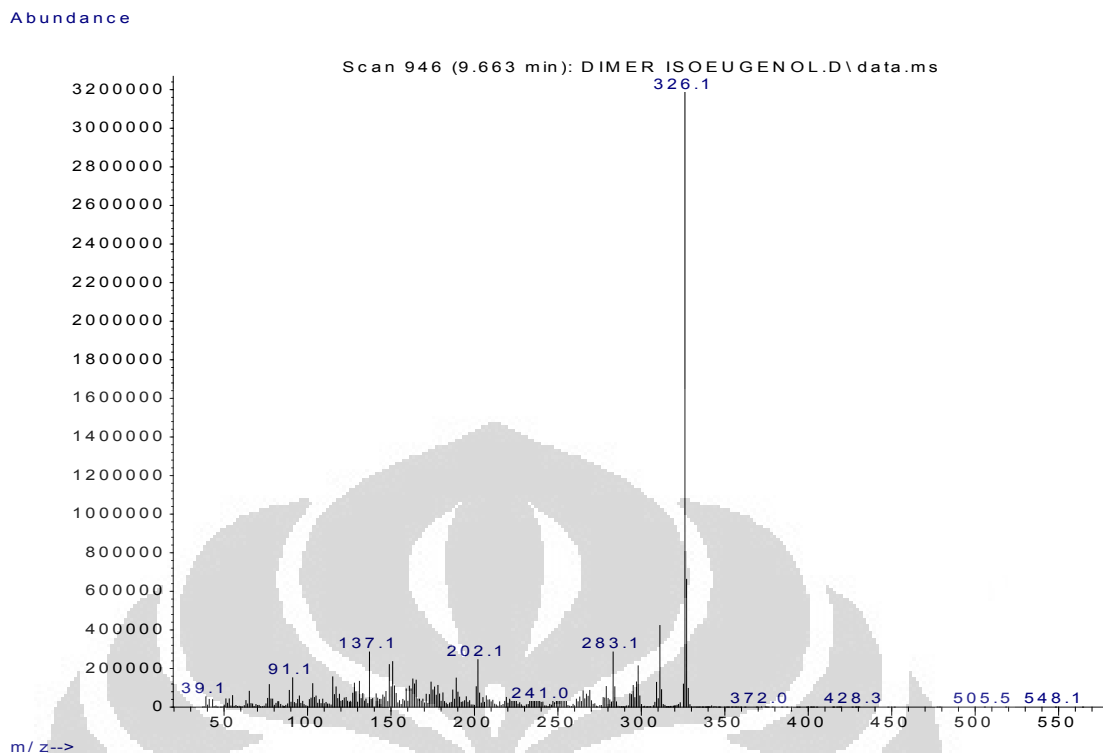
4.5.3. Analisis dengan Menggunakan Gas Chromatography Mass Spectroscopy (GC-MS)

Hasil kromatogram GCMS dari senyawa produk reaksi isoeugenol dapat dilihat pada gambar di bawah ini:



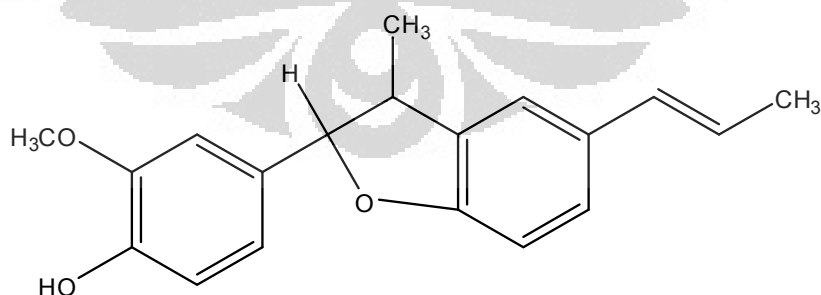
Gambar 4.12. Kromatogram GCMS Senyawa Produk Reaksi Isoeugenol

Kemudian kromatogram GC dianalisis lebih lanjut dengan menggunakan data *library* spektroskopi massa senyawa produk reaksi isoeugenol dan diperoleh spektrum sebagai berikut



Gambar 4.13. Spektrum Massa Senyawa Hasil Reaksi Isoeugenol

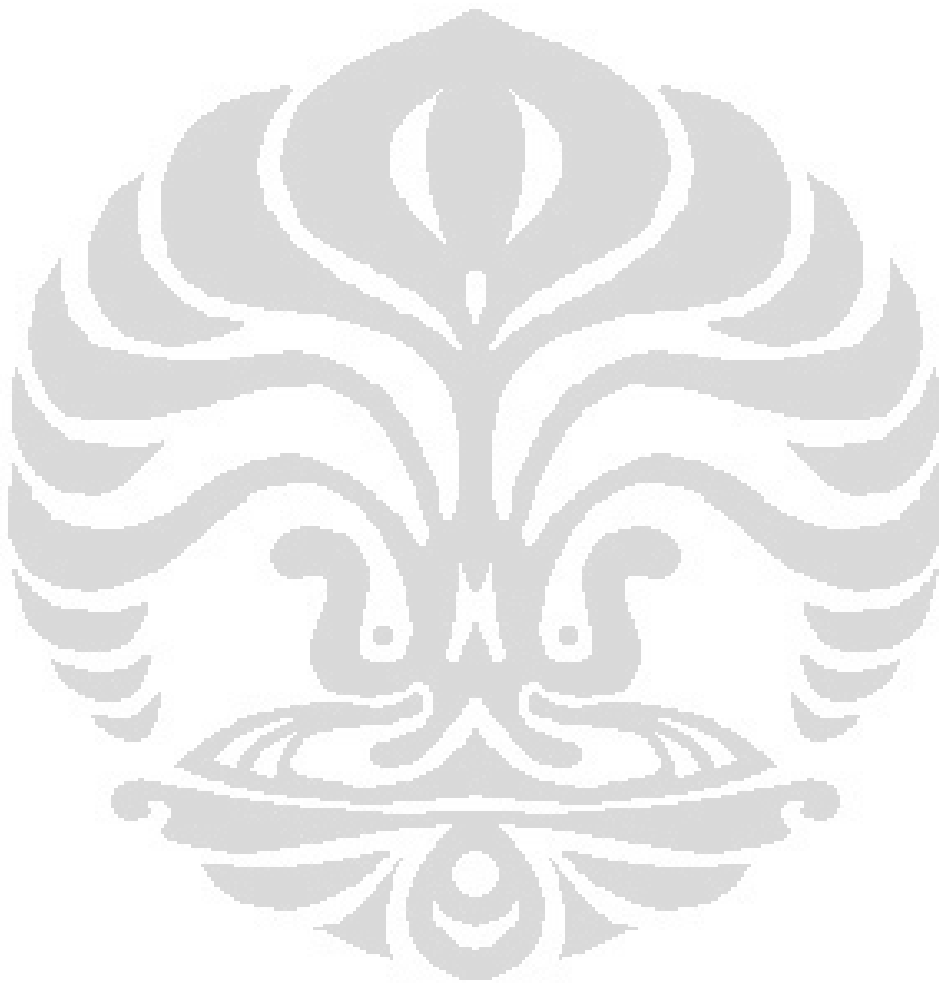
Berdasarkan hasil analisis dengan menggunakan GCMS, produk reaksi isoeugenol menghasilkan puncak tertinggi pada waktu retensi 9,663 menit dengan luas area sebesar 3,53%. Dari data *library* yang dimiliki oleh instrumen GCMS yang terdapat pada Laboratorium PUSLABFOR MABES POLRI, diketahui bahwa senyawa hasil reaksi trans isoeugenol adalah senyawa Phenol,4-[2,3,-dihydro-7-methoxy-3-methyl-5(1-propenyl)-2-benzofuranyl]-2-methoxy yang lebih dikenal sebagai dehidroisoeugenol atau Licarin A dengan *quality* sebesar 94.

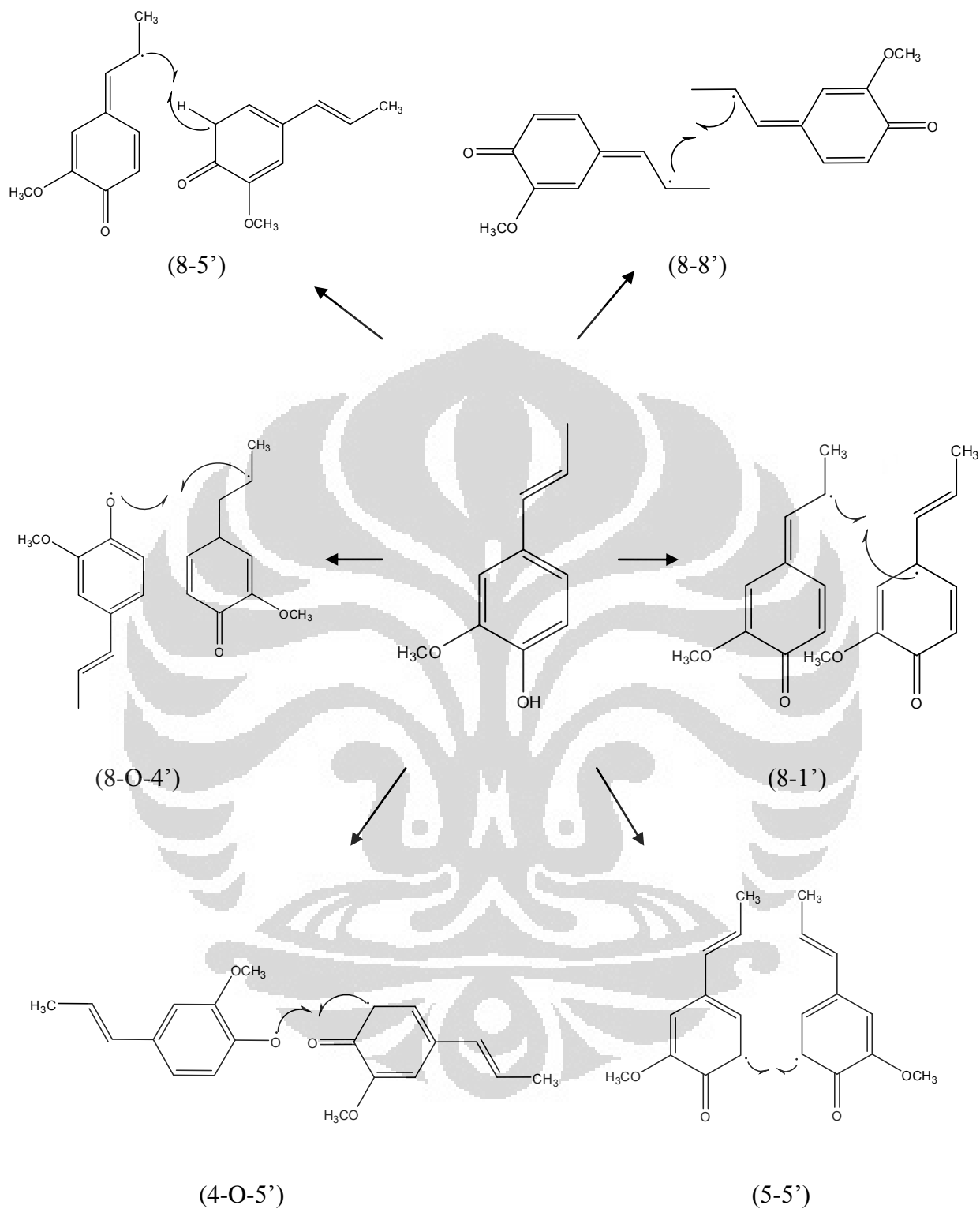


Gambar 4.14. Struktur Senyawa Hasil Reaksi Trans Isoeugenol

Senyawa yang dihasilkan tersebut merupakan senyawa dimer isoeugenol yang terbentuk pada posisi penggabungan 8-5'.

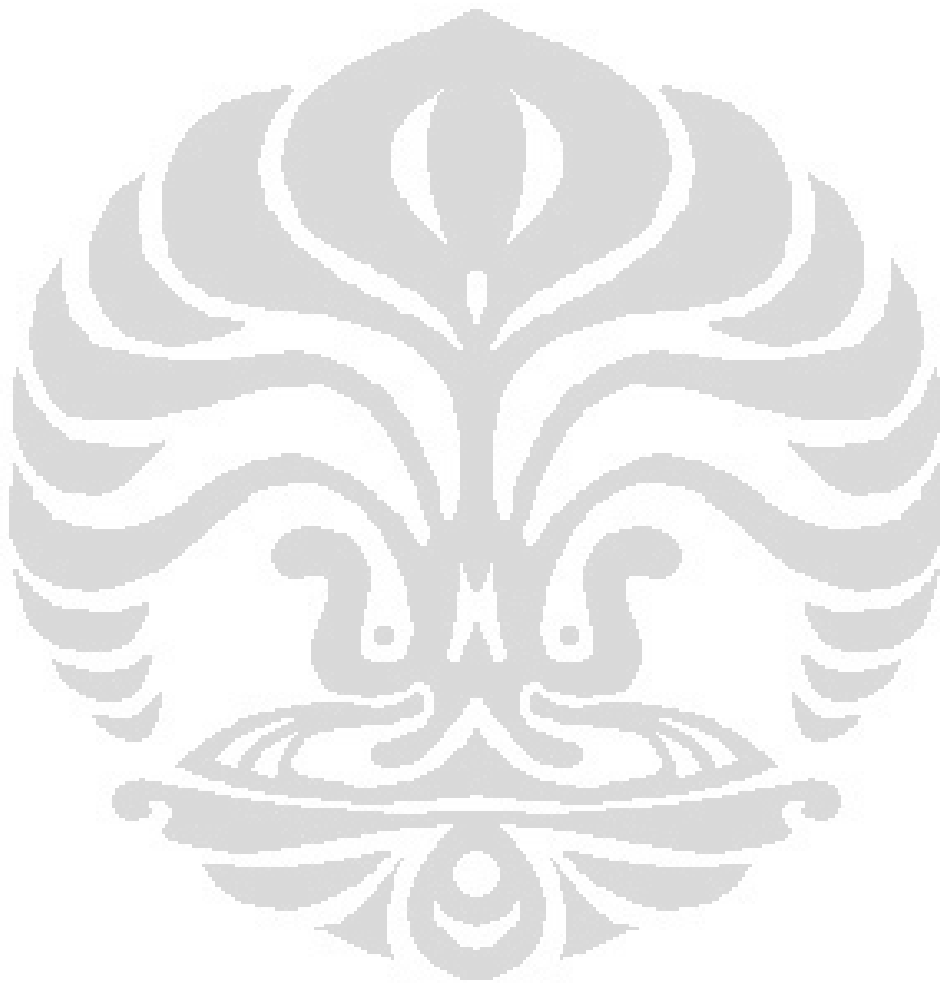
Reaksi kopling oksidatif isoeugenol ini tidak hanya terjadi pada posisi 8-5' namun dapat terjadi pada beberapa posisi karena adanya resonansi elektron pada radikal fenoksi. Kemungkinan posisi ikatan yang dapat terjadi dapat dilihat pada gambar di bawah ini:



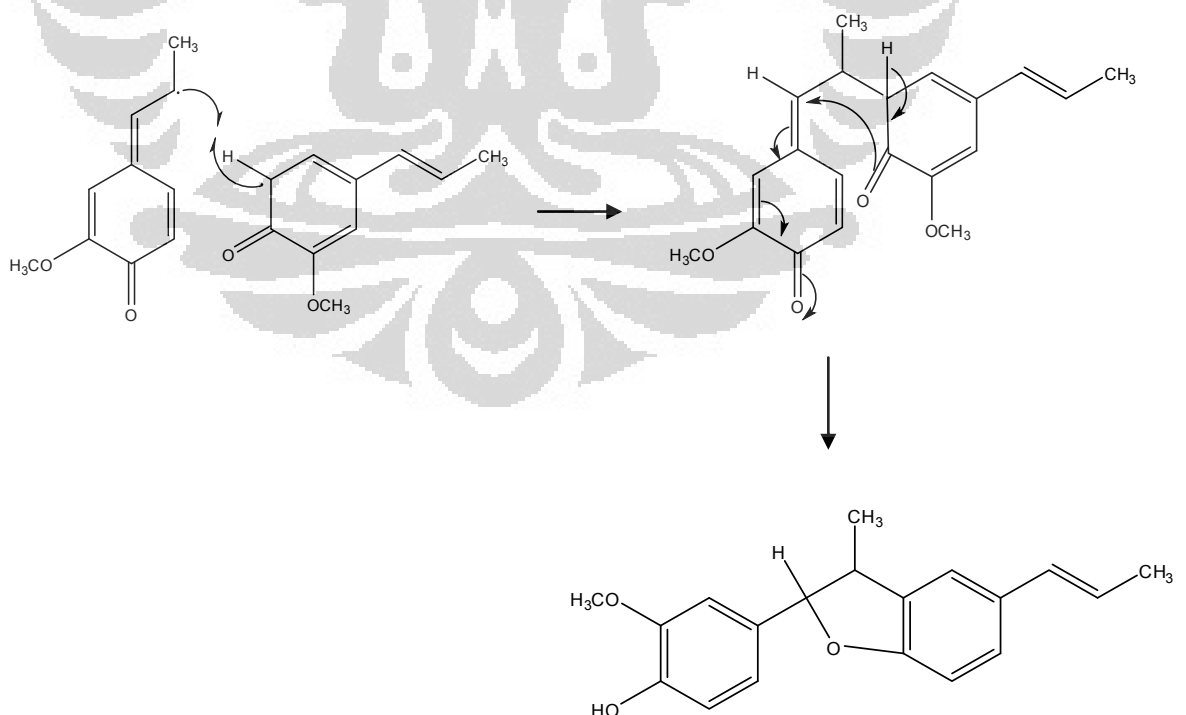
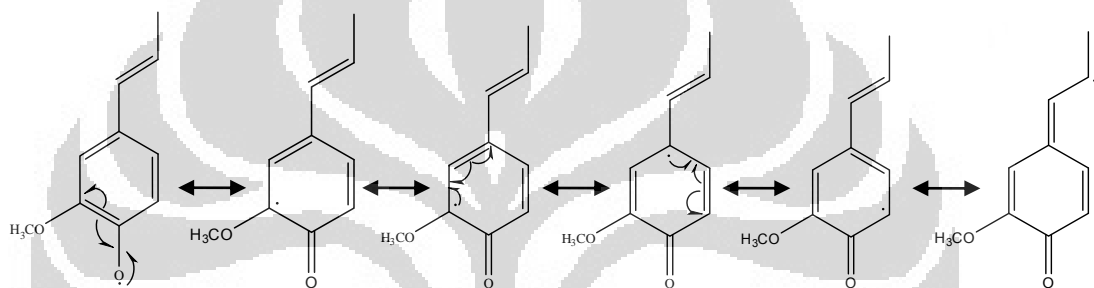
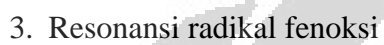
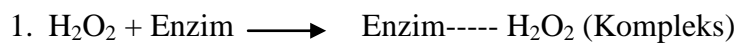


Gambar 4.15. Posisi Ikatan Pada Reaksi Kopling Oksidatif Isoeugenol

Menurut Setala, 2008, reaksi kopling oksidatif isoeugenol pada posisi 4-O5'; 8-1'; dan 5-5' sangat sulit terjadi kecuali jika pada posisi C-5 dan C-3 tidak terdapat substituen maka reaksi kopling oksidatif pada posisi 4-O-5'; 8-1'; dan 5-5' dapat terjadi. Sedangkan pada posisi 8-8'; 8-5'; dan 8-O-4' sangat mudah terjadi pada reaksi kopling oksidatif.

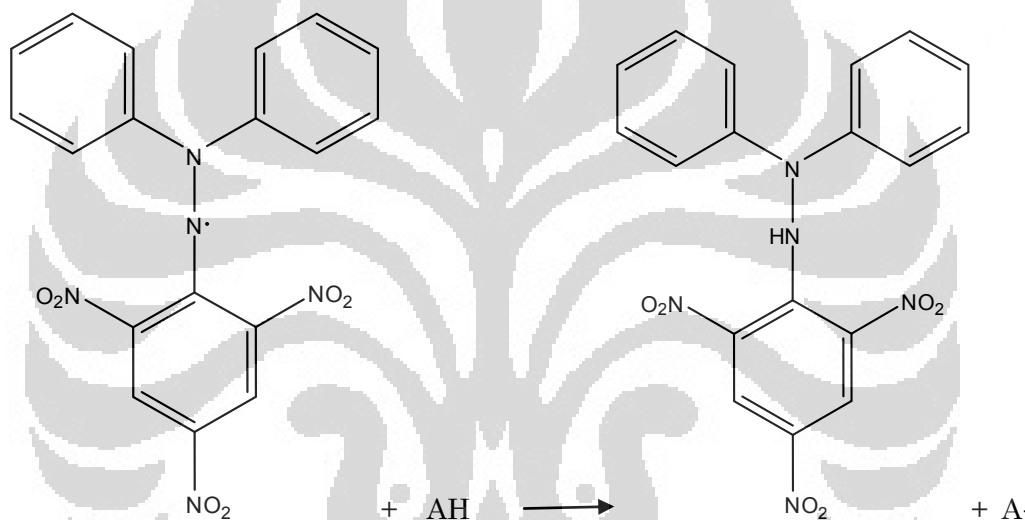


4.6. Mekanisme Reaksi Kopling Oksidatif Isoeugenol dengan Enzim Peroksidase



4.7. Uji Antioksidan dengan DPPH

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 antioksidan dengan DPPH sebagai berikut :



Gambar 4.16. Reaksi Antioksidan dengan DPPH

Larutan DPPH 0,2 mM berwarna ungu dan memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 517 nm. Larutan isoeugenol dan senyawa hasil sintesis yang akan diuji dibuat dengan konsentrasi masing-masing 1000 ppm, 100 ppm, 75 ppm dan 50 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 517 nm

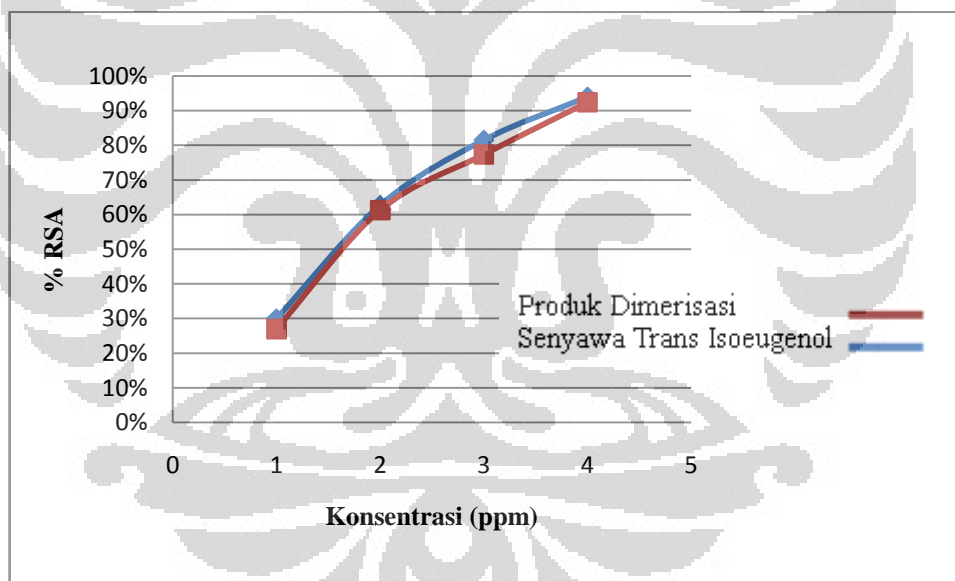
sebanyak 2 kali. Setelah diketahui absorbansinya dari masing-masing konsentrasi, kemudian dihitung persen inhibisi dengan rumus :

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

RSA = Radical Scavenging Activity

Tabel 4.5. Persentase *Scavenging Activity* Produk Dimerisasi dengan Senyawa Isoeugenol Murni

Konsentrasi	% RSA	
	Isoeugenol	Produk Reaksi
1000 ppm	94%	92,4%
100 ppm	81,5%	77,4%
75 ppm	62,7%	61,3%
50 ppm	30%	27%

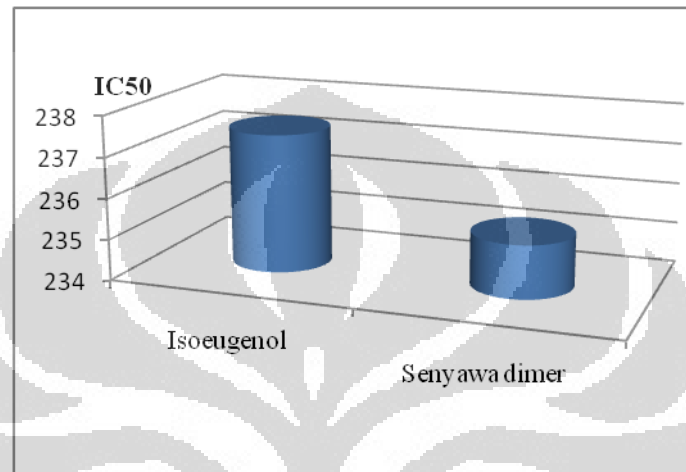


Gambar 4.17. Grafik Aktivitas Antioksidan Senyawa Isoeugenol dan Senyawa Dimer

Dari data % RSA 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 kecil nilai IC_{50} berarti semakin sedikit konsentrasi senyawa tersebut dalam menghambat radikal bebas, yang

berarti juga semakin kuat sifat antioksidan.

Dari data % RSA didapat nilai IC_{50} untuk isoeugenol sebesar 237,4 ppm sedangkan senyawa dimer yang dihasilkan memiliki IC_{50} sebesar 235,3 ppm. Hal ini menunjukkan senyawa hasil sintesis dari bahan dasar isoeugenol memiliki sifat antioksidan yang lebih kuat dibandingkan isoeugenol.



Gambar 4.18. Grafik Perbandingan IC_{50} antara Senyawa Isoeugenol dengan Senyawa Dimer

Kenaikan kekuatan antioksidan produk hasil dimerisasi diduga karena adanya struktur baru yang mempunyai gugus fenolik dan ikatan rangkap terkonjugasi..

BAB V PENUTUP

5.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan:

1. Pemurnian peroksidase dari bawang bombay melalui pengendapan menggunakan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ menghasilkan aktivitas enzim peroksidase sebesar 0,521 U/mg
2. Kondisi optimum reaksi kopling oksidatif pembentukan dimer isoeugenol diperoleh perbandingan isoeugenol dan H_2O_2 1:0,5 pH 3,0 , *cosolvent* metanol, dengan jumlah 10% metanol.
3. Berdasarkan hasil analisis LC-MS didapatkan berat molekul 327 yang merupakan berat molekul $\text{M}^+ \text{H} = 327$, sehingga berat molekul sebenarnya adalah 326 yang merupakan berat molekul dimer isoeugenol.
4. Berdasarkan hasil analisis GC-MS diketahui bahwa senyawa hasil reaksi adalah Phenol, 4-[2,3-dihydro-7-methoxy-3-methyl-5(1-propenyl)-2-benzofuranyl]-2-methoxy atau licarin A.
5. Berdasarkan hasil analisis LC-MS dan GC-MS, diketahui bahwa reaksi dimerisasi isoeugenol secara enzimatis akan diperoleh produk dimer pada posisi ikatan 8-5'.
6. Hasil pengujian antioksidan dengan menggunakan metode DPPH menunjukkan bahwa senyawa dimer yang dihasilkan memiliki kemampuan sebagai antioksidan yang lebih tinggi dengan nilai $\text{IC}_{50} = 235,3$ ppm dibandingkan dengan isoeugenol.

5.2. Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, saran yang perlu disampaikan untuk penelitian ke depan yaitu perlu dilakukan pemurnian lebih lanjut enzim peroksidase dengan menggunakan elektrophoresis atau dengan cara lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdul Rohman dan Sugeng Riyanto. (2005). *Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kemuning secara in Vitro*. Universitas Gadjah Mada
- Benkeblia N. (2005). Free-Radical scavenging capacity and antioxidant properties of some selected onions (*Allium cepa L.*) and Garlic (*Allium sativum L.*) extracts. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48(5), 753-759.
- Bortolomeazzi, R., Verardo, G., Liessi, A., Callea, A.; *Formation of dehydrodiisoeugenol and dehydrodieugenol from the reaction of isoeugenol and eugenol with DPPH radical and their role in the radical scavenging activity. Food Chemistry*, **118**(2), 256-265 (2009)
- D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C. and Masella R. (2007). *Polyphenols, dietary sources and bioavailability*. *Ann Istituto Superior di Sanità* 43(4), 348-361.
- Davidenko, TI, OV. Oseyhchuk et al. (2004). *Peroxidase Oxidation of Phenols*. *J. Biochemistry and Microbiology*. 40(6): 542-546.
- Dehpour, A.A., Ebrahimzadeh, M.A., Fazel, N.S., dan Mohammad, N.S., 2009, *Antioxidant Activity of Methanol Extract of Ferula Assafoetida and Its Essential Oil Composition, Grasas Aceites*, 60(4), 405-412.
- Diah Pratimasari. (2009). *Uji Aktivitas Penangkap Radikal Buah Carica Papaya L. Dengan Metode Dpph Dan Penetapan Kadar Fenolik Serta Flavonoid Totalnya*. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- El Agha A., Abbeddou S. Makris D. P., Kefalas P. (2009). Biocatalytic properties of a peroxidase-active cell-free extract from onion solid wastes: caffeic acid oxidation. *Biodegradation* 20, 143–153.
- El Agha A., Makris D. P., Kefalas P. (2008). Peroxidase-Active Cell Free Extract from Onion Solid Wastes: Biocatalytic Properties and Putative Pathway of Ferulic Acid Oxidation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(3), 279-285.
- Fessenden, R.J. and Fessenden, J.S. (1991). *Kimia Organik. Jilid 1 Ed ke-3*. (Pudjaatmika, A.H., Penerjemah). Jakarta: Erlangga

- Fujisawa, Seiichiro, Mariko Ishihara, et al. (2007). *Predicting The Biological Activities of 2-Methoxyphenol Antioxidants: Effects of Dimers. In Vivo*, 21, 181-188.
- Fujisawa, Seiichiro, Toshiko Atsumi, and Yoshinori Kadoma. (2004). *Cytotoxicity, ROS-generation Activity and Radical Scavenging Activity of Curcumin and Related Compounds. Anticancer Research*. 24: 563-570
- Hapiot, Philippe, Jean Pinson, Pedat Syr Neta, et al. (1994). *Mechanism of Oxidative Coupling of Coniferyl Alcohol, Phytochemistry*. Vol. 36, No.4.1013-1020.
- Hijova E. (2006). *Bioavailability of chalcones. Minireview: Batisl Lek Listy*; 107(3), 80-84.
- Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y., Matsui H (2001). *A Large Family of Class III Plant Peroxidases. Cell Physiology*. 42(5), 462-468.
- Hiroshi Uyama, Naoyuki Maruchi, Hiroyuki Tonami, and Shiro Kobayashi. (2002). *Peroxidase-Catalyzed Oxidative Polymerization of Bisphenols. Biomacromolecules*, 3, 187-193.
- James, A. Nicell and Harold Wright. (1997). *A Model of Peroxidase Activity with Inhibition by Hydrogen Peroxide. Enzyme and Microbial Technology*, 21, 302-310.
- Kobayashi, Shiro, Hiroshi Uyama, and Shunsaku Kimura. (2001). *Enzymatic Polymerization. Chem. Rev*, 101, 3793-3818
- Kusnaningsih. (2011). *Studi Identifikasi Produk Reaksi Oksidasi Kopleng Cis-Isoeugenol dan Trans-Isoeugenol dengan Katalis Peroksidase dari Raphanus Sativa L. Universitas Indonesia*
- Lindiyah. (2008). *Reaksi Dimerisasi Eugenol dan Isoeugenol dengan Bantuan Enzim Peroksidase dari Horseradish. FMIPA-UI: Depok*.
- Manu B.T. and Prasada Rao U.J.S. (2002). *Calcium modulated activity enhancement and thermal stability study of a cationic peroxidase purified from wheat bran. Food Chemistry* 114, 66-71.

- Muryeti. (2011). *Optimasi Dimerisasi Eugenol dan Isoeugenol Menggunakan Enzim Horseradish Peroksidase serta Uji Aktivitas Anti Kanker*. Universitas Indonesia
- Osman A., Makris D. P., Kefalas P. (2008). *Investigation on biocatalytic properties of a peroxidase-active homogenate from onion solid wastes: An insight into quercetin oxidation mechanism*. *Process Biochemistry* (43), 861-867.
- Palmer, Trevor. (1991). *Understanding Enzyme*, Ed.3 Ellis Horwood Limited. England
- Ralph John. (2009). *Quinone Methides in Lignification*. Department of Chemistry, USA.
- Sakihama Y., Cohen M.F., Grace S.C. and Yamasak H. (2002). *Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants*. *Toxicology* 177 (1), 67-80.
- Setala, H. (2008). *Regio and Stereoselectivity of Oxidative Coupling Reactions of Phenols*. Faculty of Science, University of Helsinki.
- Sticher L., Penel C. and Greppin H. (1981). *Calcium requirement for the secretion of peroxidases by plant cell suspensions*. *Journal of Cell Science* 48, 345-353.
- Sonia Moussouni. (2009). *Crude Peroxidase Extract From Onion: Activity On O-Diphenol & Pentahydroxy Chalcone Oxidative Cyclisation Into Aureusidin*. Chania: Greece.
- T. Atsumi, S. Fujisawa B, K. Tonosaki. (2005). *A Comparative Study of The Antioxidant/Prooxidant Activities of Eugenol and Isoeugenol with Various Concentrations and Oxidation Conditions*. *Toxicology in Vitro*, 19, 1025-1033.
- Urquiaga I. and Leighton F. (2000). *Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress Biological Research* 33(2), 55-64.
- Villalobos D.A. and Buchanan I.D. (2002). *Removal of aqueous phenol by *Arthomyces ramosus* peroxidase*. *Journal of Environmental Engineering Science* 1, 65-73.

Lampiran 1. Pengukuran Aktivitas Spesifik Enzim Peroksidase

Data Absorbansi untuk Pengukuran Aktivitas Peroksidase

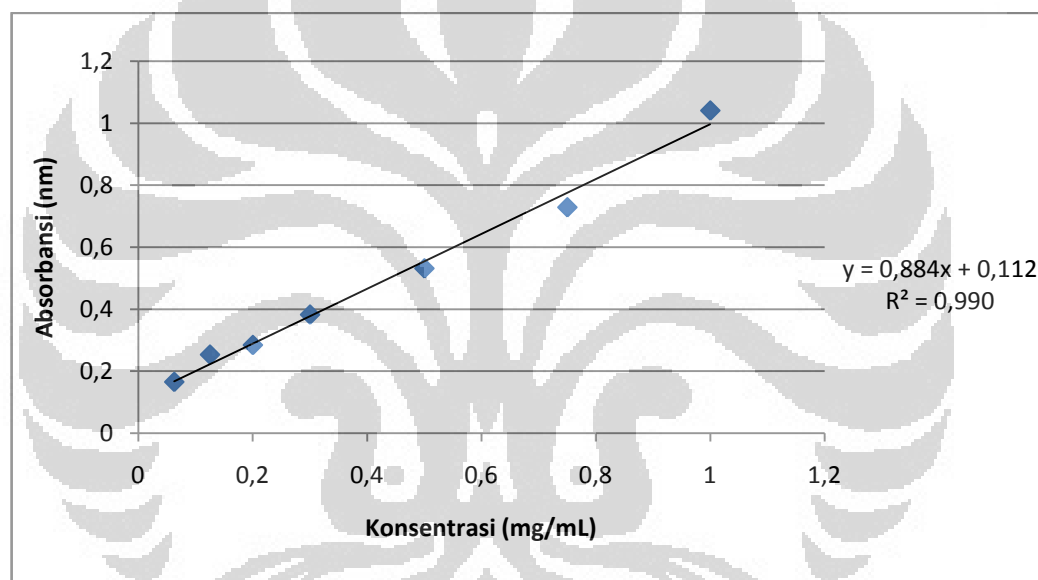
Tahap	Sampel	Absorbansi (nm)
Fraksionasi dengan (NH ₄) ₂ SO ₄	• Fraksi I (0-30%)	0,159
	• Fraksi II (30-50%)	0,136
	• Fraksi III (50-70%)	0,124
	• Filtrat Akhir	0,013

Data Absorbansi untuk Pengukuran Kadar Protein Enzim Peroksidase

Tahap	Sampel	Absorbansi (nm)
Fraksionasi dengan (NH ₄) ₂ SO ₄	• Fraksi I (0-30%)	0,230
	• Fraksi II (30-50%)	0,187
	• Fraksi III (50-70%)	0,144
	• Filtrat Akhir	0,126

Data Absorbansi Larutan Standar Bovine Serum Albumin (BSA) pada 750 nm

Konsentrasi (mg/mL)	Absorbansi (nm)
0,0625	0,165
0,125	0,253
0,2	0,284
0,3	0,382
0,5	0,531
0,75	0,728
1	1,04



Perhitungan Aktivitas Spesifik Enzim Peroksidase

$$Y = 0,884x + 0,112$$

1. Fraksi 1

$$Y = 0,884x + 0,112$$

$$0,230 = 0,884x + 0,112$$

$$X = 0,1335 \text{ mg/mL}$$

Aktivitas Spesifik Peroksidase

$$0,159 : (6,58 \times 0,1335) = 0,181 \text{ U/mg}$$

2. Fraksi 2

$$Y = 0,884x + 0,112$$

$$0,187 = 0,884x + 0,112$$

$$X = 0,0848 \text{ mg/mL}$$

Aktivitas Spesifik Peroksidase

$$0,136 : (6,58 \times 0,0848) = 0,244 \text{ U/mg}$$

3. Fraksi 3

$$Y = 0,884x + 0,112$$

$$0,144 = 0,884x + 0,112$$

$$X = 0,0362 \text{ mg/mL}$$

Aktivitas Spesifik Peroksidase

$$0,124 : (6,58 \times 0,0362) = 0,521 \text{ U/mg}$$

4. Filtrat Akhir

$$Y = 0,884x + 0,112$$

$$0,126 = 0,884x + 0,112$$

$$X = 0,0159 \text{ mg/mL}$$

Aktivitas Spesifik Peroksidase

$$0,013 : (6,58 \times 0,0159) = 0,124 \text{ U/mg}$$

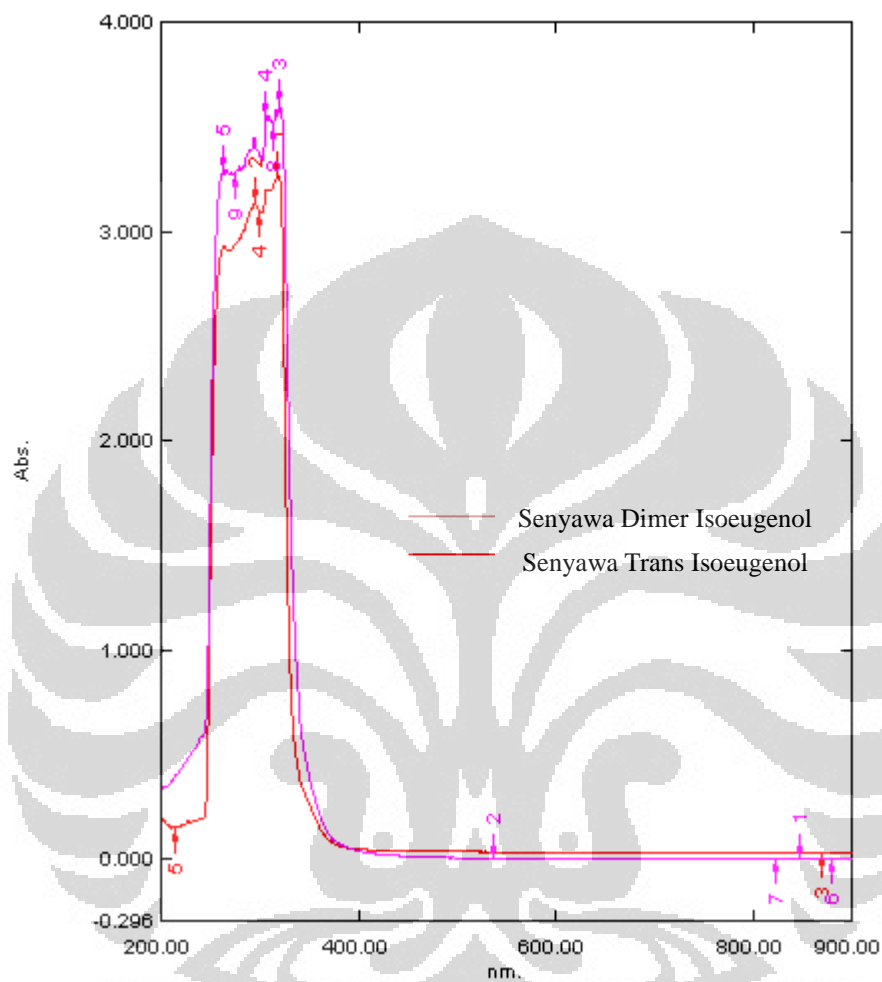
Hasil Perhitungan Kadar Protein Enzim Peroksidase

Tahap	Sampel	Kadar Protein (mg/mL)
Fraksionasi dengan (NH ₄) ₂ SO ₄	• Fraksi I (0-30%)	0,1335
	• Fraksi II (30-50%)	0,0848
	• Fraksi III (50-70%)	0,0362
	• Filtrat Akhir	0,0159

Hasil Perhitungan Aktivitas Spesifik Enzim Peroksidase

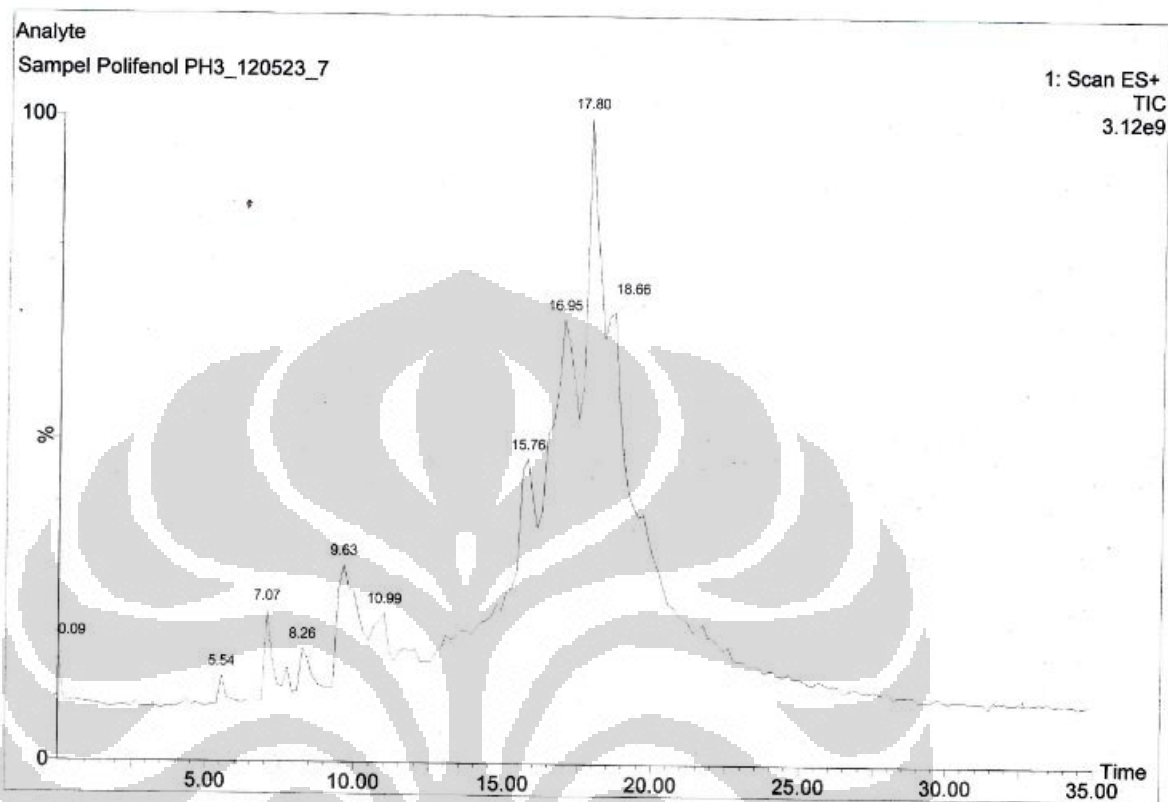
Tahap	Sampel	Aktivitas Spesifik Peroksidase (U/mg)
Fraksionasi dengan (NH ₄) ₂ SO ₄	• Fraksi I (0-30%)	0,181
	• Fraksi II (30-50%)	0,244
	• Fraksi III (50-70%)	0,521
	• Filtrat Akhir	0,124

Lampiran 2. Spektrum Serapan UV-Visible Isoeugenol dan Produk Reaksi Dimerisasi

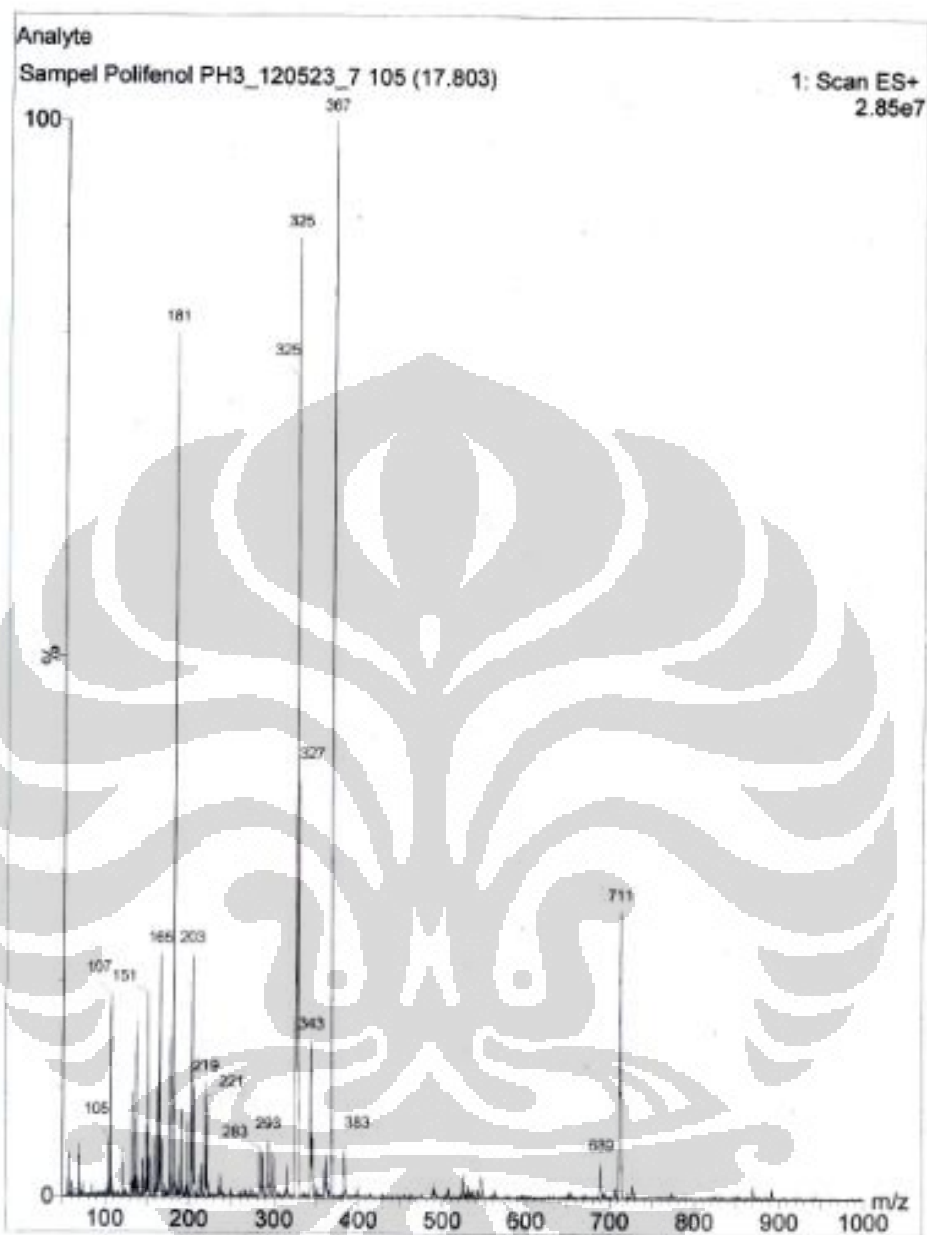


Senyawa	λ_{\max}
Trans Isoeugenol	318 nm
Hasil Reaksi	321 nm

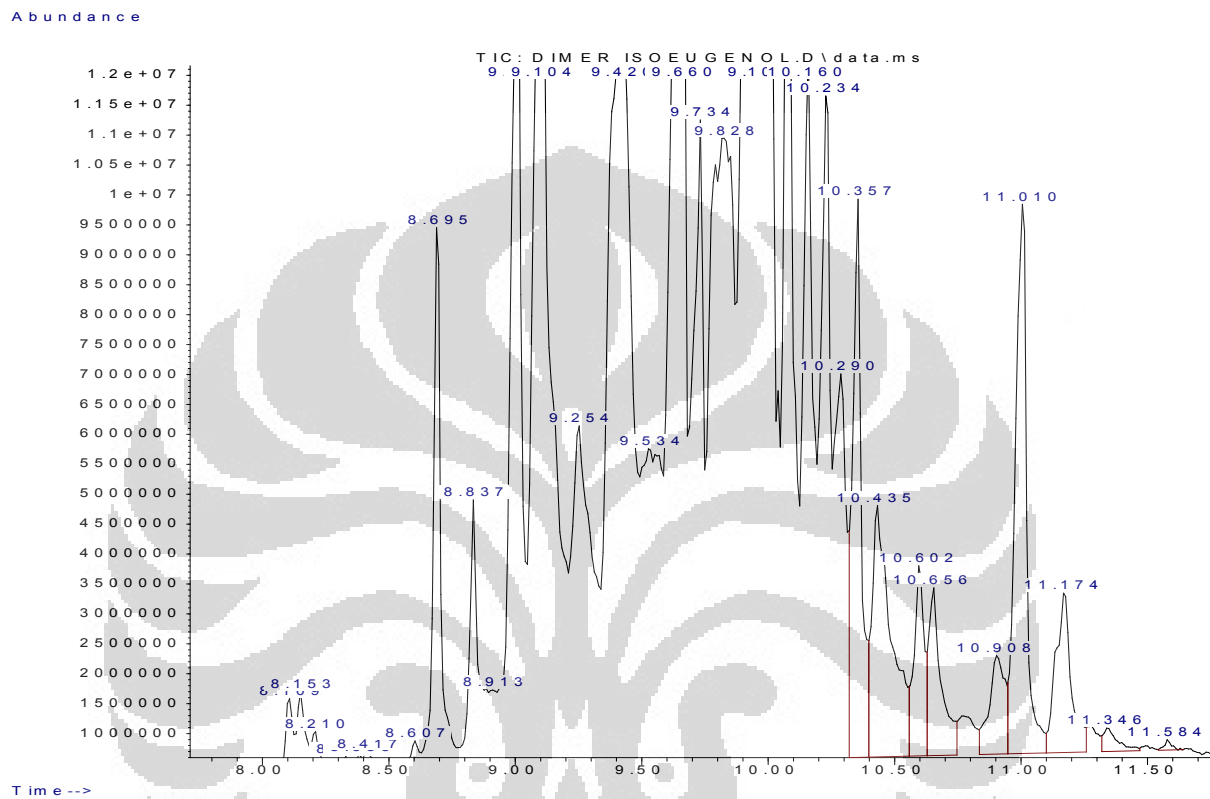
Lampiran 3. Kromatogram LC-MS



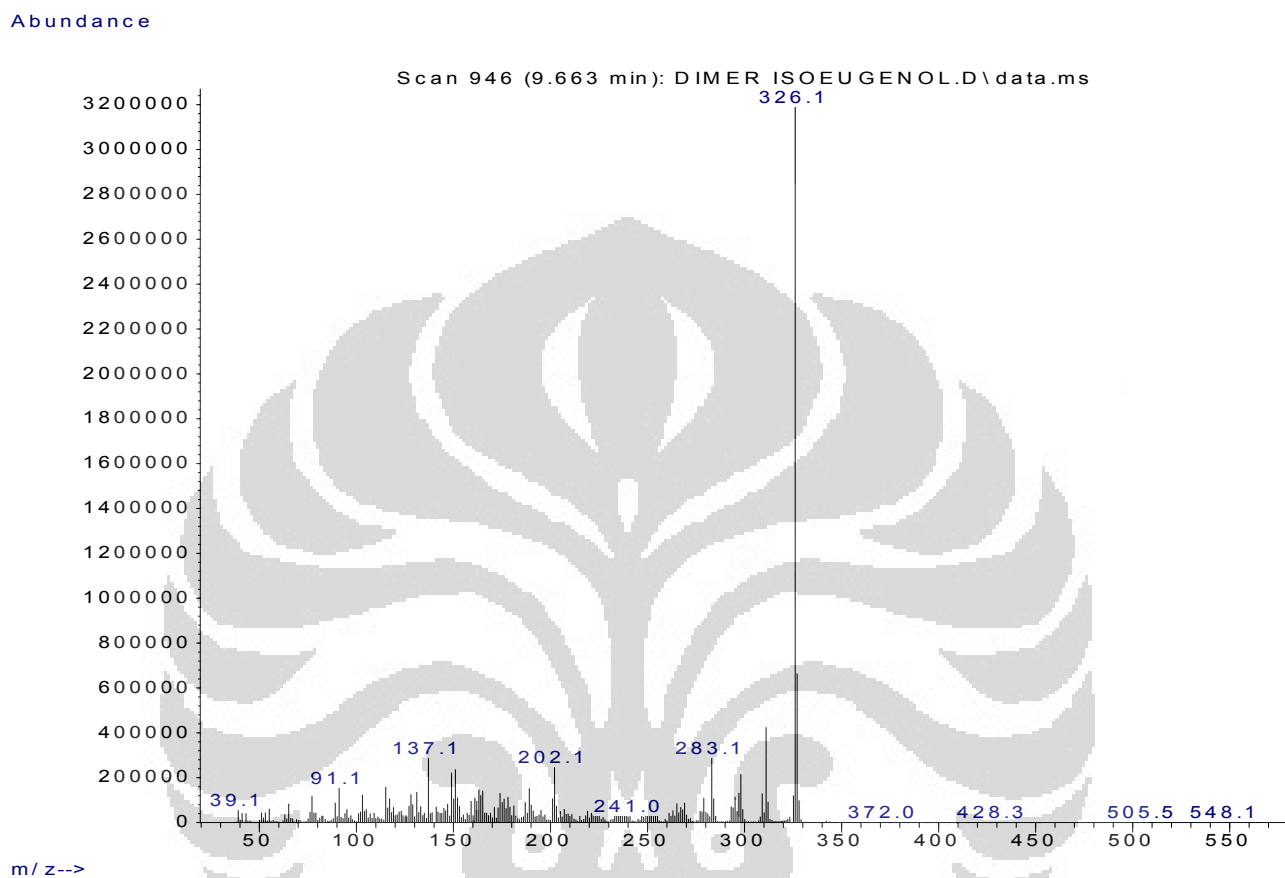
Lampiran 4. Spektrum Massa LC-MS



Lampiran 5. Kromatogram GC-MS



Lampiran 6. Spektrum Massa GC-MS



Lampiran 7. Pengukuran Aktivitas Antioksidan

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	
	Senyawa Trans Isoeugenol	Produk Dimerisasi Isoeugenol
1000	0,023	0,028
100	0,065	0,083
75	0,137	0,142
50	0,257	0,268

Absorbansi Kontrol = 0,367

Perhitungan % inhibisi produk dimerisasi dan senyawa trans isoeugenol

$$\% \text{ RSA (Radical Scavenging Activity)} = [(A_o - A_b) / A_o] \times 100\%$$

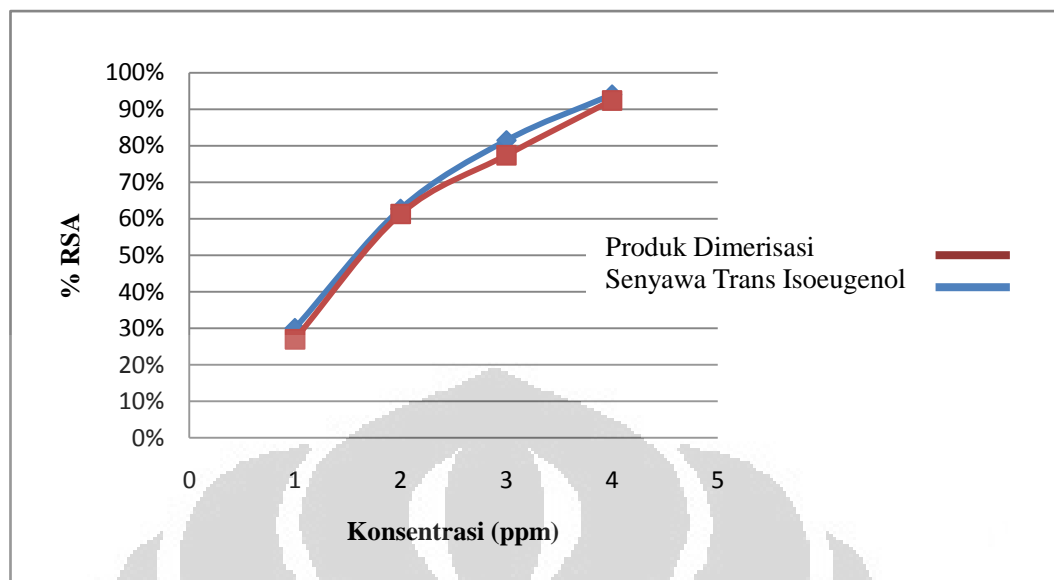
A_o = Absorbansi DPPH larutan tanpa sampel (Absorbansi Kontrol)

A_b = Absorbansi DPPH dengan sampel

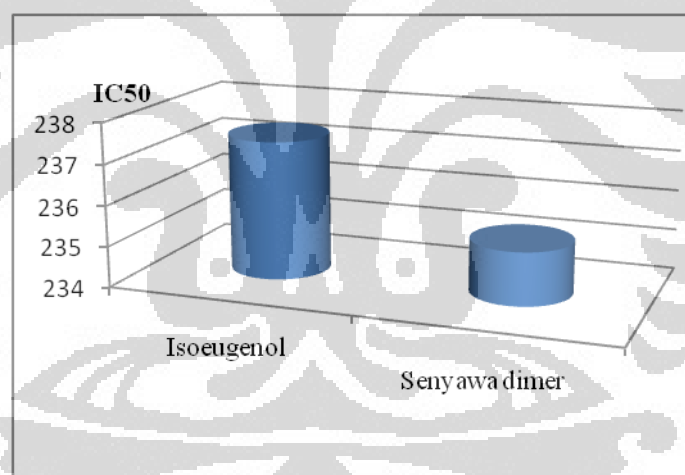
Dari rumus di atas didapat nilai % RSA masing-masing sampel

Tabel hasil perhitungan % RSA masing-masing sampel

Konsentrasi	% RSA	
	Isoeugenol	Produk Reaksi
1000 ppm	94%	92,4%
100 ppm	81,5%	77,4%
75 ppm	62,7%	61,3%
50 ppm	30%	27%



Gambar 4.15. Grafik Aktivitas Antioksidan Senyawa Isoeugenol dan Senyawa Dimer



Gambar 4.16. Grafik Perbandingan IC₅₀ antara Senyawa Isoeugenol dengan Senyawa Dimer

Lampiran 8. Kondisi Kolom LC-MS

LC-MS dilakukan di LABKESDA (Laboratorium Kesehatan Daerah DKI Jakarta). Adapun kondisi LC-MS nya adalah:

LC-MS-MS Quatro Mikro Triple Kuadropol

HPLC Alliance 2695

Kolom X-Terra C18 diameter 3,5 μm

Panjang Kolom 100 x 2 mm

Fase Gerak : Metanol dan Asam Format 2% dengan perbandingan 10:90

Flow Rate : 0,2 mL/menit

