

**STUDI DIMERISASI ASAM FERULAT DAN ESTERNYA MELALUI REAKSI
OKSIDATIF KOPLING DENGAN BIOKATALIS
PEROKSIDASE**

LAILI FAUZIAH

0302030343



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN KIMIA
DEPOK
2008**

**STUDI DIMERISASI ASAM FERULAT DAN ESTERNYA MELALUI REAKSI
OKSIDATIF KOPLING DENGAN BIOKATALIS
PEROKSIDASE**

**Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains**

Oleh:

LAILI FAUZIAH

0302030343



DEPOK

2008

SKRIPSI : STUDI DIMERISASI ASAM FERULAT DAN ESTERNYA
MELALUI REAKSI OKSIDATIF KOPLING DENGAN
BIOKATALIS PEROKSIDASE

NAMA : LAILI FAUZIAH

NPM : 0302030343

SKRIPSI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JULI 2008

Dr. ANTONIUS HERRY CAHYANA
PEMBIMBING I

Tanggal lulus Ujian Sidang Sarjana: 18 Juli 2008

Penguji I : Prof. Dr. Wahyudi Priyono S.

Penguji II : Drs. Sultan Badjri., M. Si.

Penguji III : Dra. Susilowati., M. Sc.

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya yang tiada terhingga, memberikan ujian kepada manusia dan juga memberikan pertolongan-Nya untuk menjadikan manusia lebih baik dan memiliki kecintaan terhadap-Nya lebih besar pula. Shalawat dan salam teriring untuk Rasulullah Muhammad SAW, keluarganya, dan para sahabatnya serta para pengikutnya yang tetap teguh di jalan Allah SWT hingga hari akhir nanti.

Terima kasih yang sebesar-besarnya penulis haturkan kepada Departemen Kimia UI, atas segala fasilitas dan kesempatan yang telah diberikan kepada penulis, juga merupakan tempat penulis menimba ilmu.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Herry, pembimbing yang selalu sabar menanggapi ketidak tahuan penulis. Ibu Tresye, kordinator penelitian yang selalu memberi pertimbangan-pertimbangan dan saran terbaik. Terima kasih kepada Bapak Haryadi dan keluarga atas bantuannya selama ini. Terima kasih kepada Bapak Cecep yang telah membantu menyediakan bahan-bahan kimia. Terima kasih juga penulis ucapkan untuk Bapak Jaswanto Kepala Laboratorium GC-MS Mabes Polri yang telah membantu mengukur sampel dengan ikhlas hingga melewati waktu jam kerjanya, membuat penulis tetap bersemangat hingga didapatkan hasil yang diinginkan. Penulis juga ucapkan terima kasih kepada Ibu Widyastuti selaku Pembimbing Akademik yang telah pula membantu penulis, semoga Allah memberikan balasan atas kebaikan yang telah ibu lakukan.

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada mama yang telah menghadirkan penulis ke dunia ini dan bekerja keras selama ini hingga penulis dapat mengenyam bangku kuliah, om yang sudah penulis anggap seperti papa kandung, yang memberi bantuan, didikan, kasih sayang, dan perhatian yang lebih, kakak, adik-adik penulis, dan keponakan yang selalu memberi dukungan dalam segala aspek kehidupan penulis. Semoga Allah selalu mencintai dan melindungi mereka.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh Dosen, khususnya Ibu Siti Channah yang telah memberikan inspirasi dan bekal ilmu. Juga para staf Kimia, FMIPA UI yang telah banyak membantu, penulis ucapkan terima kasih. Teman-teman angkatan 2002: Elda, Lara, Noni, Anjar, Nia, Nurma, Dian, Riris, Rani, Syakir, Ma-il, Tama dan yang lainnya tidak mungkin disebutkan satu persatu. Dan seluruh teman-teman di Departemen Kimia dan di MIPA serta saudara-saudariku dan 'bunda' yang dirahmati Allah, orang-orang yang tak pernah lelah memberi semangat dan do'a kepada penulis sehingga menjadikan penulis tak pernah gentar dan selalu bersemangat menyelesaikan tugas akhir ini. Semoga Allah merahmati mereka. Dan semoga Allah meninggikan derajat; ikhwah UI dan ikhwah SMU 68 dan seseorang yang selalu penulis hormati.

Semoga hasil skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan terutama bidang Kimia Bahan Alam.

Depok, Juni 2008

Penulis

ABSTRAK

Penelitian ini memperlihatkan pengaruh bentuk ester terhadap kestabilan radikal yang akan berpengaruh terhadap jenis dimer dan kuantitas yang dihasilkan. Dalam penelitian ini dilakukan esterifikasi metode Fischer yakni esterifikasi dengan menggunakan asam halida. Pada percobaan ini asam ferulat dilarutkan terlebih dahulu dalam etanol kemudian ditambahkan asetil klorida lalu dirotatory evaporator selama semalam pada suhu 40°C. Hasil MS produk esterifikasi menunjukkan adanya spektrum dengan $m/z = 222$ pada waktu retensi 14,415 menit. Hasil ini berbeda dengan hasil MS dari bahan bakunya yakni asam ferulat yang menunjukkan adanya spektrum dengan $m/z = 194$ pada waktu retensi 14,020 menit. Hal ini menunjukkan bahwa telah terjadi reaksi esterifikasi asam ferulat. Etil ferulat murni yang dihasilkan sebesar 0,003 mol (40,00 %). Kemudian masing-masing asam ferulat dan etil ferulat didimerisasi menggunakan enzim peroksidase yang diisolasi dari batang brokoli dengan aktivitas spesifiknya sebesar 0,847. Didapat dimer asam ferulat tanpa pemurnian sebesar 0,045 g sedangkan dimer etil ferulat tanpa pemurnian sebesar 0,036 g. Analisis GC-MS dari hasil dimerisasi asam ferulat menunjukkan terbentuknya senyawa baru yang diduga merupakan dimer asam ferulat dengan nilai $m/z = 386$ pada waktu retensi 11,680 menit (luas area 0,33 %). Berdasarkan spektrum massanya, diduga dimer asam ferulat yang terbentuk adalah 8-8'-dehidrodiferulat. Sedang analisis GC-MS dari hasil dimerisasi etil ferulat menunjukkan terbentuknya senyawa baru yang diduga merupakan dimer etil ferulat dengan nilai $m/z = 422$ pada waktu retensi 31,200 menit (luas area 29,89

%) dan 31,620 menit (luas area 1,88 %). Berdasarkan spektrum massanya, diduga dimer etil ferulat yang terbentuk pada waktu retensi 31,200 menit (luas area 29,89 %) adalah dimer etil ferulat ikatan 8-8' dan pada waktu retensi 31,620 menit (luas area 1,88 %) adalah dimer etil ferulat ikatan 8-O-4'.

Kata kunci: asam ferulat, etil ferulat, oksidatif kopling, enzim peroksidase

xii+ 68 hlm; gbr; tab; lamp

bibliografi 24 (1957-2007)

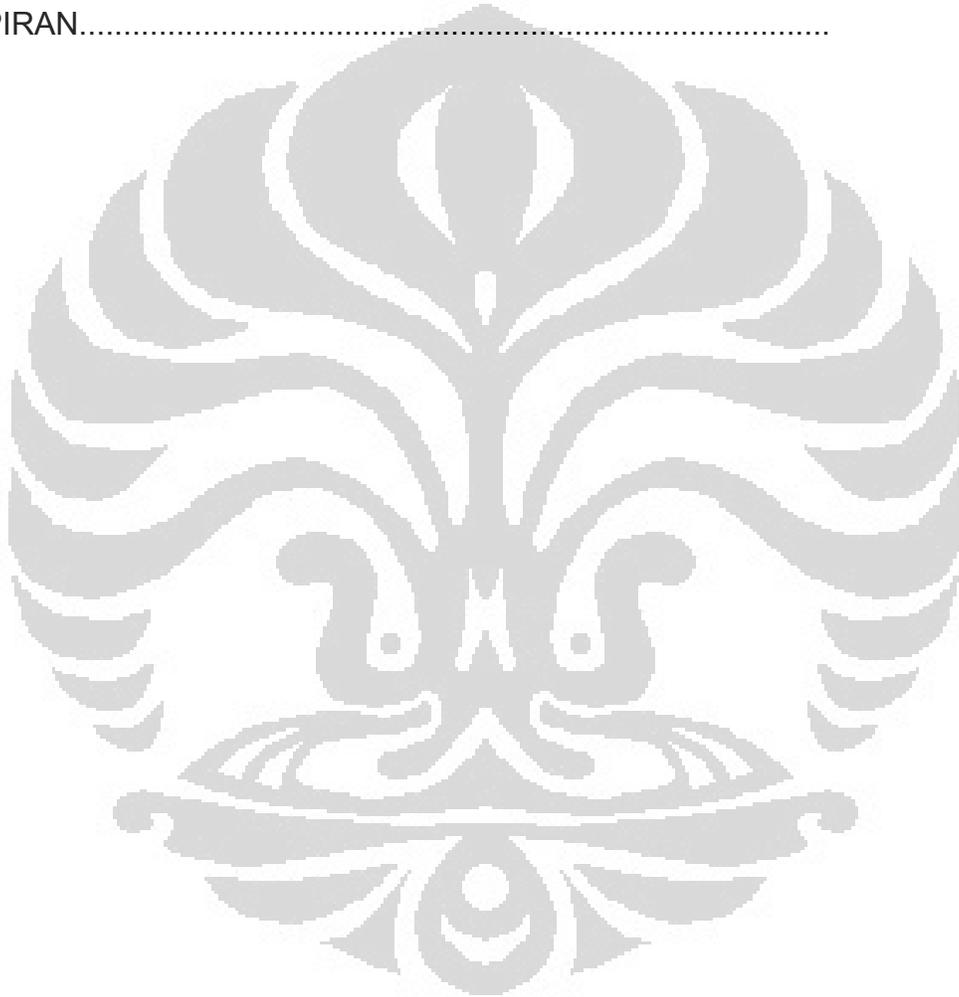


DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
ABSTRAK	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Tujuan penelitian	2
1.3 Metode penelitian	2
1.4 Tempat penelitian	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Senyawa fenolik.....	3
2.1.1 Fenolik sederhana.....	4
2.1.2 Fenolik propanoid.....	5
2.1.3 Lignan.....	5
2.1.4 Asam ferulat.....	7
2.1.5 Etil ferulat.....	10
2.2 Enzim peroksidase.....	11
2.2.1 Klasifikasi tanaman brokoli.....	12

2.2.2 Aktifitas Enzim	13
2.3 Reaksi Esterifikasi	15
2.4 Mekanisme kopling oksidatif asam ferulat dan etil ferulat.....	15
BAB III BAHAN, ALAT DAN CARA KERJA.....	18
3.1. Bahan.....	18
3.2. Alat	18
3.3. Cara kerja.....	19
3.3.1. Esterifikasi Asam Ferulat.....	19
3.3.2. Isolasi Enzim Peroksidase.....	19
3.3.2.1 pemurnian dengan ammonium sulfat...	20
3.3.2.2 pemurnian dengan aseton.....	21
3.3.3. Penentuan Aktivitas Peroksidase.....	22
3.3.4. Penentuan Kadar Protein.....	23
3.3.5. Reaksi Oksidasi Kopling Asam Ferulat dan Etil Ferulat yang Dikatalisis Peroksidase.....	24
3.3.6. Uji KLT dan GC-MS.....	24
3.3.7. Skema kerja.....	25
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	29
4.1. Esterifikasi Asam Ferulat.....	29
4.2. Isolasi Enzim Peroksidase.....	37
4.3. Uji Aktivitas Enzim Peroksidase dan Kadar Protein..	40
4.4. Reaksi Oksidasi Asam Ferulat.....	43

4.5. Analisis KLT dan GC-MS.....	45
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	56
5.1. Kesimpulan	56
5.2. Saran	57
DAFTAR PUSTAKA.....	58
LAMPIRAN.....	61

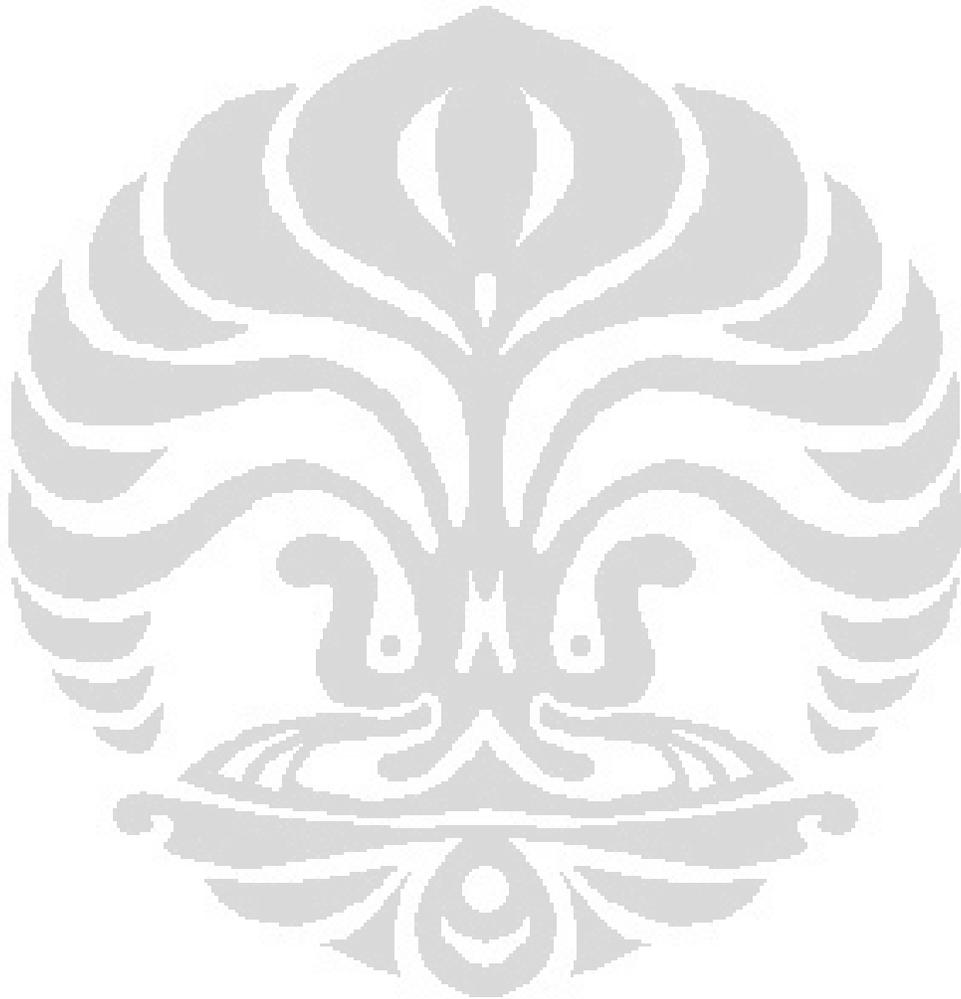


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1 Golongan senyawa fenolik sederhana.....	4
2 Resonansi radikal fenoksi o-Kresol.....	4
3 Struktur fenil ropanoid.....	5
4 Penomoran atom pada senyawa fenil propanoid dan lignan...	6
5 Struktur senyawa golongan neolignan dan oxineolignan.....	6
6 Asam ferulat.....	9
7 Tanaman brokoli.....	12
8 Reaksi esterifikasi secara umum.....	15
9 Reaksi kopling oksidatif etil ferulat.....	16
10 (a)Reaksi esterifikasi asam ferulat.....	29
(b)Mekanisme reaksi esterifikasi asam ferulat.....	30
11 Hasil esterifikasi asam ferulat yang belum dimurnikan.....	30
12 KLT hasil esterifikasi.....	32
13 Etil fertulat hasil rekristalisasi.....	33
14 Kromatogram asam ferulat.....	33
15 Spektrum massa asam ferulat.....	34
16 Kromatogram etil ferulat.....	34
17 Spektrum massa etil ferulat.....	35
18 Ekstrak enzim kasar.....	37

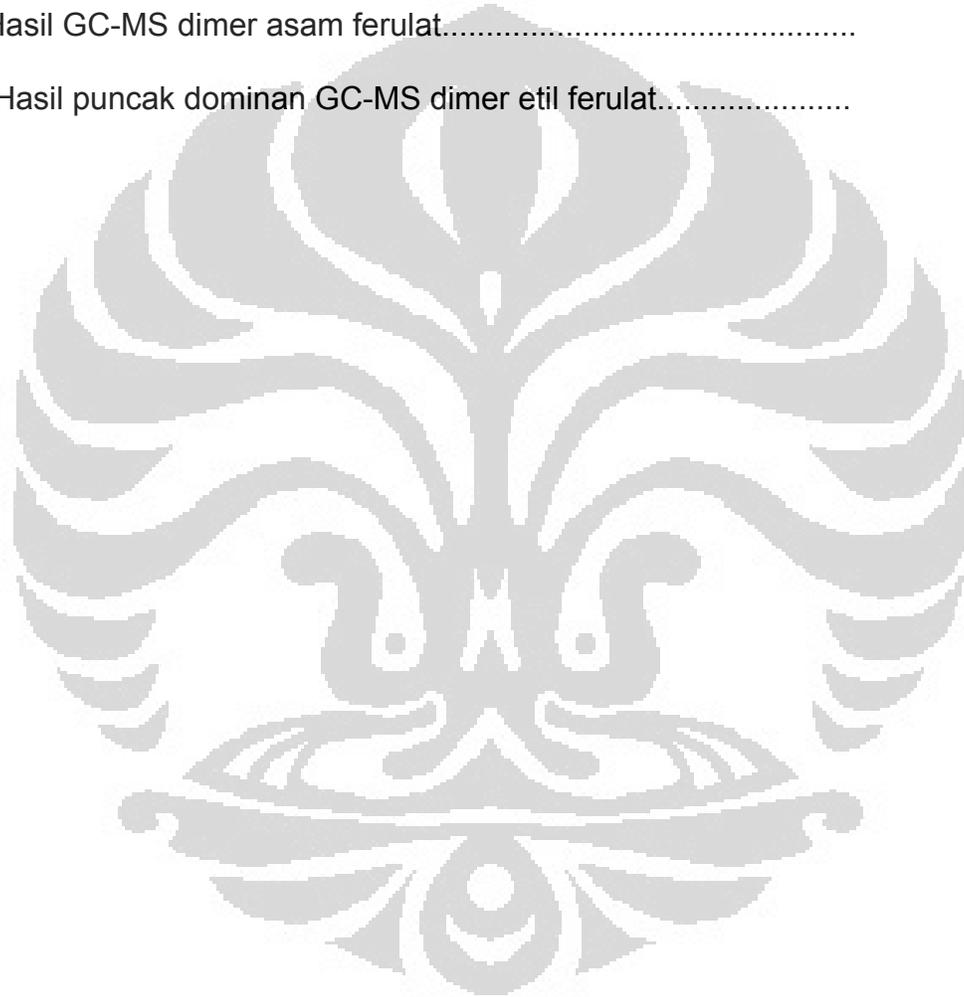
19	Ekstrak enzim fraksi I, II dan III Ammonium sulfat.....	38
20	Ekstrak enzim fraksi I dan II aseton.....	39
21	Pengukuran aktivitas enzim (a) Enzim dengan ammonium sulfat dan (b) Enzim dengan aseton.....	40
22	Enzim ditambahkan guaiakol dan H ₂ O ₂ (a)Enzim fraksi III ammonium sulfat (b)Enzim fraksi II aseton.....	41
23	Larutan standar BSA pengukuran kadar protein.....	42
24	Reaksi dimerisasi asam ferulat.....	44
	Reaksi dimerisasi etil ferulat.....	44
25	Ekstraksi hasil reaksi dimerisasi (a) Ekstraksi dimer asam ferulat (b) Ekstraksi dimer etil ferulat...	44
26	Dimer asam ferulat dan dimer etil ferulat	45
27	Hasil KLT dimer asam ferulat dan etil ferulat	46
28	Kromatogram dimer asam ferulat	47
29	Spektrum massa dimer asam ferulat	48
30	Fragmentasi senyawa 8-8'diferulat	48
31	Kromatogram dimer asam ferulat ion spesifik	49
32	Spektrum fragmentasi ion spesifik dimer asam ferulat	49
33	Kromatogram dimer etil ferulat	50
34	Spektrum fragmentasi etil ferulat pada waktu retensi 31,200 menit	50
35	Spektrum fragmentasi etil ferulat pada waktu retensi 31,620 menit.....	51

36	Fragmentasi senyawa 8-8' di(etil ferulat).....	52
37	Fragmentasi senyawa 8-O-4' di(etil ferulat).....	53



DAFTAR TABEL

	Halaman
1 Hasil GC-MS etil ferulat.....	35
2 Aktivitas enzim peroksidase	42
3 Hasil GC-MS dimer asam ferulat.....	48
4 Hasil puncak dominan GC-MS dimer etil ferulat.....	51



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1 Pengukuran kadar protein berdasarkan metode Lowry dengan menggunakan standar BSA.....	60
2 Spektrum UV-Vis aktivitas enzim fraksi I Ammonium sulfat panjang gelombang, $\lambda = 510$ nm.....	62
3 Spektrum UV-Vis aktivitas enzim fraksi II Ammonium sulfat panjang gelombang, $\lambda = 510$ nm	63
4 Spektrum UV-Vis aktivitas enzim fraksi III Ammonium sulfat panjang gelombang, $\lambda = 510$ nm.....	64
5 Spektrum UV-Vis aktivitas enzim fraksi I Aseton panjang gelombang, $\lambda = 510$ nm.....	65
6 Spektrum UV-Vis aktivitas enzim fraksi II Aseton panjang gelombang, $\lambda = 510$ nm.....	66
7 Perhitungan Unit Aktivitas Spesifik Enzim.....	67

BAB I PENDAHULUAN

1.1. LATAR BELAKANG

Salah satu senyawa yang menjadi pusat perhatian para peneliti Kimia Bahan Alam sekarang ini adalah asam ferulat. Pada tahun 1999, ilmuwan Jepang mempelajari pengaruh inhibisi dari masing-masing senyawa yakni : asam ferulat dan EGMP (Ethyl 3-(4-geranyloxy-3-methoxyphenyl)-2-propenpate) terhadap perkembangan sel kanker usus besar. Ternyata dengan ditambahkannya asam ferulat dapat menurunkan perkembangan sel kanker sebesar 0,2 %¹. Selain asam ferulat, senyawa dari sintesis asam ferulat juga bermanfaat, berikut ini contoh penelitian berkaitan dengan sintesis asam ferulat.

Pada tahun 2003, senyawa asam ferulat direaksikan menjadi senyawa amida dan diuji terhadap penderita diabetes tipe 2 (tidak tergantung insulin), ternyata didapat kenaikan jumlah sekresi insulin¹.

Oleh karena telah diketahui bahwa senyawa dimer asam ferulat memiliki banyak kelebihan/ manfaat, maka penelitian ini dilakukan untuk mengkaji senyawa ini lebih dalam lagi.

Penelitian ini dilatar belakangi oleh penelitian sebelumnya pada tahun 2007, yakni mendimerisasikan asam ferulat dengan bantuan enzim peroksidase, dihasilkan senyawa dimer yang tidak signifikan jumlahnya. Hal ini kemungkinan disebabkan ketidakstabilan dari radikal ferulat².

1.2. TUJUAN PENELITIAN

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah membuat ester asam ferulat dan melihat pengaruh dari bentuk ester terhadap kestabilan radikal, yang kemudian akan berpengaruh juga terhadap jenis dimer dan kuantitas yang dihasilkan.

1.3. METODE PENELITIAN

Metode penelitian yang dipakai adalah membuat reaksi esterifikasi asam ferulat, kemudian asam ferulat dan esternya didimerisasi dengan menggunakan enzim peroksidase hasil isolasi dari tanaman brokoli pada bagian batang.

1.4. TEMPAT PENELITIAN

Penelitian dilakukan di laboratorium Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia dan di Laboratorium Forensik Markas Besar Kepolisian Republik Indonesia.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Senyawa Fenolik

Senyawa fenolik meliputi aneka ragam senyawa yang berasal dari tumbuhan yang mempunyai ciri sama, yaitu cincin aromatik yang mengandung satu atau dua gugus OH^3 . Senyawa fenolik di alam terdapat sangat luas, mempunyai variasi struktur yang luas, mudah ditemukan di semua tanaman, daun, bunga dan buah. Ribuan senyawa fenolik alam telah diketahui strukturnya, antara lain flavonoid, fenol monosiklik sederhana, fenil propanoid, polifenol (lignin, melanin, tannin), dan kuinon fenolik.

Banyak senyawa fenolik alami mengandung sekurang-kurangnya satu gugus hidroksil dan lebih banyak yang membentuk senyawa eter, ester atau glioksida daripada senyawa bebasnya. Senyawa ester atau eter fenol tersebut memiliki kelarutan yang lebih besar dalam air daripada senyawa fenol dan senyawa glioksidanya.

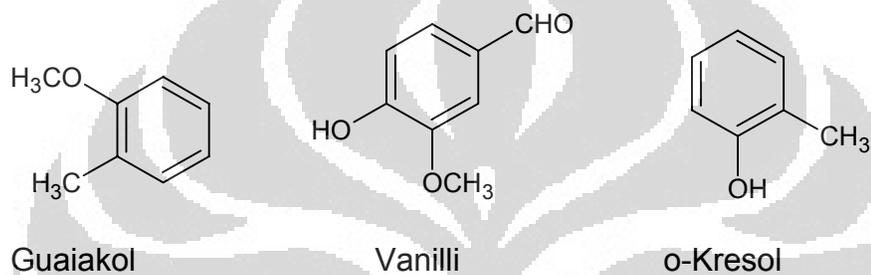
Dalam keadaan murni, senyawa fenol berupa zat padat yang tidak berwarna, tetapi jika teroksidasi akan berubah menjadi gelap. Kelarutan fenol dalam air akan bertambah, jika gugus hidroksil makin banyak.

Senyawa fenolik memiliki aktivitas biologis yang beraneka ragam, dan banyak digunakan dalam reaksi enzimatis oksidasi kopling sebagai substrat donor H. Reaksi oksidasi kopling, selain membutuhkan suatu oksidator juga

memerlukan adanya suatu senyawa yang dapat mendonorkan H. Senyawa fenolik merupakan contoh ideal dari senyawa yang mudah mendonorkan atom H.

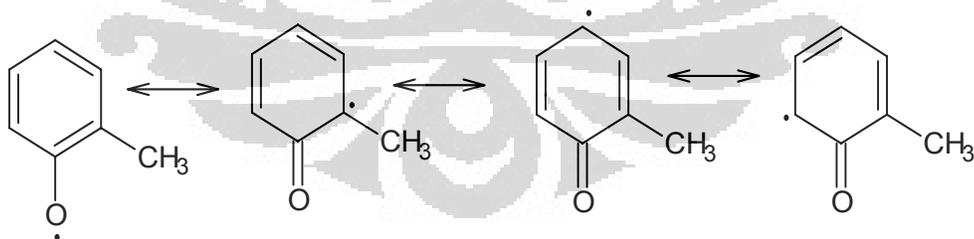
2.1.1. Fenolik Sederhana

Golongan senyawa-senyawa yang termasuk fenolik sederhana antara lain meliputi guaiakol, vanilli dan kresol.



Gambar 2.1. Golongan senyawa fenolik sederhana

Umumnya radikal fenoksi yang terbentuk dari senyawa golongan fenolik sederhana, mengalami pengkopelan pada posisi *orto* atau *para* terhadap gugus hidroksi fenolat³. Posisi ini lebih disukai, karena tidak terlalu sterik sehingga memudahkan radikal lain untuk berikatan pada posisi tersebut.



Gambar 2.2. Resonansi radikal fenoksi o-Kresol

Namun kombinasi pengkopelan lain juga diamati kemungkinannya, yaitu O-*p*, O-*o* dan O-O⁴.

2.1.2. Fenil Propanoid

Fenil propanoid merupakan senyawa fenol alam yang mempunyai cincin aromatik dengan rantai samping terdiri dari 3 atom karbon. Golongan fenil propanoid yang paling tersebar luas adalah asam hidroksi sinamat, yaitu suatu senyawa yang merupakan bangunan dasar lignin. Empat macam asam hidroksi sinamat banyak terdapat dalam tumbuhan. Keempat senyawa tersebut yaitu asam ferulat, sinapat, kafeat dan *p*-kumarat⁵.



R=H, Asam *p*-kumarat /asam *p*-OH sinamat

R= H, Asam ferulat

R=OH, Asam kafeat

R=OMe, Asam sinapat

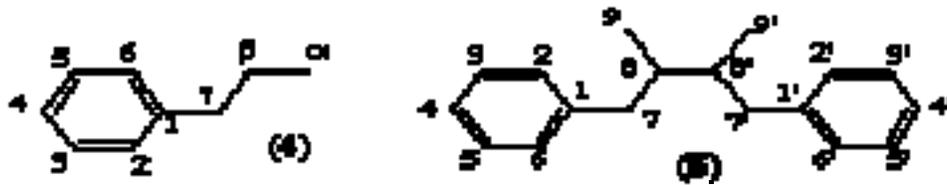
Gambar 2.3. Struktur Fenil propanoid⁴

Radikal fenoksi dari senyawa ini umumnya mengalami pengkopelan di posisi atom C₈, membentuk struktur dengan jembatan 8-8 (8-8 bridges)⁶.

2.1.3. Lignan

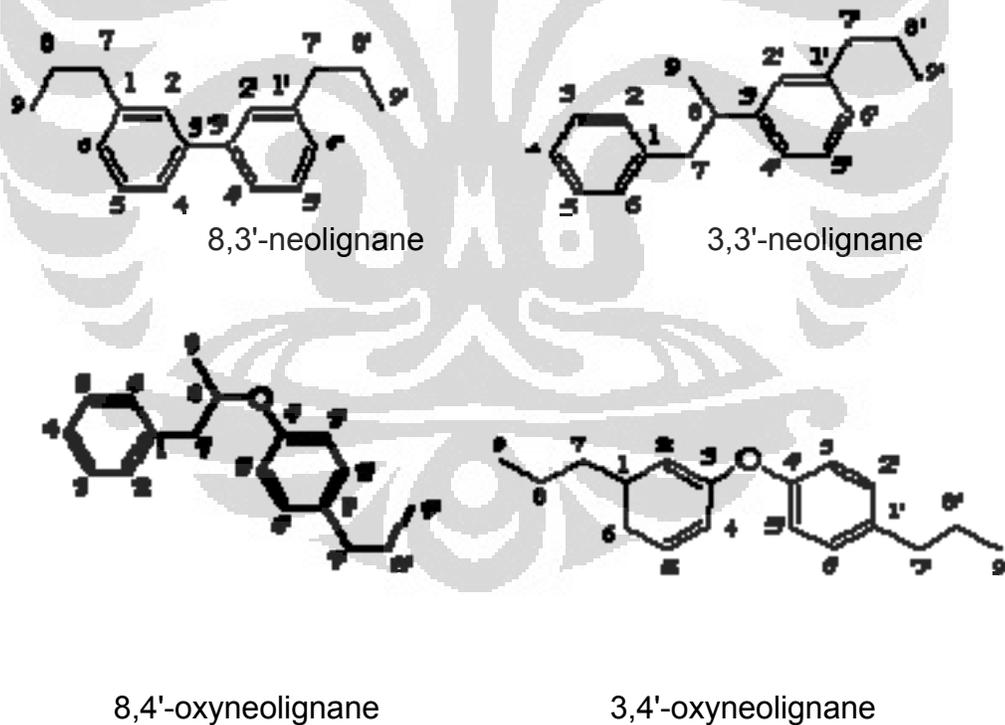
Senyawa-senyawa golongan fenil propanoid membentuk suatu senyawa dimer dengan struktur lignan. Senyawaan lignan memiliki struktur dasar (struktur

induk) yang terdiri dari 2 unit fenil propanoid yang bergabung melalui ikatan 8-8. Ikatan khas ini digunakan sebagai dasar penamaan lignan⁶.



Gambar 2.4. Penomoran atom pada senyawa fenil propanoid dan lignan

Penggabungan 2 unit fenil propanoid dapat pula terjadi melalui ikatan selain membentuk 8-8, yang digolongkan ke dalam neolignan. Sedangkan jika 2 unit fenil propanoid bergabung melalui atom O, senyawa yang terbentuk tergolong dalam oxineolignan⁶.



Gambar 2.5. Struktur senyawa golongan neolignan dan oxineolignan

Senyawaan lignan memiliki banyak modifikasi pada struktur induknya, yang antara lain dapat menghasilkan penambahan cincin, penambahan atau penghilangan atom C, dan sebagainya⁶. Senyawaan ini tersebar luas di dunia tumbuhan, dan banyak digunakan secara niaga sebagai antioksidan dan sebagai komponen sinergistik dalam insektisida. Selain itu, lignan merupakan komponen kimia yang aktif dalam tumbuhan obat tertentu⁷. Salah satu senyawa golongan lignan, yaitu podophyllotoxin, diketahui dapat menghambat tumor. Dalam pengobatan Cina, lignan banyak dipakai untuk mengobati penyakit hepatitis dan melindungi organ hati.

2.1.4. Asam Ferulat

Asam ferulat adalah turunan dari golongan asam hidroksi sinamat, yang memiliki kelimpahan yang tinggi dalam dinding sel tanaman. Hal ini memungkinkan untuk dapat memberikan keuntungan yang signifikan di bidang kesehatan, karena senyawa asam ferulat memiliki aktivitas antikanker dan antioksidan. Selain itu juga dapat menjadi prekursor dalam pembuatan senyawa aromatik lain yang bermanfaat.

Sebagai antioksidan, asam ferulat kemungkinan menetralkan radikal bebas, seperti spesies oksigen reaktif (ROS). ROS kemungkinan yang menyebabkan DNA rusak dan mempercepat penuaan.

Dengan studi pada hewan dan studi in vitro, mengarahkan bahwa asam ferulat kemungkinan memiliki hubungan dengan aktivitas antitumor perlawanan

kanker payudara dan kanker hati. Asam ferulat memiliki kemungkinan sebagai pencegah kanker yang efektif, yang disebabkan oleh paparan senyawa karsinogenik, seperti benzopirene dan 4-nitroquinoline 1-oksida. Namun perlu menjadi catatan, bahwa hal itu tidak diuji coba kontrol random pada manusia, sehingga hasilnya kemungkinan pula tidak dapat dimanfaatkan untuk manusia¹.

Jika ditambahkan pada asam askorbat dan vitamin E, asam ferulat kemungkinan dapat mengurangi stress oksidasi dan pembentukan dimer timidine dalam kulit¹.

Pada tumbuhan, asam ferulat meningkatkan rigiditas dan kekuatan dinding sel tanaman, melalui ikatan silang (*cross linking*) dengan pentosan, arabinosilan dan hemiselulosa, sehingga dinding sel tidak mudah dihidrolisis secara enzimatis selama proses perkecambahan.

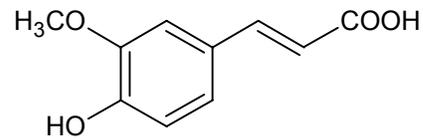
Asam ferulat banyak ditemukan dalam padi (terutama beras merah), gandum, kopi, buah apel, nanas, jeruk dan kacang tanah.

Dalam perindustrian, asam ferulat memiliki kelimpahan dan dapat dimanfaatkan sebagai prekursor dalam pembuatan vanilli, agen perasa sintesis yang sering digunakan dalam ekstrak vanilla alami.

Asam ferulat adalah senyawa fenolik yang dapat dihasilkan salah satunya ialah dengan reaksi kondensasi vanilli dengan asam malonat.

Karakteristik asam ferulat:

Rumus Bangun :



Nama Trivial :Asam ferulat

Nama IUPAC :Asam -3-(4'-hidroksi-3'-metoksi)fenil- 2-trans-propenoat

Rumus molekul :C₁₀H₁₀O₄

Bentuk fisik :kristalin berwarna kuning muda

Berat molekul :194,184 g/mol

Titik leleh :168-171°C

Kemurnian :99 %

Kelarutan :H₂O hangat, etanol, dietil eter, etil asetat dan aseton



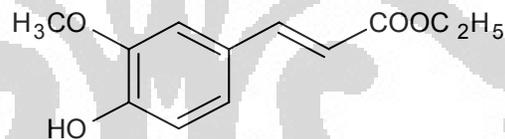
Gambar 2.6. Asam Ferulat

2.1.5. Etil Ferulat

Etil ferulat tergolong ke dalam turunan senyawa asam hidroksi sinamat, yang merupakan turunan dari asam ferulat dalam bentuk ester. Senyawa fenolik ini terdistribusi secara luas pada berbagai jenis tanaman yang dapat dikonsumsi oleh makhluk hidup. Senyawa tersebut terdapat dalam tanaman, terutama pada benih padi dan gandum, tetapi dalam jumlah kecil. Oleh karena itu, senyawa ini biasanya disintesis dari prekursor asam ferulat⁷. Bentuk fisik etil ferulat berupa kristal berwarna putih dan memiliki aktifitas sebagai antioksidan yang sangat baik dibandingkan asam bebasnya. Etil ferulat digunakan sebagai bahan aktif dalam pengobatan terapi untuk antihipertensi.

Karakteristik Etil ferulat :

Rumus Bangun :



Nama Trivial : Etil ferulat

Nama IUPAC : (E)-Etil-3-(4'-hidroksi-3'-metoksi)fenil-2-propenoat

Rumus molekul : C₁₂H₁₄O₄

Bentuk fisik : kristalin berwarna putih

Berat molekul : 222,24 g/mol

Titik leleh : 63-65°C

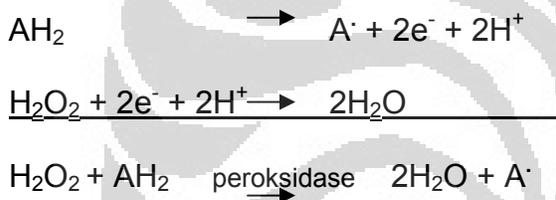
Kemurnian : 99 %

Kelarutan : Etanol, eter, etil asetat, aseton, diklorometana

2.2. Enzim Peroksidase (EC 1.11.1.7)

Enzim peroksidase tergolong ke dalam kelas pertama yaitu oksidoreduktase, dan memiliki gugus prostetik berupa ferri protoporphyrin IX yang disebut dengan heme⁹.

Enzim peroksidase dalam metabolisme makhluk hidup berfungsi mempercepat konversi H_2O_2 menjadi H_2O , dengan adanya donor hidrogen. Peroksidase mereduksi H_2O_2 menjadi H_2O dan mengoksidasi sejumlah substrat yang lain. Substrat AH_2 pada reaksi ini bertindak sebagai donor hidrogen.



Enzim ini ditemukan pada bagian vakuola, tonoplas, plasmalema, di bagian luar dan dalam dinding sel. Dengan adanya peroksida, enzim peroksidase dari jaringan tumbuhan dapat mengoksidasi sebagian besar senyawa-senyawa fenolik, seperti guaiakol, asam klorogenat, katekin, dan katekol.

Peroksidase mempunyai berbagai macam fungsi, antara lain berperan pada regulasi hormon pada tanaman, mekanisme pertahanan, dan biosintesis lignin. Karena fungsinya yang banyak, enzim ini biasanya ditemukan dalam bentuk isoenzim. Sebagai salah satu tanaman penghasil peroksidase, brokoli mengandung 3 buah isoenzim peroksidase, yaitu peroksidase yang bersifat

asam, basa dan netral. Peroksidase pada brokoli mempunyai berat molekul yang mirip dengan peroksidase dari tanaman Horse Radish. Berat molekul enzim ini berkisar dari 30-60 kiloDalton.

Enzim peroksidase stabil pada pH 4 sampai pH 10, serta memiliki kestabilan termal pada suhu $< 60^{\circ}\text{C}^{10}$.

2. 2. 1 Klasifikasi Tanaman Brokoli¹¹

Taksonomi tanaman Brokoli :

Divisi : Spermathophyta

Subdivisi : Angiospermae

Kelas : Monokotil

Family : Brassicaceae

Genus : Brassica

Spesies : *Brassica oleracea var. Italica*



Gambar 2.7. Tanaman Brokoli

2. 2. 2 Aktivitas Enzim

Satuan standar yang digunakan untuk mengukur aktivitas 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 mg protein.

Berdasarkan definisi tersebut, maka nilai aktivitas spesifik enzim menunjukkan kemurnian suatu enzim, dengan demikian semakin besar aktivitas spesifiknya berarti kemurnian enzim tersebut 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 mempunyai ruang yang tepat untuk menampung substrat yang sesuai. Substrat yang konformasinya tidak cocok dengan sisi aktif enzim tidak dapat berfungsi terhadap substrat tersebut. Kontak antara enzim dan substrat menyebabkan terjadinya suatu kompleks enzim substrat. Komplek 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 rendah akan menyebabkan denaturasi protein, sehingga enzim menjadi tidak aktif lagi. Oleh karena itu, perlu dicari pH optimum enzim tersebut.

3. Pengaruh suhu

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

4. Pengaruh aktivator

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

5. Pengaruh inhibitor

Inhibitor adalah suatu senyawa yang cenderung menurunkan laju suatu reaksi enzimatik. Inhibitor terbagi dua, yaitu inhibitor reversibel dan inhibitor irreversibel. Inhibitor reversibel adalah inhibitor yang berikatan dengan enzim secara reversibel, inhibitor ini dapat dilepas kembali dengan proses dialisis atau bahkan hanya dengan pengenceran, sehingga aktivitas enzim didapatkan kembali. Karena biasanya ikatan yang terbentuk adalah ikatan kovalen. Sedangkan inhibitor Irreversibel adalah inhibitor yang terikat secara kuat dan tidak dapat dipisahkan dari enzim tanpa merusaknya ¹¹.

2.3. Reaksi Esterifikasi

Reaksi esterifikasi adalah reaksi yang berlangsung antara asam karboksilat dengan suatu alkohol membentuk suatu ester, berkataliskan asam dan merupakan reaksi yang reversibel¹². Suatu ester asam karboksilat ialah suatu senyawa yang mengandung gugus $-\text{CO}_2\text{R}$ dengan R dapat berbentuk alkil maupun aril. Reaksi esterifikasi secara umum digambarkan sebagai berikut :



Gambar 2.8. Reaksi esterifikasi secara umum

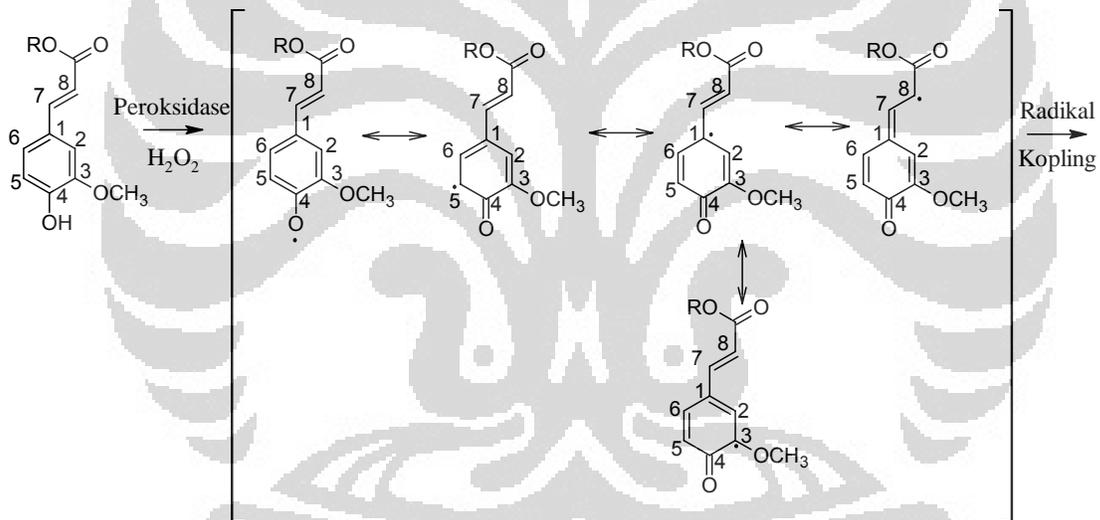
2.4. Mekanisme Kopling Oksidatif Asam Ferulat dan Etil ferulat

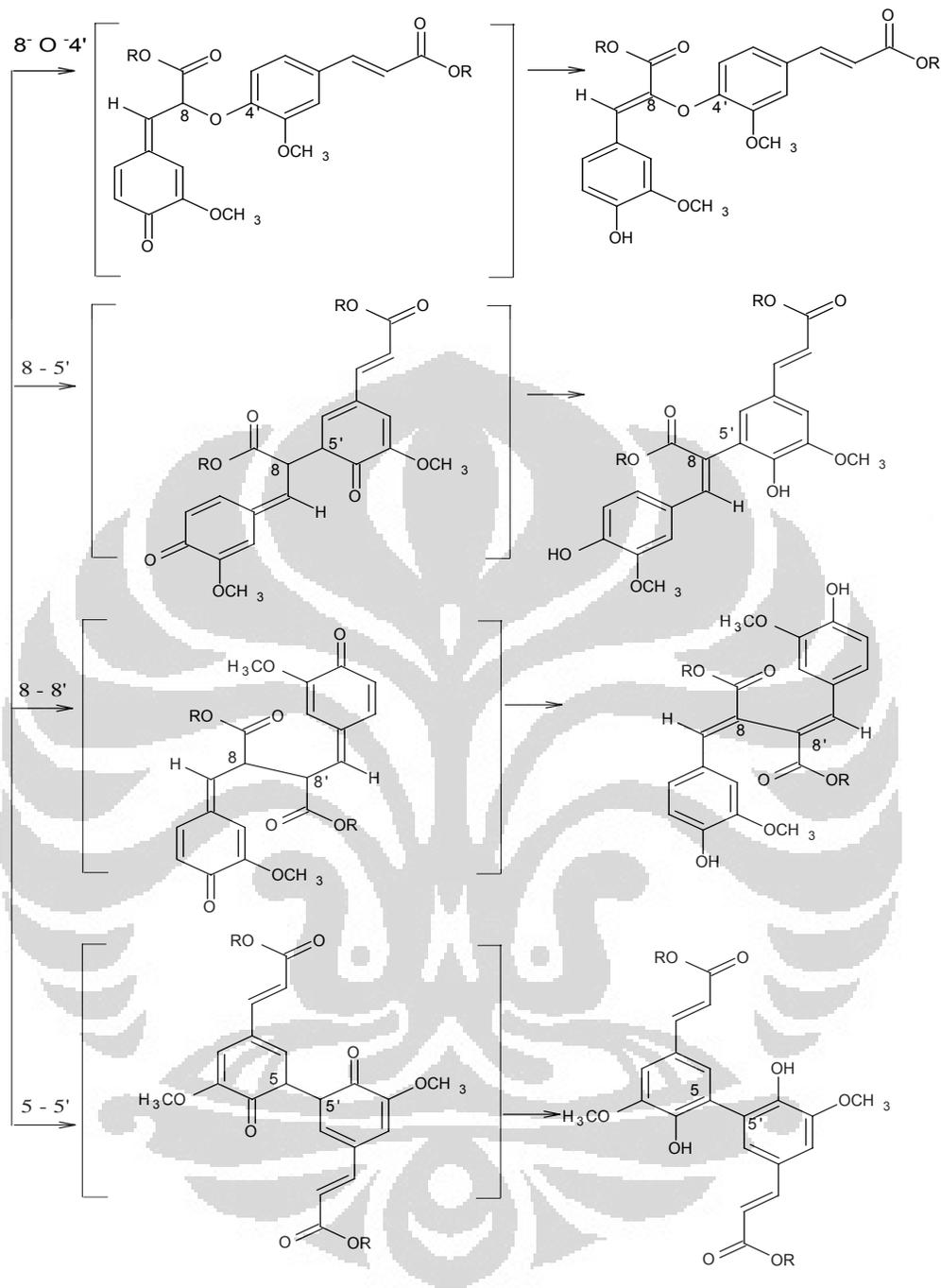
Reaksi kopling oksidatif adalah reaksi penggabungan dua radikal hidrokarbon dengan bantuan katalis. Reaksi kopling ada dua tipe, yang pertama adalah reaksi kopling silang yaitu reaksi penggabungan dua molekul berbeda membentuk sebuah molekul baru. Sebagai contoh yakni reaksi aril magnesium klorida direaksikan dengan aril klorida dengan katalis nikel klorida menjadi biaril. Tipe lainnya adalah homokopling (reaksi Ullmann), yakni reaksi penggabungan

dua molekul sama membentuk sebuah molekul baru contohnya adalah reaksi aril halida yang dikatalisis dengan logam tembaga menghasilkan biaril¹³.

Pada penelitian ini dilakukan reaksi homokopling oksidatif antara molekul asam ferulat dengan asam ferulat dan molekul etil ferulat dengan etil ferulat dengan bantuan enzim peroksidase dari batang brokoli.

Pada etil ferulat dan asam ferulat, radikal fenoksi yang terbentuk akan mengalami radikal kopling seperti terlihat pada Gambar 2.8.





Keterangan : R = H, Asam ferulat

= C₂H₅, Etil ferulat

Gambar 2.9. Reaksi kopling oksidatif asam ferulat dan etil ferulat

BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

3.1 BAHAN

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari: *dry ice* atau CO₂ kering, brokoli (Hypermart), es batu, kapas dan bahan-bahan kimia. Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah Asam ferulat [Sigma Aldrich], Etanol absolut teknis [Bratachem], Akuademin, Asetil klorida (CH₃COOCl), Ammonium sulfat ((NH₄)₂SO₄) [Harum Kimia], Natrium hidroksida (NaOH), Asam asetat (CH₃COOH), Natrium asetat (CH₃COONa), Aseton [Bratachem], *n*-heksana teknis [Bratachem], Etil asetat teknis [Bratachem], H₂O₂ 30%, Follin ciocalteu 1N, CuSO₄.5H₂O, Na₂CO₃, Fenol, 4-aminoantipyrine, KH₂PO₄, K₂HPO₄, K-Na tartarat, BSA dan silika gel.

3.2 ALAT

Peralatan yang digunakan meliputi: blender, beaker glass, pipet ukur (1 mL, 2 mL dan 10 mL), pipet tetes, labu ukur (25 mL, 50 mL dan 100 mL), batang pengaduk, tabung reaksi, spatula, corong pisah, corong, kolom, botol vial, tabung sentrifuge, lemari pendingin, spektrofotometer UV, *cuvette*, lemari asam pH meter, termometer, *magnetic stirrer*, timbangan digital, sentrifuge, botol semprot, erlenmeyer 250 mL, labu destilasi, *heating mantel*, *hot plate*, *rotatory evaporator*, sarung tangan dan kamera digital.

3.3 CARA KERJA

3.3.1 Esterifikasi Asam Ferulat

Padatan asam ferulat sebanyak 1 g dilarutkan dalam 10 mL etanol absolut, lalu ditambahkan 0,5 mL asetil klorida kemudian diesterifikasi dengan *rotatory evaporator* selama satu malam dengan suhu 40°C. Selanjutnya ditambahkan etanol absolut beberapa tetes kemudian diuapkan kembali. Larutan hasil reaksi diekstraksi dengan etil asetat dan air. Fasa organiknya diambil dan dikeringkan/ diuapkan, kemudian direkristalisasi dengan etil asetat. Lalu kristal hasil esterifikasi ditimbang dan diuji KLT dengan pengembang *n*-heksana : etil asetat = 3 : 2. Kristal hasil esterifikasi dimurnikan dengan kromatografi kolom dengan silika gel dan pengembangnya adalah *n*-heksana dan etil asetat. Kristal hasil pemurnian ditimbang kembali.

3.3.2 Isolasi Enzim Peroksidase

Sebanyak 400 g batang brokoli dibender dalam larutan buffer K-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 (ekstrak enzim kasar) diambil sebagian kecil untuk diukur aktivitas enzim dan kadar proteinnya, kemudian sebagian besarnya dibagi menjadi dua bagian yang sama untuk dimurnikan dengan dua cara, yakni yang satu

dimurnikan bertahap dengan menggunakan ammonium sulfat dan yang lainnya dimurnikan bertahap dengan menggunakan aseton yang telah didinginkan dengan ditambahkan CO₂ kering ke dalamnya.

3.3.2.1 Pemurnian dengan Ammonium sulfat

Ekstrak Enzim kasar (supernatan) yang diperoleh dimurnikan dengan penambahan garam (NH₄)₂SO₄ 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 :

$$\text{Jumlah (NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4 \text{ (gram)} = \frac{533 (S_2 - S_1)}{100 - 0,3S_2} \times \frac{V_{\text{supernatan}} \text{ (mL)}}{1000 \text{ mL}}$$

Supernatan dalam beaker glass yang dilengkapi dengan ice salt bath ditambahkan ammonium sulfat 0-30% sedikit-demi sedikit pada suhu 0-5°C, lalu distirer selama 2 jam. Kemudian larutan dibiarkan mengendap selama satu malam di dalam lemari pendingin. Kemudian larutan disentrifugasi selama 6 menit dengan kecepatan 3400 rpm pada suhu ruang. Selanjutnya larutan disuspensikan dalam larutan buffer K-fosfat pH 7,0. Lalu suspensi ini (enzim fraksi I) ditentukan aktivitas enzim dan kadar proteinnya.

Dilakukan hal yang sama pada penambahan (NH₄)₂SO₄ 30-50%, dan 50-70%.

3.3.2.2 Pemurnian dengan Aseton

Disiapkan aseton dingin dengan ditambahkan CO₂ kering sedikit demi sedikit ke dalamnya hingga permukaan luar beaker glass yang berisi aseton membeku/ terbentuk kristal-kristal es. Ekstrak Enzim kasar (supernatan) yang diperoleh dimurnikan dengan penambahan aseton dingin sebanyak 1 : 1 dengan volume supernatan (ekstrak enzim kasar). Larutan dibiarkan mengendap selama satu malam di dalam lemari pendingin. Kemudian larutan disentrifugasi selama 6 menit dengan kecepatan 3400 rpm pada suhu ruang. Selanjutnya endapan disuspensikan dalam larutan buffer K-fosfat pH 7,0. Lalu suspensi ini (enzim fraksi I) ditentukan aktivitas enzim dan kadar proteinnya.

Filtrat dari supernatan ini kemudian ditambahkan kembali aseton dingin dengan perbandingan yang sama kemudian didiamkan selama satu malam dan disentrifugasi selama 6 menit dengan kecepatan 3400 rpm. Endapan enzim fraksi II disuspensikan dalam buffer fosfat pH 7,0. Lalu ditentukan aktivitas enzim dan kadar proteinnya.

Selain itu, enzim fraksi I dan II aseton ini diuji kualitatif dengan penambahan H₂O₂ dan guaiakol.

3.3.3 Penentuan Aktivitas Peroksidase

Substrat yang digunakan :

- ✓ Larutan H_2O_2 1,7 mM dalam buffer K-fosfat 0,2 M pH 7,0 :

1 mL larutan H_2O_2 30% dilarutkan dengan air akuademin hingga volumenya 100 mL. Sebanyak 1 mL dari larutan ini dilarutkan ke dalam buffer K-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 akuademin lalu ditambahkan 25 mg 4-aminoantipyrine dan dilarutkan dengan akuademin hingga volumenya 50 mL.

Langkah kerja :

Larutan 4-aminoantipyrine/ fenol 1,4 mL dan 1,5 mL H_2O_2 1,7 mM dicampur ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 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, larutan enzim diganti dengan akuademin.

Pengukuran aktivitas dilakukan secara spektrofotometri pada λ 510 nm berdasarkan pembentukan produk dari substrat yang teroksidasi.

Aktivitas spesifik enzim dihitung dengan menggunakan persamaan
Worthington Manual Enzyme yang dimodifikasi :

$$\text{Unit/ mg} = \frac{A_{510\text{nm}}}{\text{menit}} \\ 6,58 \times \text{mg protein/mL}$$

3.3.4 Penentuan kadar protein enzim dengan Metode Lowry

Pereaksi Lowry :

- A. Na_2CO_3 2 g dalam 100 mL NaOH 0,1 N
- B. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g dalam 50 mL K-Na tartarat 1%
- C. Campuran 50 mL larutan A dan 1 mL larutan B
- D. Pereaksi Follin ciocalteu 1N

Langkah kerja :

Sebanyak 1 mL larutan enzim (protein) dicampur dengan 5 mL pereaksi C, kemudian diaduk hingga merata lalu dibiarkan selama 10 menit. Selanjutnya ke dalam campuran di atas ditambahkan 0,5 mL pereaksi D, lalu diaduk kembali hingga merata dan dibiarkan selama 30 menit. Serapannya diukur pada spektrofotometer UV dengan panjang gelombang 750 nm. Sebagai larutan standar, larutan enzim diganti dengan BSA dengan variasi konsentrasi mulai dari 0,0625 mg/mL hingga 1,00 mg/MI. Pada pengukuran blanko, larutan enzim diganti dengan air.

3.3.5 Reaksi Oksidasi Kopling Asam ferulat dan Ester (Etil ferulat) yang Dikatalisis Peroksidase

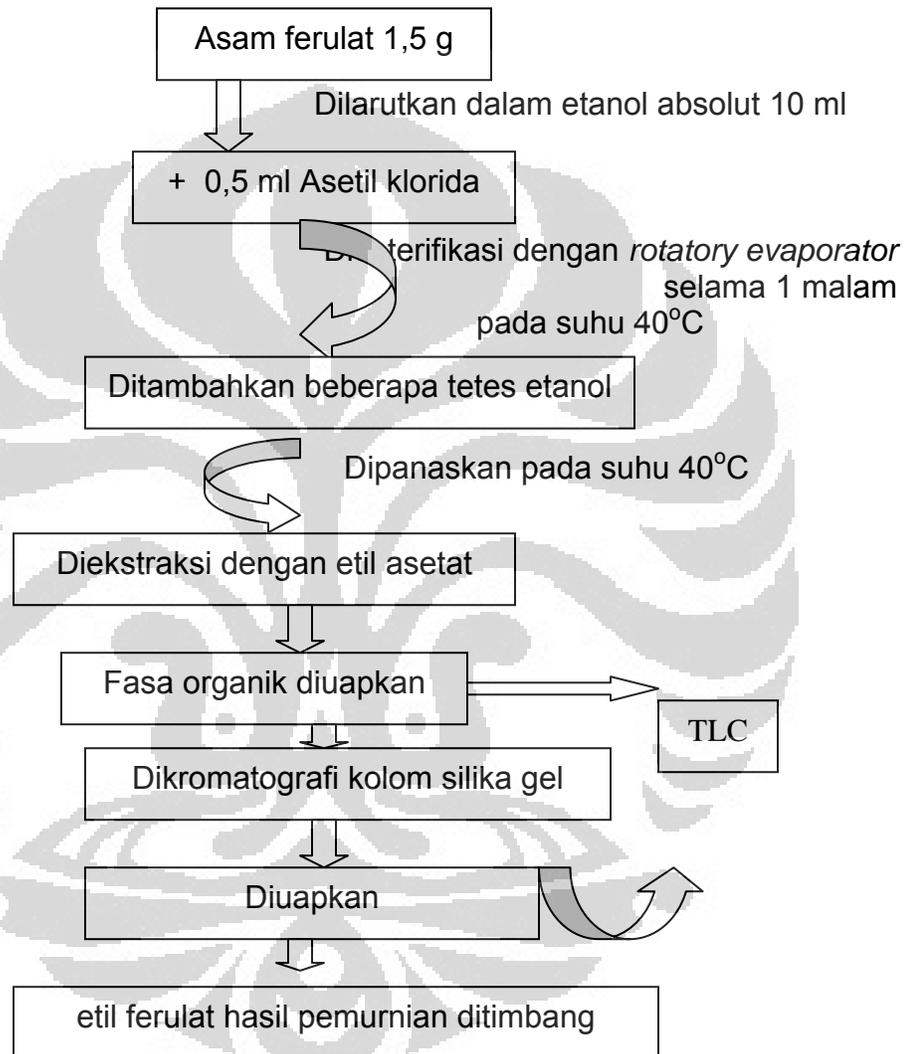
Sebanyak 0,1 g asam ferulat dan etil ferulat dilarutkan ke dalam 100 mL buffer Na-asetat pH 4,0 pada suhu 60°C. Setelah larut, larutan didinginkan hingga suhu 40°C, kemudian ditambahkan 0,04 mL H₂O₂ dan 0,7 mL larutan enzim fraksi II aseton, lalu diaduk selama 10 menit. Kemudian larutan hasil reaksi diekstraksi dengan etil asetat kemudian diuapkan kembali. Ditimbang berat kristal yang didapat, kemudian dimurnikan dengan kromatografi kolom. Hasil dimer yang telah dimurnikan diuapkan lalu ditimbang kembali.

3.3.6 Uji KLT dan GC-MS

Produk hasil reaksi selanjutnya ditambahkan etil asetat beberapa tetes untuk ditotolkan pada plat KLT dengan pengembang *n*-heksana : etil asetat = 3 : 2. Hasil reaksi selanjutnya dianalisis dengan instrumen GC-MS.

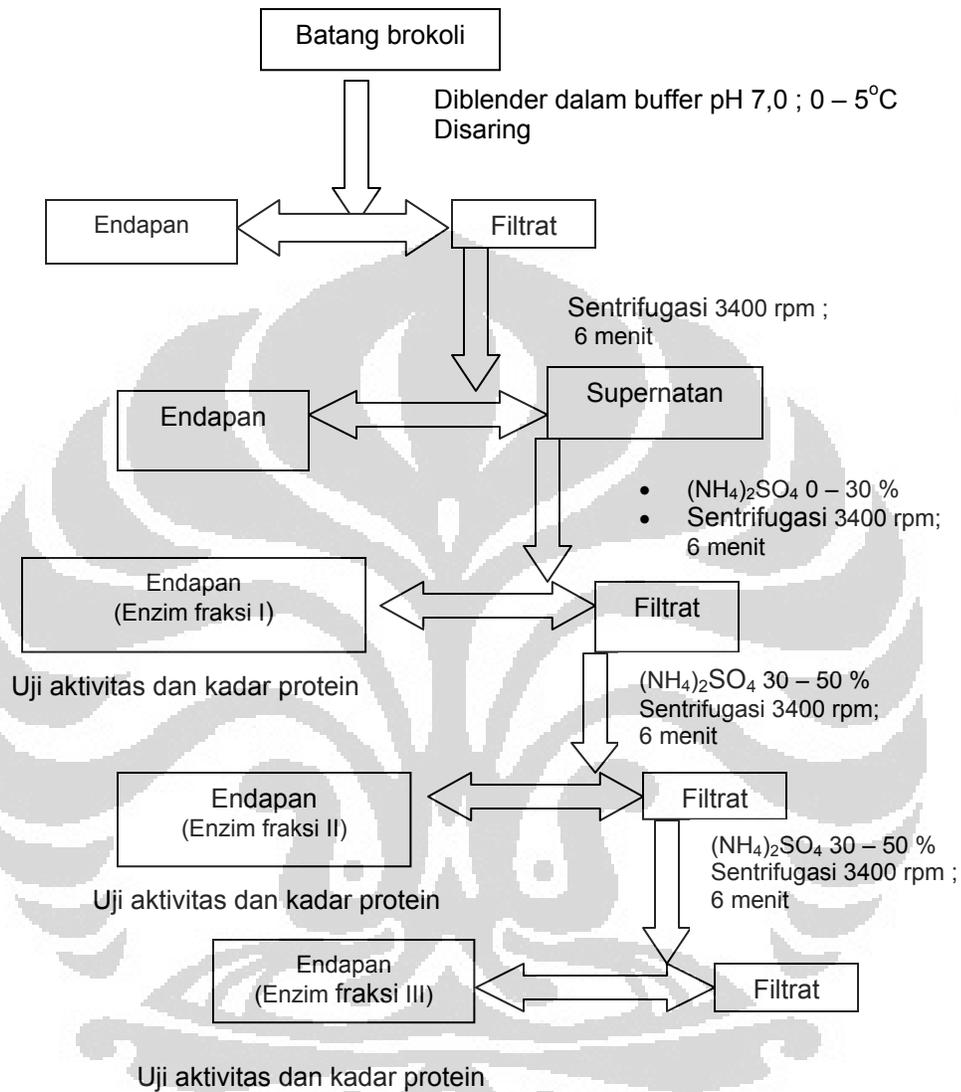
3.3.7 Skema Kerja

I. Esterifikasi Asam Ferulat

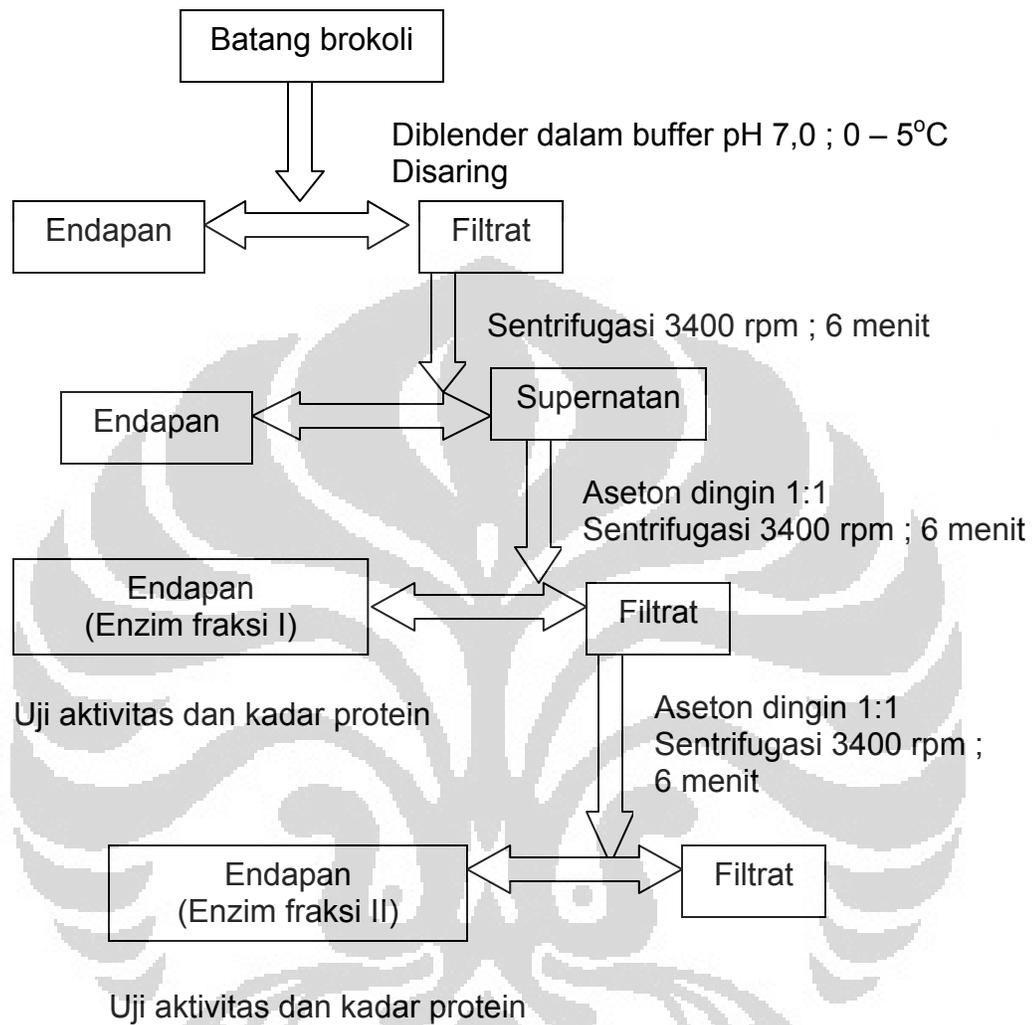


II. Isolasi Enzim Peroksidase

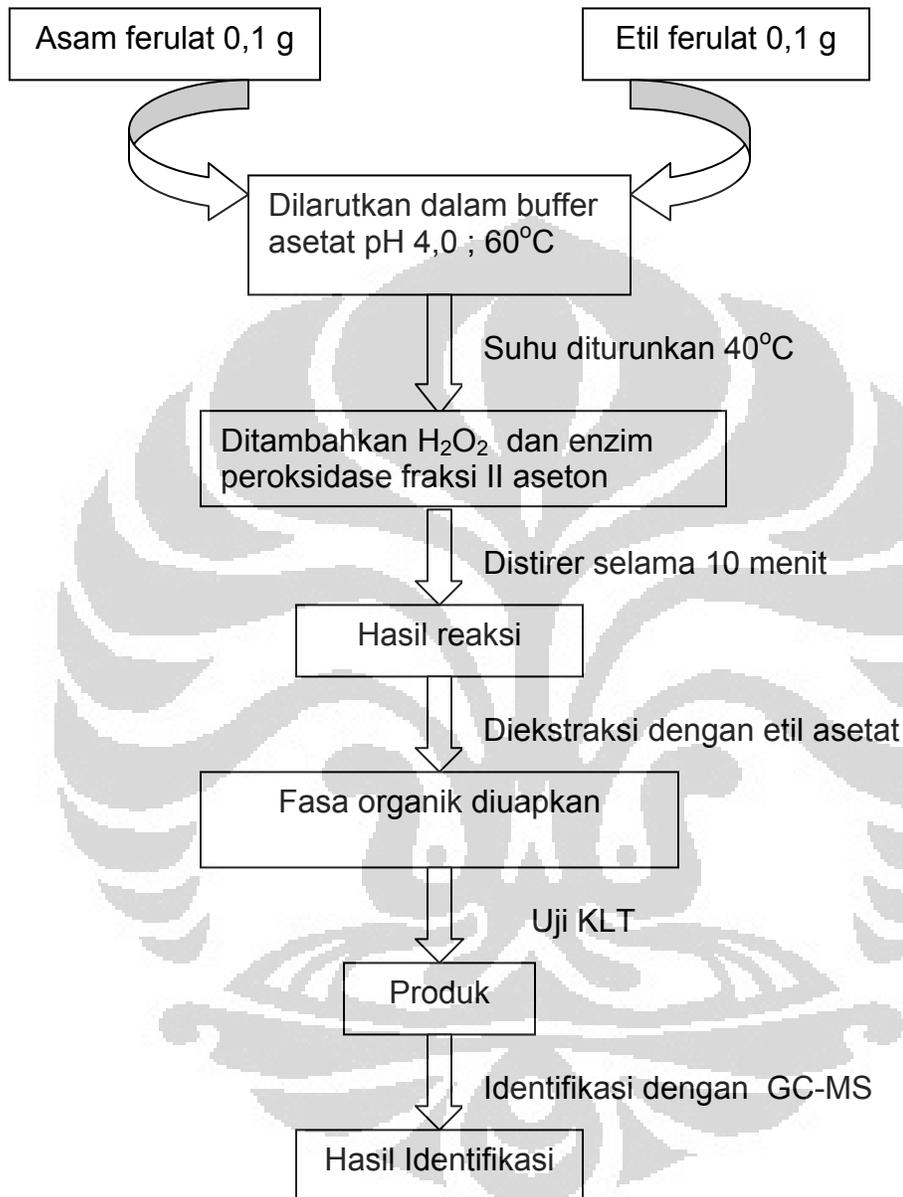
II.1 Isolasi dengan garam $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$



II.2 Isolasi dengan aseton suhu dibawah 0°C (ditambahkan *dry ice*)



III. Dimerisasi Asam Ferulat dan Ester

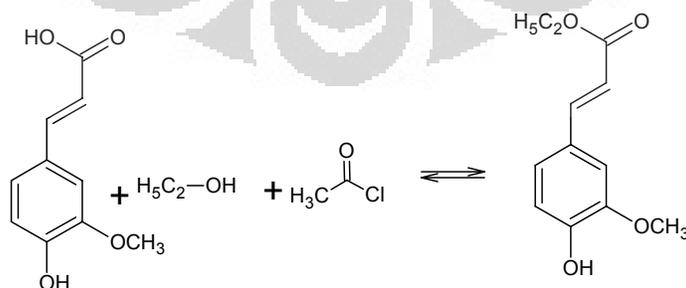


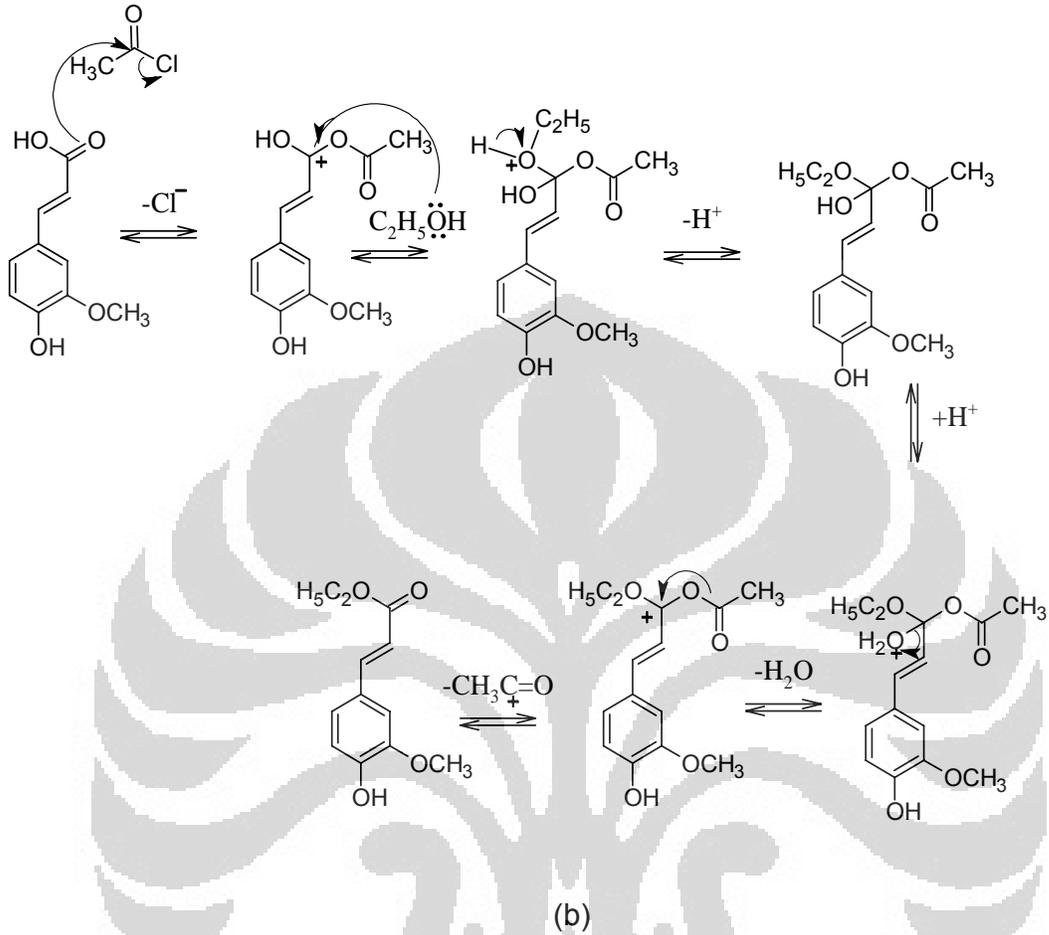
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Esterifikasi Asam Ferulat

Ester asam karboksilat adalah suatu senyawa yang mengandung gugus $-COOR$ dengan R dapat berbentuk alkil atau pun aril¹². Dalam penelitian ini dilakukan esterifikasi metode fischer yakni esterifikasi dengan menggunakan asam halida. Pada percobaan ini 1 g asam ferulat (0,005 mol) dilarutkan terlebih dahulu dalam 10 ml etanol (0,345 mol) kemudian ditambahkan 0,50 mL asetil klorida (0,017 mol) lalu dirotatory evaporator selama semalam pada suhu $40^{\circ}C$. Berdasarkan data mol tersebut dapat kita ketahui bahwa etanol absolut yang dipakai berlebih karena reaksi esterifikasi adalah reaksi reversibel, untuk memperoleh rendemen tinggi dari ester tersebut, kesetimbangan harus digeser ke arah sisi ester. Salah satu caranya ialah dengan menggunakan salah satu zat pereaksi/reagen secara berlebihan. Dan esterifikasi dilakukan pada suhu $40^{\circ}C$ bertujuan agar reagen dapat bereaksi sempurna karena pada suhu tersebut terjadi kontak yang maksimum antar reagen. Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut :





Gambar 4.1. (a) Reaksi esterifikasi asam ferulat

(b) Mekanisme reaksi esterifikasi asam ferulat



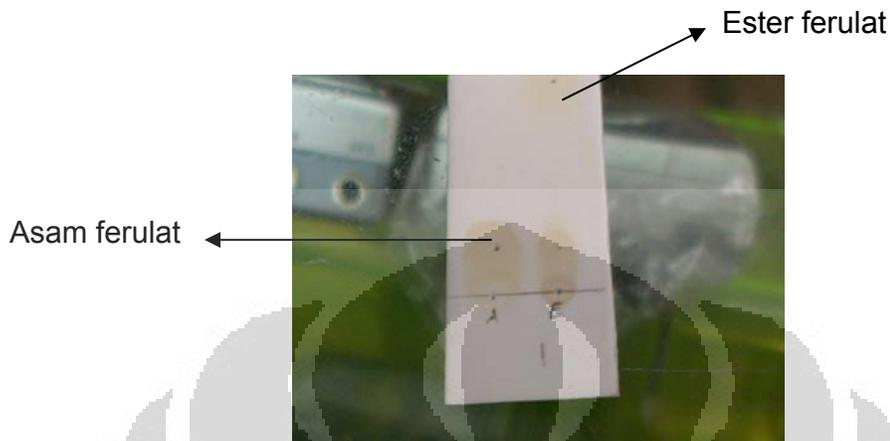
Gambar 4.2. Hasil esterifikasi asam ferulat yang belum dimurnikan

Setelah direaksikan, hasil ester diekstraksi untuk dipisahkan ester dari pengotor-pengotor polar dengan menggunakan etil asetat. Etil asetat yang merupakan senyawa nonpolar akan larut dalam etil asetat (fasa organik) kemudian dipisahkan fasa organiknya dan diuapkan. Didapat massa hasil esterifikasi yang belum dimurnikan adalah 1,0535 g (Gambar 4.2.).

Hasil ester kemudian diuji KLT (Kromatografi Lapisan Tipis) untuk melihat komposisi pengembang/fasa gerak yang sesuai untuk pemisahan komponen-komponen yang terdapat pada ester hasil reaksi dan juga sebagai tahap awal identifikasi untuk melihat banyaknya komponen yang terdapat dalam produk. Uji kualitatif ini memerlukan waktu yang lama \pm 6-10 menit dan mudah dilakukan. KLT memiliki tingkat resolusi pemisahan yang jauh lebih baik daripada kromatografi kertas dan dapat pula digunakan untuk memeriksa adanya zat pengotor dalam pelarut.

Dalam uji KLT umumnya fasa diam (silika gel) bersifat polar dan senyawa polar akan melekat lebih kuat pada lempeng daripada senyawa nonpolar, hal ini diakibatkan adanya interaksi tarik menarik dipol-dipol. Peningkatan polaritas pelarut akan menurunkan interaksi senyawa dengan fasa diam sehingga memungkinkan senyawa dalam fasa gerak bergerak lebih jauh pada lempeng. Jarak tempuh ke atas lempengan merupakan gambaran dari polaritas suatu senyawa.

Komponen hasil esterifikasi dipisahkan dengan pengembang *n*-heksana : etil asetat = 3 : 2. Didapat spot ester hasil reaksi dengan Rf 0,71 dan 0,28.



Gambar 4.3. KLT hasil esterifikasi asam ferulat

Ester hasil reaksi dikromatografi kolom untuk memurnikan etil ferulat yang terbentuk dan memisahkannya dari pengotor-pengotornya seperti sisa asam ferulat dan hasil-hasil lain dari reaksi ester tersebut. Hasil kolom ditampung tiap 20 mL, dikeringkan dan diuji KLT dengan pengembang *n*-heksana : Etil asetat = 3:2 dengan asam ferulat sebagai pembanding, berikut ini adalah hasilnya :

Asam ferulat murni : 0,14 (pembanding)

Hasil ester setelah dikromatografi kolom kemudian dikeringkan dan diKLT :

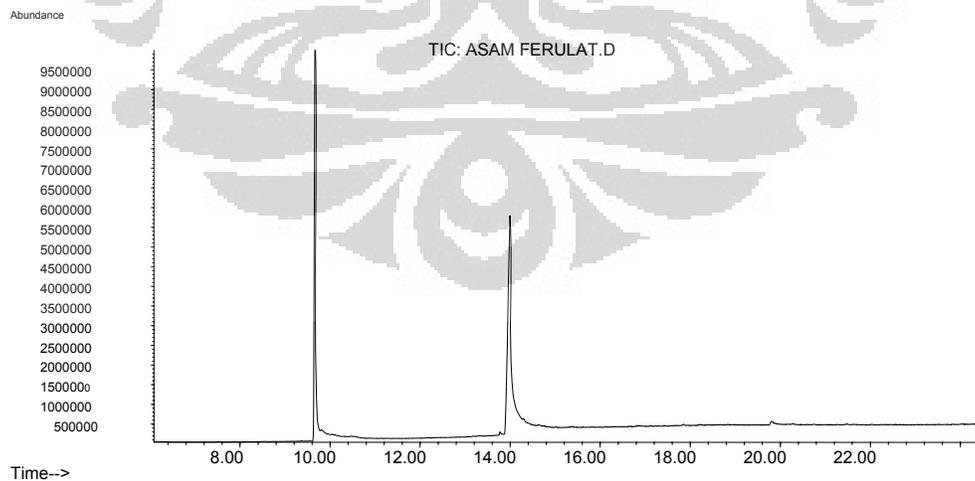
Tampungan I	: -	
Tampungan II	: 0,64	→ ester ferulat
Tampungan III	: 0,16	↙ ↘ sisa asam ferulat
Tampungan IV	: 0,16	

Dari hasil diatas dapat diketahui bahwa hasil ester adalah etil ferulat dan asam ferulat hasil pembentukan kembali, dikarenakan reaksi esterifikasi adalah reaksi reversibel. Dan ester yang didapat dikeringkan, lalu direkristalisasi dengan etil aasetat, kemudian ditimbang didapat kristal putih kekuningan massanya adalah 0,6714 g.

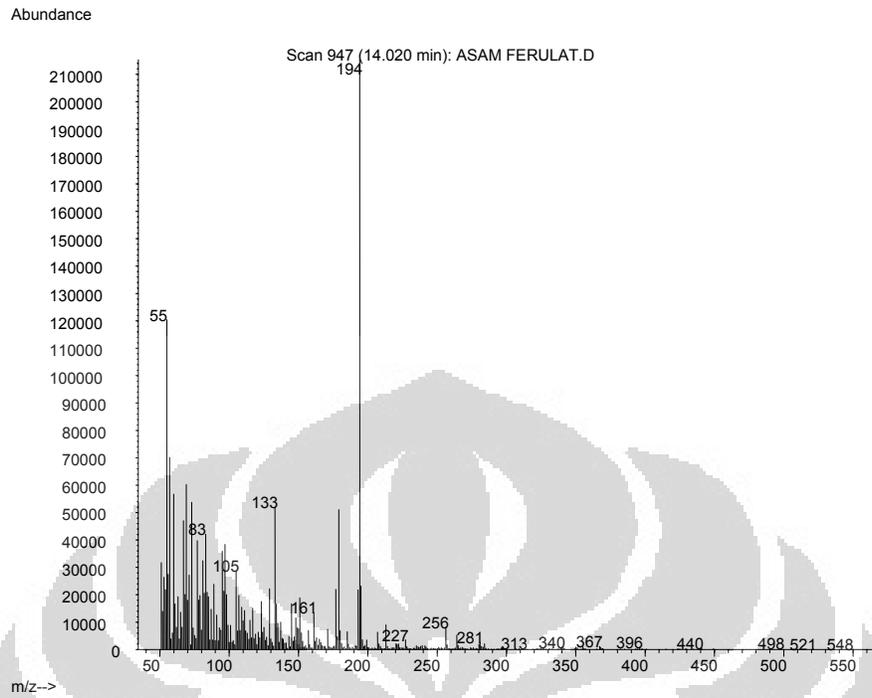


Gambar 4.4. Etil Fertulat Hasil Rekristalisasi

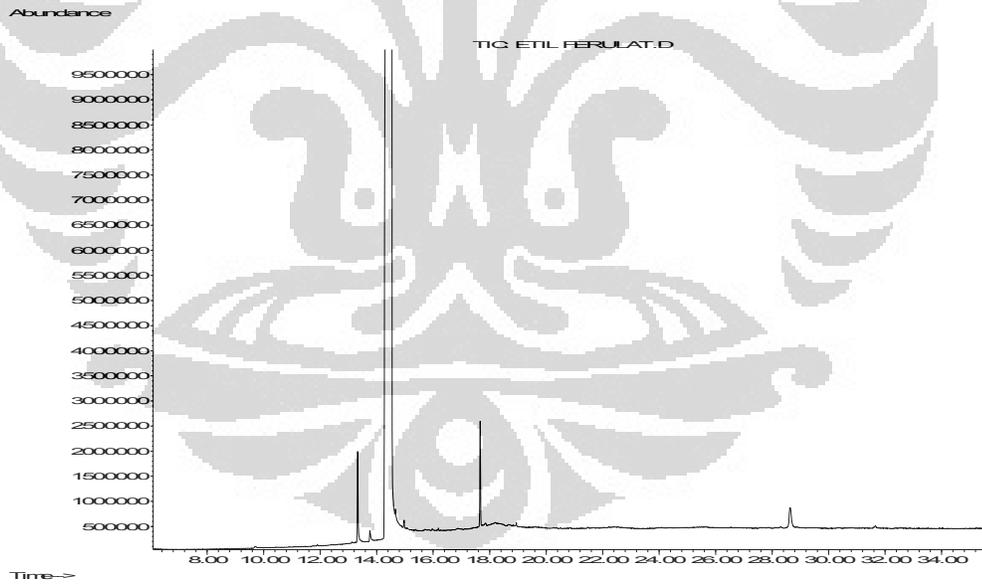
Untuk memastikan terbentuknya ester, hasil ester ini dianalisis GC-MS beserta asam ferulatnya kemudian dibandingkan. Analisis GC-MS (kromatografi gas dan spektrum massa) digunakan untuk mengetahui berapa banyak senyawa kimia yang terkandung dalam suatu sampel dan dapat menentukan berat molekul atau massa relatifnya Analisis GC-MS yang dilakukan terhadap produk ester menghasilkan kromatogram seperti yang terlihat pada gambar di bawah ini.



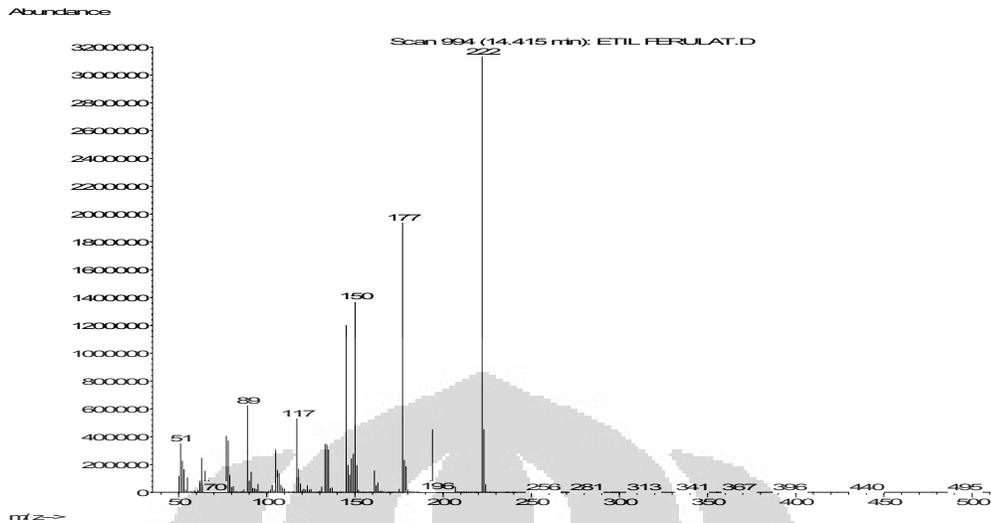
Gambar 4.5. Kromatogram asam ferulat



Gambar 4.6. Spektrum massa asam ferulat



Gambar 4.7. Kromatogram etil ferulat



Gambar 4.8. Spektrum massa etil ferulat

Tabel 4.1. Hasil GC-MS etil ferulat

Waktu retensi (menit)	Luas area (% area)	m/z
14,415	95,49	222

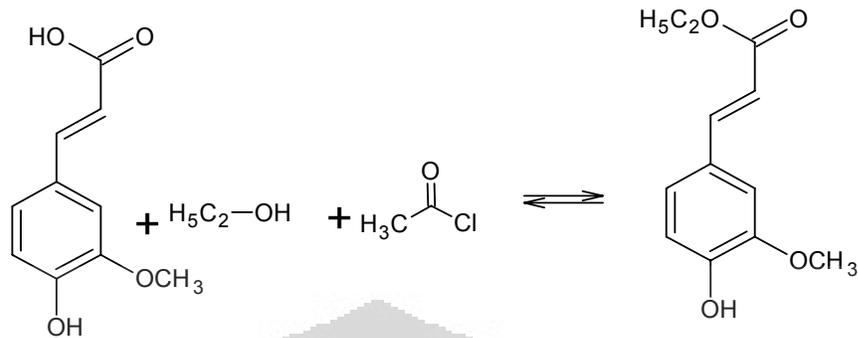
Hasil MS produk esterifikasi menunjukkan adanya spektrum dengan m/z = 222 pada waktu retensi 14,415 menit. Hasil ini berbeda dengan hasil MS dari bahan bakunya yakni asam ferulat yang menunjukkan adanya spektrum dengan m/z = 194 pada waktu retensi 14,020 menit. Hal ini menunjukkan bahwa telah terjadi reaksi esterifikasi asam ferulat dan dilihat dari nilai m/z yang didapat sesuai dengan massa molekul etil ferulat dari literatur yakni 222,24 g/mol.

Berdasarkan tabel di atas etil ferulat yang terbentuk dapat diketahui sebagai berikut.

Berat etil ferulat yang terbentuk : $95,49 \% \times 0,6714 \text{ g} = 0,6411 \text{ g}$.

Jumlah mol etil ferulat yang terbentuk : $0,6411 \text{ g} / 222,24 \text{ g/mol} = 0,003 \text{ mol}$.

Berdasarkan perhitungan secara empiris :



Mula-mula : 0,005 mol 0,345 mol 0,017 mol

Bereaksi : 0,005 mol 0,005 mol 0,005 mol 0,005 mol

Sisa : - 0,34 mol 0,012 mol 0,005 mol

Jadi persentase (%) etil ferulat yang terbentuk = $\frac{0,005 \text{ mol} - 0,003 \text{ mol}}{0,005 \text{ mol}} \times 100\%$

$$= 40,00 \%$$

4.2. Isolasi Enzim Peroksidase

Brokoli merupakan tanaman yang memiliki aktivitas peroksidase tertinggi, dibandingkan dengan sumber terbanyak dari tanaman lain seperti *Horse Radish*. Pada penelitian ini digunakan bagian batang brokoli sebagai sumber enzim karena aktivitas peroksidase tertinggi ditemukan pada bagian batang¹¹. Peroksidase tergolong ke dalam jenis enzim intraseluler sehingga untuk melepaskan enzim dibutuhkan pemecahan dinding sel, salah satunya ialah dengan alat homogenizer seperti blender¹⁶. Batang brokoli diblender dalam buffer K-fosfat pH 7,0 pada suhu

4°C. Pada kondisi tersebut akan diperoleh aktivitas enzim peroksidase yang optimum dan pada suhu dingin dapat mencegah terjadinya degradasi proteolitik.

Setelah dinding sel dipecahkan, maka enzim yang dihasilkan harus dipisahkan dari sel penghasilnya dan senyawa-senyawa lain seperti enzim-enzim lain, protein metabolit dan lain-lain. Pemisahan ini dilakukan dengan sentrifugasi yang akan menghasilkan filtrat sebagai enzim kasar dan endapan. Pemisahan dengan sentrifugasi akan berlangsung lebih cepat dan lebih mudah tercapai salah satunya dengan radius putaran yang besar¹⁶. Pemisahan juga akan lebih mudah tercapai bila diameter partikel besar, perbedaan massa jenis partikel dan larutan besar, viskositas larutan rendah dan kecepatan angular yang tinggi¹⁵.

Ekstrak enzim kasar diambil sebagian kecil untuk mengukur aktivitas dan kadar protein, kemudian sebagian besarnya dibagi menjadi dua bagian yakni masing-masing 200 mL. Bagian pertama dimurnikan melalui metode pengendapan dengan garam ammonium sulfat dan bagian lainnya dimurnikan bertahap dengan menggunakan aseton yang telah didinginkan dengan ditambahkan CO₂ kering ke dalamnya.



Gambar 4.9. Ekstrak enzim kasar

Pada ekstrak enzim yang dimurnikan melalui pengendapan dengan ammonium sulfat pada berbagai tingkat konsentrasi yakni : 0-30%, 30-50%, dan 50-70% (b/v) berprinsip pada perbedaan kelarutan dari protein-protein. Protein yang

mempunyai berat molekul yang besar mempunyai tingkat kelarutan yang rendah sehingga akan mengendap terlebih dahulu, lalu diikuti dengan protein-protein yang memiliki berat molekul yang lebih kecil. Dengan memvariasikan tingkat konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, diharapkan protein-protein dapat dipisahkan dalam berbagai kelompok (fraksi) yang memiliki berat molekul yang sama ataupun sangat berdekatan¹⁶.

Didapat ekstrak enzim kasar, fraksi I (7,0 mL), II (5,0 mL) dan fraksi III (1,5 mL) diukur aktivitas enzim dan kadar proteinnya.



Gambar 4.10. Ekstrak enzim fraksi I, II dan III ammonium sulfat

Begitu pula dengan pemurnian dengan aseton dingin yang dilakukan bertahap (2 tahap), masing-masing tahap ditambahkan aseton dingin dengan perbandingan volume ekstrak enzim : volume aseton = 1 : 1, dimaksudkan agar protein dapat dipisahkan dalam berbagai kelompok (fraksi) yang memiliki berat molekul yang sama ataupun sangat berdekatan. Aseton setelah ditambahkan *dry ice* menjadi dingin, hal ini dilakukan agar tidak terjadi degradasi proteolitik. Pada saat penambahan pelarut organik seperti aseton, kepolaran enzim dalam air akan berkurang sehingga enzim terendapkan. Didapat ekstrak enzim hasil

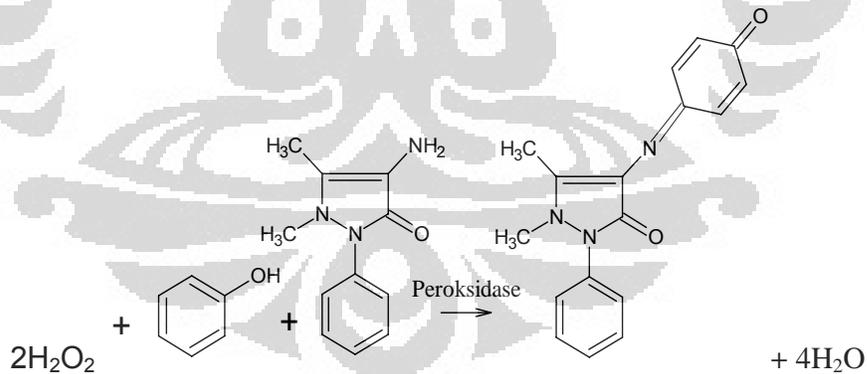
pemurnian dengan aseton fraksi I (18,0 mL) dan II (2,46 mL) diukur aktivitas enzim dan kadar proteinnya.



Gambar 4.11. Ekstrak enzim fraksi I dan II aseton

4.3. Uji Aktivitas Enzim dan Kadar Protein

Enzim yang di dapat hasil pemurnian dengan ammonium sulfat maupun dengan aseton kemudian ditentukan aktivitasnya berdasarkan reaksi oksidasi aminoantipyrine dan fenol dengan H_2O_2 . Reaksi terjadi :



fenol 4-aminoantipyrine Quinonimina

4-aminoantipyrine dan fenol bertindak sebagai substrat donor H yang akan membentuk senyawa berwarna merah, quinonimina. Senyawa ini memiliki serapan maksimum pada $\lambda = 510 \text{ nm}$.

Aktivitas enzim ditentukan dengan mengukur absorbansi pada $\lambda = 510 \text{ nm}$. Satu unit enzim dihasilkan dari dekomposisi $1 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ per menit pada suhu 25°C dan pH 7,0 pada kondisi spesifik⁸. Uji aktivitas enzim merupakan cara untuk mengetahui apakah enzim yang sudah diisolasi dan dimurnikan merupakan enzim peroksidase atau bukan serta memiliki aktivitas atau tidak.

Senyawa quinonimina berwarna merah yang terbentuk menandakan bahwa enzim peroksidase bekerja mengkatalisis reaksi redoks. Penggunaan substrat 4-aminoantipyrine dan fenol didasarkan pada kemudahan kedua senyawa ini dalam mendonorkan H dan menghasilkan produk berwarna merah yang intensif yang dapat dideteksi secara spektroskopi pada daerah visibel.



(a) Enzim dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$



(b) Enzim dengan aseton

Gambar 4.12. Pengukuran aktivitas enzim

Uji aktivitas ini pun dapat di deteksi secara kualitatif dengan menggunakan substrat lain yang mudah menghasilkan produk berwarna yang intensif yang dapat dilihat kasat mata, salah satunya adalah guaiakol.



(a) Enzim fraksi III ammonium sulfat



(b) Enzim fraksi II aseton

Gambar 4.13. Enzim ditambahkan guaiakol dan H_2O

Dengan penambahan guaiakol dan H_2O_2 , terjadi perubahan warna menjadi merah kecoklatan, hal ini menandakan bahwa telah terjadi reaksi oksidasi guaiakol dengan H_2O_2 . Guaiakol bertindak sebagai substrat donor H yang akan membentuk senyawa berwarna merah kecoklatan. Dengan terjadinya reaksi tersebut dapat membuktikan dalam fraksi tersebut terdapat enzim peroksidase, enzim yang mengarahkan kepada reaksi redoks (reduksi-oksidasi).

Penentuan kadar protein pada peroksidase dilakukan dengan menggunakan metode Lowry. Metode Lowry adalah metode yang memiliki tingkat sensitifitas yang tinggi karena menghasilkan warna yang intensif. Dalam metode ini, terjadi reaksi Biuret yaitu ion Cu^{2+} dari $CuSO_4$ bereaksi dengan ikatan peptida protein membentuk kompleks dan mengalami reduksi Cu^{2+} menjadi Cu^{1+} . Setelah itu pereaksi Follin direduksi oleh gugus tirosin dan triptofan. Reaksi Biuret yang menghasilkan warna yang kurang sensitif, ketika ditambahkan Follin terbentuklah warna biru dan lebih sensitif dibandingkan warna dari reaksi Biuret saja²⁵.



Gambar 4.14. Larutan standar BSA pengukuran kadar protein

Sebagai larutan standar, enzim digantikan dengan larutan BSA dengan konsentrasi bervariasi (0,0625 mg/mL hingga 1,00 mg/mL) sehingga dihasilkan kurva standar (lampiran 1).

Pada uji aktivitas enzim diperoleh absorbansi pada $\lambda = 510 \text{ nm}$ (lampiran 2 - 6) dan pada uji kadar protein diperoleh pada $\lambda = 750 \text{ nm}$ (lampiran 1) yakni sebagai berikut :

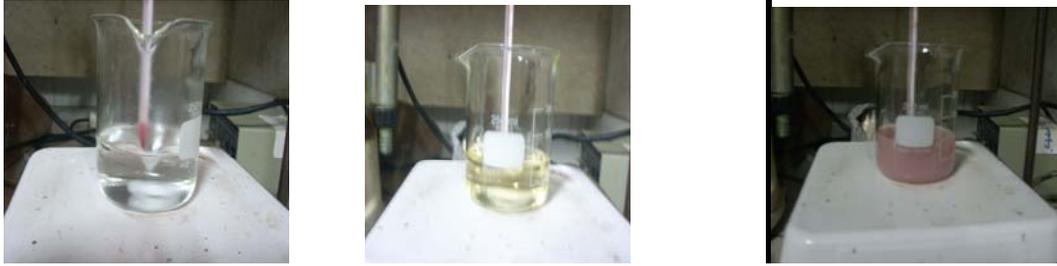
Tabel 4.2. Aktivitas enzim peroksidase

Enzim	A ₅₁₀	A ₇₅₀	Kadar protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg)
Kasar ((NH ₄) ₂ SO ₄)	0,056	0,39654	0,2420	0,035
Fraksi I ((NH ₄) ₂ SO ₄)	0,131	0,80495	0,5926	0,027
Fraksi II ((NH ₄) ₂ SO ₄)	0.469	0,98796	0,7497	0,151
Fraksi III ((NH ₄) ₂ SO ₄)	1.082	0,55699	0,3797	0,433
Fraksi I (Aseton)	0,162	0,55212	0,3756	0,065
Fraksi II (Aseton)	1,722	0,47473	0,3091	0,847

Dari data berikut, dapat disimpulkan bahwa enzim fraksi II aseton lebih baik dari pada enzim fraksi III (NH₄)₂SO₄ (enzim fraksi III adalah yang paling besar diantara fraksi lain enzim hasil pemurnian dengan ammonium sulfat) hal ini terjadi disebabkan pada pemurnian dengan menggunakan aseton aktivitas enzim dapat terjaga dikarenakan aseton adalah pelarut non polar, enzim hanya sedikit yang larut, sebagian besarnya dalam bentuk padatan (tidak larut), sehingga dalam penyimpanan, aktivitas enzim terjaga, kalau pun terjadi penurunan nilai aktivitas tidak terlalu signifikan.

4.4. Reaksi Oksidasi Kopliling Asam Ferulat dan Etil Ferulat

Enzim peroksidase pada tanaman brokoli mempunyai 3 buah bentuk isoenzim, yaitu peroksidase yang bersifat asam, bersifat basa, dan bersifat netral. Peroksidase bersifat asam ditemukan paling banyak pada batang brokoli dan diketahui terlibat dalam biosintesis lignin. Senyawa asam ferulat adalah senyawa yang terlibat pada jalur pembentukan lignin sehingga peroksidase asam ini lebih banyak mengkatalisis reaksi asam ferulat¹⁵. Peroksidase asam pada brokoli mempunyai aktivitas optimum untuk bereaksi pada pH 4-5 dan pada penelitian sebelumnya mengenai pH optimum enzim peroksidase yang bersifat asam didapatkan data bahwa enzim tersebut memiliki aktivitas terbesar pada pH 4,0. Oleh karena itu pada penelitian ini asam ferulat dilarutkan dalam buffer pH 4,0, akan tetapi disertai dengan pemanasan hingga suhu 60°C dikarenakan asam ferulat kurang larut dalam buffer asetat pH 4,0. Setelah larut, kemudian larutan didinginkan sampai suhu 40°C, pada suhu tersebut peroksidase yang nanti akan ditambahkan dapat bekerja secara optimum. Warna larutan asam ferulat dengan buffer dan larutan etil ferulat dengan buffer adalah bening, kemudian ditambahkan 0,04 mL H₂O₂, warna larutan asam ferulat berubah menjadi bening kekuningan, sedangkan larutan etil ferulat berubah menjadi putih keruh. Kemudian larutan ditambahkan 0,70 mL enzim fraksi II aseton, larutan asam ferulat berubah menjadi kemerahan, sedangkan larutan etil ferulat menjadi berwarna putih susu kekuningan. Perubahan warna larutan tersebut menandakan telah terjadinya reaksi. Reaksi dilakukan selama 10 menit.



(a) Asam ferulat + buffer (b) Setelah ditambah H_2O_2 (c) Setelah ditambah enzim

Gambar 4.15. Reaksi dimerisasi asam ferulat



(a) Etil ferulat + buffer (b) Setelah ditambah H_2O_2 (c) Setelah ditambah enzim

Gambar 4.16. Reaksi dimerisasi etil ferulat

Setelah itu hasil reaksi diekstraksi dengan etil asetat sebanyak 3 x 20 mL. Hasil ekstraksi dimer asam ferulat (fasa organik) berwarna merah kejinggaan sedang dimer etil ferulat berwarna bening keputihan.



(a) Ekstraksi dimer asam ferulat (b) Ekstraksi dimer etil ferulat

Gambar 4.17. Ekstraksi hasil reaksi dimerisasi

Ekstrak ini kemudian dipekatkan (diuapkan) dan ditimbang berat masing-masing. Didapat dimer asam ferulat tanpa pemurnian sebesar 0,045 g, sedangkan berat dimer etil ferulat tanpa pemurnian sebesar 0,036 g.



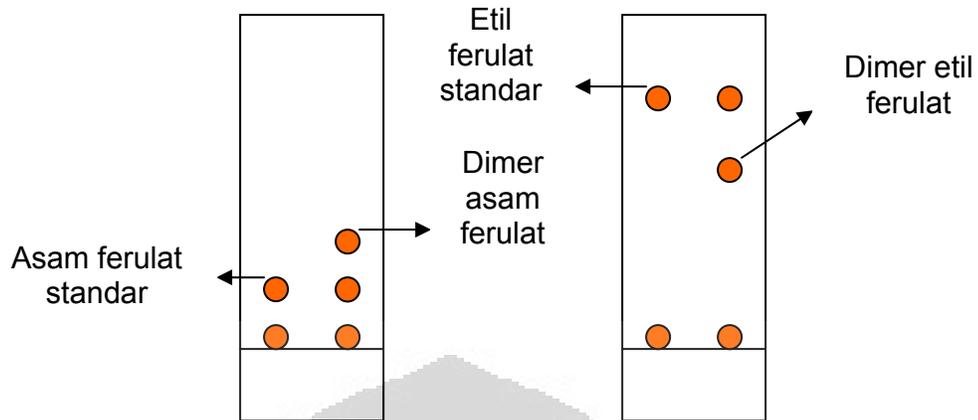
Gambar 4.18. Dimer asam ferulat dan dimer etil ferulat

4.5. Analisis dengan KLT dan GC-MS

Hasil produk dimerisasi ini baik asam maupun etil ferulat diuji KLT dengan asam ferulat dan etil ferulat sebagai pembanding, sebagai tahap awal identifikasi untuk melihat banyaknya komponen yang terdapat dalam produk.

Hasil uji KLT dengan pengembang *n*-heksana : etil asetat = 3 : 2 menunjukkan banyaknya komponen dalam produk dimerisasi asam ferulat adalah 2 spot (0,34 dan 0,22). Spot 0,22 hampir serupa dengan spot asam ferulat yakni 0,24. Begitu pula dengan hasil reaksi dimerisasi etil ferulat yang menunjukkan banyaknya komponen adalah 2 spot (0,72 dan 0,62). Spot 0,72 serupa dengan spot etil ferulat yakni 0,72. Hasil ini menandakan masih ada sisa asam ferulat pada dimer asam ferulat dan sisa etil ferulat pada dimer etil ferulat.

Spot yang diduga merupakan dimer asam ferulat terdapat pada bagian atas spot asam ferulat, dikarenakan dimer asam ferulat lebih non polar dibandingkan asam ferulat disebabkan banyaknya ikatan karbon, terutama benzena. Sedang spot yang diduga adalah dimer etil ferulat berada lebih bawah dari pada spot etil ferulat karena dimer etil ferulat lebih polar dibandingkan etil ferulat disebabkan dimer etil ferulat lebih banyak mengandung gugus –OH.

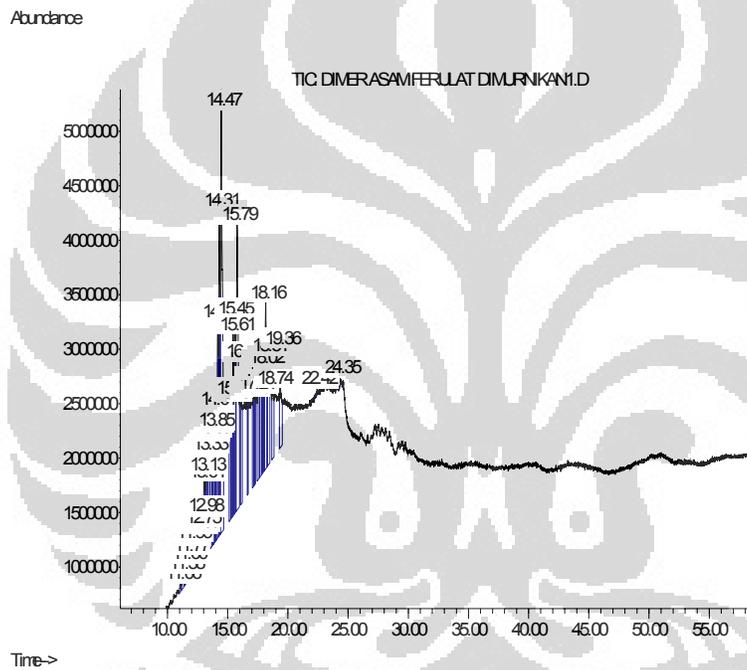


Gambar 4.19. Hasil KLT dimer asam ferulat dan etil ferulat

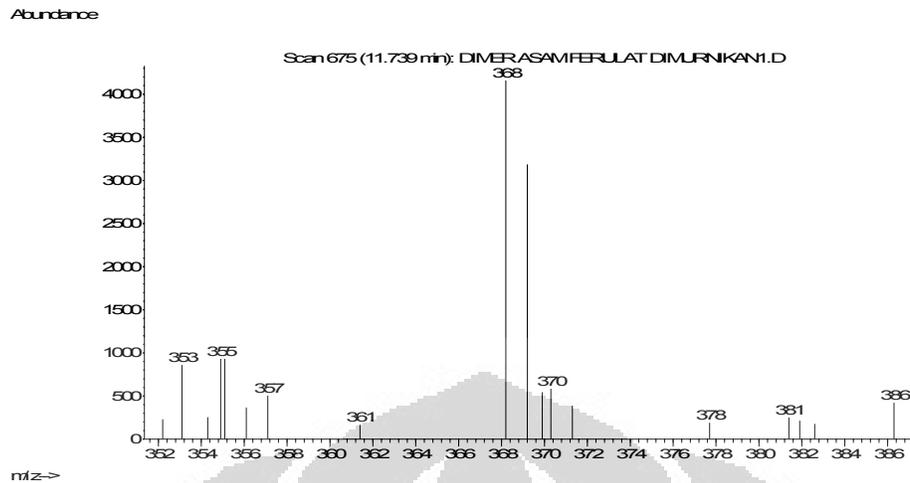
Kemudian hasil dimerisasi dianalisis GC-MS. Analisis GC-MS (kromatografi gas dan spektrum massa) digunakan untuk mengetahui berapa banyak senyawa kimia yang terkandung dalam suatu sampel dan dapat menentukan berat molekul atau massa relatifnya yang disertai dengan pola fragmentasi dari senyawa kimia tersebut. Proses pemisahan sampel dalam kromatografi gas berlangsung di dalam kolom berdasarkan pada interaksi komponen sampel dan fasa diam. Interaksi ini sangat menentukan berapa lama komponen-komponen sampel akan ditahan. Komponen-komponen yang mempunyai afinitas lebih rendah terhadap fasa diam akan keluar dari kolom. Kemudian dalam sebuah spektrometer massa sampel yang dipanaskan pada temperatur tinggi sehingga dalam keadaan gas dibombardir dengan elektron *n* (*lone pair electron*) dari molekul suatu sampel dan terbentuknya suatu ion organik. Ion organik yang dihasilkan ini tidak stabil dan pecah menjadi fragmen kecil, dapat berbentuk radikal bebas ataupun ion-ion lain. Dari peak untuk radikal ion (biasanya terletak paling kanan dalam spektrum) ini, bobot molekul suatu senyawa dapat ditentukan²⁴.

Setelah ionisasi awal, ion molekul akan mengalami fragmentasi, dimana radikal-radikal bebas atau molekul netral kecil dilepaskan dari ion molekul tersebut. Sebuah ion molekul tidak pecah secara acak, melainkan cenderung membentuk fragmen-fragmen yang sestabil mungkin²³. Berikut ini adalah hasil GC-MS dari dimerisasi asam ferulat dan etil ferulat.

Hasil GC-MS dimerisasi asam ferulat didapatkan spektrum dengan $m/z = 386$ pada waktu retensi sebagai berikut.



Gambar 4.20. Kromatogram Dimer asam ferulat

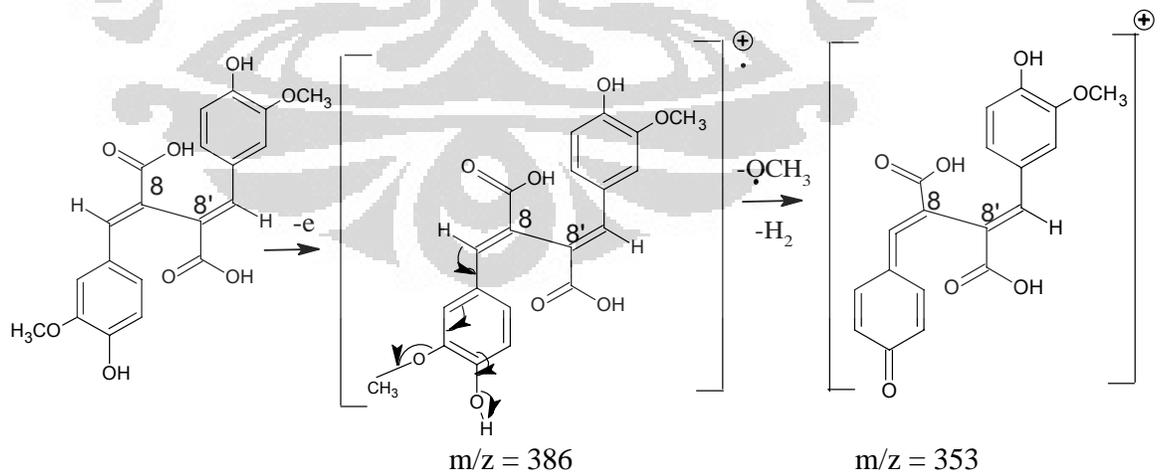


Gambar 4.21. Spektrum massa dimer asam ferulat

Tabel 4.3. Hasil GC-MS dimer asam ferulat

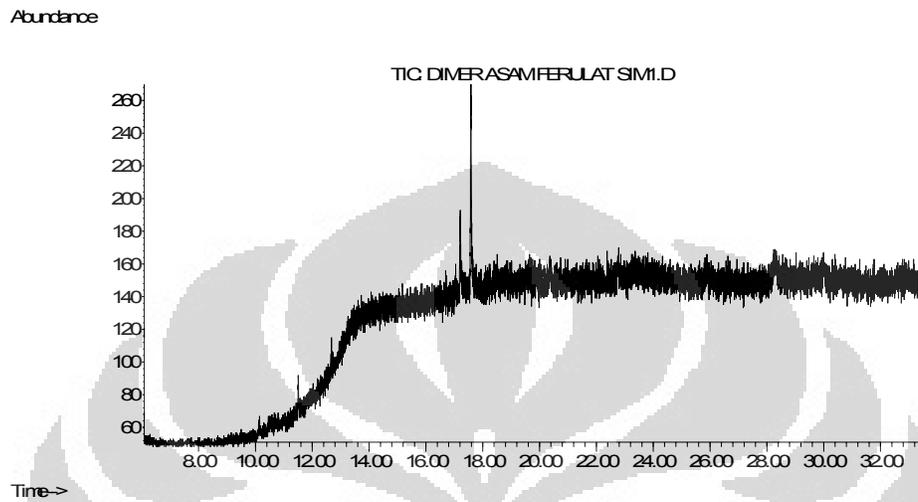
Waktu retensi (menit)	Luas area (% area)	m/z
11,680	0,33	386

Dari spektrum di atas, dapat diduga bahwa senyawa dimer asam ferulat yang terbentuk adalah 8-8'-dehidrodiferulat. Ada pun pola fragmentasi senyawa 8-8'-dehidrodiferulat dapat digambarkan sebagai berikut.

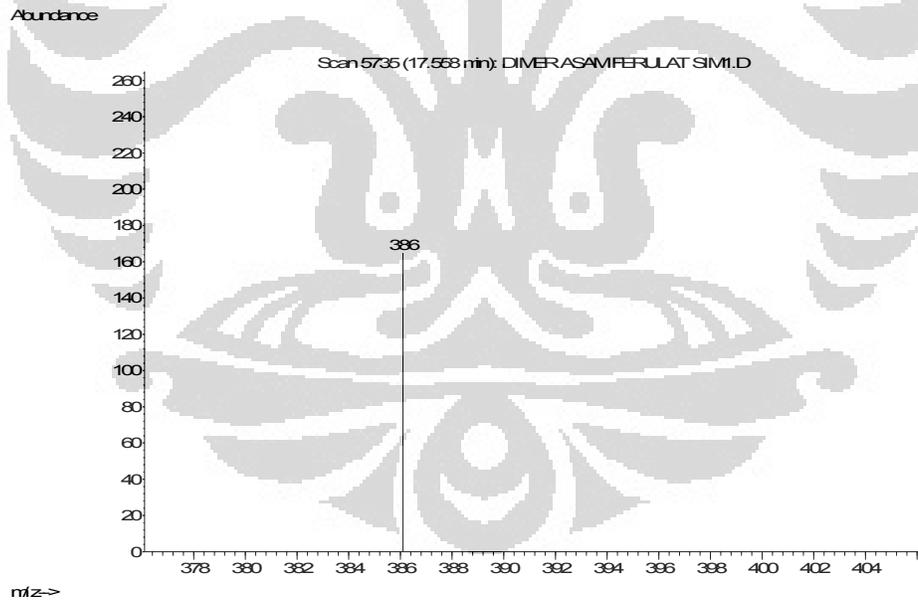


Gambar 4.22. Fragmentasi senyawa 8-8'diferulat

Untuk membuktikan adanya dimer asam ferulat diuji kembali dengan GC-MS tapi menggunakan sensor massa ion spesifik. Didapat spektrumnya adalah sebagai berikut.



Gambar 4.23. Kromatogram dimer asam ferulat dari massa ion spesifik



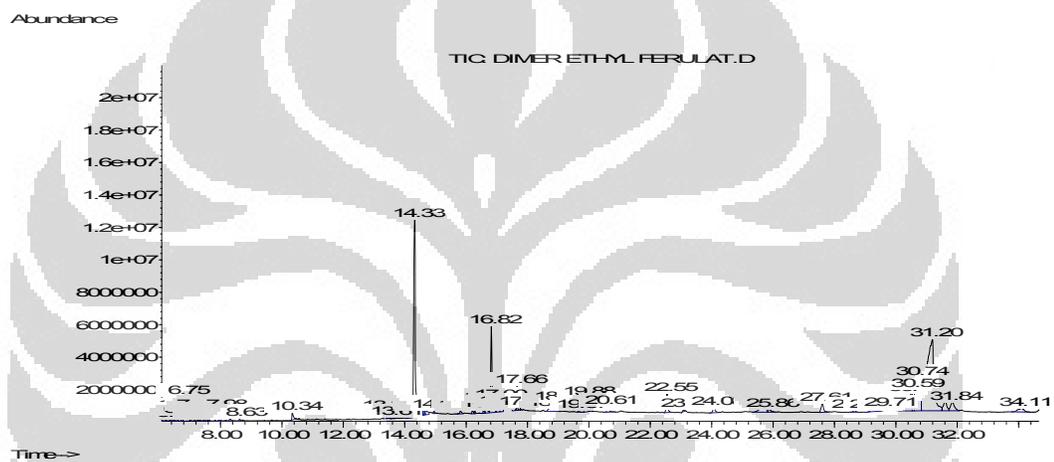
Gambar 4.24. Spektrum massa ion spesifik dimer asam ferulat

Didapat spektrum dari dimer asam ferulat, hal ini menandakan bahwa dalam sampel yang diukur terdapat dimer asam ferulat.

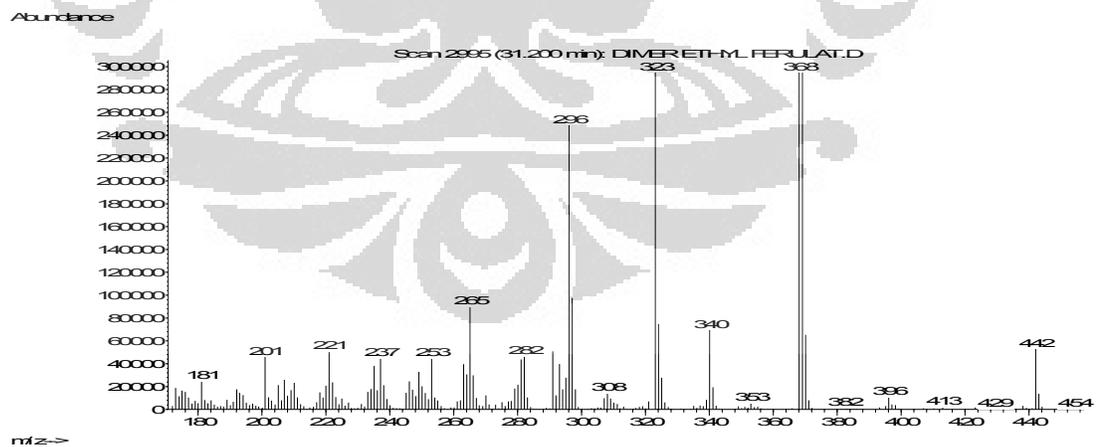
Dari tabel di atas dapat diketahui bahwa dimer asam ferulat yakni 8-8'-dehidrodiferulat yang terbentuk adalah sebesar 0,0004 mmol, berikut ini adalah perhitungannya :

$$(0,33 \% \times 0,045 \text{ g}) : (386 \text{ g} \times 1000 / \text{mmol}) = 0,0004 \text{ mmol}.$$

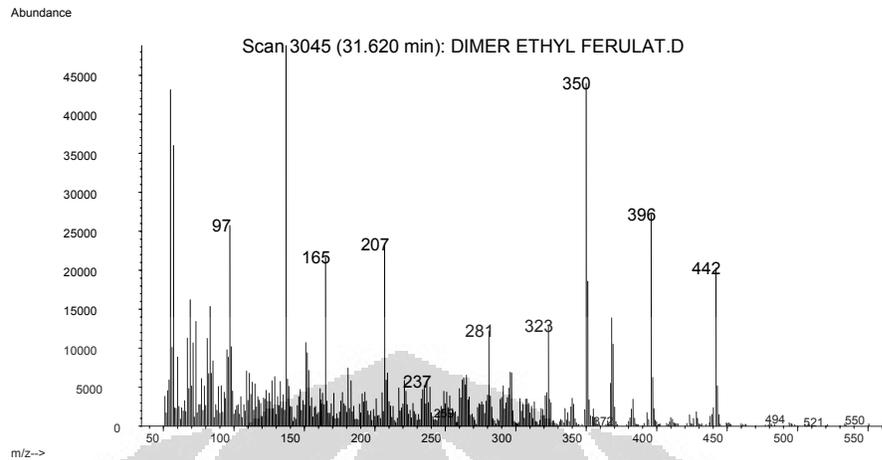
Kemudian hasil dimerisasi dari etil ferulat dianalisis dengan GC-MS. Didapat spektrum hasil dimerisasi etil ferulat $m/z = 442$ pada waktu retensi 31,200 menit dan 31,620 menit. Berikut ini adalah hasil GC-MS dimer etil ferulat.



4.25. Gambar kromatogram dimer etil ferulat



Gambar 4.26. Gambar spektrum massa dimer etil ferulat pada waktu retensi 31,200 menit

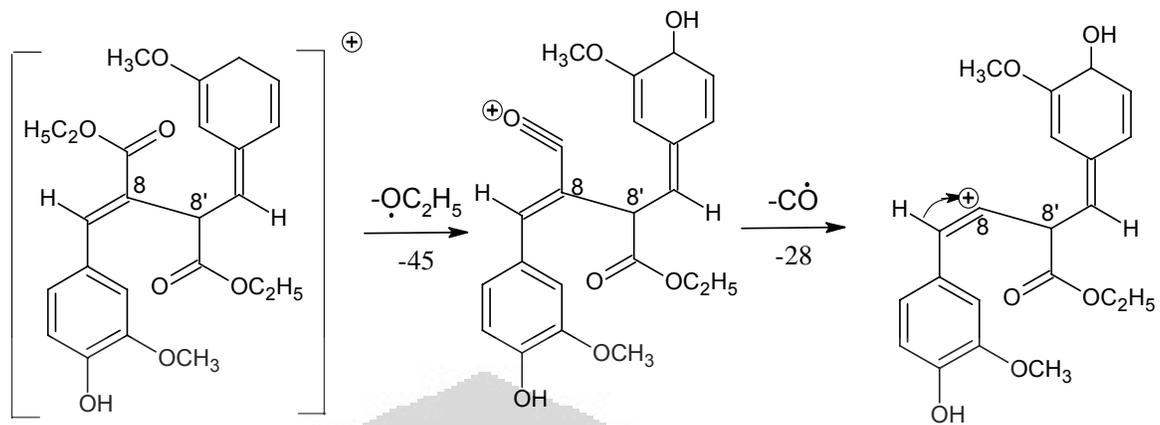


Gambar 4.27. Spektrum massa dimer etil ferulat pada waktu retensi 31,620 menit

Tabel 4.4. Hasil puncak dominan GC-MS dimer etil ferulat

Waktu retensi (menit)	Luas area (% area)	m/z
31,200	29,89	442
31,620	1,88	442

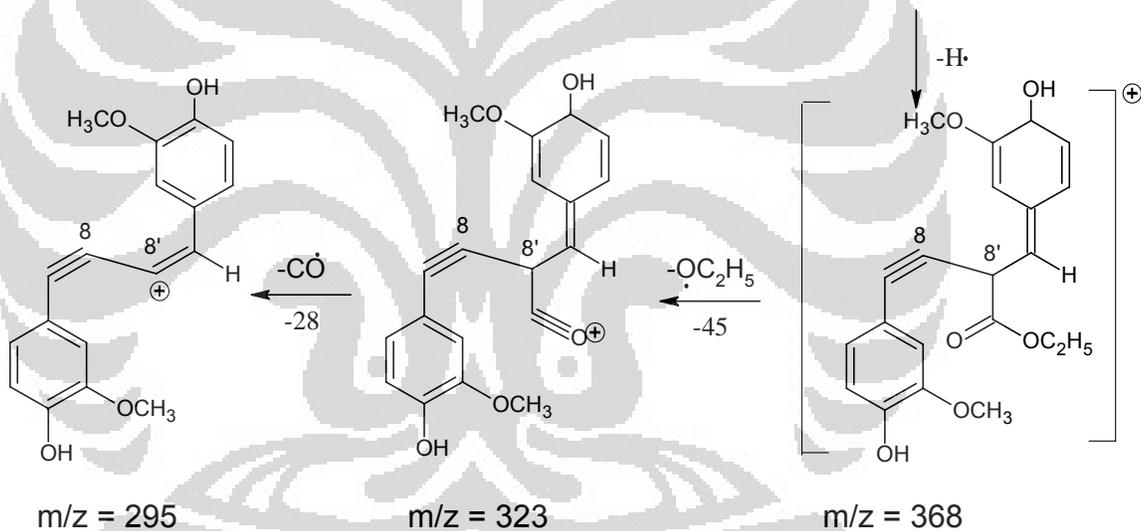
Dari spektrum massa dimer etil ferulat diduga bahwa senyawa dimer asam ferulat yang terbentuk adalah dimer etil ferulat ikatan 8-8' pada waktu retensi 31,200 menit dan dimer etil ferulat ikatan 8-O-4' pada waktu retensi 31,620 menit. Ada pun pola fragmentasi senyawa dimer etil ferulat ikatan 8-8' dan dimer etil ferulat ikatan 8-O-4' dapat digambarkan sebagai berikut.



8-8'- dietil ferulat
 M^+ 422

$m/z = 397$

$m/z = 369$

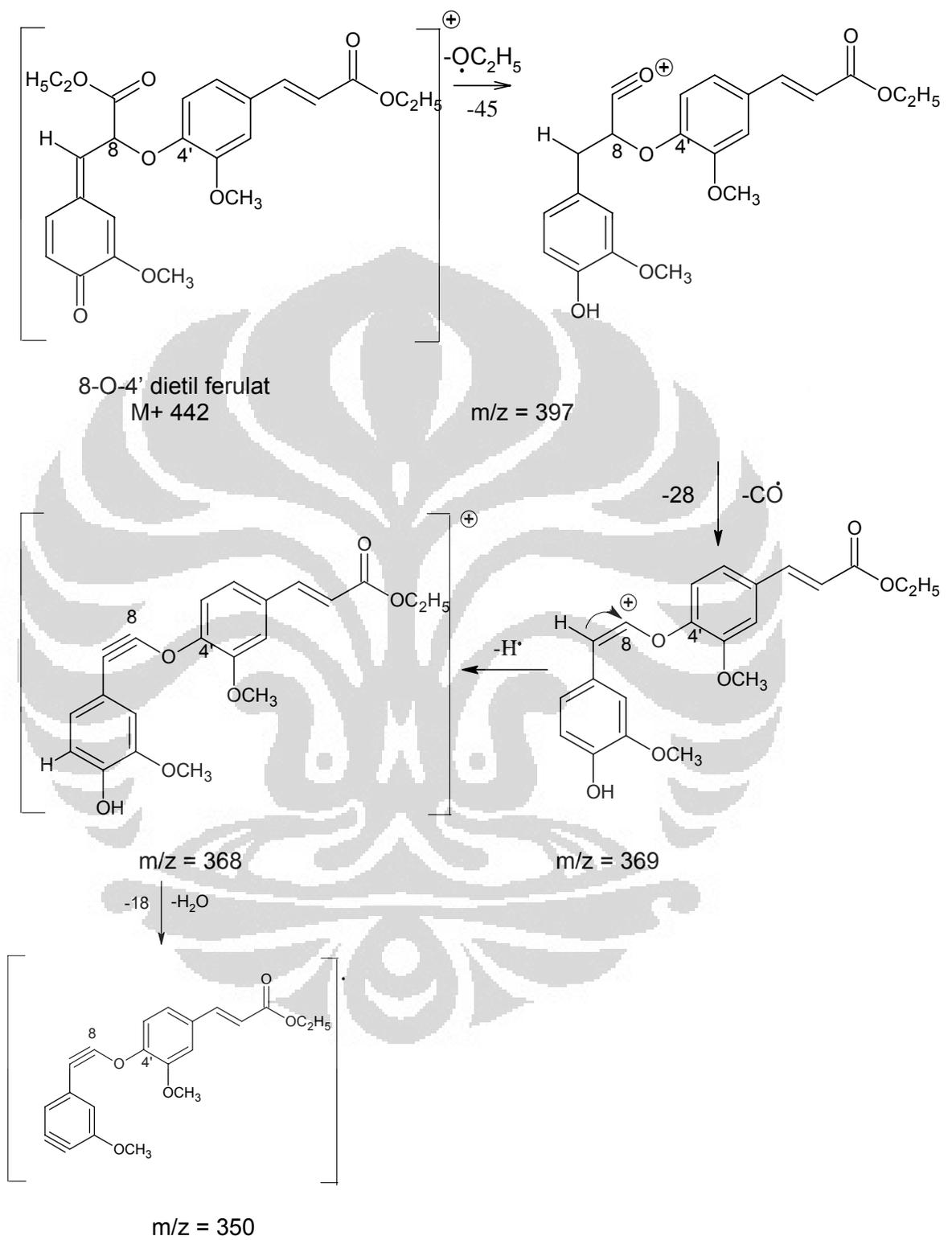


$m/z = 295$

$m/z = 323$

$m/z = 368$

Gambar 4.28. Fragmentasi senyawa dimer etil ferulat ikatan 8-8'



Gambar 4.29. Fragmentasi senyawa dimer etil ferulat ikatan 8-O-4'

Dari tabel di atas dapat diketahui dimer etil ferulat ikatan 8-8' terbentuk sebesar 0,0243 mmol, perhitungannya adalah sebagai berikut :

$$(29,89 \% \times 0,036 \text{ g}) : (442 \text{ g} \times 1000 / \text{mmol}) = 0,0243 \text{ mmol.}$$

Dimer etil ferulat ikatan 8-O-4' terbentuk sebesar 0,0015 mmol, perhitungannya adalah sebagai berikut :

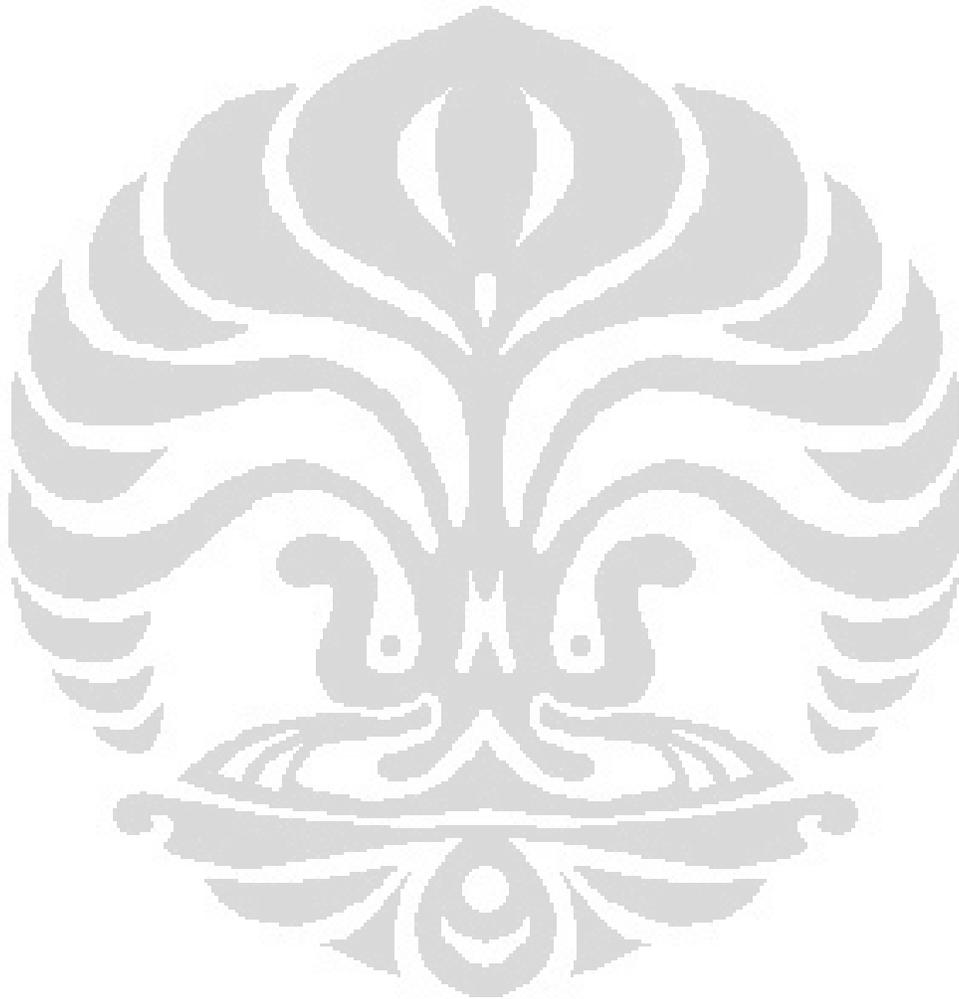
$$(1,88 \% \times 0,036 \text{ g}) : (442 \text{ g} \times 1000 / \text{mmol}) = 0,0015 \text{ mmol.}$$

Dari data di atas dapat disimpulkan, bahwa radikal etil ferulat lebih reaktif dikarenakan adanya gugus penarik elektron $-\text{COOR}$ yang lebih lemah dari gugus $-\text{COOH}$ sehingga lebih stabil dan lebih reaktif. Gugus penarik elektron pada radikal C_8 menyebabkan terjadinya penguatan muatan radikal yang mendestabilkan radikal tersebut, sehingga menjadi radikal yang kurang reaktif. Gugus COOC_2H_5 adalah gugus penarik elektron yang lebih lemah dibandingkan gugus COOH , sehingga efek pendestabilan menjadi lebih lemah, sehingga radikal etil ferulat lebih reaktif dibandingkan dengan radikal asam ferulat.

Senyawa radikal yang reaktif ini akan lebih mudah bereaksi dan hasil dimer dari etil ferulat lebih beragam. Hal ini dibuktikan dengan hasil fragmentasi dari GC-MS yang memperlihatkan bahwa hasil dimerisasi etil ferulat menghasilkan dimer yang berikatan 8-8' dan 8-O-4', sedang hasil dimerisasi asam ferulat hanya terjadi ikatan 8-8'.

Disamping itu, pada hasil dimer etil ferulat, terlihat bahwa dimer etil ferulat ikatan 8-8' lebih banyak terbentuk dibandingkan dimer etil ferulat ikatan 8-O-4'. Hal ini kemungkinan dikarenakan tingkat kereaktifan dari radikal pembentuknya yakni 2 molekul radikal etil ferulat pada C_8 untuk ikatan 8-8' dengan radikal etil ferulat pada

O dan radikal etil ferulat pada C_8 untuk ikatan 8-O-4'. Radikal etil ferulat pada O kurang reaktif dikarenakan kurang stabilnya radikal (kondisi kekurangan elektron) pada atom oksigen yang memiliki keelektronegatifan cukup besar. Sehingga umur radikal pada O lebih pendek dan kemungkinan terbentuknya ikatan lebih kecil dibandingkan radikal pada C_8 .



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

1. Hasil reaksi esterifikasi Fischer yakni etil ferulat sebesar 0,003 mol (40,00 %).
2. Enzim hasil pemurnian dengan aseton fraksi II (0,847 U/mg) lebih baik dibandingkan dengan ammonium sulfat fraksi III (0,433 U/mg).
3. Berat dimer asam ferulat tanpa pemurnian 0,045 g dan berat dimer etil ferulat tanpa pemurnian 0.036 g.
4. Dimer asam ferulat yakni 8-8'-dehidrodiferulat yang terbentuk adalah sebesar 0,0004 mmol. Dimer etil ferulat ikatan 8-8' terbentuk sebesar 0,0243 mmol dan dimer etil ferulat ikatan 8-O-4' terbentuk sebesar 0,0015 mmol.
5. Dengan esterifikasi, hasil dimerisasi ferulat lebih bervariasi dibandingkan dengan hasil dimerisasi asamnya. Hal ini diduga dikarenakan radikal etil ferulat lebih stabil (efek pendestabilan dari gugus penarik elektron lebih rendah) sehingga radikal berumur lebih panjang dan meningkatkan probabilitas terjadinya ikatan dimer.

5.2 SARAN

1. Perlu dilakukan analisis lebih lanjut mengenai pemurnian dengan aseton karena murah dan efektif menjaga kestabilan aktivitas enzim.
2. Perlu dilakukan pemurnian seperti Kromatografi kolom atau pun KLT preparatif serta uji lebih lanjut seperti uji spektroskopi UV-Vis, FT IR, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ untuk meyakinkan ikatan yang terjadi pada dimer baik dimer asam ferulat maupun dimer etil ferulat dan lebih merincikan lagi struktur dari senyawa yang dihasilkan.
3. Perlu dilakukan variasi bentuk ester, seperti alkil primer, alkil sekunder, maupun alkil tersier atau pun variasi alkil yang semakin panjang (propil, butil, dan lain-lain) untuk dilihat pengaruhnya terhadap kestabilan radikal ferulat.
4. Perlu dilakukan uji aktivitas biologis terhadap dimer asam ferulat dan etil ferulat karena dari struktur dimer diduga memiliki aktivitas biologis.

DAFTAR PUSTAKA

1. Advanced Application Technology of Rice Bran : Preparation of Ferulic Acid and its Applications. <http://www.irri.cgiar.org/publications/wrrc/wrrc/PDF/session10-04.pdf>. Tanggal 2 Oktober 2007, Pukul 08.00 WIB
2. Permatasari, Nelma. 2007. *Pembentukan Senyawa Dehidrodiferulat melalui Oksidasi Koping Asam Ferulat Dengan Biokatalis Peroksidase dan Uji Aktivitas Alelopati*. Karya Utama Sarjana Kimia, FMIPA UI.
3. Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Terj. dari The Organic Constituen of Higher Plant, oleh Kosasih, P. ITB Bandung.
4. Margareth, R. 2005. Studi Pendahuluan Produksi Senyawa Antimikroba dari Senyawa Fenolik dengan Katalis Enzim Laccase. Karya utama Sarjana Kimia. Departemen Kimia. FMIPA UI.
5. Harbone, J. B. 1987. *Metode Fitokimia*. Terj. Dari Phytochemical Methods, oleh Kosasih, P & Iwang, S. ITB Bandung.
6. Lignan and Neolignans. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/lignan/>. Tanggal 23 Oktober 2007, Pukul 11.00 WIB.
7. Herbert, B. R. 1995. *Biosintesis Metabolit Sekunder*. Terj. Dari The Biosynthesis of Secondary Metabolites, oleh Srigandono B. IKIP Semarang Press.
8. Ethyl Ferulate. http://www.Chemical_Land21.com/search/cas/4046-02-0.html. Tanggal 2 Oktober 2007. Pukul 09.00 WIB.

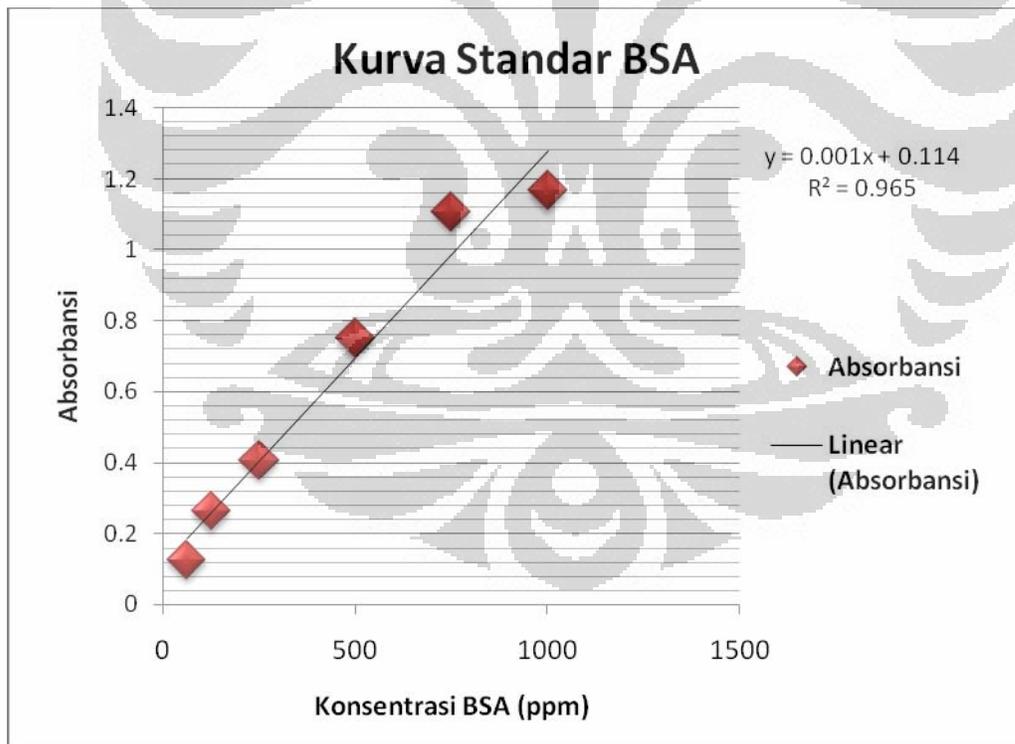
9. Peroxidase. <http://www.chem.admu.edu.ph/~nina/rosby/main.html>.
Tanggal 2 Oktober 2007, Pukul 10.00 WIB.
10. Broccoli. <http://www.uga.edu/vegetable/broccoli.html>. Tanggal 14 Oktober 2007, Pukul 12.00 WIB.
11. Fessenden, R. J. & Fessenden. *Kimia Organik* jilid 2. Terj. dari *Organic Chemistry* oleh Aloysius Hadyana Pujaatmaka. Erlangga.
12. Oksidative Coupling. <http://www.google.com/search/OksidativeCoupling.html>. Tanggal 1 Oktober 2007, Pukul 10.00 WIB.
13. Fieser, L. F., M., Fieser. *Introduction to Organic Chemistry*. Maruzen Company LTD Tokyo. 1957.
14. Thongsook T., Barret M. D. 2005. *Purification and Partial Characterization of Broccoli (Brassica oleracea var. Italica) Peroxidase*. *J. Agric. & Food Chem.* 53 : 3206 – 3214.
15. Saepudin, E., Setiasih S. 2005. *Bioteknologi*. Departemen Kimia FMIPA UI.
16. Indah, Mutiara. *Enzim*. Fakultas Kedokteran USU. Biokimia Mutiara. <http://www.google.com/search/enzim.html>.
17. Ralph, J., Conesa, M. T. G., Williamson G. 1998. *Simple Preparation of 8-5 coupled diferulate*. *J. Agric. and Food Chem.* 46 : 2531 - 2532.
18. Material Safety Data Sheet Acetyl Chloride. http://www.google.com/search/MSDS_Acetyl_Chloride.html. Tanggal 4 Oktober 2007. Pukul 09.00 WIB.

19. Hartree-Lowry and Modified Lowry Protein Assays.
<http://www.ruf.rice.edu/%7Ebioslabs/methods/protein/protcurve.html>.
[Tanggal 25 Oktober 2007](#). Pukul 10.00 WIB.
20. Williams, D. H., Fleming. *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*.
Oxford University Press. 1980.
21. Hudyono, Sumi, P.W.S. 2005. *Enzim*. Departemen Kimia, FMIPA UI.
22. Haro, Adrian. 2007. *Identifikasi Produk Oksidative Coupling Etil Ferulat Oleh Enzim Peroksidase dan Uji Aktivitas Biologis*. Karya Utama Sarjana Kimia, FMIPA UI.
23. Raodatul Jannah, Idoh. 2006. *Optimasi Kondisi Reaksi Oksidasi Senyawa Fenolik Guaiakol yang Dikatalisis Enzim Peroksidase Dari Brokoli*. Karya Utama Sarjana Kimia, FMIPA UI.
24. Coupling Oxidative Reaction. [http://www.google.com/search/Coupling Oxidative Reaction.html](http://www.google.com/search/CouplingOxidativeReaction.html). Tanggal 4 Oktober 2007. Pukul 09.00 WIB.

LAMPIRAN 1

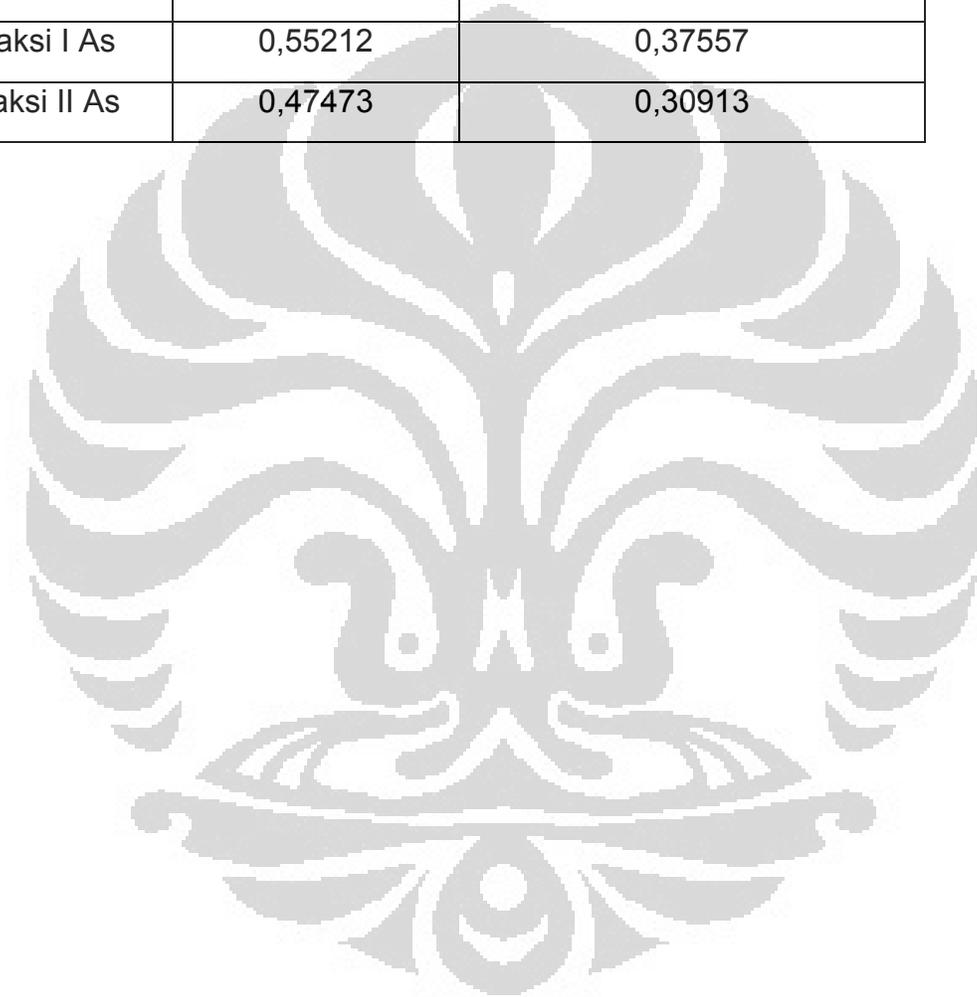
Pengukuran kadar protein berdasarkan metode Lowry dengan menggunakan standar BSA

Konsentrasi BSA (ppm)	Absorbansi
62,5	0,12585
125	0,26140
250	0,40626
500	0,75009
750	1,10789
1000	1,16684



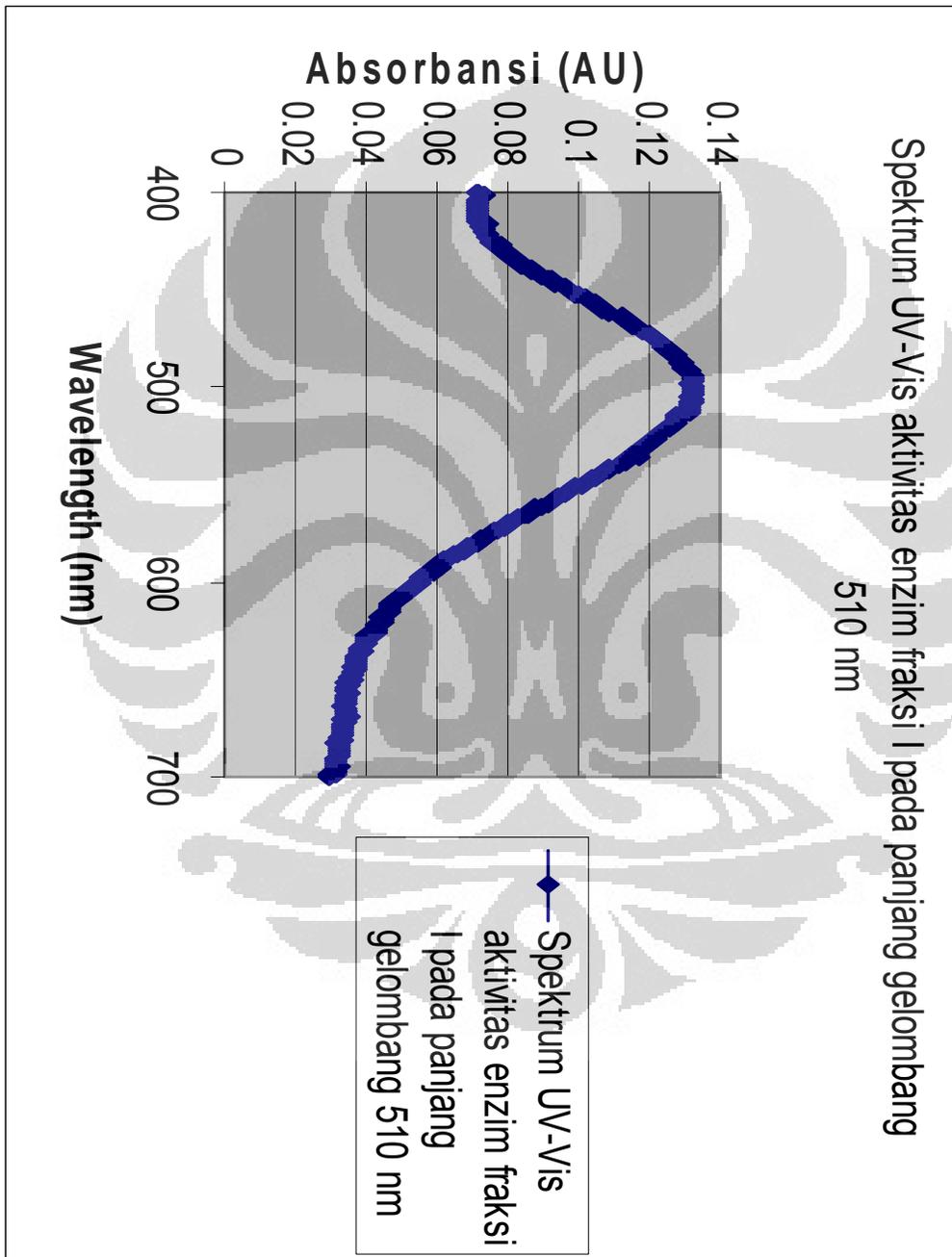
Kadar Protein Enzim Peroksidase

	Absorbansi	Kadar protein (mg/mL)
fraksi I Am	0,80495	0,59262
fraksi II Am	0,98796	0,74974
fraksi III Am	0,55699	0,37975
fraksi I As	0,55212	0,37557
fraksi II As	0,47473	0,30913



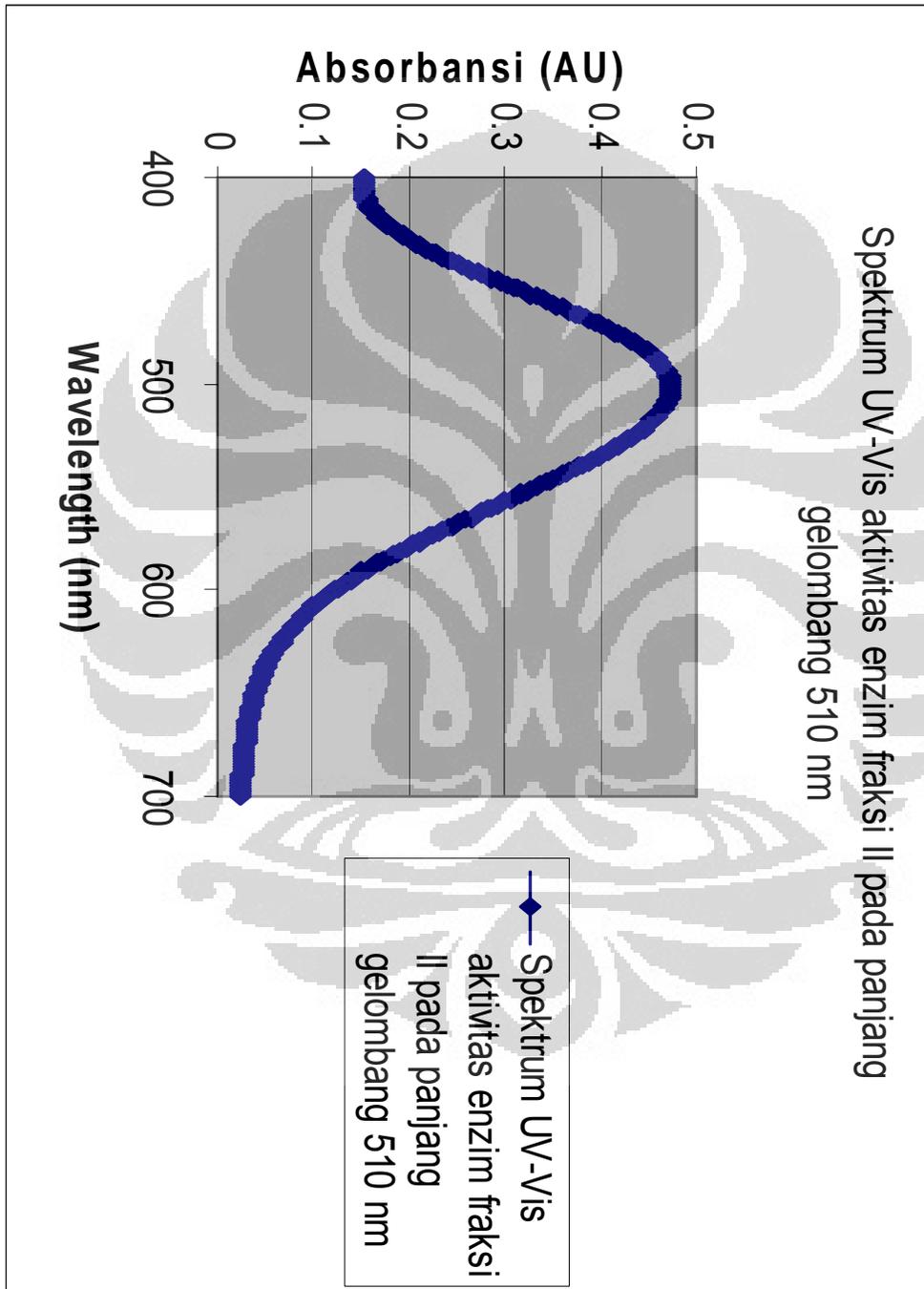
LAMPIRAN 2

Spektrum UV-Vis aktivitas enzim fraksi I ammonium sulfat pada panjang gelombang, $\lambda = 510 \text{ nm}$



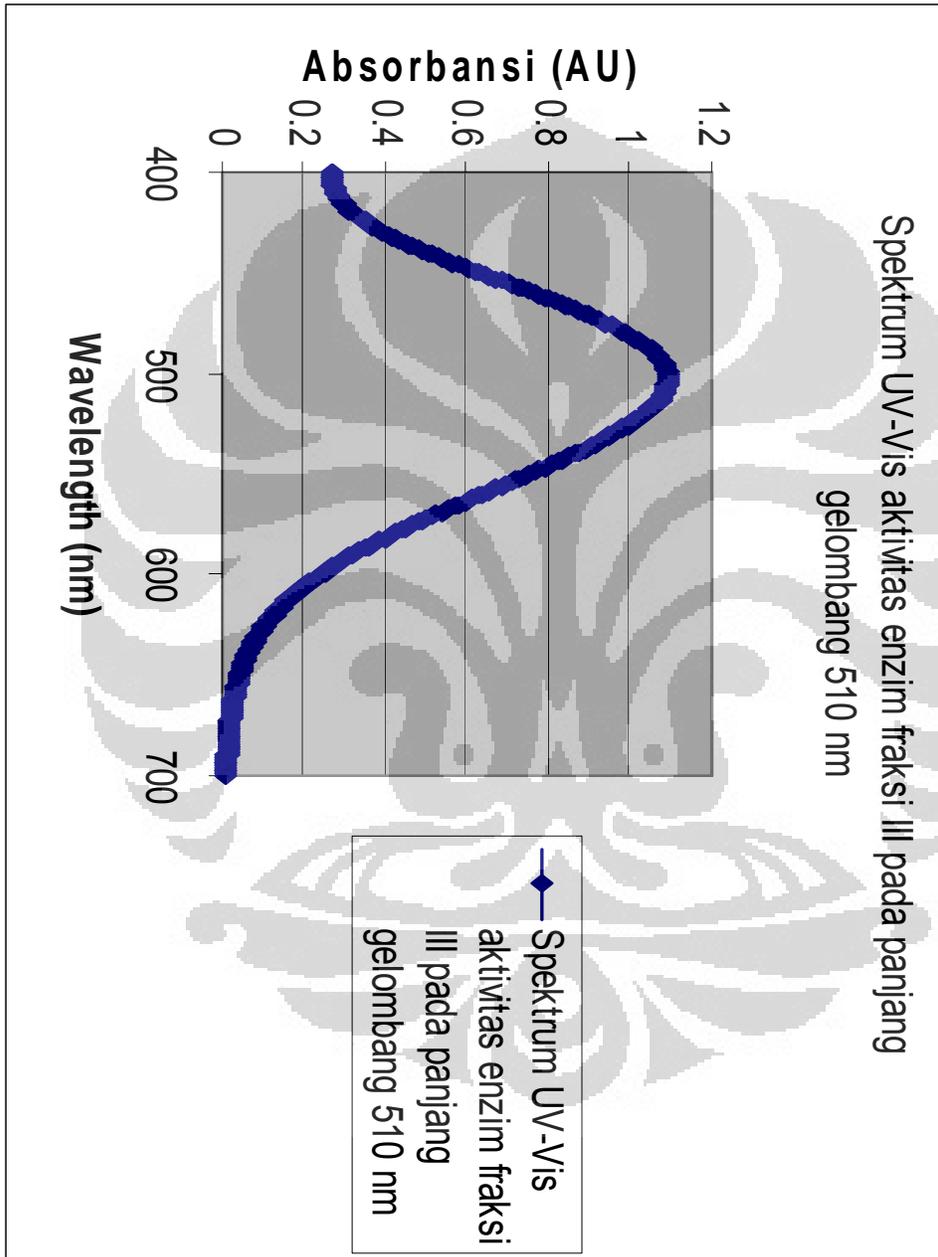
LAMPIRAN 3

Spektrum UV-Vis aktivitas enzim fraksi II ammonium sulfat pada panjang gelombang, $\lambda = 510 \text{ nm}$



LAMPIRAN 4

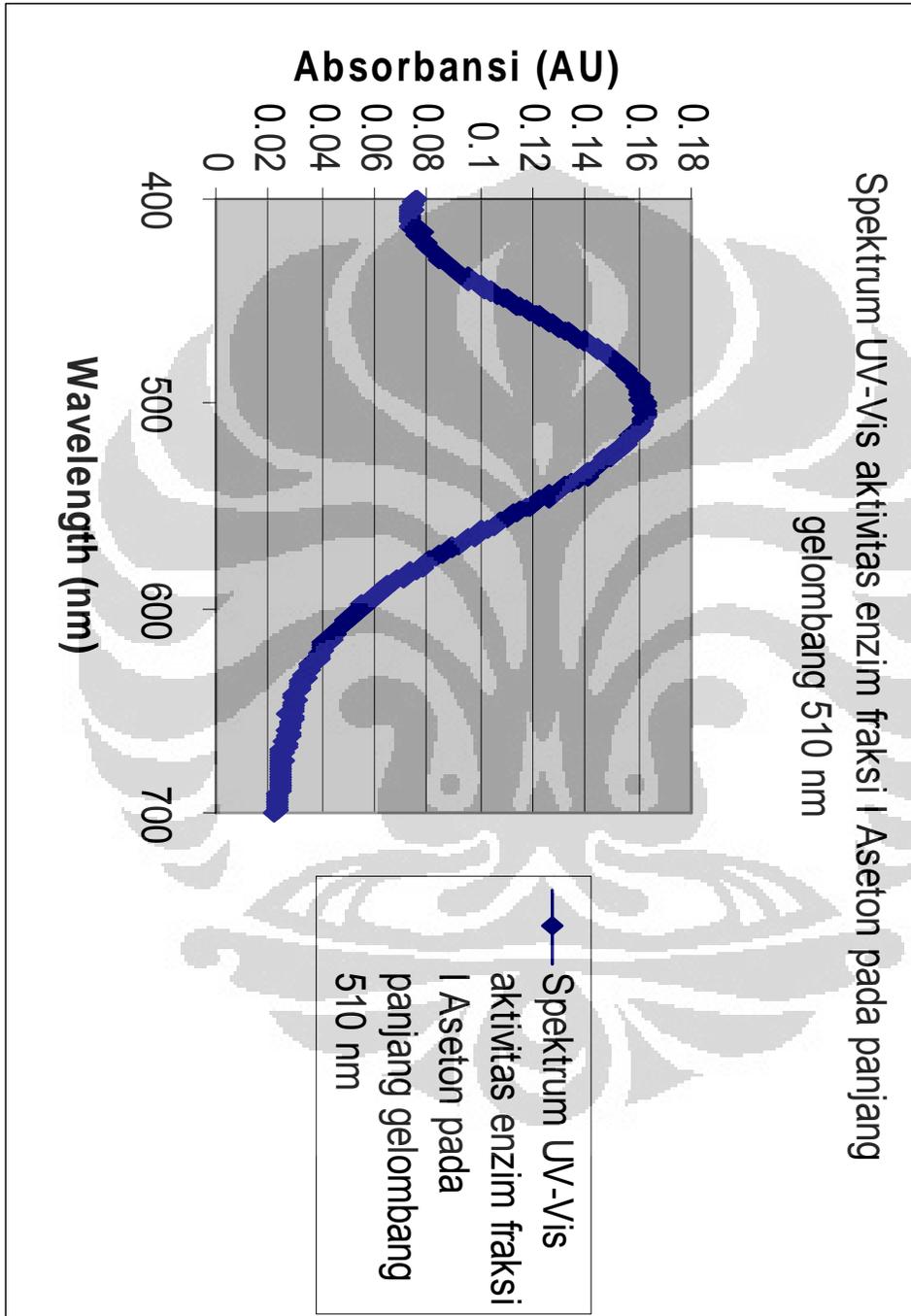
Spektrum UV-Vis aktivitas enzim fraksi III ammonium sulfat pada panjang gelombang, $\lambda = 510$ nm



LAMPIRAN 5

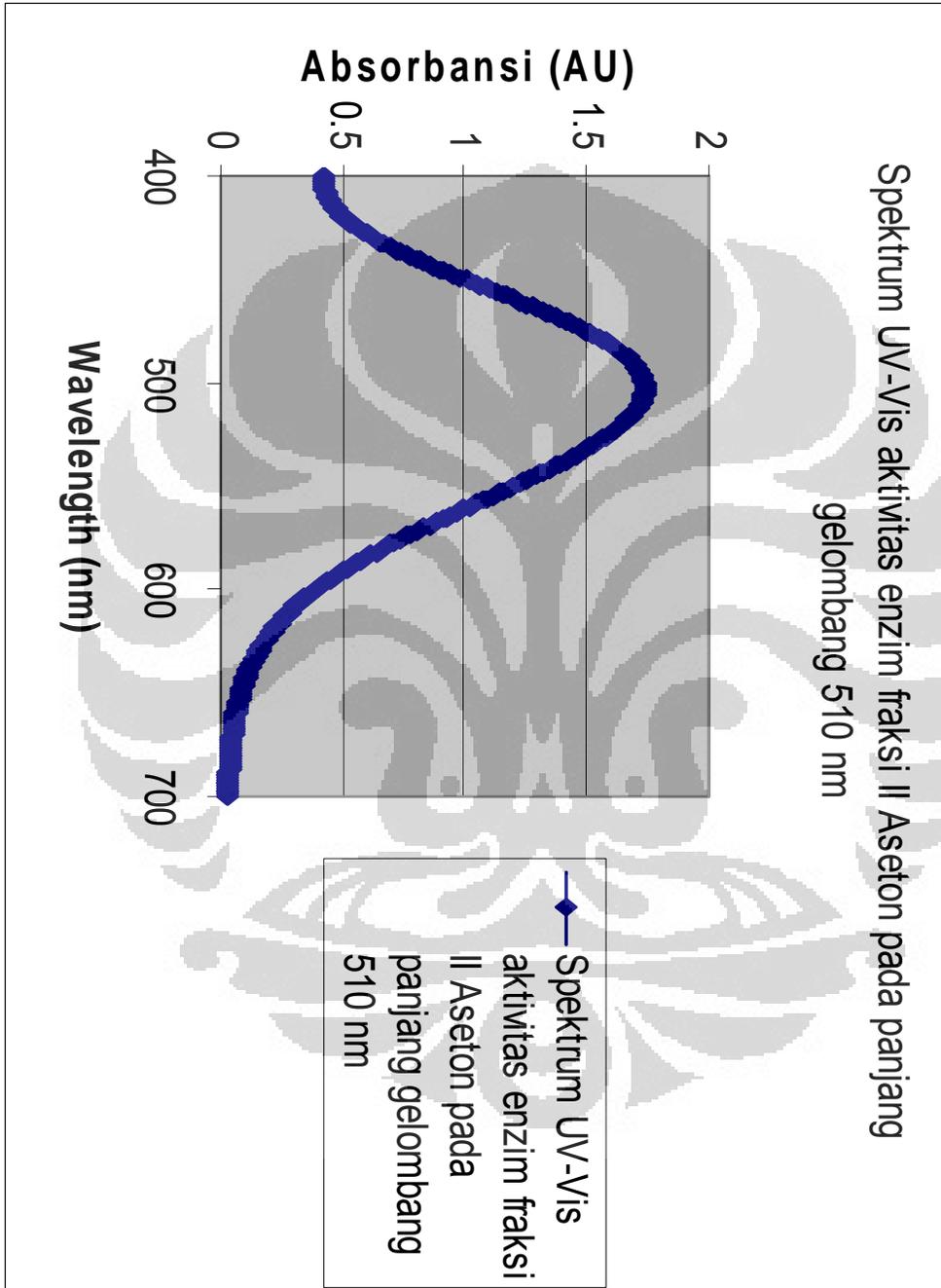
Spektrum UV-Vis aktivitas enzim fraksi I aseton pada panjang gelombang,

$\lambda = 510 \text{ nm}$



LAMPIRAN 6

Spektrum UV-Vis aktivitas enzim fraksi II aseton pada panjang gelombang,
 $\lambda = 510 \text{ nm}$



LAMPIRAN 7

Perhitungan Unit Aktivitas Spesifik Enzim

$$\text{Unit / mg} = \frac{A_{510 \text{ nm}} / \text{menit}}{6,58 \times \text{mg protein} / \text{mL}}$$

Absorbansi kadar protein enzim fraksi II Aseton pada λ 750 nm = 0.47473. Dari kurva standar BSA, diperoleh persamaan $Y = 1,165 \times 10^{-3}X + 0,114640$, dimana X = kadar protein (ppm) dan Y = absorbansi. Dengan memasukkan nilai 0,30913 kedalam persamaan, maka diperoleh :

$$0.47473 = 1,165 \times 10^{-3}X + 0,114640$$

$$\begin{aligned} \text{kadar protein} = X &= 309.13333 \text{ ppm} \\ &= 0,30913 \text{ mg / mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Unit / mg} &= \frac{1.722 \text{ U / mL}}{6,58 \times 0,30913 \text{ mg / mL}} \\ &= 0,847 \text{ Unit / mg} \end{aligned}$$