

**SINTESIS ESTER LAKTOVANILAT DARI ASAM VANILAT DAN
LAKTOSA SERTA UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN**

VERONIKA YULIANI

0304030561



UNIVERSITAS INDONESIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

DEPARTEMEN KIMIA

DEPOK

2008

**SINTESIS ESTER LAKTOVANILAT DARI ASAM VANILAT DAN
LAKTOSA SERTA UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN**

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

Oleh:

VERONIKA YULIANI

0304030561



DEPOK

2008

SKRIPSI : SINTESIS ESTER LAKTOVANILAT DARI ASAM VANILAT
DAN LAKTOSA SERTA UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN

NAMA : VERONIKA YULIANI

NPM : 0304030561

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JUNI 2008



PROF. DR. SOLEH KOSELA M.Sc

PEMBIMBING

Tanggal Lulus Ujian Sidang Sarjana :

Penguji I :

Penguji II :

Penguji III :

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis naikkan kepada Tuhan Yesus Kristus, karena hanya oleh pimpinan dan penyertaan-Nya skripsi ini dapat selesai dengan baik dan tepat pada waktunya.

Skripsi yang berjudul Sintesis Ester Laktovanilat dari Asam Vanilat dan Laktosa serta Uji Aktivitas Antioksidan ini disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan program sarjana strata satu di Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Pada kesempatan ini, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu penulis dari awal hingga selesainya penelitian serta penulisan skripsi ini. Terutama kepada Papa dan Mama yang selalu mendoakan, menolong, memberi semangat dan kasih sayang yang tulus dan tidak pernah habis kepada penulis. Juga kepada Ko Eddy, Kris dan Esther serta Ci Etty atas bantuan dan perhatiannya selama ini, *God bless all of you always*. Selain itu, penulis juga ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Soleh Kosela M.Sc sebagai pembimbing, terima kasih atas semua bantuan dan arahan yang begitu berguna bagi penulis dari awal hingga selesainya penelitian ini.
2. Dr. Endang Saepudin selaku pembimbing akademik, terima kasih telah membimbing penulis selama kuliah di Kimia UI.

3. Prof. Dr. Wahyudi Priyono, Dr. Herry Cahyana dan Drs. Erzi Rizal Azwar selaku dosen penguji.
4. Semua dosen Departemen Kimia FMIPA UI, terima kasih telah mengajar dan memberikan ilmunya kepada penulis lewat semua mata kuliah yang ada.
5. Bpk. M. Hanafi, Bpk. Ngadiman, Kak Nita, Mba Lala, Ibu Puspa, Mas Gozali dan semua staf di LIPI Serpong, terima kasih atas kesempatan dan semua bantuan selama penulis melakukan penelitian di sana.
6. Geraldine Marcella, sahabat istimewa yang Tuhan kirim ketika masuk di Kimia UI, *thanks for knowing and helping me in times of need. May God bless you abundantly.*
7. Para sahabat, motivator dan teman yang membuat hidup jadi berwarna; Kurnia, Alex, Tina, Calvin, Bernat, Cing, Ruth, Wuri, Nagun, Lany, Agus, , Renny dan Winny. *Thanks for every times that we spent together, that's mean so much for me.*
8. Kak Dessy dan Janti, PKK dan teman KK tersayang, *may God always bless both of you wherever you are.*
9. Teman satu tim penelitian; Eka, Irwan dan Kak Ridwan, terima kasih atas semua bantuan dan kerja samanya selama penelitian ini.
10. Semua teman seperjuangan di lantai penelitian; Ima, Ari, Ami, Citra, Atri, Tya, Kiki, Lindi, Fitri, Wakhid, Danar, Isal, Jali, Ratna, Atul, Nur, Opik, Hanum, Hamim, Basit, Kak Vena, Kak Dina, Kak Santi, Kak Riki, Kak Vera, Kak Dewi dan Kak Laili.

11. Semua GSM Senayan 3 dan semua teman di PO FMIPA UI, terima kasih untuk dukungan dan doa buat penulis.

12. Pihak-pihak yang telah membantu dan mendoakan namun belum disebutkan di sini.

Semoga skripsi ini bermanfaat bagi pembaca serta bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Depok, 10 Juni 2008

Penulis



ABSTRAK

Laktosa merupakan disakarida dengan struktur yang polihidroksi, sehingga dari laktosa dapat dibuat ester, yaitu bila direaksikan dengan asam vanilat yang memiliki gugus karboksilat. Di samping itu, asam vanilat juga memiliki gugus fenolik yang dapat bersifat sebagai antioksidan. Esterifikasi asam vanilat dengan laktosa dilakukan untuk memperbanyak gugus fenolik. Dalam penelitian ini, senyawa ester laktovanilat berhasil disintesis dari laktosa dan asam vanilat. Asam vanilat diperoleh dari oksidasi vanili dengan oksidator Ag_2O yang terbentuk dari AgNO_3 dengan NaOH berlebih, dengan rendemen 75,94%. Reaksi esterifikasi dilakukan dengan perbandingan mol laktosa: asam vanilat = 1:3, dibantu DCC sebagai aktivator dan DMAP sebagai katalis serta aseton sebagai pelarut. Reaksi dilakukan dalam sistem refluks pada suhu $60\text{ }^\circ\text{C}$ selama 24 jam. Dihasilkan ester laktovanilat dengan rendemen sebesar 76,82%. Asam vanilat dan ester laktovanilat di uji aktivitas antioksidannya dengan metode peredaman radikal DPPH, diperoleh nilai IC_{50} asam vanilat standar dan ester laktovanilat adalah 379,85 ppm dan 1314,33 ppm.

Kata kunci: vanili, asam vanilat, laktosa, esterifikasi, ester laktovanilat

xi + 72; Tabel; Gambar; Lampiran

Bibliografi: 27 (1946-2008)

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
ABSTRAK	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	2
1.3 Kedudukan Penelitian	3
1.4 Hipotesis Penelitian	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Vanili	5
2.2 Asam Vanilat	9
2.3 Pembuatan Asam Vanilat	10
2.4 Laktosa	12
2.5 Esterifikasi	14
2.6 DCC (N,N'-disikloheksilkarbodiimida)	17
2.7 DMAP (4-dimetilaminopiridin)	18

2.8 Aseton	20
2.9 Etil Asetat	21
2.10 Radikal Bebas	22
2.11 Antioksidan	23
2.12 Uji Aktivitas Antioksidan	24
BAB III METODE PENELITIAN	28
3.1 Metode Penelitian	28
3.2 Alat	28
3.3 Bahan	29
3.4 Cara Kerja	29
3.4.1 Pembuatan Asam Vanilat.....	29
3.4.1.1 Oksidasi Vanili	29
3.4.1.2 Pemurnian Asam Vanilat	30
3.4.1.3 Uji Kemurnian	31
3.4.2 Pembuatan Ester Laktovanilat	31
3.4.2.1 Esterifikasi Asam Vanilat dengan Laktosa	31
3.4.2.2 Pemurnian Ester Laktovanilat	32
3.4.2.3 Uji Kemurnian	32
3.4.3 Uji Aktivitas Antioksidan	32
3.4.3.1 Pembuatan Larutan Pereaksi DPPH	32
3.4.3.2 Pembuatan Larutan Blanko	33
3.4.3.3 Persiapan Larutan Sampel	33
3.4.3.4 Pengukuran Aktivitas Antioksidan	34

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	35
4.1 Pembuatan Asam Vanilat	35
4.1.1 Oksidasi Vanili	35
4.1.2 Pemurnian Asam Vanilat	39
4.1.3 Uji Kemurnian Asam Vanilat	42
4.1.4 Analisis FT-IR Asam Vanilat	43
4.2 Pembuatan Ester Laktovanilat	47
4.2.1 Esterifikasi Asam Vanilat dengan Laktosa	47
4.2.2 Pemurnian Ester Laktovanilat	50
4.2.3 Analisis KLT Ester Laktovanilat	52
4.2.4 Analisis FT-IR Ester Laktovanilat	54
4.3 Uji Aktivitas Antioksidan	56
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	61
5.1 Kesimpulan	61
5.2 Saran	61
DAFTAR PUSTAKA	63
LAMPIRAN	66

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur Vanili	5
2. Buah Vanila	6
3. Fermentasi Glukovanili	7
4. Tanaman Vanila	7
5. Reaksi Sintesis Vanili dari Eugenol	9
6. Struktur Asam Vanilat	10
7. Reaksi Oksidasi Vanili menjadi Asam Vanilat	11
8. Struktur Laktosa	12
9. Mekanisme Estrifikasi Fisher	15
10. Mekanisme Esterifikasi Steglich	16
11. Struktur DCC	17
12. Mekanisme Esterifikasi dengan Aktivator DCC	18
13. Struktur DMAP	19
14. Mekanisme Esterifikasi dengan Katalis DMAP	20
16. Reaksi Radikal DPPH dengan Antioksidan	25
17. Kurva Uji Aktivitas Antioksidan	26
18. Endapan Ag ₂ O yang telah tereduksi	37
19. Reaksi Terbentuknya Garam Natrium Vanilat	38

20. Konversi Natrium Vanilat menjadi Asam Vanilat	38
21. Endapan Asam Vanilat	39
22. Ekstrak Asam Vanilat	41
23. Kristal Asam Vanilat	42
24. Hasil KLT Asam Vanilat	43
25. Spektrum FT-IR Asam Vanilat Sintesis dan Asam Vanilat Standar	44
26. Dimer Asam Karboksilat	45
27. Ester Laktovanilat dan DCU	50
28. Endapan DCU	50
29. Ekstraksi Ester Laktovanilat	51
30. Ester Laktovanilat	52
31. Hasil KLT Ester Laktovanilat	53
32. Struktur Ester Laktovanilat	54
33. Spektrum FT-IR Ester Laktovanilat	55
34. Kurva Uji Antioksidan Ester Laktovanilat	57
35. Kurva Uji Antioksidan Asam Vanilat Standar	58

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Sifat Fisik Vanili	6
2. Sifat Fisik DCC	17
3. Sifat Fisik DMAP	19
4. Sifat Fisik Aseton	20
5. Sifat Fisik Etil Asetat	21
6. Identifikasi Gugus Fungsi pada Spektrum Asam Vanilat Hasil Sintesis dan Asam Vanilat Standar	46
7. Hasil Uji Antioksidan Ester Laktovanilat	56
8. Hasil Uji Antioksidan Asam Vanilat Standar	58

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Pembuatan Asam Vanilat	66
2. Mekanisme Reaksi Esterifikasi Steglich	67
3. Mekanisme Reaksi Canizaro	68
4. Pembuatan Ester Laktovanilat	69
5. Spektrum FT-IR Asam Vanilat Standar	70
6. Spektrum FT-IR Asam Vanilat Hasil Sintesis	71
7. Spektrum FT-IR Ester Laktovanilat	72

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Terjadinya berbagai macam penyakit degeneratif, akibat ketidakseimbangan jumlah prooksidan dan antioksidan dalam tubuh, menimbulkan minat para peneliti untuk menemukan jenis-jenis antioksidan yang baru. Salah satunya adalah pada kelompok penelitian Potier, dkk¹ yang berhasil mensintesis antioksidan ester sukrogalat dari karbohidrat (dalam hal ini sukrosa) dan senyawa fenolik yang memiliki gugus karboksilat yaitu asam galat.

Secara kimiawi, karbohidrat dapat didefinisikan sebagai polihidroksi aldehida atau keton atau substansi, yang bila dihidrolisis menghasilkan polihidroksi aldehida dan keton², serta dapat dikelompokkan menjadi monosakarida, disakarida, oligosakarida dan polisakarida. Selain sukrosa, senyawa disakarida yang dapat digunakan untuk membuat ester adalah laktosa (dikenal sebagai gula susu), yang dapat diperoleh dari hasil samping industri keju. Karena strukturnya yang polihidroksi, dengan kata lain mempunyai banyak gugus alkohol, maka dari senyawa laktosa dapat dibuat senyawa turunannya, antara lain dapat dibuat senyawa ester, yaitu bila laktosa direaksikan dengan senyawa yang mengandung gugus karboksilat.

Selain asam galat, senyawa fenolik yang juga memiliki gugus karboksilat adalah asam vanilat. Seperti telah diketahui, senyawa fenolik dapat berfungsi sebagai antioksidan yaitu dengan mendonorkan atom hidrogen fenoliknya pada radikal bebas yang datang menyerang. Reaksi esterifikasi antara laktosa dengan asam vanilat dilakukan untuk mendapatkan senyawa yang memiliki banyak gugus fenolik. Dengan demikian, dari reaksi antara laktosa dengan asam vanilat diharapkan terbentuk senyawa ester yang dapat digunakan sebagai antioksidan.

I.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mensintesis senyawa ester laktovanilat dari reaksi esterifikasi antara asam vanilat hasil oksidasi vanillin dengan laktosa, menggunakan senyawa N,N'-disikloheksilkarbodiimida (DCC) sebagai aktivator, senyawa 4-dimetilaminopiridin (DMAP) sebagai katalis serta aseton sebagai pelarut.
2. Melakukan uji aktivitas antioksidan pada senyawa ester laktovanilat yang dihasilkan.

I.3 Kedudukan Penelitian

Pada tahun 1999, kelompok penelitian yang terdiri dari Potier, dkk¹ berhasil mensintesis senyawa ester sukroglalat, yaitu dari reaksi antara sukrosa dengan asam galat. Dengan menggunakan beberapa metode, sebanyak dua, tiga, enam dan delapan gugus asam galat berhasil teresterifikasi ke dalam sukrosa. Senyawa ester sukroglalat yang dihasilkan tersebut ternyata memiliki aktivitas antioksidan.

Pada tahun 2007, Intan Nurulita³ berhasil membuat senyawa ester glukovanilat, yaitu dari asam vanilat dan glukosa, menggunakan metode refluks dengan dibantu katalis asam sulfat pekat.

Selain itu, pada akhir tahun 2007, Siti Hawa⁴ telah berhasil membuat senyawa ester sukrovanilat, dari reaksi antara sukrosa dengan asam vanilat menggunakan aktivator DCC dan katalis DMAP. Namun dalam penelitian ini belum dilakukan uji aktivitas antioksidan dari senyawa ester sukrovanilat yang dihasilkan.

I.4 Hipotesis Penelitian

Reaksi esterifikasi (pembuatan ester) dapat dilakukan dengan beberapa jalan, salah satunya adalah dengan mereaksikan asam karboksilat dengan alkohol. Berdasarkan hal tersebut maka diduga kuat senyawa ester laktovanilat dapat dibuat dengan mereaksikan asam vanilat dengan laktosa.

Senyawa ester laktovanilat memiliki struktur yang mirip dengan senyawa ester sukrogalat. Senyawa ester sukrogalat telah terbukti memiliki sifat sebagai antioksidan, sehingga senyawa ester laktovanilat yang akan disintesis dalam penelitian ini, diduga juga memiliki aktivitas antoksidan. Hal ini didukung oleh fakta bahwa asam vanilat merupakan salah satu senyawa fenolik, sehingga kemungkinan besar dapat bersifat sebagai antioksidan.

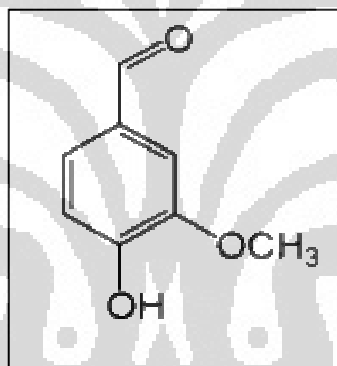


BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Vanili^{5,6}

Vanili adalah senyawa organik dengan rumus molekul $C_8H_8O_3$. Nama IUPAC dari vanili adalah 4-hidroksi-3-metoksi benzaldehid dengan struktur sebagai berikut:



Gambar 1. Struktur Vanili

Seperti yang terlihat pada strukturnya, gugus fungsi yang terdapat pada senyawa vanili adalah aldehida, eter dan fenol. Adapun sifat-sifat fisik dari vanili adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Sifat Fisik Vanili

Berat molekul	152,15 g/mol
Wujud	Padatan berwarna putih
Densitas	1,056 g/cm ³
Titik Leleh	80-81 °C (353-354 K)
Titik Didih	285 °C (558 K)
Kelarutan dalam Air	1 g/100 mL
Titik nyala	147 °C
(Data diambil pada keadaan standar: 25 °C, 100 kPa)	

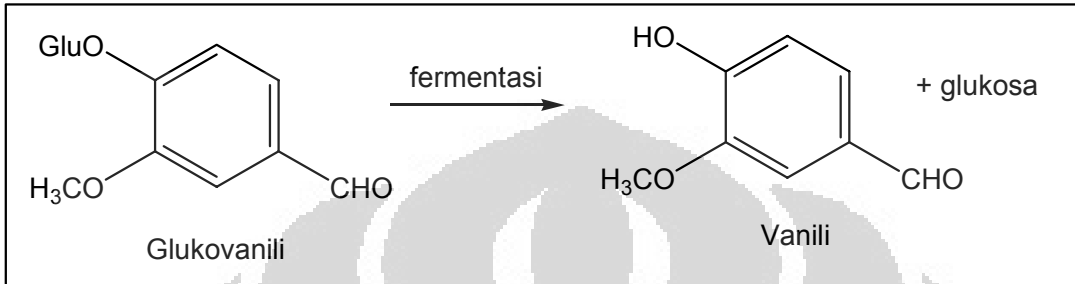
Vanili merupakan komponen utama dari sekitar 200 jenis senyawa beraroma yang terdapat dalam buah vanila. Berat vanili adalah sekitar 2 - 2,75% dari berat kering buah vanila yang terawat.



Gambar 2. Buah Vanila

Secara alamiah, vanili didapat dari ekstrak buah vanila yang masih muda dan berwarna hijau, namun masih dalam bentuk aglikon dari β -D-

glukosida (glukovanili). Setelah glukovanili difermentasi, barulah akan didapat senyawa vanili.



Gambar 3. Fermentasi Glukovanili

Tanaman vanila merupakan tumbuhan merambat, tumbuh menjalar pada pohon, tiang, dll.

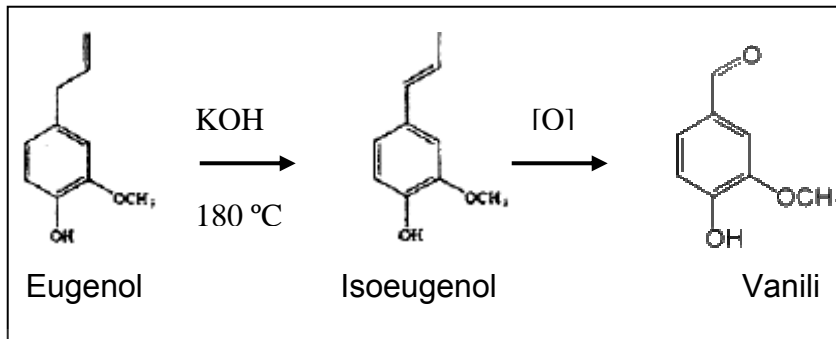


Gambar 4. Tanaman Vanila

Spesies tanaman vanila yang paling banyak mengandung vanili adalah *Vanilla planifolia*. Species ini mula-mula terdapat di Meksiko, namun sekarang telah menyebar ke daerah tropis di seluruh dunia. Klasifikasi taksonomi dari tanaman *Vanilla planifolia* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Liliopsida
Ordo	: Orchidales
Famili	: Orchidaceae
Genus	: Vanilla
Spesies	: <i>Vanilli planifolia</i>

Harga ekstrak vanila alami yang mahal serta jumlah kebutuhan vanili yang jauh lebih besar dibanding produksi vanili alami mendorong terjadinya pengembangan untuk mendapatkan vanili secara sintesis. Vanili sintetis yang pertama didapat dari eugenol. Sintesis ini terdiri atas dua tahap, tahap pertama adalah pemanasan eugenol dengan adanya KOH pada temperatur 180 °C sehingga terbentuk isoeugenol, tahap kedua adalah oksidasi isoeugenol menjadi vanili.



Gambar 5. Reaksi Sintesis Vanili dari Eugenol ⁷

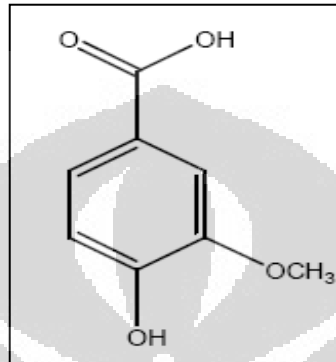
Kemudian ditemukan cara lain untuk pembuatan vanili yaitu dari guaiakol, serta dari produk samping industri kertas yaitu lignin yang merupakan konstituen alami dalam kayu .

Karena vanili mempunyai bau yang harum dan menyenangkan, maka senyawa ini banyak digunakan untuk memberi aroma pada berbagai jenis makanan dan minuman, seperti es krim, coklat, gula-gula, kue, dll. Vanili juga dimanfaatkan dalam industri parfum dan untuk menutupi bau ataupun rasa tidak enak pada obat-obatan, makanan ternak dan produk pembersih. Selain itu, dari vanili dapat dibuat berbagai macam senyawa kimia yang lain.

2.2 Asam Vanilat ⁸

Asam vanilat merupakan senyawa yang mempunyai rumus molekul $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$, dan dapat diperoleh dari hasil oksidasi vanili dengan perak oksida (Ag_2O) ataupun metode *caustic fusion*. ⁹ Nama IUPAC untuk senyawa asam

vanilat adalah asam 4-hidroksi-3-metoksi benzoat. Berat molekul asam vanilat adalah 168,1467 g/mol dengan struktur sebagai berikut:



Gambar 6. Struktur Asam Vanilat

Wujud asam vanilat secara fisik adalah berupa bubuk (*powder*) atau kristal berbentuk jarum berwarna putih hingga kekuningan, dengan titik leleh sebesar 210-213 °C. Hidrolisis asam vanilat dalam air adalah 1:860 bagian, Asam vanilat larut dalam eter dan sangat larut dalam alkohol, serta dalam bentuk garamnya sangat larut dalam air.¹⁰

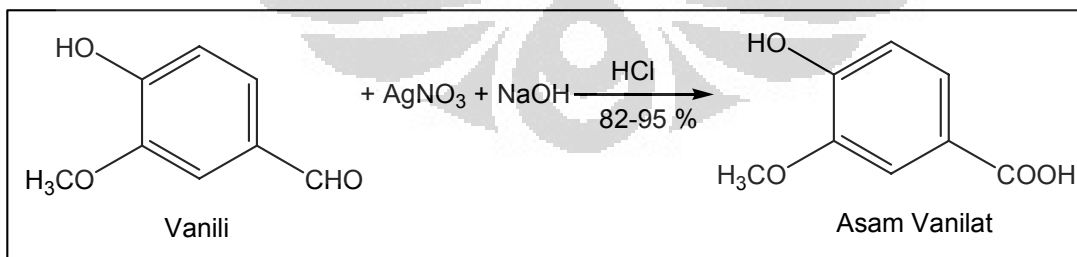
2.3 Pembuatan Asam Vanilat

Asam vanilat dapat dibuat dengan cara mengoksidasi gugus aldehida dari vanili. Gugus aldehida yang terdapat pada vanili merupakan gugus yang sangat mudah teroksidasi menjadi asam karboksilat, bahkan oleh zat

pengoksidasi yang lembut seperti Ag^+ .¹¹ Salah satu zat pengoksidasi yang dapat digunakan untuk mengoksidasi vanili adalah Ag_2O .

Wujud fisik Ag_2O adalah berupa bubuk (*powder*) berwarna hitam atau coklat gelap. Ag_2O mempunyai berat molekul sebesar 231,7148 g/mol, dengan densitas sebesar $7,2 \text{ g/cm}^3$ dan akan terdekomposisi pada suhu $280 \text{ }^\circ\text{C}$ atau bila terkena cahaya. Kelarutan Ag_2O dalam air pada suhu $20 \text{ }^\circ\text{C}$ adalah sebesar $0,0013 \text{ g/100 mL}$. Ag_2O hanya sedikit terhidrolisis dalam air (1: 40.000 bagian), namun dapat larut dengan baik dalam larutan amonium hidroksida dan asam nitrat, hanya sedikit larut dalam natrium hidroksida.¹²

Ag_2O dapat dibuat dengan mereaksikan larutan perak nitrat dengan hidroksida alkali. Reaksi oksidasi vanili dengan oksidator Ag_2O yang dibuat dari larutan perak nitrat dengan natrium hidroksida berlebih, terbukti menghasilkan rendemen asam vanilat dalam jumlah yang besar. Hal ini diketahui dari hasil penelitian yang dilakukan Pearl¹³. Persamaan reaksinya adalah sebagai berikut:

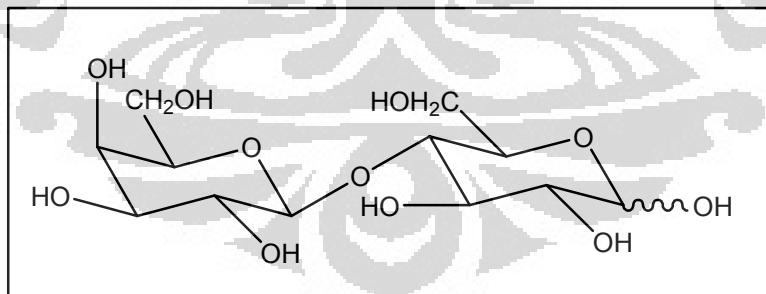


Gambar 7. Reaksi Oksidasi Vanili menjadi Asam Vanilat¹³

2.4 Laktosa ^{10,14}

Laktosa merupakan karbohidrat yang secara alamiah terdapat pada susu dari mamalia, sebagai contoh susu manusia mengandung 6,7% laktosa dan susu sapi mengandung 4,5% laktosa. Karena itu, laktosa sering disebut gula susu. Secara komersial, laktosa diperoleh sebagai hasil samping industri keju. ¹¹

Secara kimia, laktosa mempunyai rumus molekul $C_{12}H_{22}O_{11}$ dan termasuk dalam disakarida, karena tersusun dari β -D-galaktopiranososa (bentuk siklik dari galaktosa) dan β -D-glukopiranososa (bentuk siklik dari glukosa), dimana keduanya dipersatukan oleh ikatan glikosida β -1,4'. Dengan demikian, nama laktosa secara kimia adalah 4-O-(β -D-galaktopiranosil)-D-glukopiranosida. Struktur laktosa adalah sebagai berikut:



Gambar 8. Struktur Laktosa

Seperti yang terlihat pada strukturnya, terdapat gugus hemiasetal pada laktosa sehingga mengakibatkan terbentuknya dua anomer yaitu

konfigurasi α dan β -laktosa (hanya berbeda posisi $-OH$ pada atom karbon nomor 1, bila $-OH$ terletak di atas bidang maka disebut konfigurasi β dan sebaliknya). Kedua hemiasetal yang anomer serta bentuk rantai terbukanya berada dalam kesetimbangan dalam larutan air, sehingga pada laktosa terjadi mutarotasi, yaitu perubahan rotasi optis secara perlahan-lahan antara kedua anomer dan rantai terbuka sampai dicapai rotasi optis yang tetap.

α -laktosa adalah gula susu yang umum dan digunakan pada dunia farmasi, mempunyai rasa sedikit manis dan stabil di udara. Titik leleh α -laktosa adalah $201-202\text{ }^{\circ}\text{C}$. Satu gram α -laktosa dapat larut dalam 5 mL air, dalam 2,6 mL air mendidih, sedikit larut dalam alkohol namun tidak larut dalam kloroform dan eter.

β -laktosa diperoleh dengan mengkristalisasi larutan pekat dari α -laktosa pada suhu di atas $93,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Satu gram β -laktosa dapat larut dalam 2,2 mL air pada suhu $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan dalam 1,1 mL air mendidih.

Gula pereduksi adalah gula yang dapat dioksidasi oleh zat pengoksidasi seperti reagen Tollens (suatu larutan basa dari $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$) menghasilkan cincin perak.¹¹ Dengan demikian, gula pereduksi merupakan gula yang masih memiliki gugus aldehida sehingga dapat dioksidasi. Bentuk hemiasetal siklik masih dapat dioksidasi (bersifat gula pereduksi), karena dapat berkesetimbangan dengan bentuk rantai terbukanya dimana terdapat gugus aldehida. Laktosa merupakan gula pereduksi karena memiliki bentuk hemiasetal siklik. Hal ini dibuktikan dari hasil uji Tollens dan Fehling pada laktosa yang memberikan hasil positif.

Hidrolisis laktosa dengan katalis asam, akan menghasilkan D-glukosa dan D-galaktosa dalam kuantitas mol yang sama. Laktosa juga mengalami proses hidrolisis yang serupa dengan adanya enzim β -galaktosidase.²

2.5 Esterifikasi

Esterifikasi merupakan sebutan untuk proses pembuatan ester dari asam karboksilat dan alkohol. Ada beberapa cara lain untuk membuat ester yaitu:

- dari dari halida asam dan alkohol, dengan persamaan umum sebagai berikut:



- dari anhidrida asam dan alkohol, dengan persamaan umum sebagai berikut:

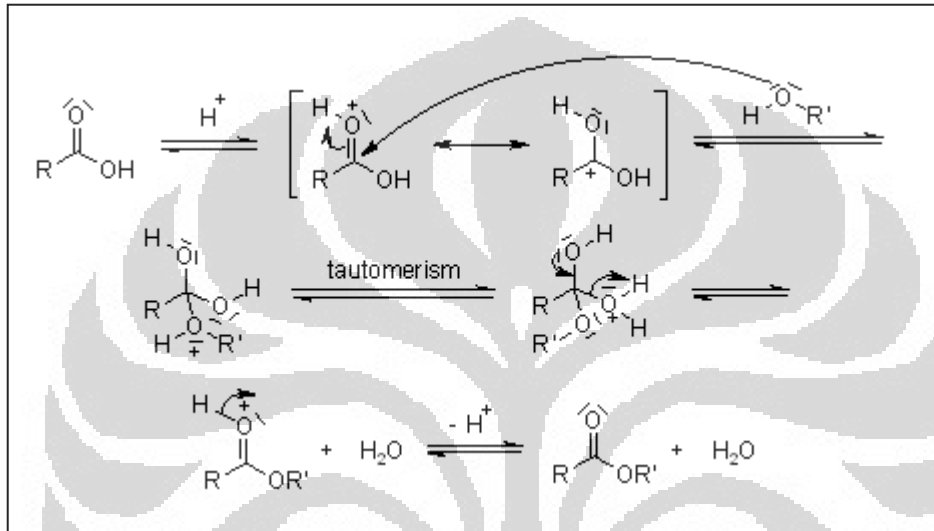


- dari suatu garam karboksilat dan alkil halida yang reaktif, dengan persamaan umum sebagai berikut:



Esterifikasi antara asam karboksilat dan alkohol memerlukan katalis asam dan bersifat reversibel karena berkesetimbangan dengan air sebagai hasil sampingnya. Reaksi ini dikenal sebagai reaksi esterifikasi Fisher, berlangsung melalui serangkaian tahap protonasi dan deprotonasi yaitu

oksigen karbonil diprotonasi, alkohol sebagai nukleofilik menyerang karbon positif yang diikuti dengan eliminasi air, maka akan didapat ester. Secara umum mekanismenya dapat dituliskan sebagai berikut:

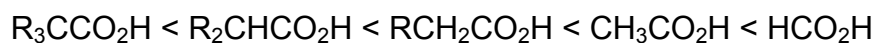


Gambar 9. Mekanisme Esterifikasi Fisher ¹⁵

Laju esterifikasi suatu asam karboksilat bergantung pada halangan sterik dalam alkohol dan asam karboksilatnya. Urutan kereaktifan alkohol terhadap esterifikasi :



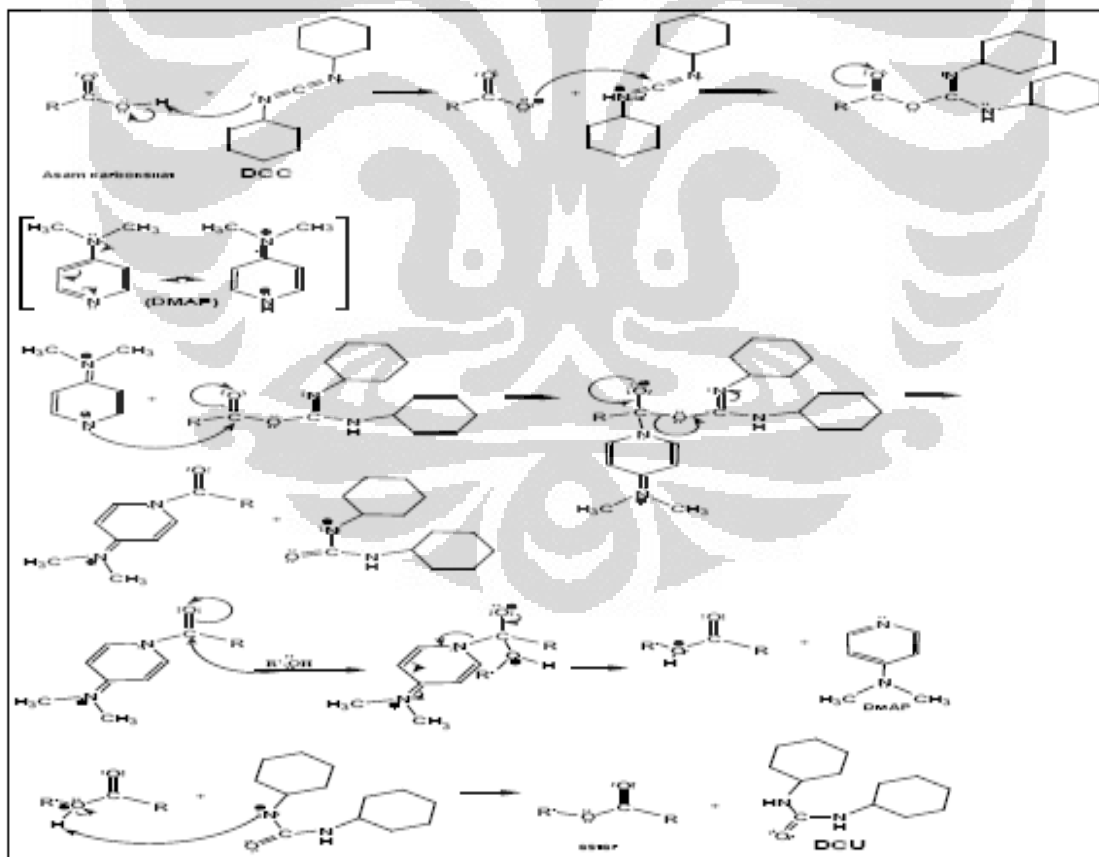
Sedang urutan kereaktifan asam karboksilat terhadap esterifikasi adalah:



Dengan bertambahnya halangan sterik dalam zat antara, laju pembentukan ester akan menurun dan rendemen esternya pun berkurang.¹¹

Steglich¹⁶ menemukan metode esterifikasi untuk variasi asam karboksilat dan alkohol yang luas, termasuk pada polyol, *α-hydroxycarboxylic acid ester*, bahkan pada asam alkohol yang sangat labil seperti vitamin A.¹⁷

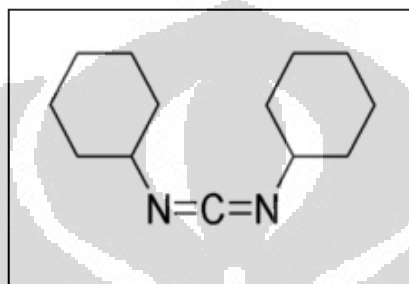
Reaksi esterifikasi Steglich ini melibatkan senyawa N,N'-disikloheksilkarbodiimida (DCC) sebagai aktivator serta senyawa 4-dimetilaminopiridin (DMAP) sebagai katalis. Mekanisme esterifikasi Steglich adalah sebagai berikut:



Gambar 10. Mekanisme Esterifikasi Steglich⁴

2.6 DCC (N,N'-disikloheksilkarbodiimida) ¹⁸

DCC merupakan senyawa organik dengan rumus kimia $C_{13}H_{22}N_2$, strukturnya adalah sebagai berikut:



Gambar 11. Struktur DCC

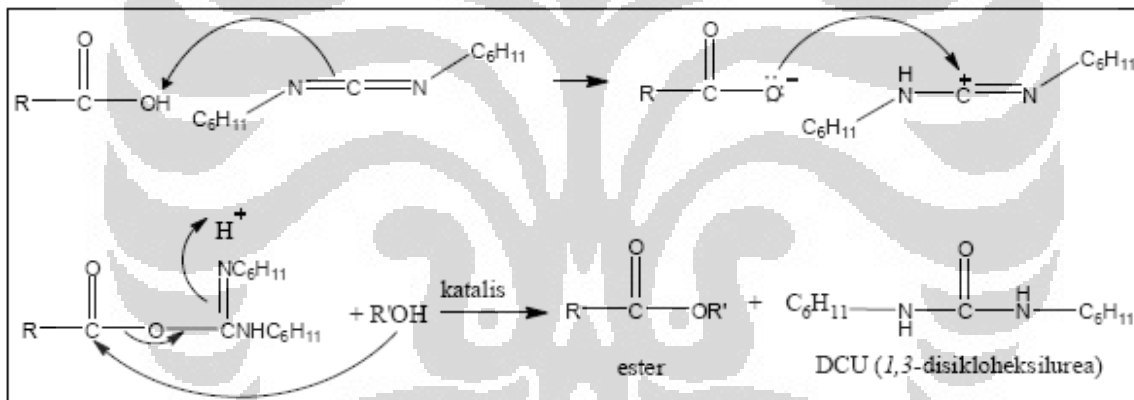
Sifat-sifat fisik dari DCC adalah sebagai berikut:

Tabel 2. Sifat Fisik DCC

Berat molekul	206,33 g/mol
Wujud	Bubuk kristal putih
Densitas	1,325 g/cm ³ , solid
Titik Leleh	34-36°C
Titik Didih	122°C
Kelarutan dalam Air	Tidak larut
(Data diambil pada	keadaan standar: 25 °C, 100 kPa)

DCC sangat larut dalam diklorometana, tetrahidrofurana, asetonitril dan dimetilformamida namun tidak larut dalam air.

Kegunaan utama DCC adalah sebagai agen pengkopling asam amino pada sintesis peptida artifisial. Selain itu, DCC dapat digunakan sebagai aktivator dalam reaksi esterifikasi asam karboksilat dengan berbagai alkohol termasuk beberapa alkohol tersier, namun masih diperlukan penggunaan katalis seperti DMAP untuk mempercepat laju reaksi. Mekanisme esterifikasi dengan aktivator DCC dapat dilihat pada gambar berikut:

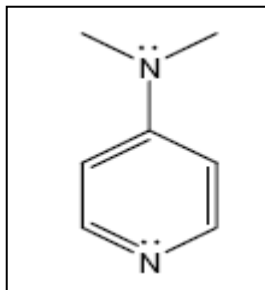


Gambar 12. Mekanisme Esterifikasi dengan Aktivator DCC ¹⁹

2.7 DMAP (4-dimetilaminopiridin) ²⁰

DMAP adalah senyawa organik dengan rumus molekul $C_7H_{10}N_2$.

Struktur DMAP adalah sebagai berikut:



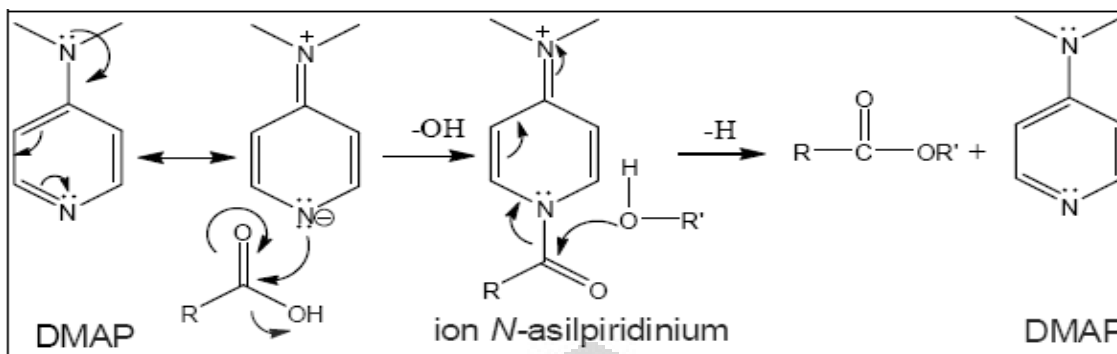
Gambar 13. Struktur DMAP

DMAP merupakan katalis nukleofilik yang mempunyai sifat mengkatalisis yang kuat. DMAP dapat mengkatalisis berbagai jenis reaksi, di antaranya adalah esterifikasi dengan anhidrida asam, reaksi hidrosilasi, serta esterifikasi Steglich dengan adanya DCC. Sifat-sifat fisik dari DMAP dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 3. Sifat Fisik DMAP

Berat molekul	122,17 g/mol
Wujud	Kristal putih
Titik Leleh	110-113°C
Titik Didih	162°C pada tekanan 50mmHg
(Data diambil pada	keadaan standar: 25 °C, 100 kPa)

Mekanisme reaksi esterifikasi dengan katalis DMAP melibatkan ion N-asilpiridinium yang ditunjukkan dalam gambar:



Gambar 14. Mekanisme Esterifikasi dengan Katalis DMAP ¹⁹

2.8 Aseton ²¹

Aseton merupakan cairan yang volatil dan mudah terbakar, mempunyai bau yang sedikit manis dan khas. Rumus kimia dari aseton adalah CH_3COCH_3 dengan nama kimia 2-propanon, dimetil keton atau β -keto propana. Sifat-sifat fisik aseton dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 4. Sifat Fisik Aseton

Berat molekul	58,08 g/mol
Wujud	Cairan bening
Densitas	0,786 g/mL
Titik Leleh	-94 °C
Titik Didih	56,5 °C
Titik Nyala	-20 °C
(Data diambil pada	keadaan standar: 25 °C, 100 kPa)

Aseton dapat larut dengan baik (*miscible*) dalam air, alkohol, DMF (dimetil formamida), kloroform dan eter. Dari sisi toksisitas, nilai LD₅₀ aseton pada tikus adalah 10,7 mL/kg (*orally*). Aseton bukanlah senyawa yang sangat toksik, namun merupakan zat yang bersifat mengiritasi. Inhalasi uap aseton harus dihindari karena dapat mengakibatkan efek hepatotoksik (menyebabkan kerusakan hati).

2.9 Etil Asetat ²²

Etil asetat adalah senyawa organik dengan rumus molekul CH₃CH₂OC(O)CH₃. Penampakan fisiknya berupa cairan bening dengan bau yang enak. Etil asetat bersifat volatil, relatif tidak toksik dan tidak higroskopis. Sifat- sifat fisik etil asetat dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 5. Sifat Fisik Etil Asetat

Berat molekul	88,105 g/mol
Wujud	Cairan bening
Densitas	0,897 g/mL
Titik Leleh	-83,6 °C
Titik Didih	77,1 °C
Titik Nyala	-4 °C
(Data diambil pada	keadaan standar: 25 °C, 100 kPa)

Kelarutan etil asetat dalam air adalah 8,3 g/100 mL pada suhu 20 °C. Etil asetat dapat larut dalam dengan baik (*miscible*) dalam etanol, aseton, dietil eter dan benzena.

2.10 Radikal Bebas

Radikal bebas dapat didefinisikan sebagai atom atau gugus atom apa saja yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan.¹¹ Karena adanya elektron yang tidak berpasangan, radikal bebas bersifat tidak stabil, reaktif dan berpotensi merusak. Radikal bebas dapat bereaksi dengan komponen sel tubuh yang bersifat struktural seperti protein dan lipid dan fungsional seperti enzim dan DNA.

Radikal bebas dapat bersumber dari dalam maupun dari luar tubuh makhluk hidup. Secara normal, radikal bebas dihasilkan selama proses metabolisme dalam tubuh. Contoh sumber radikal bebas dari dalam tubuh (endogenus) adalah reaksi autooksidasi, oksidasi enzimatik, aktivitas ion logam transisi yang mengkatalisis reaksi oksidasi dan beberapa sistem enzim. Sedang contoh radikal bebas yang berasal dari luar tubuh (eksogenus) antara lain polusi udara (CO, NO_x, SO_x), asap rokok, pestisida, radiasi sinar UV, dll.

Dalam tubuh, radikal bebas yang umum dijumpai adalah *Reactive Oxygen Species* (ROS), yang meliputi radikal turunan oksigen dan senyawa

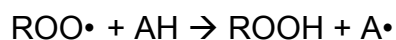
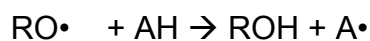
peroksida. Beberapa contoh ROS adalah $\bullet\text{O}_2^-$ (anion superoksida), $\bullet\text{OH}$ (radikal hidroksil), $\text{RO}\bullet$ (alkoksi radikal), $\text{ROO}\bullet$ (peroksi radikal), dll.

2.11 Antioksidan

Antioksidan adalah molekul yang dapat memperlambat atau bahkan mencegah terjadinya oksidasi pada molekul lain.²³ Reaksi oksidasi ini dapat menghasilkan radikal bebas (*Reactive Oxygen Species/ ROS*), yang akan memicu terjadinya reaksi berantai yang pada akhirnya mengakibatkan kerusakan bahkan kematian sel. Antioksidan berperan dalam menghentikan (terminasi) reaksi berantai ini, dengan jalan menangkap radikal bebas atau menghambat terjadinya reaksi oksidasi pada substrat dengan cara antioksidan itu sendiri yang teroksidasi.²³

Ketidakseimbangan jumlah ROS dan antioksidan dalam tubuh disebut *oxidative stress*, yang dapat menyebabkan gangguan kesehatan seperti aterosklerosis (yang memicu munculnya penyakit jantung koroner), penyakit Parkinson, Alzheimer, aging, mutasi yang memicu terjadinya kanker, dll.²⁴

Ada beberapa mekanisme kerja dari antioksidan, salah satunya adalah dengan mendonorkan hidrogen dari senyawa fenolik kepada radikal bebas, dengan mekanisme umum:



Banyak senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan, contohnya adalah vitamin C (asam askorbat), enzim dari kelompok superoksida dismutase (SODs) dan katalase, vitamin E (tokoferol dan tokotrienol) serta senyawa polifenol (resveratrol, flavonoida, dll).

Fenolik adalah suatu kelompok senyawa kimia yang mengandung satu atau lebih gugus hidroksil (-OH) yang terikat pada gugus hidrokarbon aromatik. Senyawa fenolik yang paling sederhana adalah fenol (C_6H_5OH). Bila suatu senyawa mempunyai lebih dari satu gugus OH fenolik, maka disebut polifenol. Senyawa fenolik atau polifenol dapat bersifat sebagai antioksidan, karena dapat mendonorkan hidrogen fenolik kepada radikal bebas sehingga radikal tersebut padam, sedang radikal pada fenolik distabilkan oleh resonansi pada gugus aromatiknya.

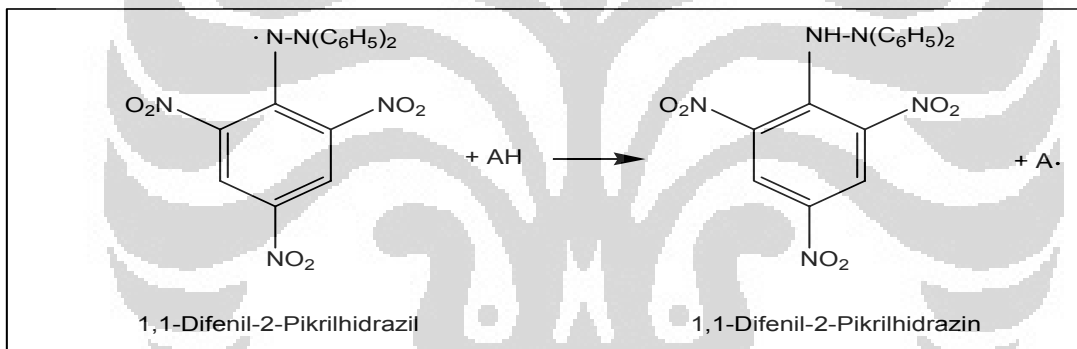
Senyawa polifenol banyak terdapat dalam buah-buahan, seperti apel, blueberi, strawberi, cheri, anggur, pear, plum, dll serta dalam sayur-sayuran seperti brokoli, seledri, bawang, jagung, dll. Bahan makanan lain yang juga mengandung polifenol, di antaranya adalah minuman anggur merah, coklat, teh, minyak zaitun, *grains*, kacang kedelai, dll.²⁵

2.12 Uji Aktivitas Antioksidan

Salah satu metode yang dapat dipakai untuk mengukur aktivitas antioksidan dari suatu sampel, adalah metode efek peredaman radikal bebas 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH). DPPH merupakan radikal bebas yang

stabil karena tidak bereaksi dengan oksigen.²⁶ Selain itu, elektron radikal DPPH terdelokalisasi dalam molekul DPPH tersebut.²⁷ Hal ini membuat radikal DPPH tidak mengalami dimerisasi (tetap dalam bentuk radikal).

Prinsip uji antioksidan pada metode ini adalah radikal bebas DPPH mengambil hidrogen radikal dari antioksidan sehingga radikal DPPH tersebut berubah menjadi 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazin, sedang radikal antioksidan yang tersisa distabilkan oleh struktur resonansinya. Secara umum, reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut:



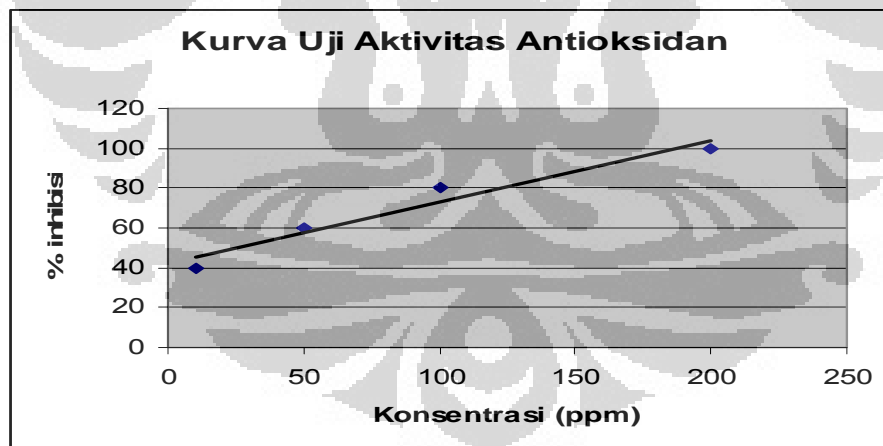
Gambar 16. Reaksi Radikal DPPH dengan Antioksidan

Reaksi ini menyebabkan terjadinya perubahan warna, yaitu dari ungu menjadi kuning. Perubahan warna tersebut yang dapat diukur dengan spektrofotometer sinar tampak pada $\lambda = 515$ nm. Dari perbedaan serapan antara blanko dan sampel diperoleh nilai persen inhibisi yaitu dengan persamaan:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(\text{Absorban blanko} - \text{absorban sampel}) \times 100 \%}{\text{Absorban blanko}}$$

Aktivitas antioksidan dari suatu senyawa diukur dari nilai *Inhibition of Concentration 50* (IC₅₀), yaitu konsentrasi antioksidan (µg/mL) yang mampu menghambat 50 % radikal bebas. Semakin kecil nilai IC₅₀, semakin aktif senyawa tersebut sebagai antioksidan.

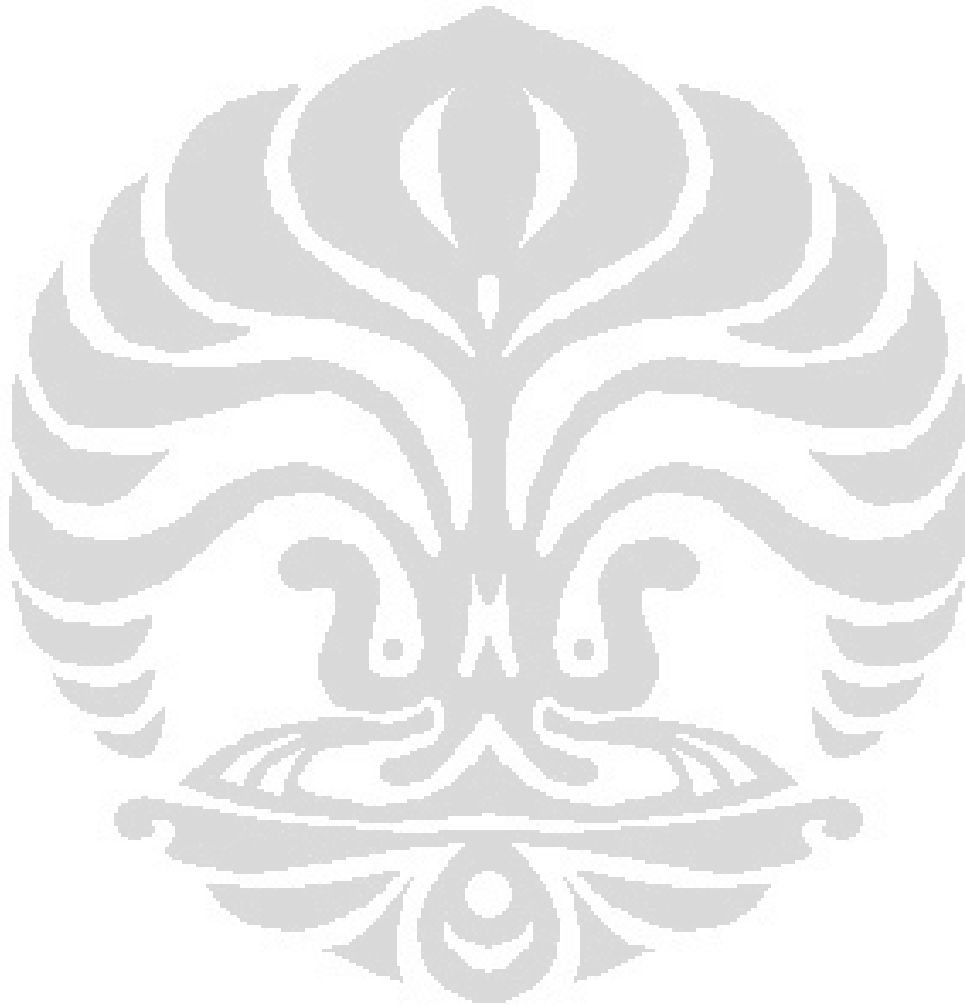
Nilai IC₅₀ diperoleh melalui kurva uji aktivitas antioksidan. Kurva uji aktivitas antioksidan tersebut dibuat dengan mengalurkan persen inhibisi sebagai ordinat dan konsentrasi sebagai absis, seperti yang dapat digambarkan pada contoh berikut ini:



Gambar 17. Kurva Uji Aktivitas Antioksidan

Dari kurva tersebut, akan diperoleh suatu persamaan garis linier ($y = ax+b$).

Nilai IC_{50} merupakan nilai x pada $y = 50$.



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Metode Penelitian

Penelitian ini diawali dengan mengoksidasi gugus aldehida pada vanili menjadi gugus karboksilat dengan menggunakan oksidator Ag_2O dan NaOH berlebih. Dengan demikian, vanili teroksidasi menjadi asam vanilat. Selanjutnya asam vanilat tersebut dimurnikan dan dibandingkan dengan asam vanilat standar melalui metode pengujian kromatografi lapis tipis (KLT) dan spektroskopi *Fourier Transform- Infra Merah* (FT-IR). Asam vanilat tersebut kemudian di esterifikasi dengan laktosa dengan menggunakan senyawa disikloheksilkarbodiimida (DCC) sebagai aktivator serta senyawa 4-dimetilaminopiridin (DMAP) sebagai katalis dalam pelarut aseton. Pada ester laktovanilat yang dihasilkan dilakukan pengujian dengan metode kromatografi lapis tipis dan spektroskopi FT-IR serta dilakukan uji aktivitas antioksidan.

3.2 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: peralatan gelas, neraca analitis, kertas saring, spatula, corong, corong pisah,

cawan penguap, plat silika gel, *hot plate*, *magnetic stirrer*, *water bath*, *oil bath*, kondensor. Adapun instrumen yang digunakan untuk pengukuran adalah *Fourier Transform- Infra Merah* (FT-IR) dan spektrofotometer *ultraviolet-visible* (UV-Vis).

3.3 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: Vanili (CV. Setia Guna), D(+)-laktosa (Laboratorium Kimia Organik FMIPA-UI), NaOH (Merck), AgNO₃ (Farco Chemical Supplies), aseton (Bratachem), kloroform (Merck), metanol (Merck), etil asetat (CV. Bina Citra Mandiri), petroleum eter (Bratachem), n-heksana (Merck), NaHCO₃ (Merck), Na₂SO₄ (Merck), aquades.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Pembuatan Asam Vanilat

3.4.1.1 Oksidasi Vanili

Larutan dari 3,377 g AgNO₃ (20mmol) dicampur dengan larutan dari 0,9254 g NaOH (23 mmol) lalu diaduk selama lima menit. Endapan Ag₂O yang terbentuk dikumpulkan dengan disaring,

kemudian dicuci dengan aquades. Pada oksida basah Ag_2O ditambahkan 40 mL aquades dan 3,9282 g (97 mmol) pellet NaOH yang telah dilarutkan sambil diaduk kuat, lalu temperatur dinaikkan sampai sekitar 55-60 °C. Saat temperatur tersebut tercapai, sebanyak 3,044 g vanili (20 mmol) dimasukkan, lalu diaduk kuat selama sepuluh menit. Kemudian campuran disaring dengan kertas saring, filtratnya diasamkan dengan asam sulfat pekat tetes demi tetes sampai terbentuk kristal asam vanilat yang tidak larut lagi. Kristal asam vanilat yang terbentuk difiltrasi, kemudian dicuci dengan aquades.

3.4.1.2 Pemurnian Asam Vanilat

Asam vanilat yang telah terbentuk dilarutkan dengan 25 mL etil asetat, dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan air dengan perbandingan 1: 1 terhadap etil asetat yang digunakan lalu dikocok (diekstraksi). Fasa organik dipisahkan sedang fasa air dimasukkan kembali ke dalam corong pisah, lalu ditambahkan etil asetat dan diekstraksi kembali. Kemudian dilakukan kembali hal yang sama sehingga ekstraksi dilakukan sebanyak tiga kali. Fasa air dipisahkan dari fasa organiknya. Produk yang terekstrak dalam fasa organik hasil tiga kali ekstraksi kemudian diuapkan sampai pelarutnya habis dan diperoleh kristal asam vanilat yang lebih murni.

3.4.1.3 Uji Kemurnian

Kristal asam vanilat yang diperoleh diuji kemurniannya melalui kromatografi lapis tipis, yaitu dibandingkan dengan asam vanilat standar serta dianalisis dengan menggunakan spektroskopi FT-IR.

3.4.2 Pembuatan Ester Laktovanilat

3.4.2.1 Esterifikasi Asam Vanilat dengan Laktosa

Larutan dari 0,1711 g (0.5 mmol) laktosa dalam aseton dicampurkan dengan 0,2522 g (1.5 mmol) asam vanilat yang telah dilarutkan dalam 5 mL aseton, kemudian ditambahkan 0,3095 g (1.5 mmol) DCC sebagai aktivator serta 0,0183 g (0.15 mmol) DMAP sebagai katalis. Campuran tersebut direfluks dengan menggunakan *oil bath* pada temperatur 60 °C sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 24 jam.

D(+)-laktosa + 3 asam vanilat → laktosa trivanilat

0,1711 g 0,2522 g

0,5 mmol 1,5 mmol 0,5 mmol

3.4.2.2 Pemurnian Ester Laktovanilat

Setelah reaksi selesai, hasil reaksi disaring untuk memisahkan ester dari endapan disikloheksil urea (DCU), kemudian dilakukan pencucian endapan DCU dengan air. Filtrat yang didapat dimasukkan ke corong pisah, ditambahkan 25 mL etil asetat lalu diekstraksi sebanyak 3 kali. Fasa organik hasil tiga kali ekstraksi ditampung dan ditambahkan Na_2SO_4 anhidrat lalu disaring. Setelah disaring, fasa organik tersebut diuapkan sampai pelarutnya habis.

3.4.2.2 Uji Kemurnian

Senyawa ester laktovanilat yang dihasilkan diuji kemurniannya melalui kromatografi lapis tipis, yaitu dibandingkan dengan asam vanilat serta dianalisis dengan menggunakan instrumen spektroskopi FT-IR.

3.4.3 Uji Aktivitas Antioksidan

3.4.3.1 Pembuatan Larutan Pereaksi DPPH

Menimbang 39,5 mg DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) kemudian dilarutkan dalam 100 mL methanol p.a.

3.4.3.2 Pembuatan Larutan Blanko

Memipet 1 mL larutan pereaksi DPPH ke dalam tabung reaksi, ditambahkan metanol p.a sampai 5 mL kemudian di homogenkan, sehingga diperoleh larutan pereaksi DPPH dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ (1 mM).

3.4.3.3 Persiapan Larutan Sampel

Menimbang 2 mg sampel (ester laktovanilat dan asam vanilat standar) kemudian dilarutkan dengan 2 mL metanol dan di homogenkan sehingga diperoleh larutan sampel dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ (larutan induk).

Memipet masing-masing 62,5; 125; 250 dan 500 μL larutan induk sampel ke dalam lima tabung reaksi yang berbeda.

Menambahkan ke dalam tiap-tiap tabung reaksi tersebut 500 μL larutan DPPH 1 mM kemudian di tambahkan methanol p.a sampai 2500 μL dan dihomogenkan. Dengan demikian diperoleh larutan sampel dengan konsentrasi 10, 50, 100 dan 200 ppm. Menutup masing-masing tabung reaksi dengan alumunium foil.

3.4.3.4 Pengukuran Aktivitas Antioksidan

Larutan blanko dan larutan sampel dalam lima konsentrasi tersebut diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C. Kemudian dilakukan pengukuran absorbansi dari larutan blanko dan larutan sampel dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Secara umum, penelitian ini terbagi atas tiga bagian besar yaitu pembuatan asam vanilat dan pembuatan ester laktovanilat serta uji aktivitas antioksidan.

4.1 Pembuatan Asam Vanilat

4.1.1 Oksidasi Vanili

Asam vanilat dibuat dengan mengoksidasi vanili. Oksidator yang digunakan adalah perak (I) oksida atau Ag_2O , dimana Ag_2O tersebut dibuat dengan mereaksikan AgNO_3 dengan NaOH yang berlebih.

Metode oksidasi vanili dengan AgNO_3 dan NaOH berlebih pertama kali dilakukan oleh Pearl pada tahun 1946.¹³ Metode ini dipilih untuk digunakan dalam penelitian ini telah terbukti menghasilkan rendemen asam vanilat dalam jumlah yang banyak.

Reaksi pembuatan asam vanilat diawali dengan melarutkan 3,377 g AgNO_3 (20mmol) dalam aquades. Pada wadah yang terpisah dibuat larutan dari 0,9254 g NaOH (23 mmol) dalam aquades. Kedua larutan tersebut kemudian dicampur sambil diaduk selama 5 menit. Tujuan pelarutan AgNO_3 dan NaOH dalam air, adalah karena baik AgNO_3 dan NaOH berada dalam

bentuk padatan, Seperti telah diketahui, padatan dengan padatan tidak dapat bereaksi sehingga perlu dilarutkan. Dalam penelitian ini masing-masing dilarutkan terlebih dahulu, sebelum kemudian dicampurkan supaya keduanya lebih mudah dan lebih cepat bereaksi. Hal ini dibantu dengan pengadukan selama 5 menit, sehingga diharapkan terbentuk Ag_2O secara optimal.

Pencampuran larutan AgNO_3 dengan larutan NaOH menghasilkan Ag_2O berupa endapan berwarna coklat gelap, reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut:



Endapan Ag_2O tersebut kemudian dikumpulkan dengan cara disaring, kemudian dicuci beberapa kali dengan aquades untuk menghilangkan pengotor yang bersifat polar, terutama ion nitrat. Ion nitrat perlu dihilangkan karena dapat menyebabkan terbentuknya asam nitrat pada saat pengasaman yang dilakukan sebagai tahap akhir pembuatan asam vanilat.

Endapan Ag_2O yang telah dicuci kemudian dilarutkan dalam 25 mL aquades serta dicampurkan dengan 3,9282 g (97 mmol) pellet NaOH yang telah dilarutkan dalam 15 mL aquades, sehingga didapatkan larutan berwarna hijau kecoklatan. Campuran tersebut kemudian dimasukkan ke dalam *water bath* yang telah diatur pada suhu sekitar 60°C . Ketika suhu campuran dalam *water bath* telah mencapai $50-55^\circ\text{C}$, ke dalam campuran dimasukkan 3,044 g (20 mmol) vanili sambil diaduk selama 10 menit agar vanili dapat larut dengan baik dan teroksidasi secara merata. Suhu $50-55^\circ\text{C}$

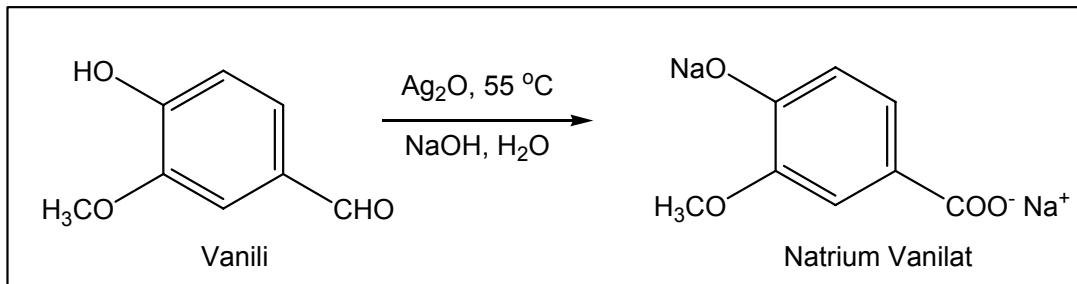
merupakan suhu kritis untuk reaksi ini. ¹³ Pengaturan suhu di sini sangatlah penting karena di bawah suhu 50 °C reaksi oksidasi vanili belum terjadi sedang di atas suhu 60 °C reaksi berjalan sangat hebat (*violent reaction*) sehingga menyebabkan tidak terbentuk asam vanilat atau bila terbentuk hanya menghasilkan rendemen yang sangat sedikit. Dengan demikian selama 10 menit pengadukan suhu harus dijaga antara 55-60 °C agar oksidasi vanili berjalan optimal.

Hasil oksidasi vanili berupa larutan berwarna hijau bening dengan endapan berwarna abu-abu dengan perak yang berkilau di dasar *beaker glass*. Endapan tersebut merupakan Ag₂O yang telah tereduksi menjadi logam Ag menurut reaksi :



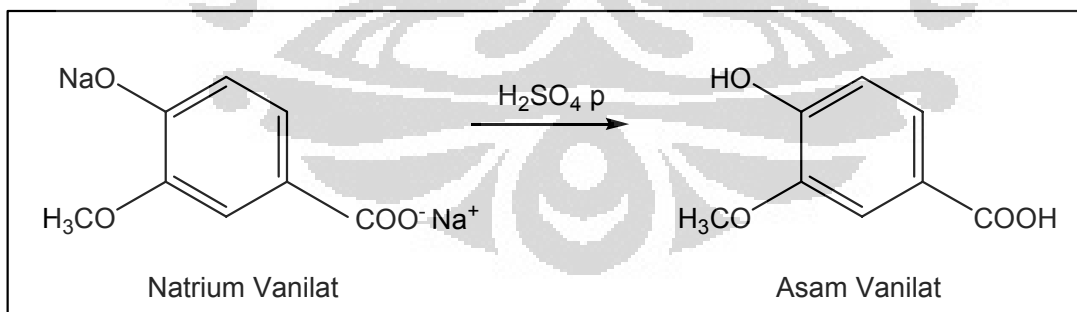
Gambar 18. Endapan Ag₂O yang Telah Tereeduksi

Sedang larutan hijau bening tersebut merupakan garam natrium vanilat yang terbentuk melalui reaksi oksidasi vanili dengan NaOH berlebih sebagai berikut:



Gambar 19. Reaksi Terbentuknya Garam Natrium Vanilat

Endapan logam Ag kemudian dipisahkan dari natrium vanilat dengan cara disaring. Pada endapan Ag yang tersaring tersebut dilakukan pencucian beberapa kali dengan menggunakan aquades untuk meloloskan sisa natrium vanilat yang mungkin masih terdapat di sela-sela endapan Ag tersebut. Pada filtrat natrium vanilat, dilakukan penambahan asam sulfat pekat yang berfungsi untuk mengkonversi natrium vanilat menjadi asam vanilat bebasnya menurut reaksi:



Gambar 20. Konversi Natrium Vanilat menjadi Asam Vanilat

Panambahan asam sulfat pekat dilakukan sampai filtrat natrium vanilat berubah menjadi asam vanilat, ditandai dengan terbentuknya endapan asam vanilat berwarna putih krem dan berbentuk seperti kapas, yang tidak hilang kembali dengan adanya pengocokan.

Endapan asam vanilat tersebut kemudian disaring serta dicuci beberapa kali dengan aquades. Pencucian endapan asam vanilat dengan aquades bertujuan untuk menghilangkan zat-zat pengotor yang bersifat polar seperti ion Na^+ , kelebihan asam sulfat pekat dan lain-lain.



Gambar 21. Endapan Asam Vanilat

4.1.2 Pemurnian Asam Vanilat

Asam vanilat yang diperoleh kemudian dimurnikan dengan cara diekstraksi dengan etil asetat. Pemilihan etil asetat untuk mengekstraksi asam vanilat adalah karena asam vanilat merupakan senyawa organik yang dapat larut dengan baik dalam pelarut organik. Di antara pelarut organik lain,

etil asetat relatif lebih aman bagi kesehatan karena tingkat toksisitasnya relatif rendah.

Proses ekstraksi diawali dengan melarutkan asam vanilat hasil sintesis dalam 25 mL etil asetat, lalu dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan aquades dengan volume yang sama (25 mL) serta dilakukan pengocokan (ekstraksi). Setelah dikocok, campuran didiamkan beberapa menit sehingga terlihat pemisahan, yaitu terbentuk dua fasa pada corong pisah. Fasa yang di atas berwarna kecoklatan dan merupakan fasa organik (etil asetat), karena berat jenis etil asetat lebih kecil daripada berat jenis air. Fasa yang di bawah berwarna kuning terang dan merupakan fasa air. Asam vanilat akan masuk ke fasa etil asetat karena memiliki kepolaran yang sama, sedang pengotor yang bersifat polar akan masuk ke fasa air. Dengan demikian akan didapat asam vanilat yang lebih murni (bebas pengotor). Ekstraksi dilakukan sebanyak tiga kali, pada ekstrak kedua di dapat fasa organik berwarna kuning muda, sedang pada ekstrak ketiga didapat fasa organik tidak berwarna (bening). Fasa organik hasil ketiga ekstraksi tersebut kemudian dikumpulkan. Pelarutnya (etil asetat) dihilangkan dengan cara diuapkan atau dapat pula dengan cara dibiarkan menguap karena etil asetat mudah menguap pada temperatur ruang.



Gambar 22. Ekstrak Asam Vanilat

Setelah pelarutnya hilang, didapat kristal asam vanilat yang berbau harum seperti vanili dan berwarna putih krem seberat 2,5537 g dengan rendemen sebesar 75,94 %.

Rendemen asam vanilat yang tidak 100% ini kemungkinan besar disebabkan karena struktur vanili sebagai bahan baku pembuatan asam vanilat. Vanili merupakan senyawa aldehida yang tidak mempunyai $H\alpha$ (atom H yang terikat pada $C\alpha$ dari gugus karbonil), sehingga kemungkinan besar berlangsung reaksi Canizaro, yaitu reaksi yang terjadi bila suatu senyawa aldehida tanpa $H\alpha$ dipanaskan dengan adanya larutan hidroksida pekat, dalam hal ini ketika vanili dipanaskan dengan adanya larutan NaOH pekat.

Mekanisme reaksi Canizaro yang terjadi dapat dilihat di bagian lampiran. Dalam reaksi Canizaro terjadi disproporsionasi dimana separuh aldehida teroksidasi menjadi asam karboksilat dan separuh lainnya akan tereduksi menjadi alkohol.¹¹ Namun kehadiran Ag_2O sebagai oksidator membuat terjadinya reaksi oksidasi vanili menghasilkan asam vanilat menjadi

lebih dominan dibanding reaksi reduksi vanili menghasilkan alkohol, dalam hal ini m-metoksi-p-hidroksi-benzil alkohol. Menurut literatur, ¹⁴ bilapun terjadi reaksi Canizaro, rendemen asam vanilat yang dihasilkan dari oksidasi vanilin dengan Ag_2O dan NaOH berlebih adalah di atas 75%.

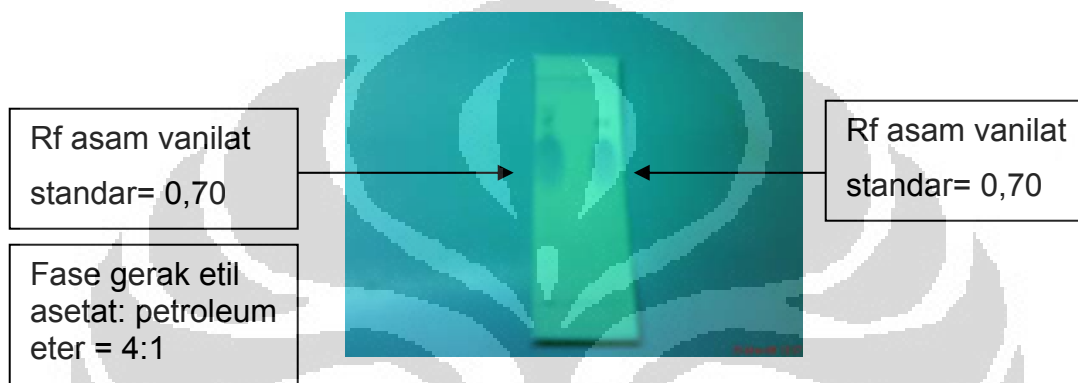


Gambar 23. Kristal Asam Vanilat

4.1.3 Uji Kemurnian Asam Vanilat

Uji kemurnian pada asam vanilat sintetis hasil ekstraksi dilakukan dengan cara uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yaitu dengan membandingkan spot asam vanilat sintetis dengan asam vanilat standar. Dalam uji KLT ini, yang digunakan sebagai fasa diam adalah plat silika gel, sedang fasa geraknya adalah larutan pengembang etil asetat : petroleum eter = 4: 1. Spot hasil KLT tidak terlihat pada cahaya tampak, sehingga untuk melihat spot tersebut diperlukan sinar lampu ultraviolet pada panjang gelombang, $\lambda = 254$ nm. Dari hasil uji KLT didapat R_f untuk spot asam vanilat sintetis sebesar

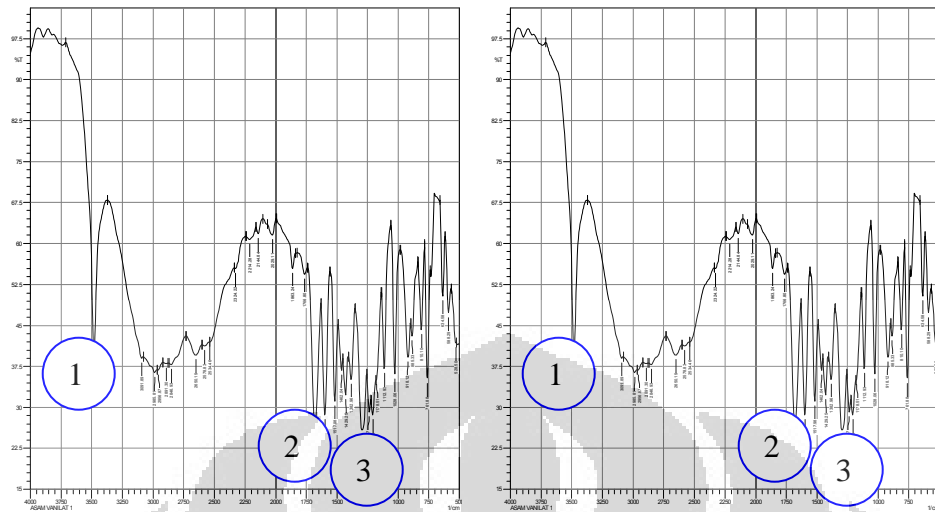
0,70; sedang Rf untuk asam vanilat standar sebagai pembanding adalah sebesar 0,70 juga. Dilihat dari nilai Rf untuk asam vanilat sintetis dan asam vanilat standar yang sama yaitu 0,70 dapat disimpulkan asam vanilat yang disintesis mempunyai kemurnian yang cukup tinggi.



Gambar 24. Hasil KLT Asam Vanilat

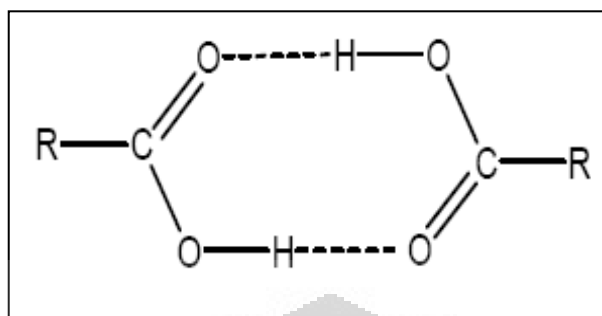
4.1.4 Analisis FT-IR Asam Vanilat

Asam vanilat hasil sintesis diidentifikasi lebih lanjut dengan menggunakan instrumen FT-IR. Analisis dilakukan dengan membandingkan spektrum FT-IR untuk asam vanilat sintetis dengan spektrum FT-IR untuk asam vanilat standar. Hasil pengukuran FT-IR yang didapat adalah sebagai berikut:



Gambar 25. Spektrum FT-IR Asam Vanilat Sintesis (Kiri) dan Spektrum FT-IR Asam Vanilat Standar (kanan)

Pita serapan yang tajam pada bilangan gelombang sekitar, $\nu = 3479 \text{ cm}^{-1}$ (1) menunjukkan serapan dari uluran O-H fenolik. Serapan lebar dan intensif pada bilangan gelombang sekitar, $\nu = 3000 \text{ cm}^{-1}$ dan melebar sampai $\nu = 2500 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan serapan uluran O-H dari asam karboksilat. Hal ini disebabkan adanya ikatan hidrogen dalam dimer asam karboksilat. Secara ideal, struktur gugus karbonil sesuai untuk membentuk dua ikatan hidrogen antara sepasang molekul. Asam karboksilat dijumpai bukan dalam bentuk monomer diskrit namun dalam bentuk dimer dimana sepasang molekul asam karboksilat saling berikatan hidrogen. Karena kuatnya ikatan hidrogen ini, asam karboksilat dalam fasa uap pun berada dalam bentuk dimer dan spektrum inframerah untuk asam karboksilat adalah spektrum dari dimernya.



Gambar 26. Dimer asam karboksilat ¹¹

Pita serapan pada bilangan gelombang, $\nu = 1700-1725 \text{ cm}^{-1}$ (2), menunjukkan serapan untuk C=O karbonil dari asam karboksilat. Pada spektrum IR asam vanilat, serapan C=O muncul pada bilangan gelombang, $\nu = 1680 \text{ cm}^{-1}$. Hal ini disebabkan adanya konjugasi pada asam vanilat, sehingga pita serapan tersebut bergeser ke bilangan gelombang yang lebih rendah. Sedang pita serapan pada bilangan gelombang, $\nu = 1210-1330 \text{ cm}^{-1}$ (3) menunjukkan serapan untuk uluran C-O dari asam karboksilat.

Identifikasi gugus fungsi pada spektrum IR asam vanilat hasil sintesis dibandingkan dengan spektrum IR asam vanilat standar dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 6. Identifikasi Gugus Fungsi pada Spektrum Asam Vanilat Hasil Sintesis dan Asam Vanilat Standar

No.	Bil. Gelombang Asam Vanilat Sintetis (ν, cm^{-1})	Bil. Gelombang Asam Vanilat Standar (ν, cm^{-1})	Identifikasi Gugus Fungsi
1	3479,58	3479,58	O-H fenolik
2	3000-2500 melebar	3000-2500 melebar	dimer asam karboksilat
3	1680,00	1680,00	C=O asam karboksilat
4	1296,16	1298,09	C-O asam karboksilat

Dari hasil identifikasi tersebut, dapat disimpulkan telah terbentuk asam vanilat dengan kemurnian yang cukup tinggi. Hal ini ditandai dengan pita-pita serapan yang mencirikan asam vanilat berada pada bilangan gelombang yang hampir sama dengan pita serapan pada asam vanilat standar.

4.2 Pembuatan Ester Laktovanilat

4.2.1 Esterifikasi Asam Vanilat dengan Laktosa

Pembuatan ester laktovanilat diawali dengan melarutkan 0,2522 g (1.5 mmol) asam vanilat dalam 5 mL aseton, larutan tersebut kemudian dicampurkan dengan larutan 0,1711 g (0.5 mmol) laktosa dalam aseton. Penggunaan asam vanilat yang berlebih, dalam hal ini komposisi laktosa: asam vanilat adalah 1:3, bertujuan supaya minimal dua buah gugus vanilat dapat teresterifikasi ke dalam laktosa, yaitu pada gugus OH primer laktosa karena halangan steriknya yang lebih rendah.

Laktosa sulit larut dalam aseton, namun dengan dibantu pengadukan yang disertai pemanasan serta penggunaan pelarut (aseton) yang sedikit berlebih, maka laktosa dapat larut dengan cukup baik. Pemilihan aseton sebagai pelarut didasarkan pada sifat aseton yang dapat melarutkan material awal, katalis dan aktivator dengan baik. Di samping itu, toksisitas aseton pun relatif lebih rendah dibanding DMF ataupun piridin sebagai pelarut yang sering digunakan dalam reaksi esterifikasi.

Asam vanilat termasuk dalam golongan asam karboksilat yang tidak mudah menjalani reaksi esterifikasi dengan alkohol. Hal ini disebabkan gugus pergi (*leaving group*) pada asam karboksilat yang tidak mudah pergi (diganti gugus lain), karena merupakan basa kuat. Gugus alkohol (-OH) yang terdapat pada laktosa merupakan nukleofil lemah, sehingga memiliki laju yang

sangat lambat dalam menyerang atom karbonil pada asam vanilat yang kurang reaktif. Selain itu, dilihat dari strukturnya, baik asam vanilat maupun laktosa merupakan molekul yang besar, sehingga halangan sterik untuk bereaksi bertambah dan reaksi sulit terjadi. Karena itu, pada reaksi esterifikasi asam vanilat dengan laktosa diperlukan kehadiran katalis. Namun yang perlu diperhatikan, katalis yang bersifat asam dapat menghidrolisis laktosa menjadi glukosa dan galaktosa penyusunnya. Akibatnya produk ester laktovanilat tidak dapat diperoleh.

Oleh karena itu, dalam penelitian ini esterifikasi asam vanilat dengan laktosa tidak menggunakan katalis asam, namun menggunakan katalis 4-dimetilaminopiridin (DMAP) dengan dibantu senyawa N,N'-disikloheksilkarbodiimida (DCC) sebagai aktivator. Dengan kombinasi kerja dari kedua senyawa tersebut, diharapkan reaksi esterifikasi dapat berlangsung dalam waktu yang relatif singkat dan didapatkan produk laktovanilat secara optimal.

Senyawa DCC berfungsi untuk mengaktifkan gugus karboksilat menjadi suatu senyawa intermediet asil yang reaktif yaitu O-asilisourea. Terbentuknya senyawa intermediet O-asilisourea diawali dengan penarikan atom H dari karboksilat oleh pasangan elektron bebas pada atom nitrogen dari DCC. Dengan demikian terbentuklah gugus aktif pada DCC yaitu isourea (-N=C=N-) yang mengandung atom pusat karbon yang kekurangan elektron, sehingga sangat mudah diserang oleh nukleofil.¹⁹ Yang bertindak sebagai nukleofil di sini adalah muatan negatif pada oksigen dari gugus karboksilat.

Senyawa DMAP sebagai nukleofilik yang lebih kuat dari alkohol berfungsi untuk mempercepat laju reaksi esterifikasi (sebagai katalis nukleofilik). Gugus dimetil amino pada DMAP berfungsi sebagai substituen donor elektron, meningkatkan daya nukleofilisitas dan kebasaan dari nitrogen piridin DMAP, ¹⁹ yang kemudian bereaksi dengan senyawa intermediet O-asilisourea membentuk ion N-asilpiridinium. Ion ini kemudian bereaksi dengan alkohol membentuk ester dan disikloheksil isourea (DCU) sebagai hasil samping penggunaan DCC. Secara keseluruhan, mekanisme yang terjadi dapat dilihat pada bagian lampiran.

Reaksi esterifikasi dilakukan pada suhu 60 °C selama 24 jam sambil di aduk dengan *magnetic stirrer*. Pemanasan bertujuan untuk membantu mempercepat reaksi. Reaksi dilakukan dalam sistem refluks yang dilengkapi kondensor supaya uap yang dihasilkan dari pemanasan tidak hilang ke udara bebas. Dalam penelitian ini, pemanasan dilakukan dalam *oil bath* karena bila dilakukan dalam *water bath* dengan waktu reaksi yang 24 jam dikhawatirkan air dalam *water bath* habis menguap meskipun suhu reaksi tidak terlalu tinggi. Dari hasil esterifikasi asam vanilat dan laktosa dengan komposisi laktosa: asam vanilat = 1:3, didapat ester laktovanilat berupa larutan berwarna putih susu dengan endapan DCU yang berwarna putih.



Gambar 27. Ester Laktovanilat dan DCU

4.2.2 Pemurnian Ester Laktovanilat

Proses pemurnian ester laktovanilat diawali dengan memisahkan endapan DCU dengan cara disaring. Endapan DCU tersebut dicuci dengan aquades untuk meloloskan sisa ester laktovanilat yang mungkin masih terdapat di sela-sela endapan DCU. Pemilihan aquades sebagai pencuci endapan DCU adalah karena DCU tidak larut dalam air, sehingga memperkecil kemungkinan endapan DCU larut kembali pada saat pencucian.



Gambar 28. Endapan DCU

Larutan ester laktovanilat tersebut kemudian dimurnikan dengan cara ekstraksi menggunakan etil asetat. Ke dalam corong pisah dimasukkan larutan ester laktovanilat kemudian ditambahkan 25 mL etil asetat dan dikocok. Setelah didiamkan beberapa saat, terlihat pemisahan, yaitu terbentuk dua fasa. Kedua fasa sama-sama tidak berwarna (bening) namun terdapat batas yang jelas di antara kedua fasa tersebut. Fasa yang di atas merupakan fasa organik (etil asetat), karena berat jenis etil asetat lebih rendah dibanding berat jenis air, sedang fasa yang di bawah merupakan fasa air-aseton. Ester laktovanilat akan terekstrak ke fasa organik karena memiliki kepolaran yang sama, sedang pengotor yang bersifat polar seperti kelebihan laktosa masuk ke fasa aseton-air. Ekstraksi dilakukan sebanyak tiga kali dengan perlakuan yang sama dan didapat hasil yang sama (kedua fasa sama-sama bening).



Gambar 29. Ekstraksi Ester Laktovanilat

Fasa organik dari tiga kali ekstraksi dikumpulkan lalu ditambahkan Na_2SO_4 anhidrat untuk menarik air yang kemungkinan terbawa, karena

pemisahan yang kurang sempurna. Setelah disaring untuk memisahkan Na_2SO_4 anhidrat, pelarut fasa organik (etil asetat) dihilangkan, sehingga didapat ester laktovanilat berupa gel berwarna kuning kecoklatan seberat 0,3045 g.

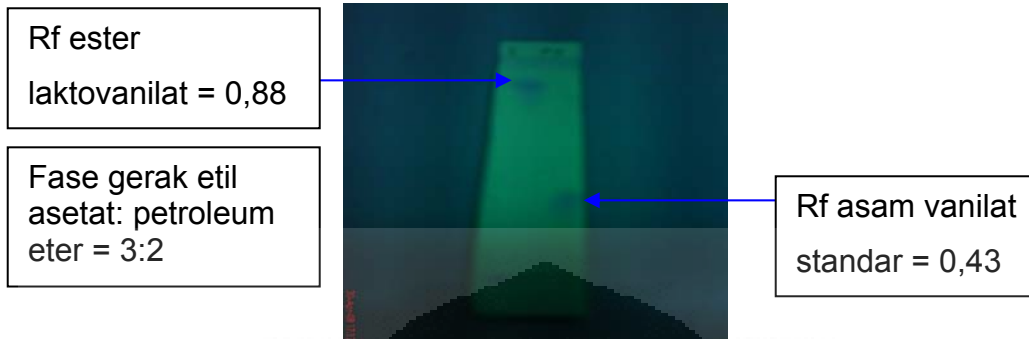


Gambar 30. Ester Laktovanilat

4.2.3 Analisis KLT Ester Laktovanilat

Pada ester laktovanilat hasil ekstraksi dilakukan uji kromatografi lapis tipis KLT sebagai tahap awal uji kemurnian. Uji KLT dilakukan dengan membandingkan spot ester laktovanilat dengan spot asam vanilat standar sebagai senyawa awal. Fasa diam yang digunakan adalah plat silika gel, sedang fasa geraknya adalah larutan pengembang etil asetat: petroleum eter = 3:2. Untuk melihat spot hasil KLT diperlukan sinar lampu ultraviolet pada panjang gelombang, $\lambda = 254 \text{ nm}$.

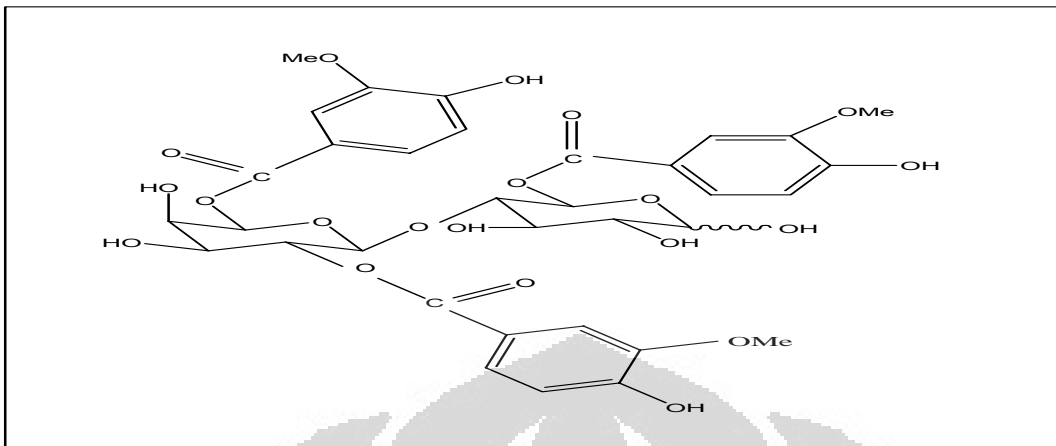
Hasil uji KLT menunjukkan R_f spot asam vanilat standar adalah 0,43; sedang dari hasil reaksi terdapat satu buah spot dengan $R_f = 0,88$.



Gambar 31. Hasil KLT Ester Laktovanilat

Spot dengan $R_f = 0,88$, yang berada jauh di atas spot asam vanilat standar sebagai pembanding, adalah spot ester laktovanilat. Hal ini didasarkan sifat ester yang lebih non polar dibanding asam karboksilat, sehingga ester kurang tertahan di fasa diam silika gel yang bersifat polar namun lebih suka berada dalam fasa gerak yang terus bergerak ke atas.

Karena hanya terdapat satu buah spot pada bagian ester laktovanilat, dapat disimpulkan tidak terdapat asam vanilat sisa. Dengan demikian tiga buah gugus vanilat teresterifikasi dengan baik ke dalam laktosa. Kemungkinan yang terjadi adalah dua buah gugus vanilat teresterifikasi pada kedua OH primer dari laktosa, sedang satu buah gugus vanilat teresterifikasi pada salah satu OH sekunder yang equatorial dari laktosa. Perkiraan struktur ester laktovanilat hasil sintesis adalah sebagai berikut:

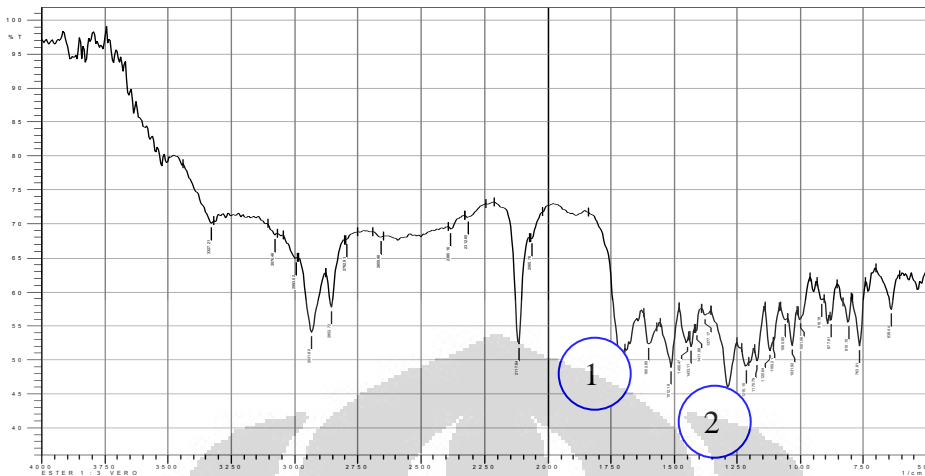


Gambar 32. Struktur Ester Laktovanilat

Dari perkiraan struktur tersebut, dapat ditentukan berat molekul dari ester laktovanilat hasil sintesis yaitu sebesar 792,7361 g/mol. Dari hasil perhitungan yang dapat di lihat di bagian lampiran, di dapat persen yield ester laktovanilat hasil sintesis sebesar 76,82 %.

4.2.4 Analisis FT-IR Ester Laktovanilat

Ester laktovanilat hasil ekstraksi tersebut diidentifikasi lebih lanjut menggunakan instrumen FT-IR. Spektrum yang didapat adalah sebagai berikut:



Gambar 33. Spektrum FT-IR Ester Laktovanilat

Spektrum IR ester laktovanilat ini dibandingkan dengan spektrum IR asam vanilat sebagai senyawa asal, ternyata telah menunjukkan perbedaan yaitu hilangnya pita serapan pada bilangan gelombang, $\nu = 1680 \text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan vibrasi ulur gugus karbonil (C=O) asam karboksilat serta pita serapan pada bilangan gelombang, $\nu = 1296,16 \text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan vibrasi ulur C-O asam karboksilat.

Pada spektrum IR ester laktovanilat muncul pita serapan pada bilangan gelombang, $\nu = 1708,93 \text{ cm}^{-1}$ (1) yang merupakan vibrasi ulur ikatan karbonil ester (C=O) dan diperkuat dengan adanya pita serapan pada bilangan gelombang, $\nu = 1286,52 \text{ cm}^{-1}$ (2) yang merupakan vibrasi ulur dari ikatan C-O ester. Dari data tersebut dapat disimpulkan, bahwa telah terbentuk ester laktovanilat.

4.3 Uji Aktivitas Antioksidan Ester Laktovanilat

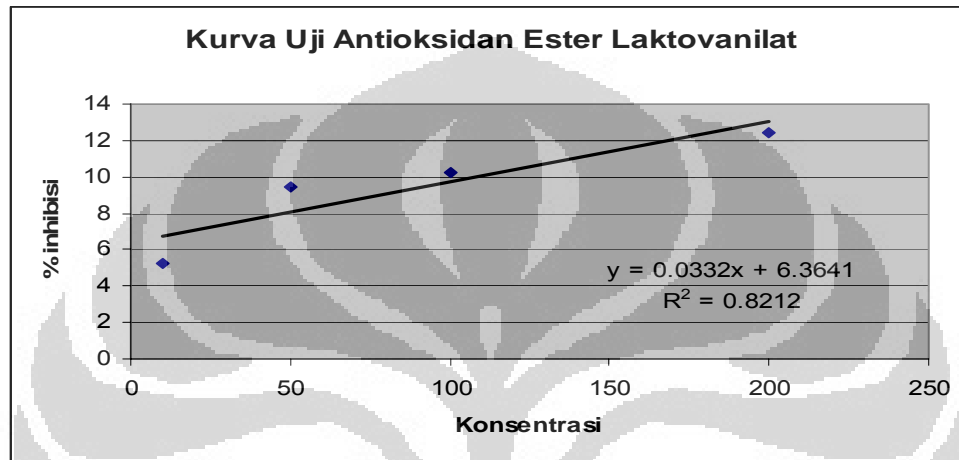
Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode peredaman radikal bebas 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH). Metode ini dipilih karena pengerjaannya yang sederhana, cepat dan tidak membutuhkan banyak reagen.

Larutan sampel yaitu larutan ester laktovanilat dan DPPH dalam metanol dibuat dalam empat konsentrasi yang berbeda yaitu 200, 100, 50 dan 10 ppm. Absorbansi dari masing-masing larutan sampel dibandingkan dengan absorbansi dari blanko, yaitu larutan DPPH dalam metanol, sehingga di dapat nilai persen inhibisi. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada tabel berikut ini:

Tabel 7. Hasil Uji Antioksidan Ester Laktovanilat

Jenis	Absorbansi ($\lambda=515$ nm)	Konsentrasi (ppm)	% Inhibisi
Blanko	1,657		
Ester laktovanilat	1,451	200	12,432
	1,487	100	10,260
	1,500	50	9,475
	1,570	10	5,250

Dari hasil tersebut dibuat persamaan linier dengan konsentrasi sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y. Kurva yang diperoleh adalah sebagai berikut:



Gambar 34. Kurva Uji Antioksidan Ester Laktovanilat

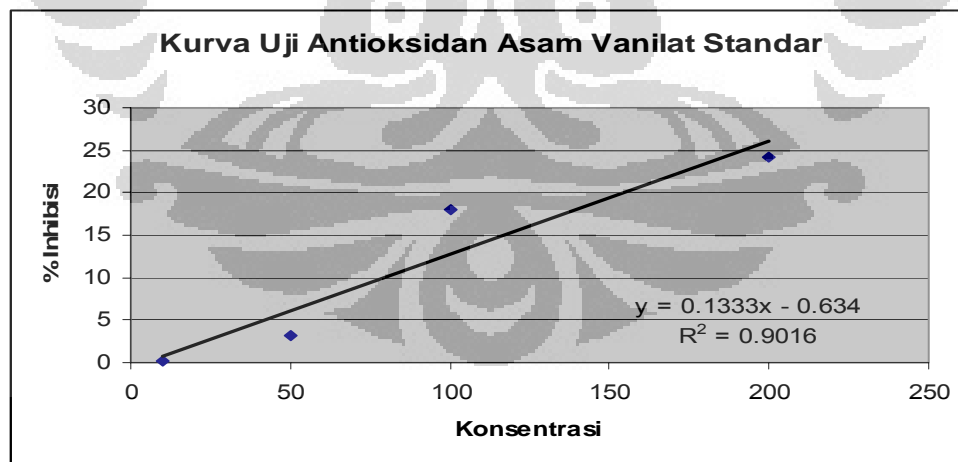
Persamaan garis regresi linier yang didapat adalah $y = 0,0332x + 6,364$; dengan memasukkan nilai $y = 50$, maka didapat nilai IC_{50} untuk ester laktovanilat yaitu diduga sebesar 1314,33 ppm. Artinya untuk meredam 50% radikal bebas, diperlukan ester laktovanilat dengan konsentrasi 1314,33 ppm.

Untuk melihat pengaruh dari proses esterifikasi, dilakukan uji antioksidan dengan cara yang sama pada asam vanilat standar sebagai senyawa asal. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 8. Hasil Uji Antioksidan Asam Vanilat Standar

Jenis	Absorbansi ($\lambda=515$ nm)	Konsentrasi (ppm)	% Inhibisi
Blanko	1,657		
Ester laktovanilat	1,257	200	24,140
	1,360	100	17,924
	1,604	50	3,199
	1,654	10	0,181

Dari data tersebut, dibuat persamaan garis regresi linier yaitu dengan mengalurkan konsentrasi sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y. Kurva yang diperoleh adalah sebagai berikut:



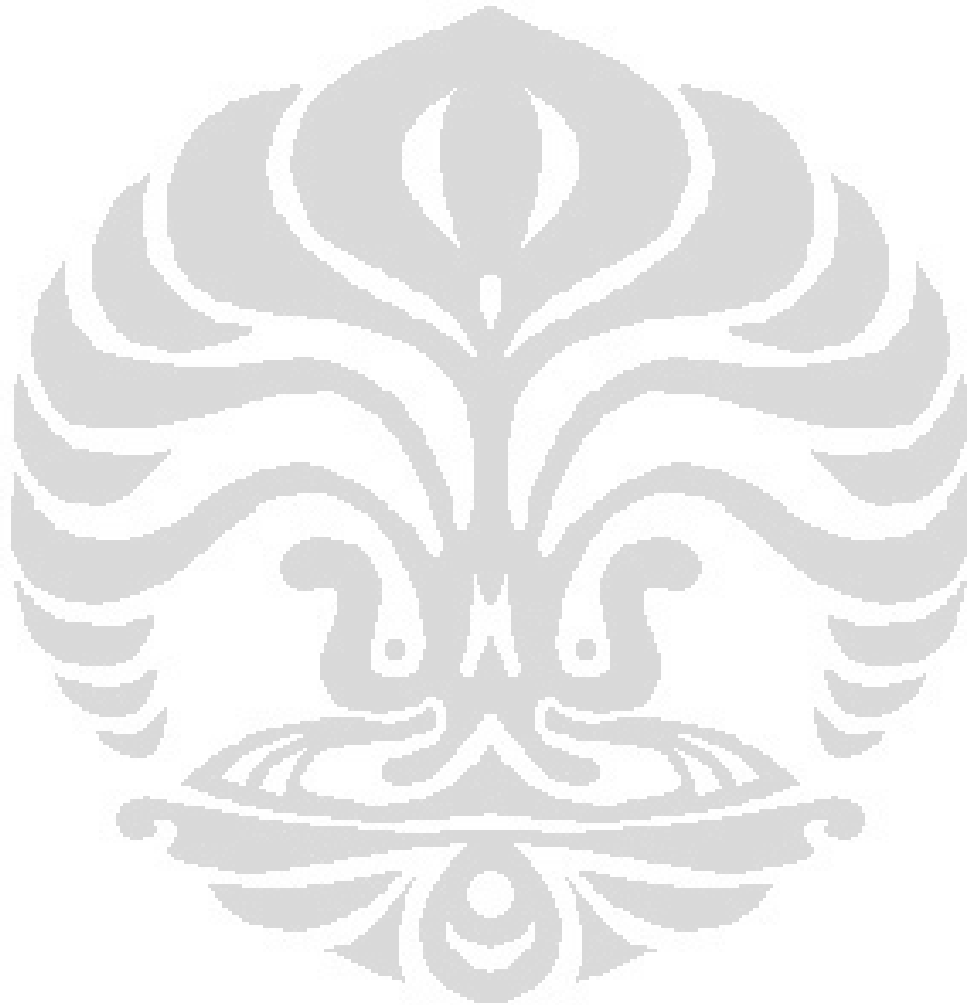
Gambar 35. Kurva Uji Antioksidan Asam Vanilat Standar

Persamaan linier untuk asam vanilat standar adalah $y = 0,1333x - 0,634$. Dari persamaan tersebut di dapat nilai IC_{50} untuk asam vanilat standar diduga sebesar 379,85 ppm. Artinya diperlukan asam vanilat dengan konsentrasi 379,85 ppm untuk dapat memadamkan 50% radikal bebas.

Hasil uji aktivitas antioksidan tersebut menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan ester laktovanilat lebih kecil dibanding aktivitas antioksidan asam vanilat sebagai senyawa asalnya. Hal ini kemungkinan disebabkan masih terdapat pengotor yang bersifat mendeaktifkan sifat antioksidan dari ester laktovanilat. Pengotor tersebut kemungkinan besar adalah sisa DCC yang tidak bereaksi ataupun DCU yang merupakan produk samping reaksi esterifikasi, yang belum secara sempurna terpisahkan dari ester laktovanilat. DCC dan DCU merupakan senyawa yang tidak larut dalam air, sehingga kedua senyawa tersebut tidak terekstrak ke fasa air pada saat ekstraksi ester laktovanilat. Dengan demikian, sisa DCC serta DCU sebagai produk samping menjadi pengotor dalam ester laktovanilat yang disintesis.

Meskipun aktivitas antioksidan ester laktovanilat lebih kecil dibanding asam vanilat standar sebagai senyawa asalnya, senyawa ini mempunyai kelebihan karena relatif larut dalam air. Hal ini disebabkan adanya gugus hidroksil dari laktosa yang belum tersubstitusi oleh gugus vanilat. Gugus hidroksil tersebut dapat berikatan hidrogen dengan air, sehingga ester laktovanilat relatif lebih larut dalam air dibanding senyawa antioksidan yang tidak mempunyai gugus hidroksil. Suatu senyawa antioksidan yang larut dalam air sangat bermanfaat dalam tubuh manusia, karena dapat berdifusi ke

sebagian besar tubuh yang terdiri dari air. Oleh karena itu, bila pengotor dalam ester laktovanilat dapat dihilangkan, niscaya akan didapat senyawa yang efektif bekerja sebagai antioksidan.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

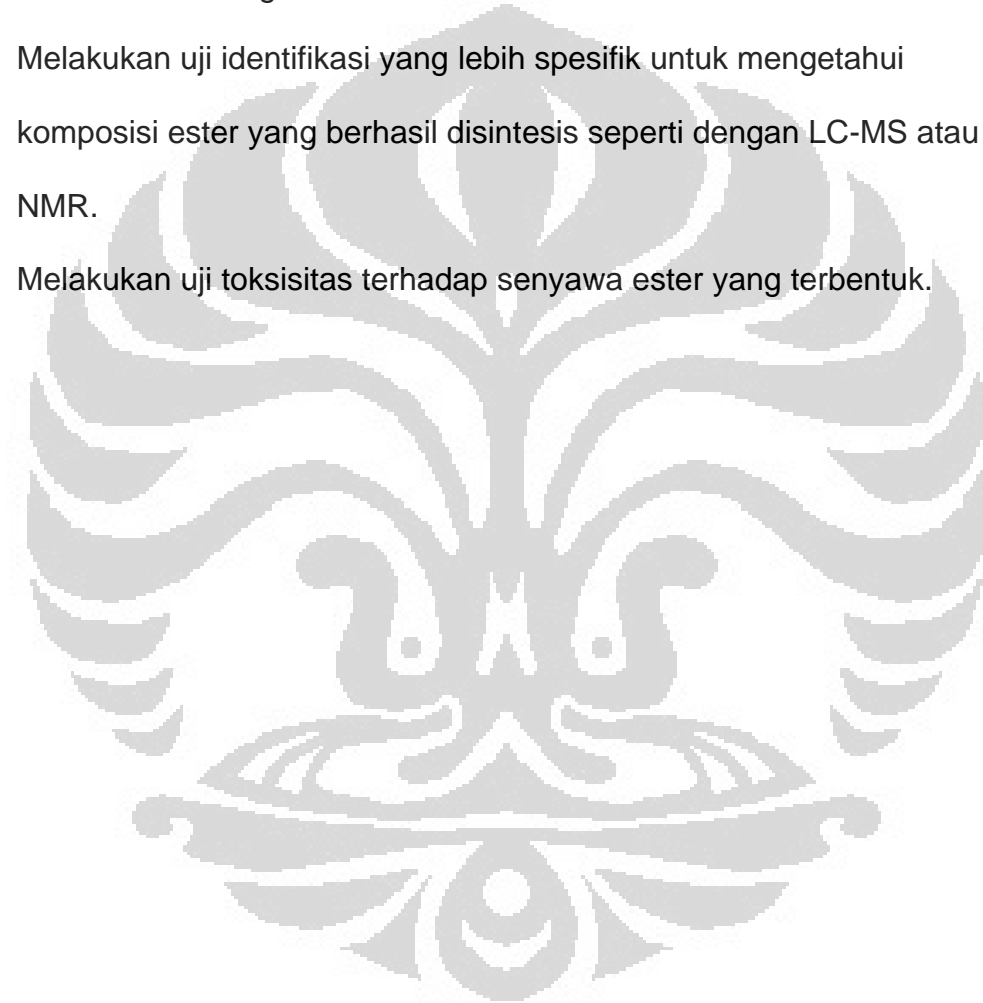
Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

- a. Asam vanilat dapat diperoleh dengan mengoksidasi vanilin menggunakan oksidator Ag_2O yang dibuat dari AgNO_3 dan NaOH berlebih, dengan rendemen sebesar 75,94 %.
- b. Ester Laktovanilat dapat diperoleh dari reaksi esterifikasi antara laktosa dengan asam vanilat dengan perbandingan mol laktosa: asam vanilat = 1:3, dibantu DCC sebagai aktivator serta DMAP sebagai katalis, dengan rendemen sebesar 76,82 %.
- c. Aktivitas antioksidan dari ester laktovanilat lebih kecil daripada asam vanilat standar; nilai IC_{50} untuk ester laktovanilat adalah sebesar 1314,33 ppm, sedang nilai IC_{50} untuk asam vanilat standar adalah sebesar 379,85 ppm.

5.2 Saran

Untuk penelitian selanjutnya disarankan:

- a. Mencari cara pemisahan yang lebih sempurna antara senyawa ester dengan sisa DCC serta DCU sebagai hasil samping reaksi esterifikasi Steglich.
- b. Mencari metode dan kondisi yang optimum untuk reaksi esterifikasi asam vanilat dengan laktosa.
- c. Melakukan uji identifikasi yang lebih spesifik untuk mengetahui komposisi ester yang berhasil disintesis seperti dengan LC-MS atau NMR.
- d. Melakukan uji toksisitas terhadap senyawa ester yang terbentuk.



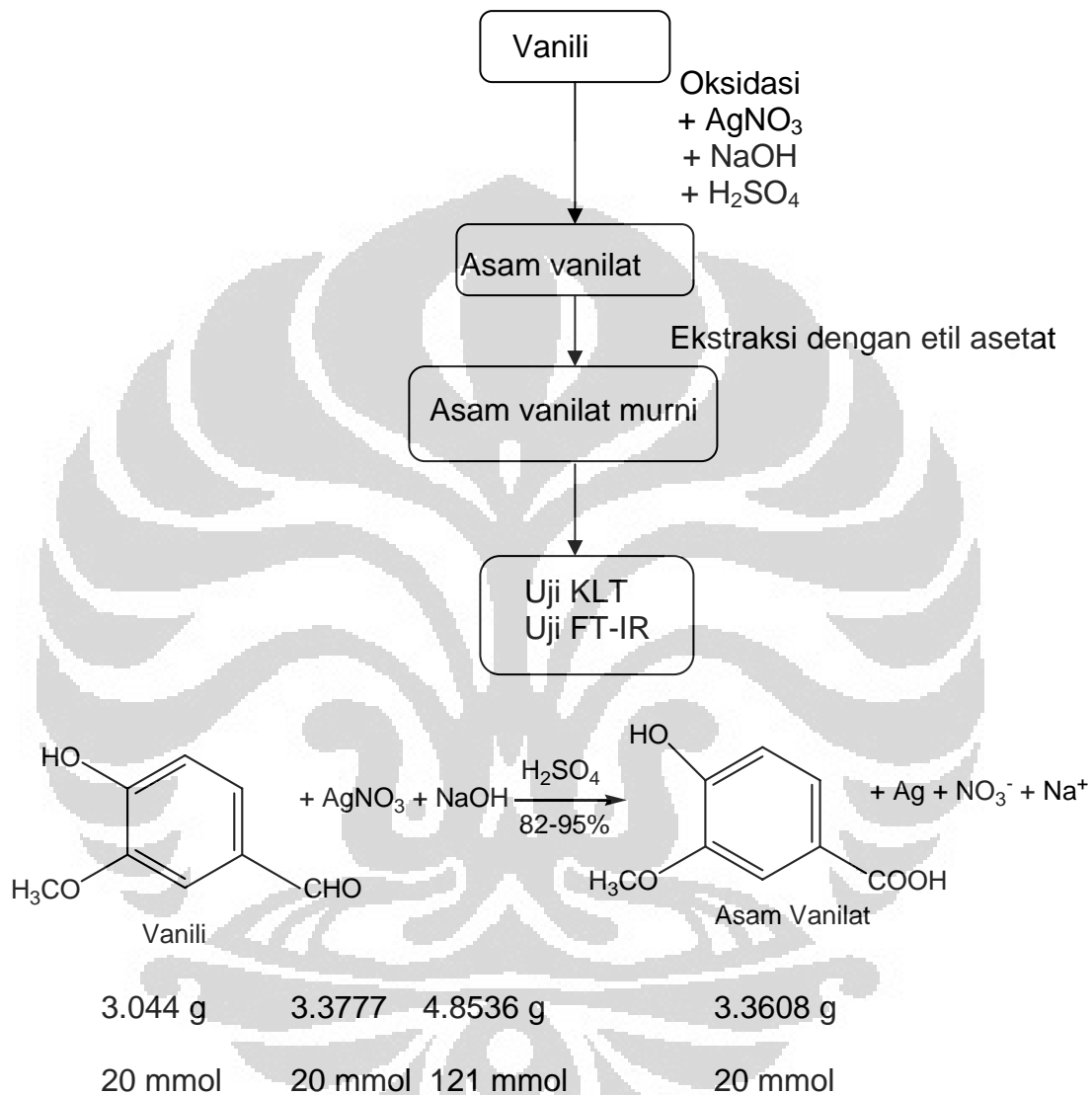
DAFTAR PUSTAKA

1. Potier, P.; Maccario, V.; Giudicelli, M.B.; Queneau, Y.; Dangles, O. *Gallic Ester of Sucrose as a New Class of Antioxidants*. *Tetrahedron Lett.* 1999, 40: 3387-3390.
2. Solomons, Graham T.W . 1988. *Organic Chemistry, 4th Ed.* John Willey and Sons Inc. United State of America
3. Nurulita, Intan. 2007. *Sintesa Ester Glukovanilat dari Vanilin*. Karya Utama Sarjana Kimia. Departemen Kimia FMIPA UI.
4. Hawa, Siti. 2007. *Studi Sintesis Ester Sukrovanilat dari Sukrosa dan Vanilin yang Telah Dioksidasi (Asam Vanilat)*. Karya Utama Sarjana Kimia. Departemen Kimia FMIPA UI.
5. Vanillin. <http://wikipedia.org/wiki/Vanillin>. 6 Januari 2008, pk. 10.42
6. Vanilla. <http://wikipedia.org/wiki/Vanilla>. 7 Januari 2008. pk. 10.18
7. Kurniawan, H. 2005. *Semi Sintesis Vanilin dari Eugenol dengan Metode Microwave*. Karya Utama Sarjana Kimia. Departemen Kimia FMIPA UI.
8. Vanillic acid. <http://wikipedia.org/wiki/Vanillic acid>. 6 Januari 2008, pk. 10.39
9. Fieser, Fieser. 1967. *Reagent for Organic Chemistry Volume 1*. Elsevier Publishing Company.

10. Windholz, M. *et al.* 1983. *The Merck Index, an Encyclopedia of Chemical, Drugs and Biological* 10th Ed. Merck and Co Inc. United State of America
11. Fessenden dan Fessenden. 1986. *Kimia Organik Terjemahan, Aloysius Hadyana Pudjaatmaka Ph.D Jilid 2 Edisi Ketiga*. Erlangga. Jakarta
12. Silver oxide. [http://wikipedia.org/wiki/Silver oxide](http://wikipedia.org/wiki/Silver_oxide). 9 Januari 2008, pk. 13.01
13. Pearl, I.A. 1946. *Reaction of Vanillin and Its Derived Compound*. Contribution from the Institute of Paper Chemistry. 1946, 68: 1100.
14. Lactose. <http://wikipedia.org/wiki/Lactose>. 7 Januari 2008, pk. 09.51
15. Fieser Esterification. [http://www.organic-chemistry.org/name reaction/fieser-esterification](http://www.organic-chemistry.org/name_reaction/fieser-esterification). 28 April 2008 pk. 13.32
16. Steglich Esterification. [http://www.organic-chemistry.org/name reaction/steglich-esterification](http://www.organic-chemistry.org/name_reaction/steglich-esterification). 28 April 2008 pk. 13.30
17. Neises, B; Steglich W. *Esterification of Carboxylic Acid with Dicyclohexylcarbodiimide/ 4-Dimethylaminopyridine: tert-Butyl Ethyl Fumarate*. *J. Org. Synth.* 1990, 7: 93.
18. N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide. <http://wikipedia.org/wiki/DCC>. 28 April 2008, pk. 13.40
19. Carey, F.A, Sunberg, R.J. 1990. *Advanced Organic, Part B: Reaction and Synthesis 3rd ed.* Plenum Press. London.

20. 4-Dimethylaminopyridine. <http://wikipedia.org/wiki/DMAP>. 28 April 2008, pk. 13.43
21. Acetone. <http://wikipedia.org/wiki/Acetone>. 28 April 2008, pk. 13.48
22. Ethyl Acetate. [http://wikipedia.org/wiki/Ethyl Acetate](http://wikipedia.org/wiki/Ethyl_Acetate). 7 Januari 2008, pk 10.22
23. Antioxidant. <http://wikipedia.org/wiki/Antioxidant>. 13 Januari 2008, pk. 21.14
24. Oxidative Stress. [http://wikipedia.org/wiki/Oxidative stress](http://wikipedia.org/wiki/Oxidative_stress). 13 Januari 2008, pk. 21.16
25. Polyphenol Antioxidant. [http://wikipedia.org/wiki/Polyphenol Antioxidant](http://wikipedia.org/wiki/Polyphenol_Antioxidant). 20 Januari 2008, pk. 16.26
26. Ionita, P. *Is DPPH Sable Free Radical a Good Scavenger for Oxygen Active Species?* Chem. Pap. 2005, 59(1)11-16.
27. Molyneux, P. *The Use of the Sable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity.* Songklanakarin J. Sci. Technol., 2004, 26(2) : 211-219.

Pembuatan Asam Vanilat



Berat asam vanilat percobaan = 2.5537 g

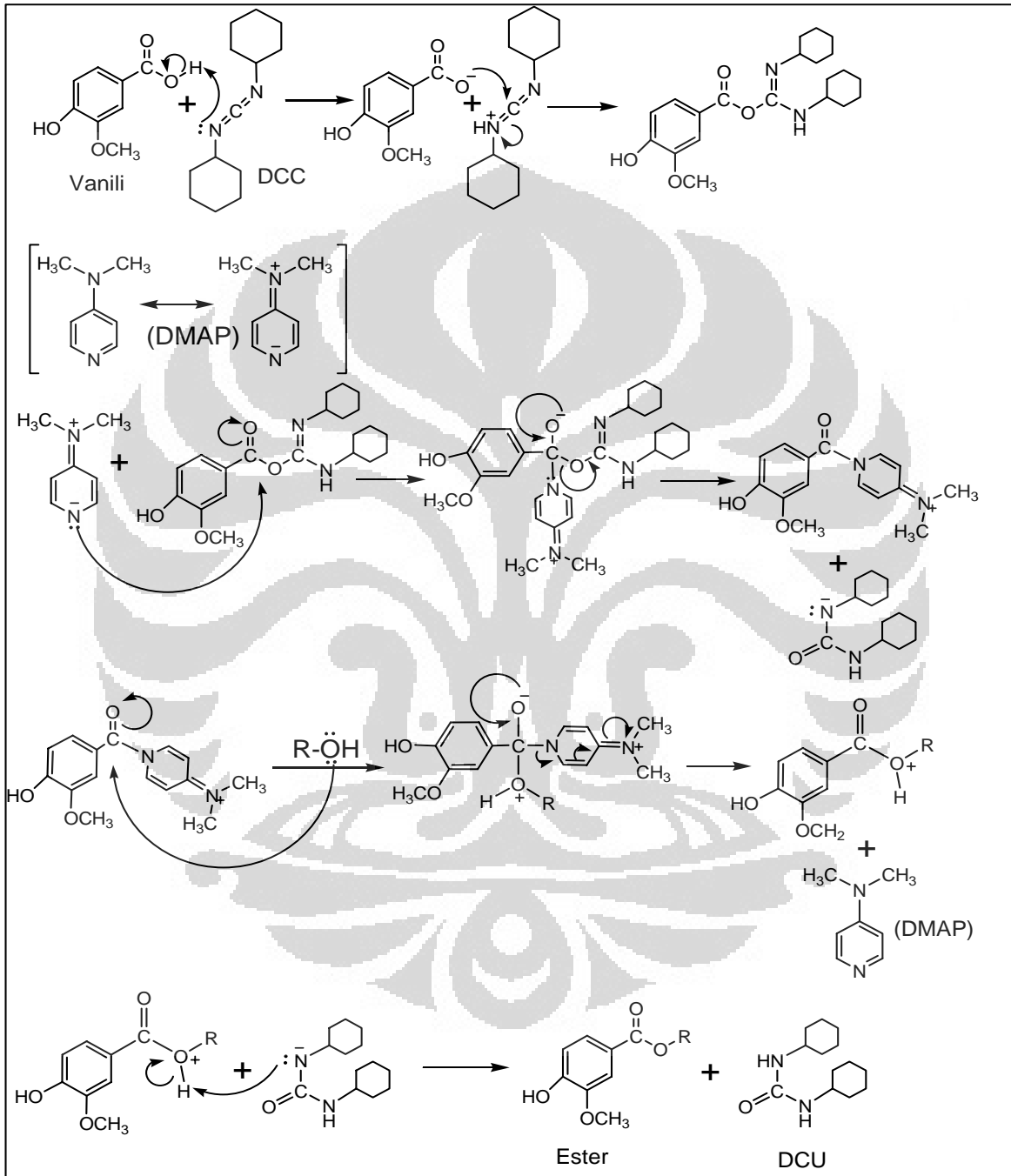
Mol ester laktovanilat percobaan = 2.5537 g : 168.1467 gr/mol

= 0.0152 mol = 15.1873 mmol

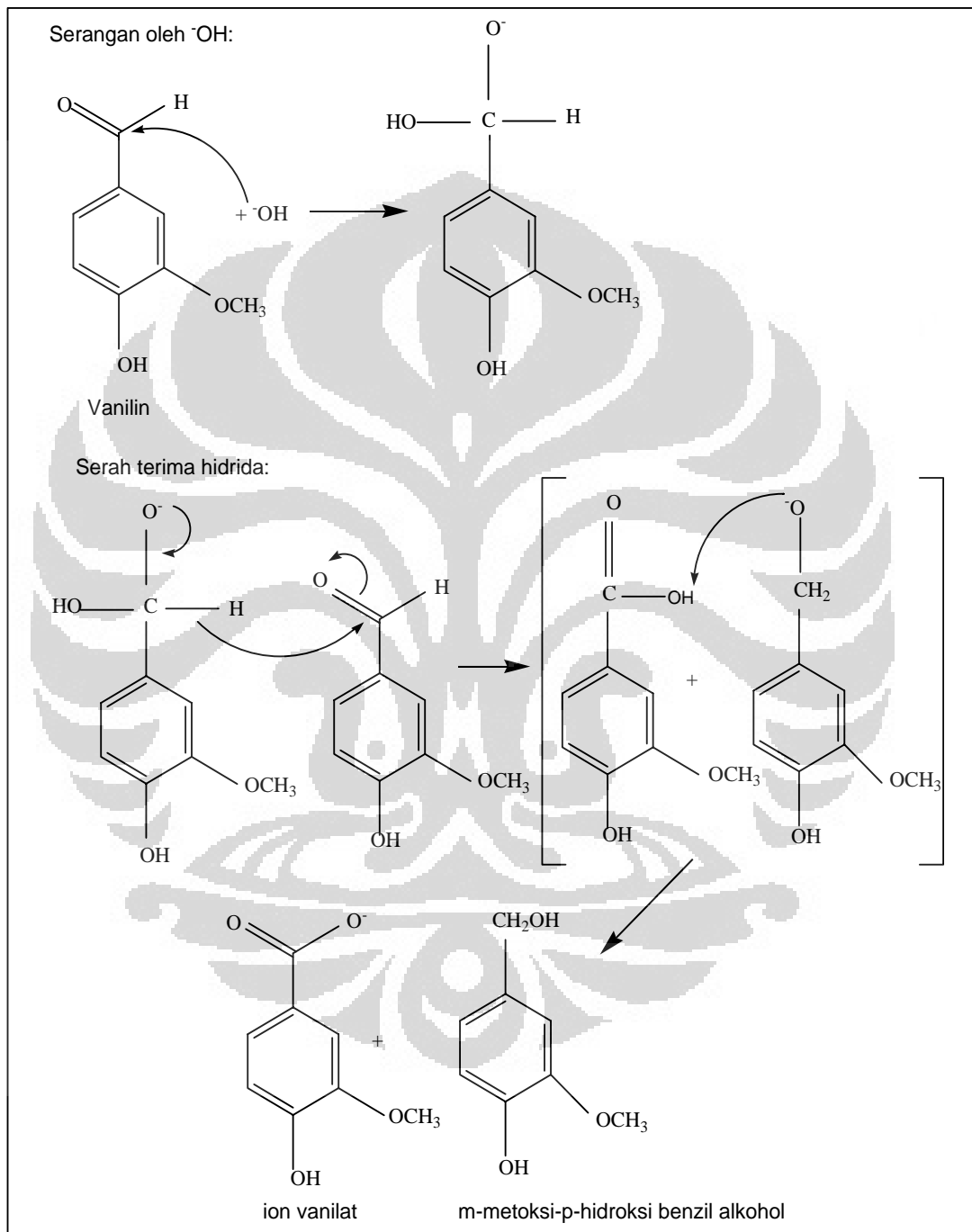
% Yield = $\frac{15.1873 \text{ mmol}}{20 \text{ mmol}} \times 100 \% = 75.94 \%$

Lampiran 2

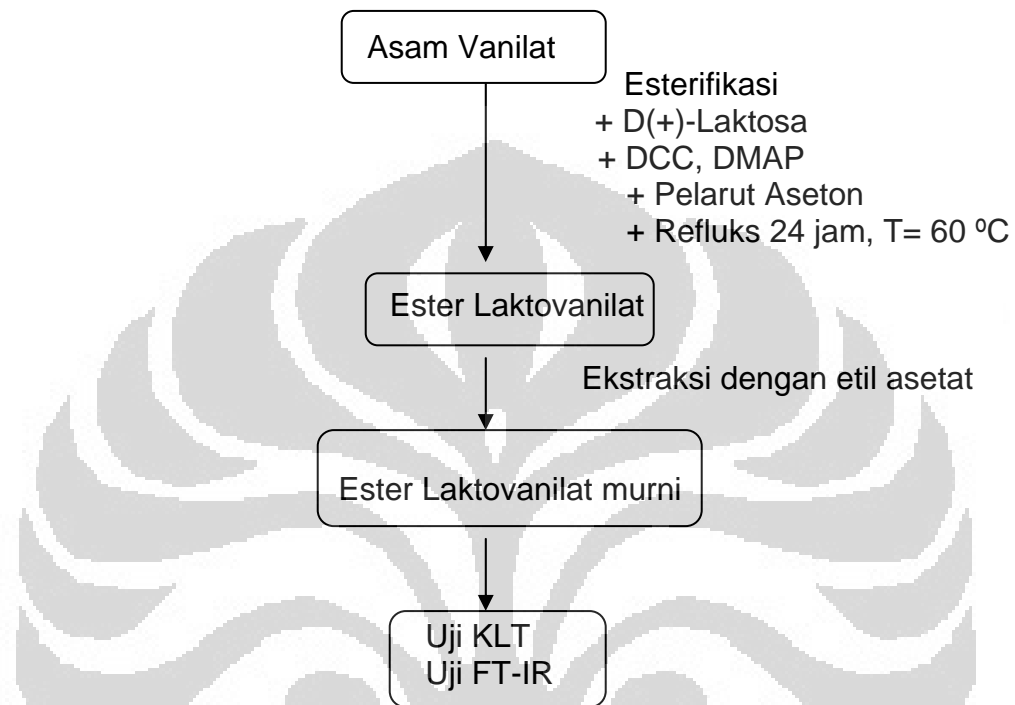
Mekanisme Estrifikasi Steglich



REAKSI CANIZARO



Lampiran 4

Pembuatan Ester Laktovanilat

D(+)-Laktosa + 3 Asam Vanilat → Laktosa trivanilat

0.1711 g	0.2522 g	
0.5 mmol	1.5 mmol	0.5 mmol

Berat ester laktovanilat percobaan = 0.3045 g

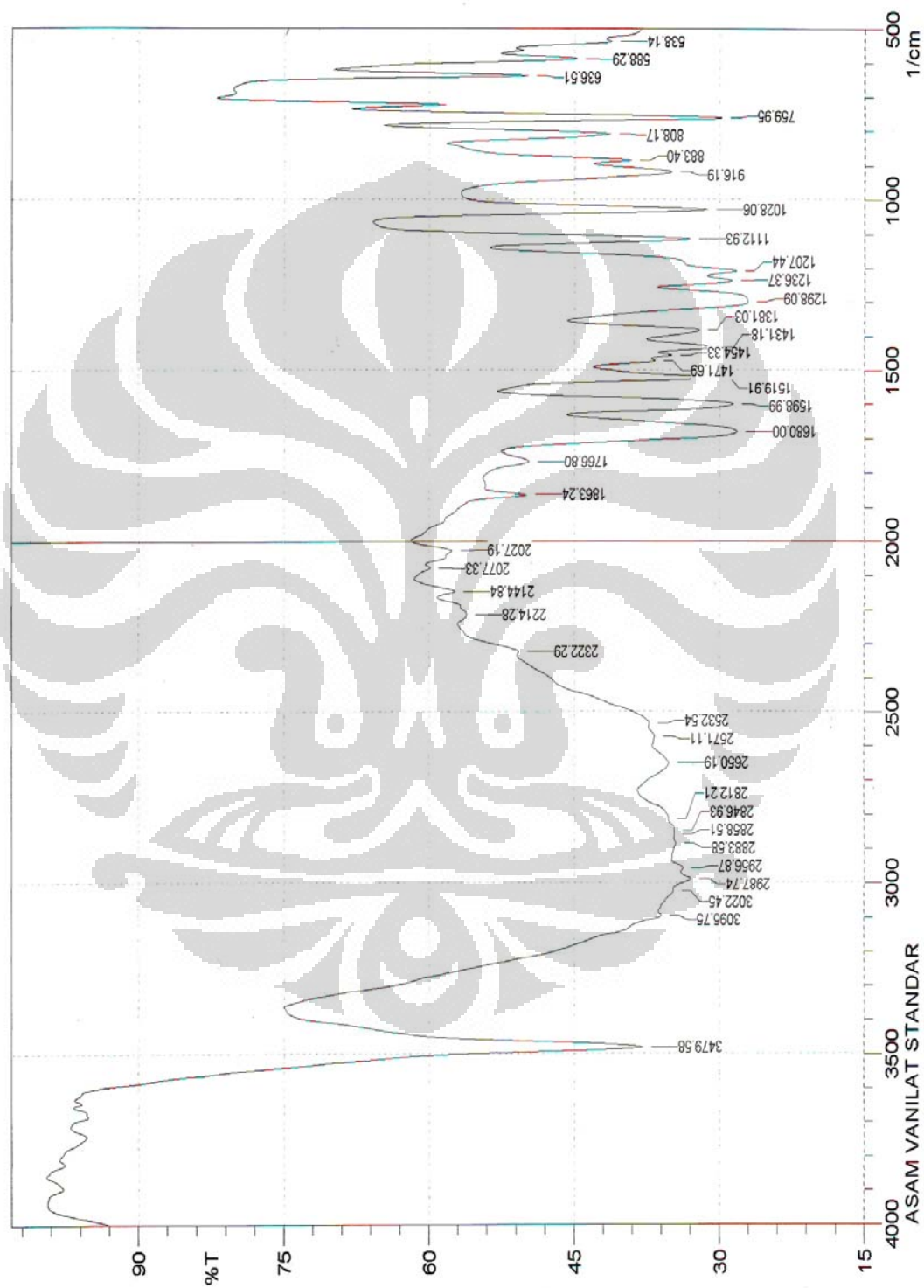
Mol ester laktovanilat percobaan = 0.3045 g : 792.7361 gr/mol

= 3.8411×10^{-4} mol = 0.3841 mmol

% Yield = $\frac{0.3841 \text{ mmol}}{0.5 \text{ mmol}} \times 100 \% = 76.82 \%$

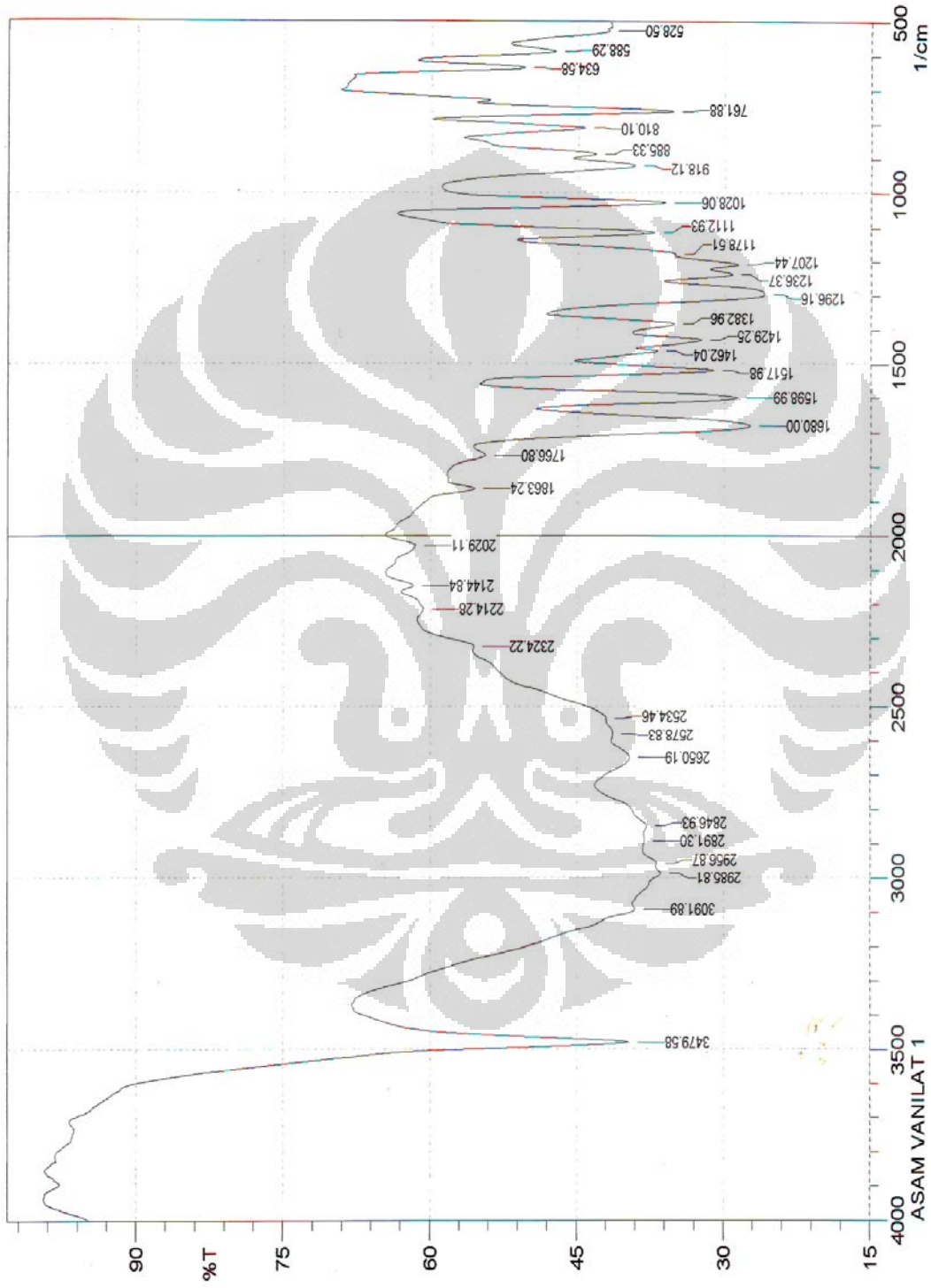
0.5 mmol

Spektrum FT-IR Asam Vanilat Standar



Lampiran 6

Spektrum FT-IR Asam Vanilat Hasil Sintesis



Lampiran 7

Spektrum FT-IR Ester Laktovanilat

