



***Brassica juncea* Peroxidase Sebagai Biokatalis Dalam Sintesis Kopling Oksidatif Senyawa Guaiakol**

(*Brassica juncea* peroxidase as biocatalyst for Synthesis of Oxidative Coupling of guaiacol)

YULIA ANITA*, HANI MULYANI

Pusat Penelitian Kimia LIPI, Kawasan Puspiptek Tangerang, 15314.

Diterima 24 April 2013, Disetujui 28 September 2013

Abstrak: Senyawa polimer fenol dalam tumbuhan sukar di isolasi karena jumlahnya sedikit dan waktu pengerjaan yang relatif lama, oleh karena itu dibutuhkan sintesis polimer fenol dengan waktu yang relatif singkat. Oksidasi fenol oleh peroksidase dengan substrat H_2O_2 menghasilkan reaksi kopling oksidatif, sehingga terbentuk polimer fenol. Peroksidase adalah enzim mengkatalisis reaksi oksidasi oleh hidrogen peroksida pada sejumlah substrat yang merupakan donor hidrogen, misalnya guaiakol. Pada penelitian ini, enzim peroksidase diisolasi dari tanaman sawi hijau (*Brassica juncea*), dan diperoleh ekstrak kasar enzim peroksidase dengan aktivitas spesifik sebesar 5.618 U/mg protein. Reaksi antara substrat guaiakol dan H_2O_2 dengan enzim peroksidase ekstrak kasar sawi hijau (*Brassica juncea*) menghasilkan suatu produk dimer guaiakol. Identifikasi struktur kimia senyawa dimer dengan NMR menunjukkan hasil dimerisasi penggabungan pada posisi para-para, 4,4'-biguaiakol dengan rendemen 17%. Ekstrak enzim peroksidase yang berasal dari sawi hijau (*Brassica juncea*) mampu berperan sebagai katalis reaksi kopling oksidatif dari senyawa guaiakol menjadi senyawa dimer guaiakol.

Kata kunci: guaiakol, peroksidase, kopling oksidatif, *Brassica juncea*.

Abstract: Isolation of phenolic polymers from plants are challenging because the low yield and time consuming. Synthesis of phenolic polymer is urgently needed to overcome the lack of the compounds. Phenolic oxidation with H_2O_2 by peroxidase, results oxidative coupling reaction and finally produces phenolic polymers. Peroxidase (e.g guaiacol) catalyzes oxidative reaction by hydrogen peroxide with substrate acted as hydrogen donor. In this study, peroxidase from sawi hijau (*Brassica juncea*) was isolated. The obtained crude peroxidase had specific activity 5.618U/mg protein. Reaction between guaiacol, H_2O_2 and crude peroxidase produced guaiacol dimer. The new dimer was identified by NMR spectrometry, and the product showed coupling in para-para of 4,4'-biguaiacol, with 17% yield. In summary, crude peroxidase obtained from sawi hijau (*Brassica juncea*) was able to act as a catalyst for the oxidative coupling reaction of guaiacol into guaiacol dimer compounds.

Keywords: guaiacol, peroxidase, oxidative coupling, *Brassica juncea*.

PENDAHULUAN

PEROKSIDASE adalah enzim yang mengkatalis reaksi oksidasi oleh hidrogen peroksida dari sejumlah substrat yang merupakan donor hidrogen seperti senyawa fenol, anilin, pirogalol, dan asam askorbat. Oksidasi fenol oleh peroksidase dengan H_2O_2 menghasilkan reaksi kopling oksidatif, sehingga

terbentuk polimer fenol⁽¹⁾. Peroksidase berfungsi mengkatalisis reaksi, sedangkan H_2O_2 berfungsi untuk menginisiasi biosintesis beberapa metabolisme sekunder yang diperlukan pada proses pertumbuhan dan diferensiasi⁽²⁾.

Peroksidase adalah katalis yang selektif terhadap polimerisasi fenol. Reaksi enzimatik dengan peroksidase merupakan proses yang ramah lingkungan dibanding reaksi dengan katalis kimia. Contoh reaksi kopling oksidatif yang dikatalisis oleh peroksidase dengan baik adalah sintesis dimer naftol⁽³⁾. *Horse*

* Penulis korespondensi, Hp. 082122062184
e-mail: myname_yulia@yahoo.com





radish peroksidase adalah peroksidase komersial untuk polimerisasi fenol yang sudah banyak digunakan. Pada penelitian ini digunakan sawi hijau sebagai sumber enzim peroksidase, yang masih berkerabat dekat dan mempunyai kemiripan struktur dengan *horseradish*. Hal ini bertujuan untuk memanfaatkan tanaman lokal Indonesia sebagai sumber enzim peroksidase.

Proses polimerisasi fenol menghasilkan radikal fenoksi, dan radikal bebas tersebut akan mengalami resonansi pada posisi *orto* atau *para*. Produk yang mungkin dihasilkan dari reaksi kopling oksidatif adalah *orto-orto*, *para-para*, atau *orto-para*, tergantung substituen yang terdapat pada senyawa fenol. Kombinasi lain yang dapat teramati yaitu pengkoplingan pada oksigen-oksigen. Namun kombinasi tersebut secara umum tidak mungkin terjadi karena ketidakstabilan peroksida yang dihasilkan⁽⁴⁾.

Polimer fenol secara lamiah terdapat dalam tumbuhan. Dalam bidang industri, polimer fenol dapat dimanfaatkan sebagai kristal cair, mikroelektronik, *deodorant*, pestisida dan peningkat aktivitas biologi seperti antioksidan, antikanker, antiinflamasi⁽⁵⁾.

Salah satu senyawa fenol dalam tumbuhan adalah guaiakol. Guaiakol dapat diperoleh dari tumbuhan Guaiakum, termasuk dalam famili *Zygopyllaceae*. Guaiakol dapat dimanfaatkan terutama sebagai bahan dasar untuk obat ekspektoran, antiseptik, obat tuberculosis, dan obat bius lokal. Pada saat ini guaiakol juga menunjukkan aktivitas antioksidan, antiinflamasi dan anti kanker⁽⁵⁾.

Oleh karena senyawa polimer fenolik dalam tumbuhan sukar di isolasi karena jumlahnya sedikit dan butuh waktu untuk mengerjakannya, oleh karena itu dibutuhkan sintesis polimer fenol dengan waktu yang relatif singkat. Penelitian ini bertujuan untuk menggunakan enzim peroksidase dari tanaman sawi hijau sebagai katalis reaksi kopling senyawa fenol. Enzim dari sawi hijau memiliki aktivitas yang cukup potensial dalam pembentukan senyawa polimer. Senyawa fenol yang digunakan dalam penelitian ini adalah guaiakol, Guaiakol digunakan sebagai bahan dasar dan menghasilkan suatu senyawa dimer guaiakol.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Sawi hijau (*Brassica juncea*) diperoleh dari pasar lokal, silika gel kolom kromatografi (Merck 70-230 mesh and 230-400 mesh), etil asetat (GR), *n*-heksan (GR), guaiakol (nacalai tesque), H₂O₂ 30% (Merck).

Alat. *Fourier Transfor Infrared Spectroscopy* (FT-IR) (Shimadzu prestige 21), ¹H- & ¹³C- Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy (500 MHz

& 25 MHz Jeol spectrophotometer).

METODE. Ekstraksi Enzim Peroksidase dari Sawi Hijau. Batang sawi hijau yang sudah dipisahkan dari daunnya ditimbang kemudian batang tersebut dipotong-potong, kemudian dicampur dengan larutan fosfat pH 7 menggunakan blender, kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh kemudian disentrifugasi untuk memisahkan ekstrak kasar enzim dari residu. Enzim peroksidase yang diperoleh diukur aktivitasnya dengan metode Bergmeyer dan kadar protein ditentukan dengan metode Lowry^(6,7).

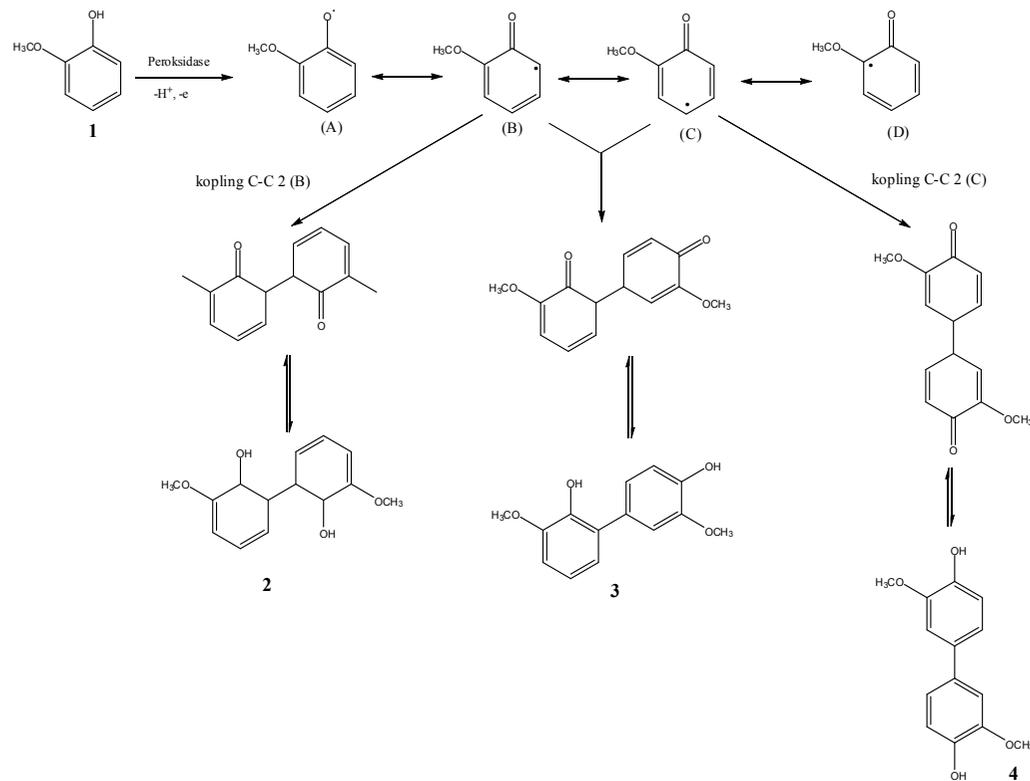
Sintesis Dimer Guaiakol Dengan Katalis Peroksidase. Sebanyak 20 mL ekstrak enzim peroksidase dengan aktivitas spesifik 5,618 U/mg direaksikan dengan 2 mL guaiakol dan ditambah 1 mL H₂O₂ 5%. Campuran tersebut diaduk selama 45 menit pada suhu ruang. Reaksi dianggap selesai ketika terjadi perubahan warna. Produk kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah dan diekstraksi dengan pelarut butanol. Fase butanol yang berwarna coklat kemudian ditambah dengan MgSO₄ anhidrat, untuk menghilangkan air yang masih ada. Ekstrak butanol yang diperoleh dipekatkan, dan dimurnikan dengan kromatografi kolom. Produk yang sudah murni di verifikasi dengan FT-IR dan NMR⁽⁵⁾.

HASIL DAN PEMBAHASAN

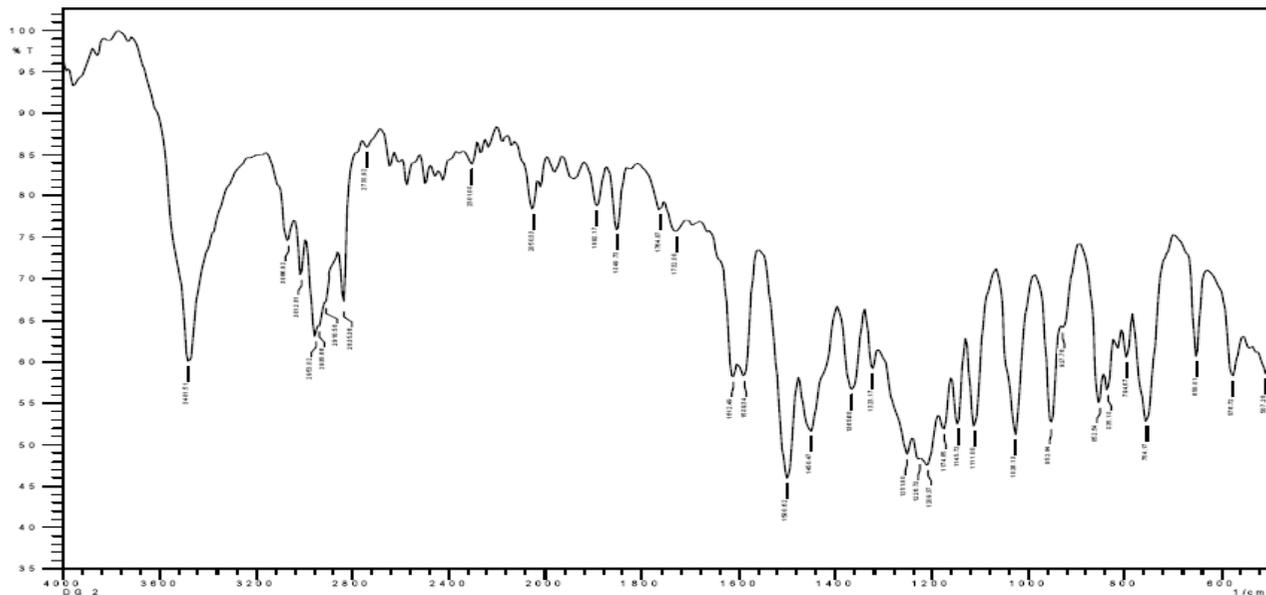
Enzim peroksidase yang digunakan adalah hasil isolasi dari tanaman sawi hijau (*Brassica juncea*), dan diperoleh ekstrak kasar enzim peroksidase. Aktivitas spesifik enzim ini sebesar 5.618 U/mg melalui perhitungan metode Bregmeyer dan Lowry. Ekstrak kasar enzim peroksidase ini selanjutnya digunakan sebagai biokatalis untuk sintesis dimer guaiakol.

Sintesis dimer guaiakol. Fenol yang digunakan adalah guaiakol⁽¹⁾ sebagai donor hidrogen, dan H₂O₂ sebagai akseptor hidrogen. Ekstrak enzim peroksidase dari sawi hijau digunakan sebagai biokatalis untuk reaksi polimerisasi senyawa fenol. Fenol atau senyawa benzoid terbentuk pada akhir biosintesis, atau terlibat dalam pembentukan metabolit yang lain. Pengkopelan dari dua residu fenolat merupakan hal yang penting. Pengganti gugus homolitik pada substrat aromatik non radikal telah diamati, dimana reaksi keseluruhannya adalah intramolekuler (semua dalam molekul tunggal fenol kompleks), tetapi biasanya melibatkan dimerisasi melalui serangan pada radikal fenoksi yang lain. Radikal fenoksi yang terbentuk akan mengalami resonansi pada posisi *orto* atau *para* (Gambar 1)⁽¹⁾. Dari reaksi fenolat, semua kombinasi terjadinya pengkopelan di amati kemungkinannya. Pada Gambar 1, fenolat (B) dapat memungkinkan terjadinya pengkopelan pada posisi *orto-orto*⁽⁵⁾, fenolat





Gambar 1. Postulasi mekanisme reaksi yang mungkin terjadi dalam reaksi kopling oksidatif guaiakol.

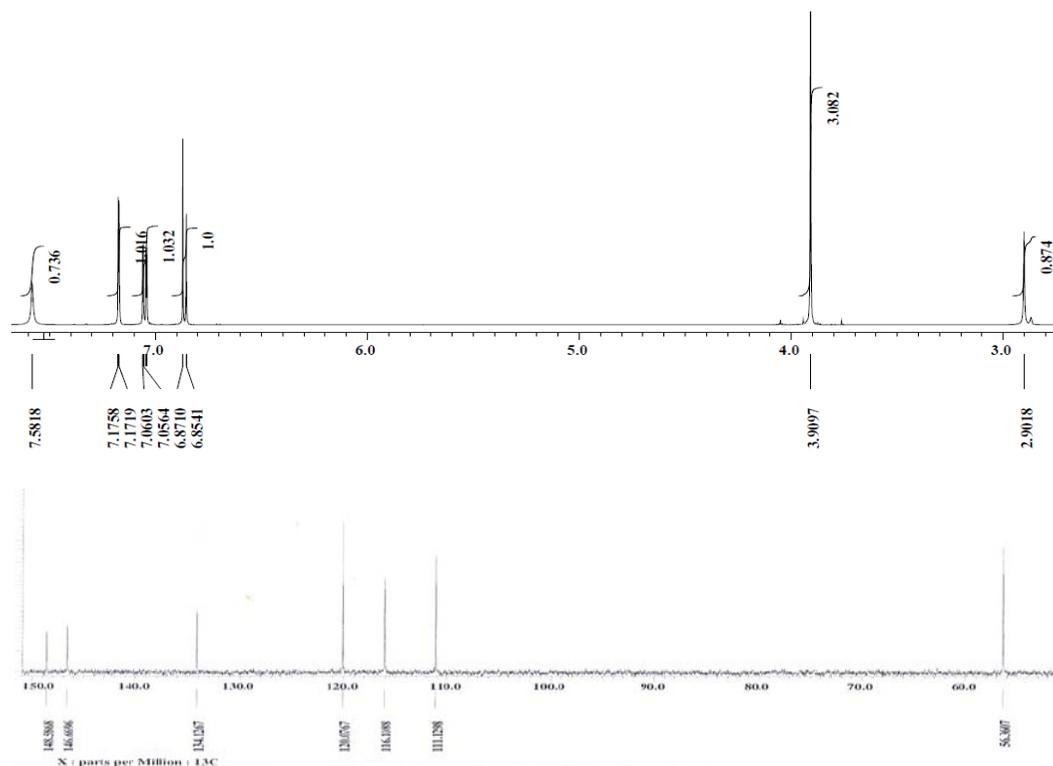


Gambar 2. Spektrum FT-IR dari Senyawa 4,4'biguaiakol.

(C) untuk pengkopelan pada posisi *ortho-para*⁽²⁾, dan fenolat (D) untuk pengkopelan posisi *para-para*⁽³⁾.

Dari proses polimerisasi ini diperoleh produk hasil reaksi berwarna coklat kemerahan berupa minyak. Selanjutnya, produk kopling oksidatif dimurnikan dengan kromatografi kolom fase gerak *n*-heksana:etilasetat dan dikarakterisasi dengan FT-IR, dan ¹H- & ¹³C-NMR. Analisa ¹H-¹³C HMQC dan HMBC juga dilakukan untuk memperkuat data korelasi antara proton dan karbon atom.

Identifikasi isolat dengan spektrofotometri inframerah dilakukan untuk penentuan gugus fungsi. Spektrum inframerah tiap senyawa organik bersifat khas, artinya senyawa yang berbeda akan menghasilkan spektrum yang berbeda. Selain dari senyawa isomer-optik, tidak satupun diantara 2 senyawa tersebut yang memiliki kurva serapan yang identik. Data FT-IR (Gambar 2) menunjukkan gugus fungsi antara lain benzena dengan 2 atau 3 substitusi (ν_{\max} 770-841 cm^{-1}), C=C cincin benzen (ν_{\max} 1593



Gambar 3. Spektrum ^1H & ^{13}C NMR dari Senyawa 4,4'-biguaikol⁽³⁾.

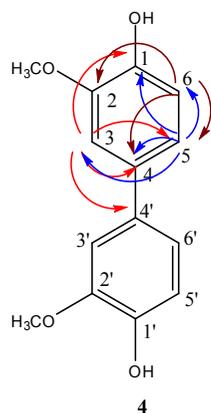
-1450 cm^{-1}), C-O-C (ν_{max} 1211 cm^{-1}), C-H aromatik (ν_{max} 3041-3100 cm^{-1}) dan O-H (ν_{max} 3481 cm^{-1}).

Hasil pengukuran NMR menunjukkan adanya 7 sinyal proton dan 7 sinyal carbon. Terbentuknya ikatan C-C pada ^{13}C -NMR pada δC 134,13 menunjukkan adanya pengkopelan pada ikatan C-C. Dari hasil analisa ini, produk utama reaksi kopling oksidatif yaitu senyawa dimer guaiakol pada posisi *para-para*⁽³⁾.

Produk sintesis mempunyai frekuensi absorpsi ν (cm^{-1}) dan NMR yang hampir sama, artinya senyawa produk yang diidentifikasi adalah senyawa dimer simetris. Hal ini menunjukkan senyawa baru tersebut merupakan hasil oksidatif kopling dari guaiakol, dimana terjadinya penggabungan radikal fenoksi,

melalui mekanisme 4, seperti diuraikan pada Gambar 1. Hal ini pun sesuai dengan reaksi enzimatik yang mengkatalis senyawa fenolik menjadi polimer.

Hasil pengukuran spektrum ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR, menunjukkan adanya sistem cincin ABX, dengan adanya sinyal pada δH 7,17 (d, 1,9 Hz) / δC 111,13; 6,86 (d, 8,4 Hz) / δC 116,11 dan 7,05 (dd, 1,9; 8,4 Hz) / δC 120,08. Hal ini menunjukkan bahwa pola spektrum ^1H -NMR dari guaiakol telah berubah jadi dimer 4,4'-biguaikol. Dengan demikian dapat



Gambar 4. Korelasi HMBC untuk senyawa⁽³⁾.

Tabel 1. Spektrum data ^1H & ^{13}C NMR, HMQC, HMBC (500 MHz, aseton-D₆) dari kopling oksidatif senyawa *para-para* biguaikol⁽³⁾.

Posisi	^1H , δ (ppm), J (Hz)	^{13}C , δ (ppm)	HMBC
1/1'	-	146,66	-
2/2'	-	148,58	-
3/3'	7,17 (1H; d; J 1,95)	111,13	1,4,4',5
4/4'	-	134,13	-
5/5'	7,05 (1H; dd; J 1,95; 8,4)	120,08	1,3,4,6
6/6'	6,86 (1H; d; J 8,4)	116,11	2,4,5
HO-1	7,58 (1H; s)	-	-
CH ₃ O-2	3,90 (3H; s)	56,36	2



dipastikan bahwa senyawa ini adalah 4,4'-biguaiakol, yang juga diperkuat dengan adanya korelasi jarak jauh antara H-2 dan C-1', seperti diilustrasikan pada Gambar 4.

Hasil identifikasi struktur kimia senyawa dimer dengan NMR menunjukkan hasil penggabungan pada posisi *para-para*, 4,4'-biguaiakol. Hasil utama produk dimer ini, pengkopelan C-C *para-para*, menunjukkan pada posisi ini proses radikalisasi lebih stabil dibanding posisi *orto-orto*, atau *orto-para*. Dimerisasi penggabungan pada posisi *para-para*, 4,4'-biguaiakol menghasilkan rendemen sebesar 17%.

SIMPULAN

Ekstrak enzim peroksidase yang berasal dari sawi hijau (*Brassica juncea*) dapat digunakan sebagai katalis reaksi kopling oksidatif dari senyawa guaiakol menjadi senyawa dimer fenolik, dan produk yang diperoleh berupa 4,4'-biguaiakol dan kopling oksidatif pada C-C yaitu penggabungan pada posisi *para-para*. Reaksi kopling oksidatif dengan enzim ini memberikan rendemen cukup baik yaitu sebesar 17%.

DAFTAR PUSTAKA

1. Cristina N, Candice G, Stephanie B, Bruno D, Sergio R. Laccase-mediated oxidation of phenolic derivatives. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2010. 65:52-7.
2. Uyama H and Kobayashi S. Enzyme-catalyzed polymerization to functional polymers. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2002.19-20:117-27.
3. Tzeng SC and Liu YC. Peroxidase-catalyzed synthesis of neolignan and its anti-inflammatory activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2004.32: 7-13.
4. Seiichiro F, Toshiko A, Yoshinori K, Hiroshi S. Antioxidant and Prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. *Toxicology*. 2002. 177:39-54.
5. Yulia A. Produksi senyawa bioaktif dari reaksi guaiakol dengan enzim peroksidase dan uji aktivitas alelopati.[skripsi]. Depok: Jurusan Kimia Universitas Indonesia; 2004. 23-68.
6. Bergmeyer HU. *Methods of enzymatic analysis*. Vol I. 2nd ed. New York: Academic Press; 1994. 495.
7. Lehninger AL. *Dasar-dasar Biokimia*. Jilid 1. Jakarta: Erlangga; 1990.
8. Daniel AB and Ruth ES. Modeling suberization with peroxidase-catalyzed polymerization of hydroxycinnamic acids: Cross-coupling and dimerization reactions. *Phytochemistry*. 2006. 67: 743-53.
9. Helena. Oxidative dimerization of ferulic acid by extracts from sorghum. *Phytomarry*. 1976. IS:465-69.
10. Van Deurzen MPJ, Van Rantjwijk F, and Sheldon RA. Selective oxidations catalyzed by peroxidases. *Tetrahedron*. 1997. 53(39):13183-220.
11. Jung MJ, Heo SI, Wang MH. Free radical scavenging and total phenolic contents from methanolic extracts of *Ulmus davidiana*. *Food Chemistry*. 2008. 108: 482-87.
12. Sonia M, Maria LS, Efstathia I, Mohamed M, Anastasia D, Vassilios R, Panagiotis K. Crude peroxidase from onion solid waste as a tool for organic synthesis. Part II: oxidative dimerization-cyclization of methyl p-coumarate, methylcaffeate and methyl ferulate. *Tetrahedron Letters*. 2011.52:1165-8.

