

Monograf

**Biotransformasi Senyawa
Alfa Pinena
dari Minyak Terpentin**



———— Nanik Wijayati ————

MONOGRAF

**BIOTRANSFORMASI ALFA
PINENA DARI MINYAK
TERPENTIN**

MONOGRAF

**BIOTRANSFORMASI ALFA
PINENA DARI MINYAK
TERPENTIN**

Dr. NANIK WIJAYATI, M.Si

Penerbit

UNNES PRESS

Jl. Kelud Raya No.2 Semarang 50232

Telp/ Fax. (024) 8415032

Hak Cipta © pada Penulis dan dilindungi Undang-Undang Penerbitan.
Hak Penerbitan pada Unnes Press, dicetak oleh TBS Press
Jl. Kelud Raya No.2 Semarang 50232
Telp/Fax. (024) 8415032

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh buku ini
dalam bentuk apapun tanpa izin dari penerbit.

Monograf
Biotransformasi Alfa Pinena dari Minyak Terpentin

Dr. Nanik Wijayati, M.Si.

Desain & Layout : Moh. Tamrin
Setting : Moh Tamrin

660.6 *Monograf* Biotransformasi Alfa Pinena dari Minyak
NAN Terpentin/Nanik Wijayati; -Cet.1-, -illus,- Semarang:
M Unnes Press, 2016
xii + 82 hal; 23,5 cm

1. Bioteknologi: mikrobiologi dan biokimia

1. Nanik Wijayati; II. Judul

ISBN 978-602-285-085-4

Sanksi Pelanggaran Pasal 72

Undang-undang Nomor 19 Tahun 2002

Tentang Hak Cipta

1. Barang siapa dengan sengaja melanggar dan tanpa hak melakukan perbuatan sebagaimana dimaksud dalam pasal 2 ayat (1) atau pasal 49 ayat (1) dan ayat (2) dipidana dengan pidana penjara masing-masing paling singkat 1 (satu) bulan dan/atau denda paling sedikit Rp. 1.000.000,00 (satu juta rupiah), atau pidana penjara paling lama 7 (tujuh) tahun dan/atau denda paling banyak Rp. 5.000.000.000,00 (lima miliar rupiah).
2. Barang siapa dengan sengaja menyiarkan, memamerkan, mengedarkan, atau menjual kepada umum suatu ciptaan atau barang hasil pelanggaran hak cipta atau hak terkait sebagaimana dimaksud pada ayat (1) dipidana dengan pidana penjara paling lama 5 (lima) tahun dan/atau denda paling banyak Rp. 500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).

PRAKATA

Dengan memanjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT, saya dapat menyelesaikan buku monograf ini dengan baik. Buku ini memberi wawasan tentang minyak terpentin. Minyak terpentin dapat disuling dari pohon pinus (*pinus merkusii jung et de fries*). Komponen senyawa dalam minyak terpentin adalah α -pinena (>80%), β -pinena, kamfena dan d-longifolena, yang termasuk dalam golongan senyawa monoterpena. Selama ini minyak terpentin harganya murah dan hanya digunakan sebagai pengencer dan pelarut cat. Salah usaha untuk meningkatkan nilai ekonomi dari minyak terpentin adalah dengan melakukan reaksi derivatisasi melalui biotransformasi dengan suatu enzim lipase. Enzim lipase dapat diisolasi dari bakteri *pseudomonas aeruginosa*.

Buku ini sangat menarik untuk dibaca karena merupakan kajian empiris penulis dari penelitian fundamental. Buku ini juga dapat digunakan untuk melengkapi bahan ajar mata kuliah kimia organik, kimia bahan alam, biokimia dan bioteknologi. Pada Bab 1, menjelaskan sekilas tentang sifat fisik minyak terpentin. Bab 2 menjelaskan tentang cara isolasi α -pinena dari minyak terpentin dengan distilasi fraksinasi pengurangan tekanan, dan karakterisasinya. Bab 3 menjelaskan tentang reaksi biotransformasi senyawa α - pinena dengan enzim lipase. Bab 4 menjelaskan tentang metode penelitian reaksi biotransformasi α -pinena, mulai dari cara mengetahui fase pertumbuhan dari enzim lipase, cara menguji aktivitas enzim dan penetrapannya ke reaksi biotransformasi. Bab 5 menjelaskan tentang hasil reaksi biotransformasi senyawa α -pinena dengan enzim lipase. Bab 6 adalah penutup.

Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada semua pihak yang telah membantu. Semoga buku ini bermanfaat bagi para pembaca, Kritik dan saran saya harapkan supaya tulisan ini menjadi lebih baik.

Salam
Penulis

DAFTAR ISI

	Hal
PRAKATA	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	xi
BAB 1 Pendahuluan	1
1.1 Minyak Atsiri	1
1.2 Minyak terpenin	8
1.3 Terpena	11
BAB 2 Alfa Pinena	15
2.1 alfa pinena	15
2.2 Analisis alfa pinena	18
BAB 3 Biotransformasi alfa pinena	33
3.1 Biotransformasi pinena	33
3.2 <i>Lipase</i>	39
3.3 Biotransformasi terpena dengan <i>Lipase</i>	40
3.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
3.5 Kurva Pertumbuhan Bakteri	46
BAB 4 Metode Penelitian Biotransformasi	49
4.1 Bahan-bahan	49
4.2 Alat-alat	49
4.3 Cara Kerja	50
a. Uji Awal	50
b. Produksi Lipase	51
c. Isolasi lipase dari bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51
d. Uji aktivitas lipase	51
e. Penentuan kadar protein	52
f. Reaksi biotransformasi α -pinena dengan enzim lipase	52
g. Analisis data	53

BAB 5 Hasil Reaksi Biotransformasi alfa pinena	55
5.1 Hasil Pertumbuhan <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	55
5.2 Aktivitas enzim lipase	57
5.3 Hasil Reaksi α -Pinena dengan enzim lipase dari <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62
a. Pengaruh konsentrasi enzim	63
b. Pengaruh konsentrasi H ₂ O ₂	64
c. Pengaruh mmol asam oktanoat	65
 BAB 6 Penutup	 75
 DAFTAR PUSTAKA	 77

DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 1.1 Rangkaian alat penyulingan uap	7
Gambar 1.2 Komponen penyusun minyak terpenin	9
Gambar 1.3 Kopling kepala dan ekor dari dua unit isoprena membentuk limonena	12
Gambar 2.1. Struktur α -pinena	15
Gambar 2.2 Produk dari bahan dasar pinena	17
Gambar 2.3 Kromatogram GC senyawa α -pinena standar (98%)	19
Gambar 2.4 Kromatogram GC β -DEX 325-Back kolom kiral (A) α -pinena standar dan (B) α -pinena hasil isolasi dari minyak terpenin	20
Gambar 2.5 Stuktur α -pinena, A: (<i>R</i>)-(+) α -pinena dan B: (<i>S</i>)-(-) α -pinena	21
Gambar 2.6 Spektrum massa senyawa α -pinena	23
Gambar 2.7 Skema fragmentasi senyawa α -pinena	25
Gambar 2.8 Spektra IR α -pinena standar dan hasil isolasi dari minyak terpenin	27
Gambar 2.9 Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa α -pinena	28
Gambar 2.10 Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa α -pinena	30
Gambar 2.11 Spektrum HSQC-NMR senyawa α -pinena	32
Gambar 3.1 Tahap pertama dari biosintesis terpenoid.	34
Gambar 3.2 Tahap kedua dalam biosintesis monoterpena	34
Gambar 3.3 Tahap ketiga biosintesis monoterpena klas pinana.	35
Gambar 3.4 Beberapa monoterpena hidrokarbon komponen dari minyak terpenin. Senyawa ini sering digunakan sebagai senyawa aroma sintetis dan juga digunakan sebagai komponen <i>flavoring</i> dan <i>fragrance</i> .	36
Gambar 3.5 Reaksi terkatalisis monooksigenase	41

Gambar 3.6 Koloni <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dalam medium agar (a) dan mikrograf <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dengan mikroskop elektron (b)	43
Gambar 3.7 Kurva Pertumbuhan Bakteri, menunjukkan empat fase pertumbuhan: a=fase lag; b=fase eksponensial; c=fase stasioner dan d=fase kematian populasi	46
Gambar 5.1 Pertumbuhan bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	55
Gambar 5.2 Aktivitas enzim lipase	57
Gambar 5.3 Standarisasi asam oleat	58
Gambar 5.4 Kurva uji aktivitas lipase dari Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada berbagai pH 6,2, 7.2 dan 8.2 dengan variasi temperatur (27, 30, 37, dan 42)	60
Gambar 5.5 Hasil titrasi pada uji aktivitas lipase	61
Gambar 5.6 Hasil isolasi lipase pada medium cair dari <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	61
Gambar 5.7 Pengaruh konsentrasi enzim terhadap kadar α -pinena oksida	64
Gambar 5.8 Pengaruh konsentrasi H_2O_2 terhadap kadar α -pinena oksida	65
Gambar 5.9 Pengaruh mmol asam oktanoat terhadap kadar α -pinena oksida	65
Gambar 5.10 Pengaruh pelarut pada reaksi biotransformasi α -pinena	67
Gambar 5.11 Kromatogram hasil reaksi biotransformasi α -pinena dengan enzim lipase dari <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68
Gambar 5.12 Spektrum IR hasil reaksi biotransformasi α -pinena dengan enzim lipase dari <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	70
Gambar 5.13. Skema Fragmentasi Senyawa α -Pinena Oksida	71
Gambar 5.14. Skema reaksi biotransformasi α -pinena dengan enzim lipase dari <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	74

DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel 1.1 Syarat umum minyak terpentin	10
Tabel 1.2 Syarat spesifikasi mutu minyak terpentin	10
Tabel 2.1 Sifat Fisik α -Pinena Hasil Isolasi Minyak Terpentin	16
Tabel 2.2 Pola fragmentasi dalam spektrum massa senyawa α -pinena	23
Tabel 2.3 Perbandingan spektrum massa senyawa α -pinena	24
Tabel 2.4 Pergeseran kimia ^1H - α - pinena (CDCl_3 400 MHz)	28
Tabel 2.5 Pergeseran kimia ^{13}C - α - pinena (CDCl_3)	29
Tabel 2.6 Analisis data ^1H -NMR, ^{13}C -NMR dan HSQC-NMR senyawa α -pinena	31
Tabel 3.1 Biotransformasi α -pinena dengan berbagai mikroorganisme (Linmark,2003)	37
Tabel 5.1 Sintesis asam peroksioktanoat dengan variasi sumber lipase.	63
Tabel 5.2 Sintesis beberapa asam peroksikarboksilat dalam pelarut heksana	63
Tabel 5.3 Pengaruh konsentrasi enzim (penambahan 6M H_2O_2 3 jam)	66

1.1 Minyak Atsiri

Minyak atsiri merupakan salah satu bahan ekspor non migas andalan Indonesia. Namun harga senyawa turunan minyak atsiri yang diimpor ke Indonesia jauh lebih mahal daripada harga minyak atsiri yang diekspor. Permasalahan tersebut dapat diatasi oleh pemerintah dengan menetapkan penelitian bidang minyak atsiri merupakan topik penelitian unggulan saat ini. Minyak daun cengkeh, minyak serih, minyak terpentin, minyak permen, minyak nilam, dan minyak akar wangi merupakan beberapa contoh minyak atsiri yang biasa ditemukan dalam kehidupan sehari-hari. Minyak atsiri awalnya digunakan sebagai bahan pewangi, parfum, obat-obatan, dan bahan aroma makanan. Pada perkembangan sekarang hasil sintesis senyawa turunan minyak atsiri dapat digunakan sebagai feromon, aditif biodisel, antioksidan, polimer, aromaterapi, penyerap logam, *sun screen block* dan banyak lagi kegunaan lainnya.

Minyak atsiri yang ada di Indonesia adalah:

- a. Minyak daun dan gagang cengkeh (*clove leaf oil & clove stem oil*)
- b. Minyak serih wangi (*citronella oil*)
- c. Minyak nilam (*patchouli oil*)
- d. Minyak terpentin (*turpentine Oil*)
- e. Minyak Pala (*nutmeg oil*) dan minyak fuli (*mace oil*)
- f. Minyak Akar Wangi (*vetiver oil*)

- g. Minyak Kayu Putih (cajeput oil)
- h. Minyak Cendana (sandalwood oil)
- i. Minyak Kananga (Cananga Oil)
- j. Minyak Massoi (Massoia Bark Oil)
- k. Minyak Kemukus (Cubeb Oil)
- l. Minyak Daun Jeruk Purut (*Kaffir Lime Leaf Oil*)

Minyak atsiri ini hanya di produksi di Indonesia dengan output beberapa ton per tahun. Pemakaian sementara ini hanya untuk fragrance, padahal potensi di flavor cukup besar hanya saja minyak atsiri ini belum memiliki nomor FEMA.

Masih ada beberapa minyak atsiri Indonesia lainnya seperti minyak lawang yang hanya dipakai di pasar domestik untuk obat gosok dan mempunyai nilai ekonomi rendah, minyak gurjun yang bisa berfungsi sebagai *fixative* namun pengadaan bahan bakunya berkategori ilegal, minyak lada hitam (*black pepper oil*) yang produsen utamanya adalah India (sebagian bahan baku impor dari Indonesia) dan mereka beroperasi efisien dengan mengintegrasikan produksi oleoresin dan oil. Selain itu juga banyak disebut di media beberapa jenis minyak atsiri dari bahan baku bunga. Sejauh ini produksinya masih sangat terbatas dan berskala kecil sekali dan belum mencapai skala ekonomis untuk bersaing dengan produsen utama di India, Mesir maupun Eropa Timur.

Pemasaran minyak atsiri tidak bisa terlepas dari penggunaannya. Industri pengguna utama minyak atsiri adalah industri *flavor & fragrance*, industri kimia aromatik, industri farmasi, industri kosmetik (termasuk spa) dan toiletries (termasuk

detergent), industri pengendalian serangga/hama serta industri makanan dan minuman.

Minyak atsiri merupakan salah satu produk bahan rempah-rempah. Minyak atsiri lazim disebut minyak yang mudah menguap (*volatile oils*). Minyak atsiri umumnya berwujud cair, diperoleh dari bagian tanaman akar, kulit batang, daun, buah, biji atau bunga dengan cara destilasi uap, ekstraksi atau dipres (ditekan). Minyak sereh, minyak daun cengkeh, minyak akar wangi, minyak nilam, minyak kenanga, minyak kayu cendana merupakan beberapa bahan ekspor minyak atsiri Indonesia. Minyak atsiri awalnya digunakan sebagai bahan pewangi, parfum, obat-obatan, dan bahan aroma makanan. Dalam perkembangan sekarang hasil sintesis senyawa turunan minyak atsiri dapat digunakan sebagai feromon, aditif biodisel, antioksidan, polimer, aromaterapi, penjerap logam, sun screen block dan banyak lagi kegunaan lainnya.

Kemampuan untuk melakukan konversi komponen minyak atsiri menjadi menjadi senyawa-senyawa yang lebih berguna merupakan suatu hal penting yang mendesak sekarang. Hal ini disebabkan senyawa turunan minyak atsiri yang diimpor ke Indonesia harganya jauh lebih mahal daripada harga minyak atsiri yang diekspor oleh Indonesia (Sastrohamidjojo, 2000).

Minyak atsiri adalah minyak yang mudah menguap pada temperatur kamar tanpa mengalami dekomposisi ((Doyle dan Mungall, 1980), tetapi minyak atsiri dapat rusak karena penyimpanan jika minyak atsiri dibiarkan lama. Minyak atsiri akan mengabsorpsi oksigen dari udara sehingga akan berubah warna, aroma, dan kekentalan sehingga sifat kimia minyak atsiri

tersebut akan berubah (Ketaren, 1985). Minyak atsiri tidak larut dalam air, larut dalam pelarut organik, dan berbau harum sesuai dengan tanaman penghasilnya.

Minyak atsiri secara umum dibagi menjadi dua kelompok, yaitu:

- a. minyak atsiri yang senyawa komponen penyusunnya sukar untuk dipisahkan, seperti minyak nilam dan minyak akar wangi. Minyak atsiri kelompok ini lazimnya langsung digunakan tanpa diisolasi komponen-komponen penyusunnya sebagai pewangi berbagai produk.
- b. minyak atsiri yang komponen-komponen senyawa penyusunnya dapat dengan mudah dipisahkan menjadi senyawa murni, seperti minyak sereh, minyak daun cengkeh, minyak permen dan minyak terpentin. Senyawa murni hasil isolasi atau pemisahan biasanya digunakan sebagai bahan dasar untuk diproses menjadi produk yang lebih berguna.

Isolasi minyak atsiri dari tanaman dapat dilakukan melalui 3 cara, yaitu: (1) pengempaan (*pressing*), (2) ekstraksi menggunakan pelarut (*solvent extraction*), dan (3) penyulingan (*distillation*). Penyulingan atau destilasi uap merupakan metode yang paling banyak digunakan untuk mendapatkan minyak atsiri. Penyulingan dilakukan dengan mendidihkan bahan baku di dalam ketel suling sehingga terdapat uap yang diperlukan untuk memisahkan minyak atsiri dengan cara mengalirkan uap jenuh dari ketel pendidih air (*boiler*) ke dalam ketel penyulingan.

Penyulingan adalah suatu proses pemisahan secara fisik suatu campuran dua atau lebih produk yang mempunyai titik didih yang berbeda dengan cara mendidihkan terlebih dahulu komponen

yang mempunyai titik didih rendah terpisah dari campuran. Metoda ini cocok untuk minyak atsiri yang tidak mudah rusak oleh panas, misalnya minyak cengkeh, nilam, sereh wangi, pala, akar wangi dan jahe. Proses penyulingan minyak atsiri dapat dipermudah dengan melakukan perlakuan pendahluan (penanganan bahan baku) dengan beberapa cara seperti pengeringan, pencucian dan perajangan.

Pengeringan dapat mempercepat proses ekstraksi dan memperbaiki mutu minyak, namun selama pengeringan kemungkinan sebagian minyak akan hilang karena penguapan dan oksidasi oleh udara (Ketaren, 1985). Beberapa jenis bahan baku tidak perlu dikeringkan, seperti jahe, dan bahan lain yang disuling dalam keadaan segar untuk mencegah kehilangan aroma yang diinginkan.

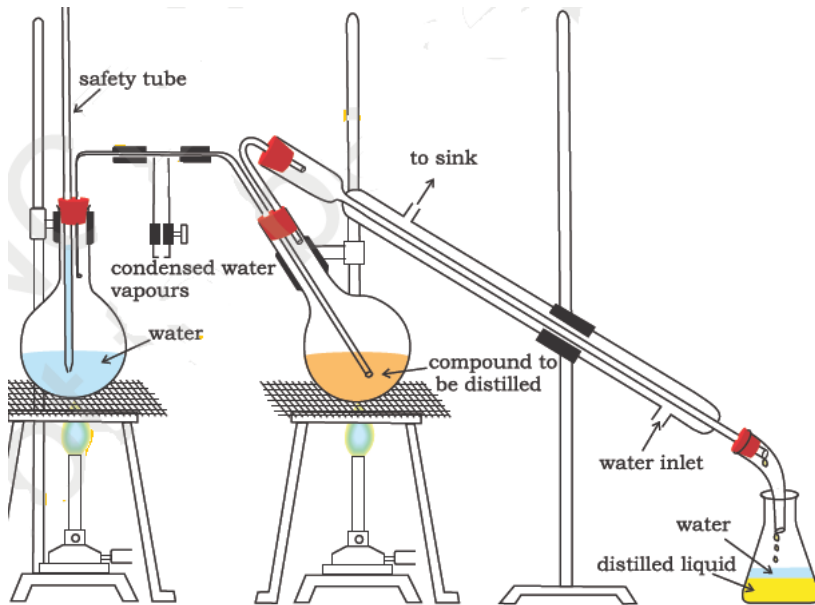
Pencucian biasanya dilakukan untuk bahan-bahan yang berasal dari tanah seperti akar wangi, dan rimpang. Tujuannya adalah untuk membersihkan bahan dari kotoran yang menempel, mencegah hasil minyak agar tidak kotor, dan efisiensi pemuatan bahan dalam ketel suling.

Perajangan bertujuan untuk memudahkan penguapan minyak atsiri dari bahan, dan memperluas permukaan suling dari bahan. Pada umumnya perajangan dilakukan pada ukuran 20 – 30 cm.

Ada industri 3 macam metode penyulingan minyak atisiri yang dikenal yaitu (1) penyulingan dengan air (water distillation), (2) penyulingan dengan air-uap (water and steam distillation), (3) penyulingan dengan uap langsung (steam distillation).

Pada proses penyulingan ini, tekanan, suhu, laju alir, dan lama penyulingan diatur berdasarkan jenis komoditi. Lama penyulingan sangat bervariasi, misalnya sereh wangi mulai dari 3-5 jam; minyak nilam 5 – 8 jam dan minyak cengkeh; minyak pala 10 – 14 jam; dan minyak akar wangi 10-16 jam. Hal tersebut bergantung kepada jenis bahan baku (basah/kering), penggunaan tekanan dan suhu penyulingan. Tekanan uap yang tinggi dapat menyebabkan dekomposisi pada minyak, oleh karena itu penyulingan lebih baik dimulai dengan tekanan rendah, kemudian meningkat secara bertahap sampai pada akhir proses.

Selama proses penyulingan, uap air yang terkondensasi dan turun ke dasar ketel harus dibuang secara periodik melalui keran pembuangan air untuk mencegah pipa uap berpori terendam, karena hal ini dapat menghambat aliran uap dari boiler ke ketel suling. Pada proses pendinginan, suhu air pendingin yang masuk ke dalam tabung atau kolam pendingin yang ideal sekitar 25-30°C, dan suhu air keluar maksimum 40 – 50°C. Suhu air keluar tersebut dapat diatur dengan memperbesar memperkecil debit air pendingin yang masuk ke dalam tabung / kolam pendingin. Serangkaian alat penyulingan disajikan pada Gambar 1.1.



Steam distillation. Steam volatile component volatilizes, the vapours condense in the condenser and the liquid collects in conical flask.

Gambar 1.1 Rangkaian alat penyulingan uap

Pengepresan dilakukan dengan memberikan tekanan pada bahan menggunakan suatu alat yang disebut hydraulic atau expeller pressing. Beberapa jenis minyak yang dapat dipisahkan dengan cara pengepresan adalah minyak almond, lemon, kulit jeruk, dan jenis minyak atsiri lainnya.

Ekstraksi minyak atsiri menggunakan pelarut, cocok untuk mengambil minyak bunga yang kurang stabil dan dapat rusak oleh panas. Pelarut yang dapat digunakan untuk mengekstraksi minyak atsiri antara lain kloroform, alkohol, aseton, eter, serta lemak. Sedangkan enfleurasi digunakan khusus untuk memisahkan minyak bunga-bunga, untuk mendapatkan mutu dan rendemen minyak yang tinggi.

Pemisahan komponen minyak atsiri dapat dilakukan secara fisika dan secara kimia.

a. Pemisahan secara fisika

Pemisahan senyawa komponen penyusun minyak atsiri secara fisika biasanya dilakukan dengan distilasi bertingkat untuk senyawa yang memiliki berat molekul rendah dan distilasi molekular untuk senyawa yang memiliki berat molekul besar. Pemisahan komponen minyak sereh akan baik dilakukan dengan distilasi bertingkat, tetapi pemisahan komponen minyak nilam akan lebih baik dilakukan dengan distilasi molekular. Distilasi yang dilakukan dalam umumnya dalam keadaan vakum. Hal ini dikerjakan untuk menghindari terjadinya isomerisasi, polimerisasi, atau peruraian karena panas. Pada penelitian ini, isolasi atau pemisahan senyawa alfa pinena dari minyak terpentin dilakukan dengan distilasi fraksinasi dengan pengurangan tekanan (vakum).

b. Pemisahan secara kimia

Pemisahan secara kimia dilakukan berdasarkan reaksi kimia. Contoh, isolasi eugenol dari komponen lain yang terdapat dalam minyak daun cengkeh dengan menggunakan larutan natrium hidroksida. Isolasi sitronelal dari komponen lain dalam minyak sereh dengan menggunakan larutan jenuh natrium bisulfit.

Pemurnian minyak dari air juga dapat dilakukan dengan menambahkan zat pengikat air berupa Natrium Sulfat anhidrat (Na_2SO_4) sebanyak 1% selanjutnya diaduk dan disaring.

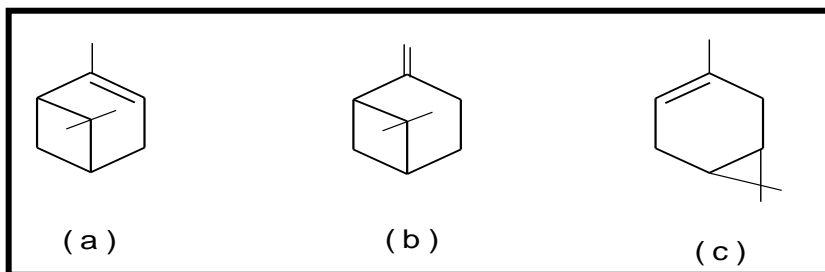
1.2 Minyak Terpentin

Di Indonesia, terpentin dihasilkan dari getah pinus jenis *Pinus merkusii*. Terpentin dihasilkan sebagai hasil atas proses

distilasi dan hasil bawahnya berupa gondorukem. Terpentin merupakan salah satu produk unggulan non kayu Perum Perhutani di Indonesia. Produksi minyak terpentin dari getah pinus sampai dengan bulan Desember 2014, dilaporkan mencapai 17.150 ton dengan luas hutan pinus sekitar 876.992,66 hektar (Perhutani, 2014).

Minyak terpentin merupakan cairan yang berwarna (jernih) dan berbau khas. Minyak terpentin sering disebut dengan *spirit of turpentin*, berupa cairan yang tidak mudah menguap, berasal dari penyulingan getah jenis pohon yang tergolong dalam getah pinus. Pohon pinus (*famili Pinaceae*) yang dibudidayakan di Indonesia sebagian besar adalah jenis pinus *merkusii Jungh et de Vr*. Pohon ini merupakan tumbuhan asli Indonesia, dan tumbuh di daerah Aceh, Sumatera Utara dan Pulau Jawa (Nanik *et al.* 2013).

Kandungan utama dari minyak terpentin mentah adalah monoterpen hidrokarbon seperti (a) α -pinena, (b) β -pinena dan (c) 3-karena (Haneke, 2002; Lindmark, 2003; VANĚK, 2005). Komponen penyusun minyak terpentin ditunjukkan pada Gambar 1.2.



Gambar 1.2 Komponen penyusun minyak terpentin

Terpenoid disebut juga isoprenoid. Hal ini dikarenakan kerangka penyusun terpenoid adalah isoprena (C_5H_8). Pada Tabel 1.1 adalah syarat umum dan Tabel 1.2 adalah spesifikasi mutu minyak terpenin menurut SNI 7633: 2011.

Tabel 1.1. Syarat umum minyak terpenin

Bentuk	Cair
Bau	Khas Terpenin
Bobot jenis pada 25°C	0,848 – 0,865
Indeks bias pada 25°C	1,464 – 1,478
Titik nyala	33 – 38 °C
Titik didih awal	150 – 160 °C

Tabel 1.2 Syarat spesifikasi mutu minyak terpenin

No	Uraian	Satuan	Persyaratan	
			Mutu A	Mutu B
1	Warna		Jernih	*)
2	Putaran optik pada suhu 27,5 °C	0	+≥32	+<32
3	Kadar Sulingan	%	≥90	<90
4	Sisa Penguapan	%	≤2	>2
5	Bilangan Asam		≤2,0	>2,0
6	Alpha Pinena	%	≥80	<80

Catatan : *)tidak dipersyaratkan

Kegunaan terpenin yang semula hanya bisa dipakai sebagai pelarut cat sehingga harganya rendah, ternyata dari terpenin ini bila diproses lebih lanjut bisa menghasilkan komponen alpha pinena dan beta pinena yang bernilai ekonomis tinggi dan

menjadi bahan baku industri parfum, kapur barus dan desinfektan (Abdulgani, 2002, Nanik *et al*, 2011).

Minyak terpentin dapat digunakan dalam berbagai macam bidang industri. Kegunaan minyak terpentin dapat disajikan sebagai berikut:

- a. Kegunaan paling penting minyak terpentin, sebagai bahan baku industri kimia dan farmasi seperti sintesis kamfer, terpineol, dan terpenil asetat.
- b. Minyak terpentin digunakan sebagai minyak dalam industri cat dan pernis.
- c. Kegunaan lain, yaitu dalam industri perekat dan pelarut lilin.

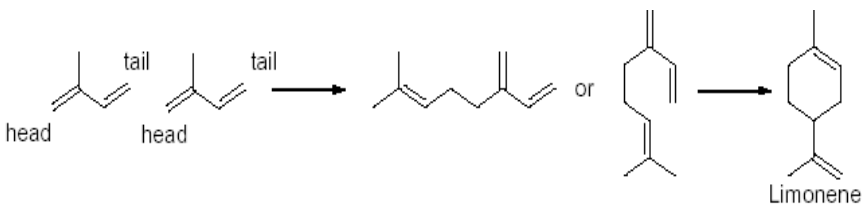
1.3 Terpena

Indonesia termasuk salah satu negara penghasil minyak atsiri yang utama di dunia. Minyak atsiri yang banyak dihasilkan di Indonesia antara lain minyak kayu putih, minyak nilam, minyak cengkeh, minyak cendana, minyak sereh dan terpentin. Minyak atsiri ini banyak diekspor ke berbagai negara untuk berbagai keperluan. Struktur minyak atsiri telah dipelajari banyak orang yang terdiri dari satuan senyawa yang terdiri dari 5 atom karbon dan 8 atom hidrogen yang disebut isopren. Isopren ini dapat mengalami reaksi polimerisasi membentuk senyawa dengan dua satuan isopren dengan C10, tiga satuan dengan C15, empat satuan isopren dengan C20 dan seterusnya. Senyawa dengan kelipatan senyawa isopren disebut senyawa terpena dan bila ada atom lain di dalam molekulnya, senyawa ini dikenal dengan nama terpenoid.

Senyawa ini mudah menguap sehingga mudah dipisahkan dari senyawa-senyawa lain dengan cara distilasi uap dari akar, kulit

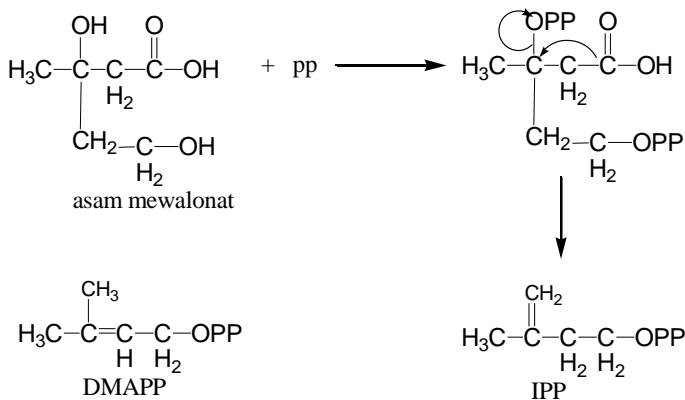
kayu, daun, bunga atau buah tumbuhan tertentu. Pada umumnya tumbuhan yang kaya minyak atsiri adalah tumbuhan yang termasuk suku Lebiatae (nilam, selasi), suku Myrlacceae (cengkeh, kayu putih), suku Umbelliferaceae (ketumbar, seledri, adas) dan Pinaceae (terpentin).

Nama-nama yang biasa digunakan adalah terpena (hidrokarbon dan terpenoid (terpena teroksigenasi). Komponen isoprenoid banyak terdapat dalam metabolit sekunder yaitu senyawa yang dihasilkan dari tumbuhan dan mikroba, yang tidak esensial untuk pertumbuhan mikroorganisme. Menurut Von Wallach (1987) dalam Linmark (2003), menyatakan bahwa unit terkecil dari terpena adalah isoprena (2-metilbutadiena) antar unit isoprena dapat bergabung antara kepala dan ekor membentuk monoterpena, seskuiterpena, diterpena dan seterusnya (Gambar 1.3).

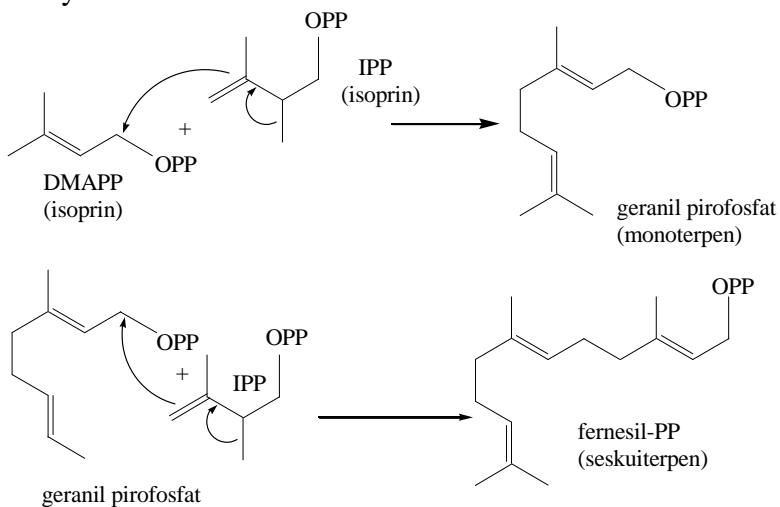


Gambar 1.3 Koping kepala dan ekor dari dua unit isoprena membentuk limonena

Senyawa terpenoid dibuat (disintesis) oleh tumbuhan yang dikenal dengan biosintesis. Manusia memperoleh senyawa terpenoid dengan cara mengisolasi melalui distilasi uap atau ekstraksi.

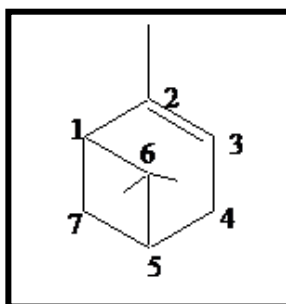


Senyawa DMAPP berkondensasi dengan IPP membentuk senyawa monoterpen. Monoterpen yang dihasilkan dapat berkondensasi lebih lanjut membentuk seskuioterpen, diterpen dan seterusnya.



2.1 Alfa Pinena

Salah satu senyawa monoterpena yang terdapat dalam minyak terpentin adalah α -pinena atau 2,6,6-trimetil bisiklo [3.1.1]-2-heptena (Lindmark, 2003; Li *et al.*, 2005). Alfa pinena dengan rumus molekul $C_{10}H_{16}$ adalah cairan yang tidak berwarna dengan bau karakteristik seperti terpentin. Rumus struktur α -pinena terdiri atas dua cincin yaitu siklobutana dan sikloheksena, oleh karena itu α -pinena termasuk monoterpena bisiklis (Gambar 2.1). Sifat fisik α -pinena adalah mempunyai massa molekul 136,2; titik didih $155-156^{\circ}\text{C}$; berat jenis (20°C) $0,864 \text{ g/mL}$; dan Indeks bias (20°C) $1,4656$. Senyawa monoterpena, merupakan senyawa hidrokarbon tak jenuh yang mempunyai 10 atom karbon dimana satuan terkecil dalam molekulnya disebut isoprena. Monoterpena digunakan secara luas dalam industri parfum karena baunya menarik, berat molekulnya rendah dan volatilitasnya tinggi. Rumus Molekul : $C_{10}H_{16}$: Nama lain : (1S)-(-)-alpha-Pinena



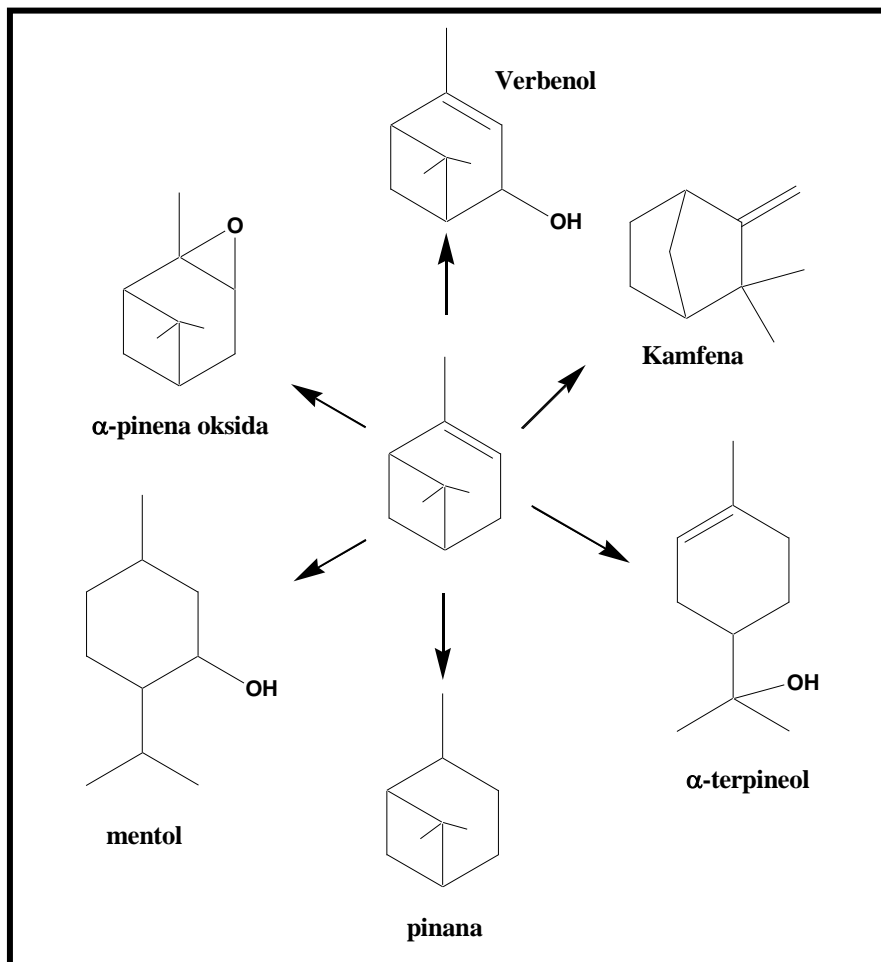
Gambar 2.1. Struktur α -pinena

Hasil penentuan sifat fisik sampel α -pinena hasil isolasi dengan distilasi fraksinasi vakum pada suhu kamar datanya disajikan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Sifat Fisik α -Pinena Hasil Isolasi Minyak Terpentin

Jenis	
Wujud	Cairan
Warna	Jernih kekuningan
Indek bias (20°C)	1,4652
Berat jenis	0,860 g/ml

α -Pinena merupakan senyawa monoterpena bisiklis yang merupakan cincin beranggota empat. Adanya gugus metil sebagai gugus pendorong elektron dan cincin beranggota empat pada α -pinena ini menyebabkan ikatan rangkap dua karbon-karbonnya (gugus alkena) mudah diadisi oleh reagen elektrofilik. Sifat inilah yang menyebabkan α -pinena dimungkinkan sangat reaktif dengan oksidator.



Gambar 2.2 Produk dari bahan dasar pinena

Alfa-Pinena merupakan suatu senyawa yang digunakan untuk sintesis senyawa parfum, resin, obat atau lainnya. Kegunaan lain dari α -pinena adalah sebagai bahan dasar sintesis mentol (Nicolau and Sorensen, 1996); pinana (Tan and Lin, 2000); verbenol (Lindmark, 2003), kamfena (Severino, 1993), α -pinena oksida (Neuenschwander U., 2010), dan α -terpineol (Avila *et al.*,

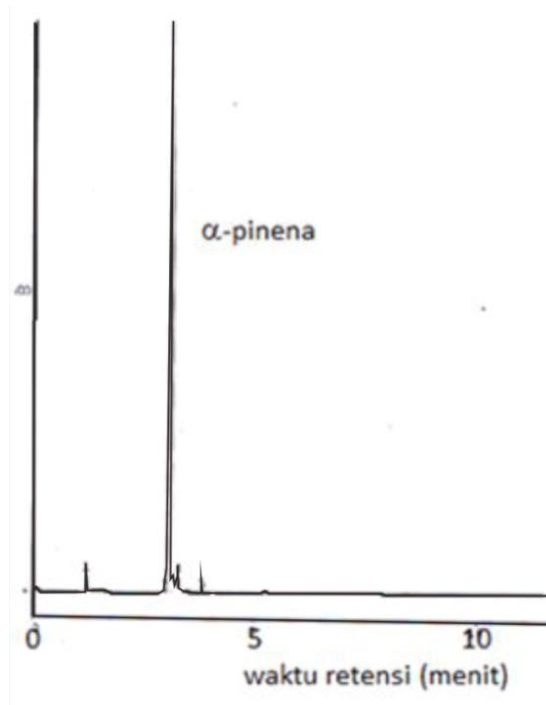
2010). Transformasi α -pinena menjadi senyawa turunannya disajikan pada Gambar 2.2.

2.2 Analisis alfa pinena

a. Analisis dengan Kromatografi Gas

Kromatografi gas adalah metode kromatografi pertama yang dikembangkan pada zaman instrumen dan elektronika yang telah merevolusikan keilmuan selama lebih dari tiga puluh tahun. Sekarang kromatografi gas dipakai secara rutin di sebagian besar laboratorium industri dan perguruan tinggi. Kromatografi gas dapat dipakai untuk setiap campuran yang sebagian komponennya, atau akan lebih baik lagi jika semua komponennya mempunyai tekanan uap yang berarti pada suhu yang dipakai untuk pemisahan. Tekanan uap memungkinkan komponen menguap dan bergerak bersama-sama dengan fase gerak yang berupa gas. Alat kromatografi gas terdiri dari beberapa komponen. Kromatografi canggih yang dilengkapi dengan sistem komputer untuk mengontrol komponen-komponennya, seperti termostat, kecepatan mengalir gas dan menyimpan data hasil percobaan di dalam memorinya .

Analisis kadungan pinena dalam minyak terpentin dilakukan dengan menggunakan kromatografi gas. Kandungan utama dalam minyak terpentin dari Perhutani Jawa Tengah adalah α -pinena (83%). Distilasi fraksinasi dengan pengurangan tekanan terhadap 500 mL minyak terpentin pada tekanan 5 cmHg menghasilkan distilat pada suhu 56-60°C.

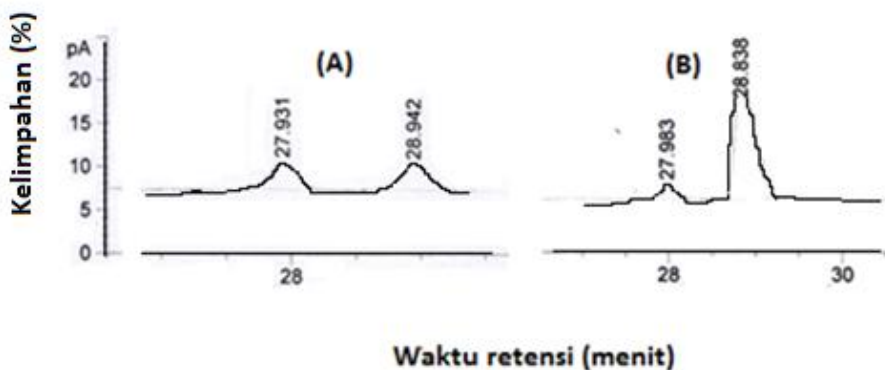


Gambar 2.3 Kromatogram GC senyawa α -pinena standar (98%)

Persentase α -pinena hasil redistilasi adalah 95%, sedangkan α -pinena standar adalah 98%. Sifat fisik dari sampel berwujud cair, warna jernih dan bau terpenin, mempunyai massa molekul 136,2; titik didih $155\text{-}156^{\circ}\text{C}$; berat jenis (20°C) $0,864\text{ g/mL}$; dan Indeks bias (20°C) $1,4656$. Pengukuran sampel dengan alat polarimeter pada panjang gelombang 589 nm dan suhu 25°C , menunjukkan bahwa rotasi optik senyawa α -pinena standar adalah $+0,36^{\circ}$, sedangkan α -pinena hasil isolasi dari minyak terpenin adalah $+48,75^{\circ}$. Kromatogram GC senyawa α -pinena disajikan pada Gambar 2.3.

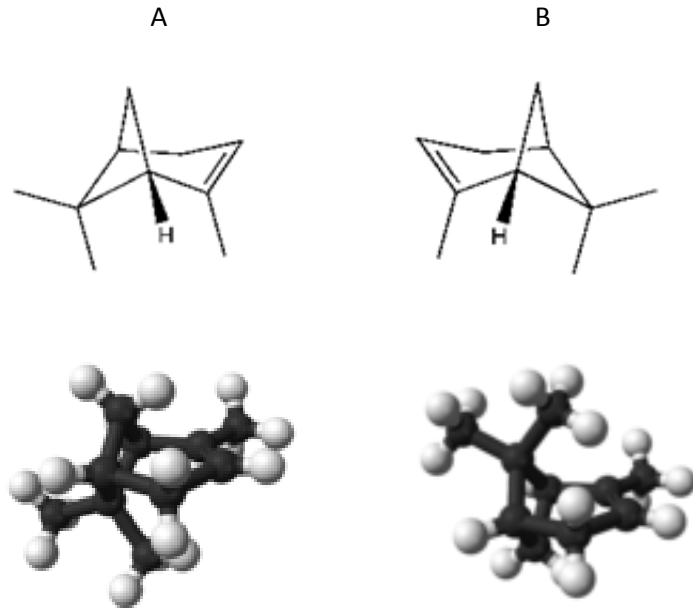
b. Analisis dengan Kromatografi Gas β -DEX 325-Back kolom kiral

Berdasarkan hasil kromatografi gas β -DEX 325-Back kolom kiral, menunjukkan bahwa baik α -pinena standar maupun α -pinena hasil isolasi dari minyak terpentin berada dalam bentuk campuran rasemik yaitu (*R*)-(+)- α -pinena atau (1*R*,5*R*)-2,6,6-trimetil bisiklo [3.1.1] 2-heptena dan (*S*)-(-)- α -pinena atau (1*S*,5*S*)-2,6,6-trimetil bisiklo [3.1.1] 2-heptena. Pada Gambar 2.4 menyajikan perbandingan komposisi konsentrasi (*R*)-(+)- α -pinena dan (*S*)-(-)- α -pinena dari α -pinena standar adalah 1:1, sedangkan α -pinena hasil isolasi dari minyak terpentin dengan perbandingan 11:1.



Gambar 2.4 Kromatogram GC β -DEX 325-Back kolom kiral (A) α -pinena standar dan (B) α -pinena hasil isolasi dari minyak terpentin

Struktur α -pinena disajikan pada Gambar 2.5 sebagai campuran rasemik (*R*)- dan (*S*)- α -pinena.



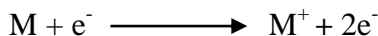
Gambar 2.5 Struktur α -pinena, A: (*R*)-(+)- α -pinena dan B: (*S*)-(-) α -pinena

Menurut data MSDS, pengukuran rotasi optik pada panjang gelombang 589 nm dan suhu 20°C, senyawa (*R*)-(+)- α -pinena adalah +42° sedangkan (*S*)-(-) α -pinena adalah -50,7°. Berdasarkan data tersebut dimungkinkan senyawa hasil isolasi dari minyak terpentin berupa campuran rasemik dominan berada dalam posisi (*R*)-(+)- α -pinena.

c. Analisis dengan Kromatografi Gas Spektrofotometer masa (GC-MS)

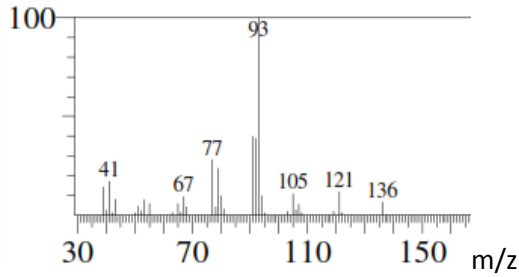
GC-MS merupakan gabungan dua buah alat, yaitu kromatografi gas dan spektrometer massa. GC-MS ini digunakan untuk mendeteksi massa antara m/z 10 sampai dengan m/z 700. Sumber pengionan berupa tumbukan elektron dengan energi sebesar 70 eV tanpa dapat divariasikan. Secara umum prinsip spektrometer massa adalah menembak bahan yang sedang dianalisis dengan berkas elektron dan secara kuantitatif mencatat hasilnya sebagai suatu spektrum fragmen ion positif. Fragmen-fragmen berkelompok sesuai dengan massanya.

Metode ini berguna untuk menentukan berat molekul senyawa. Metode-metode spektroskopi UV, FTIR, NMR, dan GC-MS bersama-sama digunakan untuk mengenal bangun molekul senyawa organik. Bila molekul netral disinari elektron berenergi tinggi maka molekul netral terurai menjadi gugus bermuatan listrik.



M adalah molekul netral dan M^{+} adalah ion positif

Spektrum massa senyawa α -pinena disajikan pada Gambar 2.6 sedangkan pola fragmentasinya disajikan pada Tabel 2.2.



Gambar 2.6 Spektrum massa senyawa α -pinena

Tabel 2.2 Pola fragmentasi dalam spektrum massa senyawa α -pinena

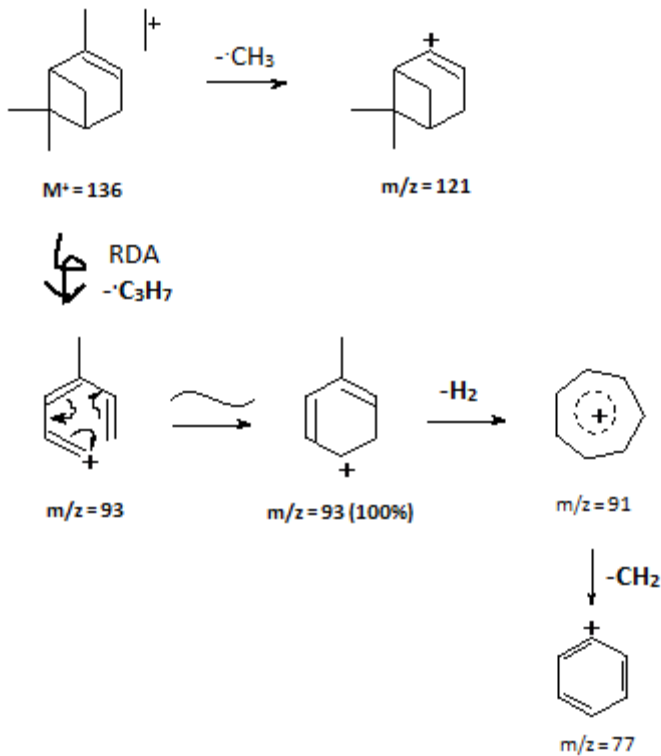
m/z	Penggalan	Ion
136	M^+	$C_{10}H_{16}^+$
121	M-15	$C_9H_{13}^+$
105	M-15- CH_2	$C_8H_{11}^+$
93	M-43	$C_7H_9^+$
91	m/z 93 - H_2	$C_7H_7^+$
77	m/z 91 - CH_2	$C_6H_5^+$
51	m/z 77 - C_2H_2	$C_4H_3^+$
43	M-93	$C_3H_7^+$

Kesamaan spektrum massa α -pinena hasil isolasi dengan α -pinena standar diketahui dari harga indek kesamaan (IK). Indeks kesamaan secara kualitatif dihitung dari perbedaan antara spektrum senyawa yang diteliti dengan spektrum senyawa yang terdaftar pada pustaka (Tabel 2.3). Pada umumnya perbedaan antara intensitas atau kelimpahan puncak spektra pada tiap nomor massa terhitung. Semakin kecil perbedaan intensitas spektra, semakin besar harga indeks kesamaannya. Harga indek kesamaan ini juga dipengaruhi oleh perbedaan pengukuran dan temperatur operasi.

Tabel 2.3 Perbandingan spektrum massa senyawa α -pinena

m/z	Kelimpahan (%)	
	α -pinena standar	α -pinena hasil isolasi
43	76,30	56,30
51	9,63	4,44
53	14,07	11,85
77	25,19	22,96
91	44,44	29,63
93	100,00	100,00
107	37,04	29,63
121	12,59	12,59
136	8.89	8.89

Puncak ion molekular pada $M^+ = m/z = 136$ mempunyai intensitas yang rendah. Hal ini dimungkinkan cincin beranggota empat yang menyebabkan ketidakstabilannya. α -pinena mempunyai peak lain pada $m/z = 121 = M-15$ (M-metil) dan $m/z 93 = M-43$ (M-isopropil). Puncak dasar pada $m/z = 93$ dapat dibentuk secara langsung dari ion induk. Puncak dengan $m/z 91$ dimungkinkan adanya ion tropilium ($C_7H_7^+$) dan puncak pada $m/z 77$ berasal dari ion tropilium- CH_2^+ . Skema fragmentasi senyawa α -pinena disajikan pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7 Skema fragmentasi senyawa α -pinena

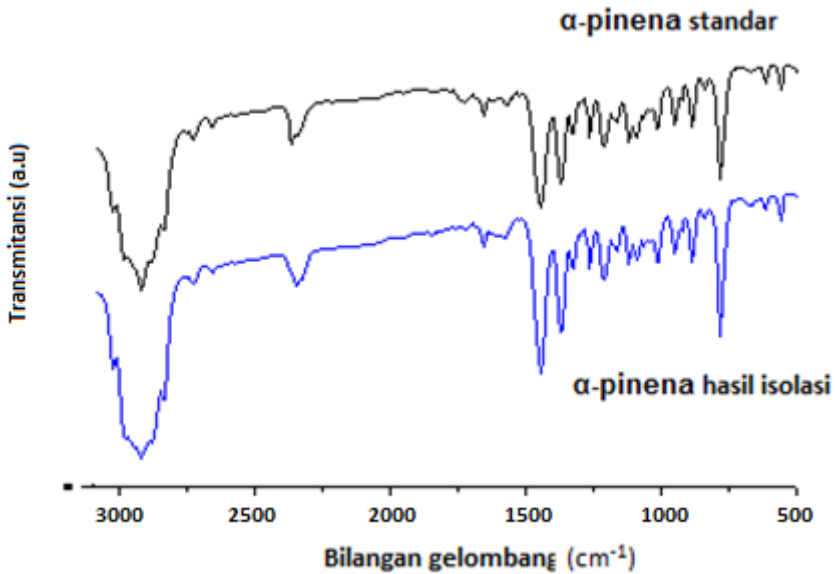
d. Analisis dengan *Forier Transfor- Infra Red (FT-IR)*

Spektroskopi infra merah sangat penting dalam kimia modern, terutama dalam daerah organik spektrofotometer merupakan alat rutin untuk mendeteksi gugus fungsional, mengidentifikasi senyawa dan menganalisis campuran (Day, 2001).

Spektrofotometer infra merah terdiri atas sumber pemancar radiasi, daerah cuplikan, fotometer, monokromator, detektor, dan rekorder. Cuplikan dapat dianalisis dengan spektrofotometer infra merah sebagai padatan atau cairan murninya, karena tidak ada

pelarut yang sama sekali transparan terhadap sinar infra merah. Cuplikan padat dapat digerus bersama kristal KBr kering (0,5 – 2 mg cuplikan, 100 mg KBr kering) dan dibentuk *pellet* terlebih dahulu sebelum dianalisis dengan spektrofotometer infra merah. Sedangkan untuk cuplikan cair, sampel dapat langsung dianalisis tanpa pengenceran dan bebas air (Sastrohamidjojo, 1992).

Elusidasi struktur senyawa α -pinena dengan spektrofotometer IR diperoleh spektrum yang disajikan pada Gambar 2.8. Berdasarkan spektra IR senyawa hasil isolasi menunjukkan adanya puncak sedang pada 3026 cm^{-1} disebabkan vibrasi rentangan C-H olefin, sedangkan puncak kuat pada $2950\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$ disebabkan oleh vibrasi rentangan C-H alkana. Ini diperkuat oleh puncak pada 1469 cm^{-1} yang disebabkan oleh vibrasi tekukan gugus metilena ($-\text{CH}_2-$) dan puncak pada 1446 cm^{-1} disebabkan oleh vibrasi tekukan gugus metil ($-\text{CH}_3$). Puncak duplet pada 1365 cm^{-1} adalah hasil dari vibrasi rentangan C- CH_3 asimetrik. Puncak ini diindikasikan bahwa α -pinena mengandung suatu gugus gem-dimetil ($\text{C}-(\text{CH}_3)_2$). Puncak kecil pada 1660 cm^{-1} disebabkan vibrasi rentangan olefin trisubstitusi. Puncak tajam pada 768 cm^{-1} disebabkan vibrasi keluar bidang gugus olefin.



Gambar 2.8 Spektra IR α -pinena standar dan hasil isolasi dari minyak terpentin

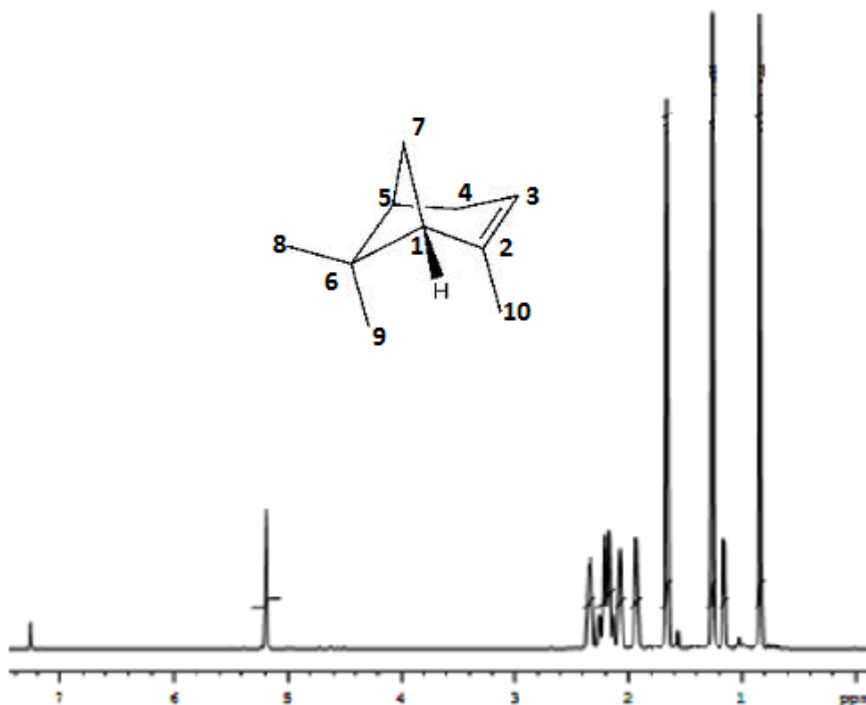
e. Analisis dengan Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

1) Analisis ¹H-NMR α -pinena

Spektra ¹H-NMR memberikan informasi posisi proton (H) pada struktur senyawa α -pinena. Harga pergeseran kimia dari masing-masing jenis proton dalam α -pinena disajikan pada Gambar 2.9 dan Tabel 2.4.

Sinyal proton ikatan rangkap muncul pada geseran kimia (δ) 5,19 ppm (CH-3) yang sesuai dengan spektra IR. Gugus gemdimetil pada spektra IR diperkuat dengan adanya sinyal singlet pada δ 1,15 ppm (CH₃-8) dan δ 0,84 ppm (CH₃-9). Terdapat proton metil singlet lainnya pada geseran kimia (δ) 1,57 ppm (CH₃-10). Sinyal singlet lainnya pada δ 2,33 ppm (CH₂-7). Sinyal kuartet

pada geseran kimia (δ) 2,14 - 2,26 ppm (CH-4). Data spektra IR dan $^1\text{H-NMR}$ yang menunjukkan adanya karbon ikatan rangkap (C=C) diperkuat dengan data spektra $^{13}\text{C-NMR}$.



Gambar 2.9 Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa α -pinena

Tabel 2.4 Pergeseran kimia $^1\text{H-}\alpha$ - pinena (CDCl_3 400 MHz)

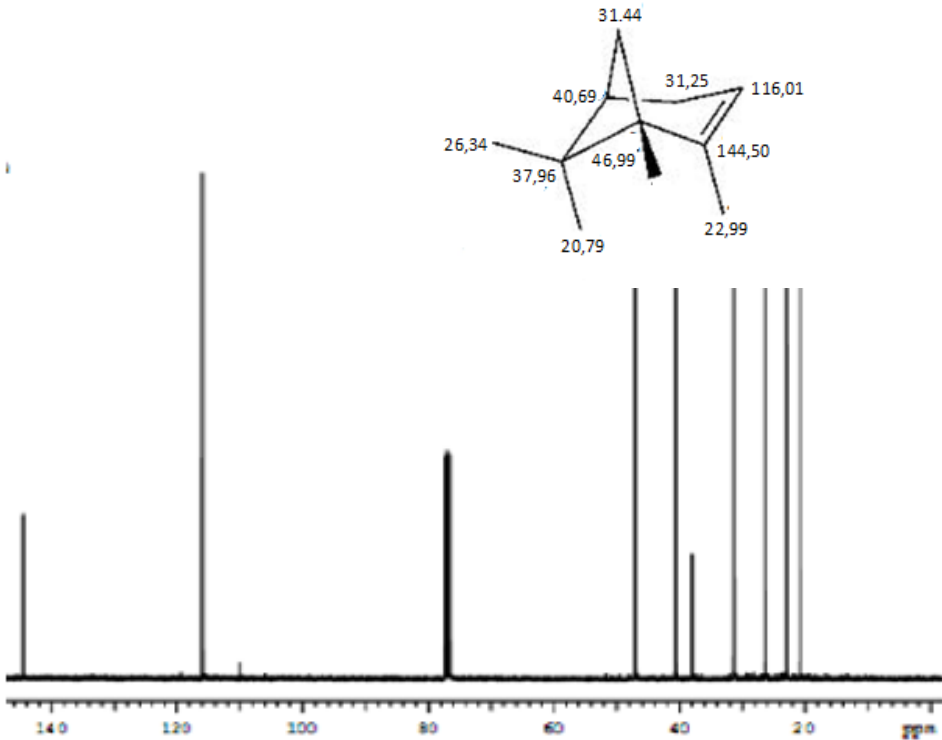
Pergeseran (δ) ppm	Jenis Proton	Posisi Proton
1,93	(s, 1H)	CH-1
5,19	(s, 1H)	CH-3
2,14 - 2,26	(dd, 2H)	CH ₂ -4
2,07	(s, 1H)	CH-5
2,33	(s, 2H)	CH ₂ -7
1,15	(s, 3H)	CH ₃ -8
0,84	(s, 3H)	CH ₃ -9
1,57	(s, 3H)	CH ₃ -10

Analisis ^{13}C -NMR

Spektroskopi ^{13}C -NMR α -pinena memberikan informasi mengenai struktur karbon dalam sebuah molekul yang dilihat dari geseran kimianya. Harga pergeseran dari masing-masing atom karbon dalam senyawa α -pinena disajikan pada Gambar 2.10 dan Tabel 2.5.

Tabel 2.5 Pergeseran kimia ^{13}C - α - pinena (CDCl_3)

Posisi Karbon	Pergeseran (δ) ppm	Jenis C
C-1	46,99	CH
C-2	144,50	C=
C-3	116,01	CH=
C-4	31,25	CH ₂
C-5	40,69	CH
C-6	37,96	C
C-7	31,44	CH ₂
C-8	26,34	CH ₃
C-9	20,79	CH ₃
C-10	22,99	CH ₃



Gambar 2.10 Spektrum ¹³C-NMR senyawa α-pinena

Spektra ¹³C-NMR menunjukkan adanya gugus gem-dimetil dari α-pinena pada geseran kimia pada δ 20,79 ppm (C-9) dan δ 26,34 ppm (C-8) dengan intensitas lebih tinggi. Data ini khas untuk α-pinena dengan satu gugus gem-dimetil yang tersubsitusi pada C-6. Adanya gugus metil lainnya ditunjukkan pada δ 22,99 ppm (C-10). Adanya 2 sinyal karbon metilen (-CH₂-) pada geseran kimia δ 31,44 ppm (C-7) dan δ 31,25 ppm (C-4). Adanya 3 sinyal karbon metin (CH) pada geseran kimia δ 46,99 ppm (C-1); 116,01

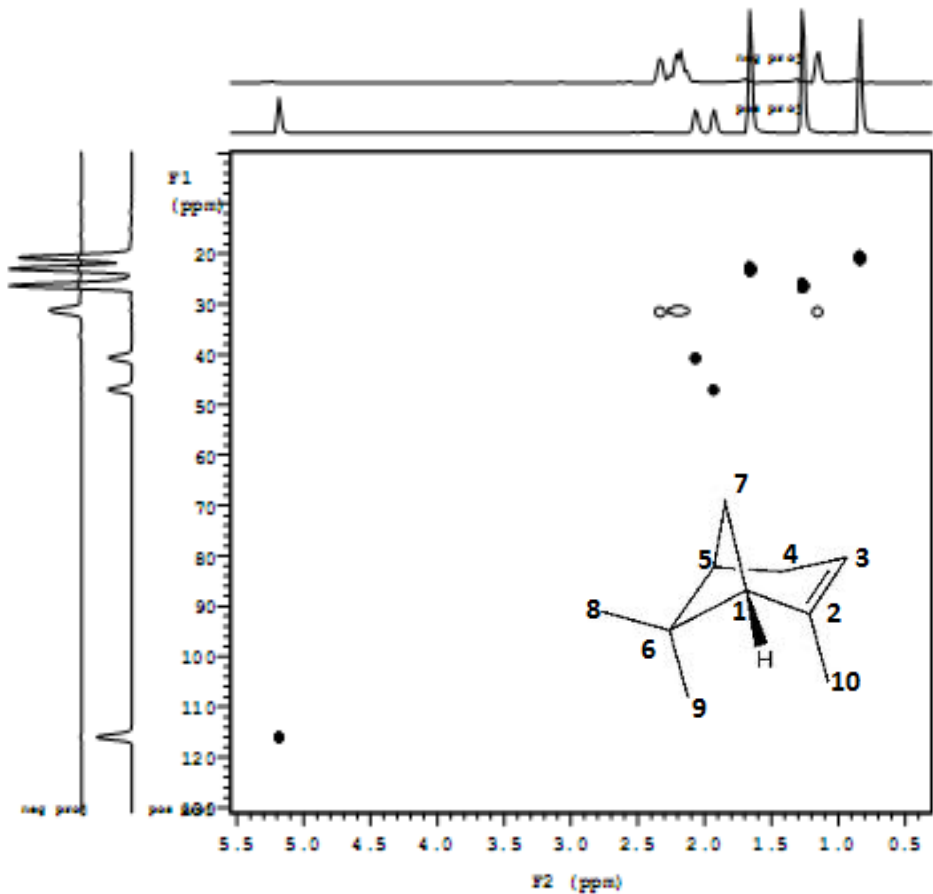
ppm (C-3) dan 40,69 ppm (C-5). Selanjutnya 2 sinyal karbon (C) pada geseran kimia δ 144,50 (C-2) dan 37,96 ppm (C-6).

Analisis HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*)-NMR α -pinena

HSQC termasuk salah satu analisis NMR 2 D (dua dimensi). Data spektrum ^1H - ^{13}C HSQC dapat memberikan korelasi antara suatu proton dengan karbon mana proton tersebut melekat (Silverstein *et al.*, 2005). Analisis α -pinena dengan HSQC-NMR disajikan pada Gambar 2. 11 dan Tabel 2.6.

Tabel 2.6. Analisis data ^1H -NMR, ^{13}C -NMR dan HSQC-NMR senyawa α -pinena

No atom C	^{13}C -NMR(δ ppm)	^1H NMR (δ ppm)	HSQC NMR (ppm)
1	46,99	1,93 (s, 1H)	C1, 1H, s
2	144,50	-	C2,
3	116,01	5,19 (s, 1H)	C3, 1H, s
4	31,25	2,14 - 2,26 (dd, 2H)	C4, 2H, dd
5	40,69	2,07 (s, 1H)	C5, 1H, s
6	37,96	-	C6
7	31,44	2,33 (s, 2H)	C7, 2H, s
8	26,34	1,15 (s, 3H)	C8, 3H, s
9	20,79	0,84 (s, 3H)	C9, 3H, s
10	22,99	1,57 (s, 3H)	C10, 3H, s



Gambar 2.11 Spektrum HSQC-NMR senyawa α -pinena

Adanya satu proton olefinik pada geseran kimia (δ 5,19 ppm) dan dua karbon olefinik pada geseran kimia (δ 144,5 dan δ 116,01 ppm) mengindikasikan bahwa struktur α -pinena mengandung satu ikatan rangkap dua (tak jenuh).

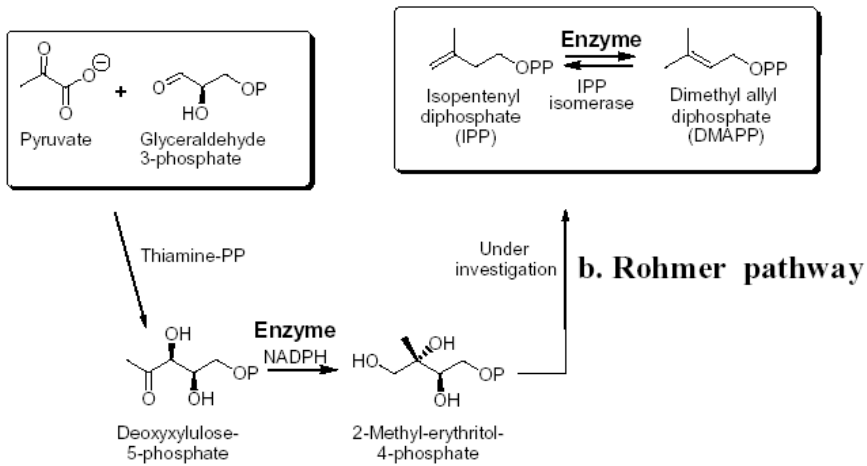
Berdasarkan interpretasi data hasil analisis baik dengan GC, GC-MS, FTIR maupun NMR ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ dan HSQC-NMR) menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi minyak terpentin adalah senyawa α -pinena yang mengandung ikatan rangkap.

Biotransformasi Alfa Pinena

3.1 Biotransformasi Monoterpena

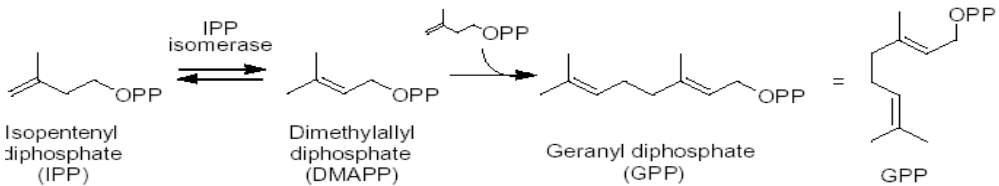
Biosintesis monoterpena seperti penataan ulang GPP ke linalil diphosfat, siklisasi dan dehidrasi pada produk penataan ulang telah dilakukan oleh Sjodin, *et al.*, 2000. Enzim mengkatalisis biosintesis monoterpena juga telah dipelajari (Bohlmann and Croteau, 1999, Philips *et al.* 1999, Faldt, *et al.*, 2003). Biosintesis monoterpena dari metabolit primer dapat dibagi dalam 4 tahap, yaitu:

Tahap 1. Sintesis unit isoprenoid, isopentenil difosfat (IPP), yang merupakan dasar dari semua isoprenoid (Gambar 3.1). Biosintesis yang utama dapat melalui jalur Mevalonat atau melalui melalui jalur Rohmer. Beberapa enzim telah diisolasi dan dikarakterisasi (Rohmer, 2001, Hoeffler *et al.*, 2002).



Gambar 3.1 Tahap pertama dari biosintesis terpenoid.

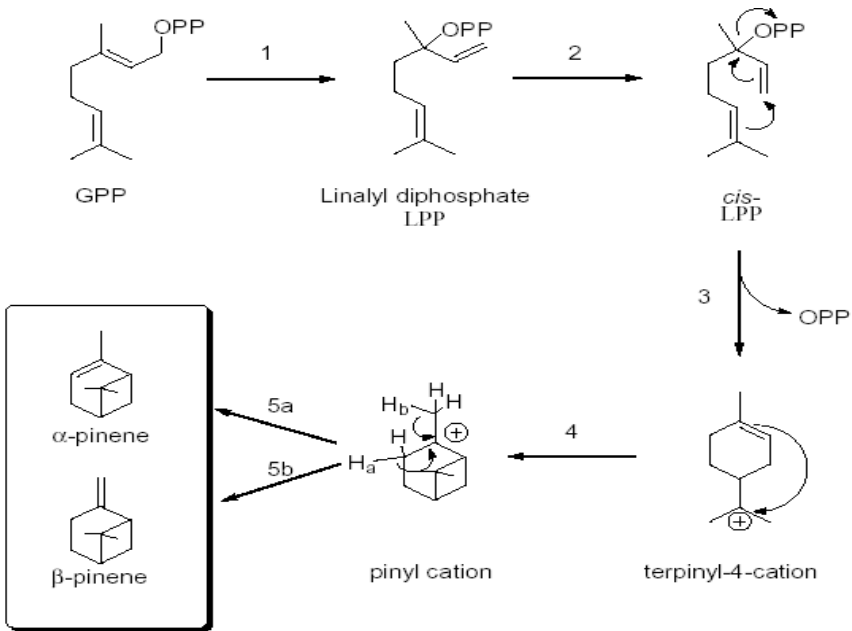
Tahap 2. Pembentukan alilik prenil diposfat, geranyl diposfat (GPP) (Gambar 3.2). GPP adalah prekursor dari semua monoterpena.



Gambar 3.2. Tahap kedua dalam biosintesis monoterpena.

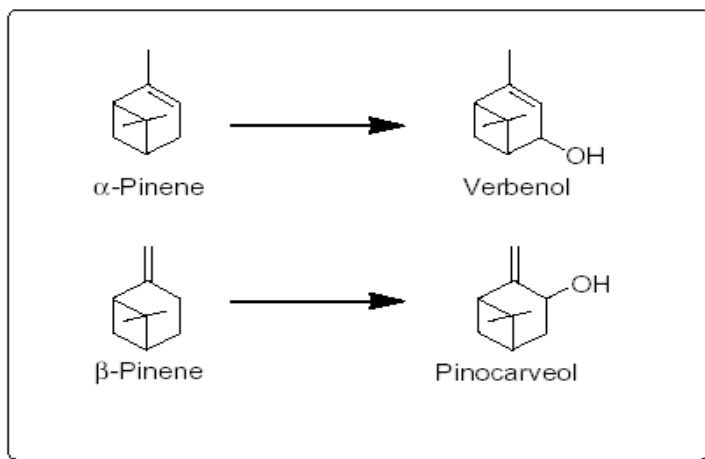
Tahap 3. Elaborasi geranyl diposfat, seperti GPP ke dalam monoterpena (Gambar 3.3). Reaksi ini dikatalisis dengan sintesis monoterpena spesifik (Schwab *et al*, 2002). Pembentukan pinana dimulai dengan isomerisasi dan siklisasi GPP menjadi kation alpha-terpinil melalui linalil diposfat (LPP) (Cane, 1999, Wise and

Croteau, 1999). Kedua isomer α -pinena dan β -pinena terjadi secara alami dimana β -pinena melalui enantiomerisasi enantiomer (1S)-kation 4-terpinil.



Gambar 3.3. Tahap ketiga biosintesis monoterpene klas pinana.

Tahap 4. Modifikasi sekunder dari produk isoprenooid induk. Reaksi enzimatik sekunder meliputi hidroksilasi ke monooksigenasi sitokrom P-450, transformasi redoks dan isomerisasi (Mc Cascill dan Croteau, 1997). Monoterpena pinana teroksigenasi seperti verbenol dan pinokarveol dihasilkan dari α -pinena dan β -pinena (Gambar 3.4).



Gambar 3.4 Beberapa monoterpena hidrokarbon komponen dari minyak terpenin. Senyawa ini sering digunakan sebagai senyawa aroma sintetis dan juga digunakan sebagai komponen *flavoring* dan *fragrance*.

Beberapa sintesis senyawa terpena sebagai *flavor* dan *fragrance* yang dibuat dari mikroorganisme dan tumbuhan fungi telah dilakukan (Demytenaere *et al.* 2001). Meskipun dengan cara ini produk yang dihasilkan rendah. Bakteri pseudomonas telah biasa digunakan untuk degradasi monoterpena. Monoterpena diubah menjadi CO_2 dan H_2O (Hungund *et al.* 1970). Jamur dan bakteri hanya dapat merubah terpena jika menggunakan media yang kaya energi. Biotransformasi α -pinena yang telah dilakukan disajikan pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Biotransformasi α -pinena dengan berbagai mikroorganisme (Linmark,2003)

Mikro-organisme	Produk Mayor			Referensi
	Alilik oksidasi	Epoksidasi	Reaksi lain	
<i>Picea abies</i>	Trans-verbenol, verbenon, mirtenol		α -terpineol, trans pinokarveol, trans sobrerol	Linmark, 2003
<i>P-450cam</i>	Trans-verbenol, verbenon, mirtenol	α -pinena oksida		Bell <i>et al</i> ,2003
<i>Rosa sentivolia</i>	Trans-verbenol,			Corbier and Ehret, 1986
<i>Nicotiana tabacum</i>	Verbenon	α -pinena epoksida	Verbenon	Hirata <i>et al</i> . 1994
<i>Hyssop officinalis</i>	Trans-verbenol			Karp and Croteau, 1992
<i>Aspergillus sp.</i> <i>Penicilium sp.</i>	Trans-verbenol Verbenon		Trans-pinokarveol, sobrerol	Agraval <i>et al</i> , 1999
<i>Bacidomycetes</i>	Trans-verbenol, mirtenol, verbenon, mirtenal		Trans-pinokarveol, sobrerol, α -terpineol, carveol, carvon	Busmann and Berger, 1994 (a)
<i>Pholiota squarrosa</i>	Trans-verbenol, verbenon, mirtenol		Trans-pinokarveol, p-ment-2-ena-1,8-diol	Busmann and Berger, 1994 (B)
<i>Aspergillus niger</i>	Cis verbenol, verbenon		Sobrerol	Rama Devi and Bhattarachyya, 1978
<i>Serratia marcescens</i>	Trans-verbenol ,mirtenol		Trans-sobrerol	Wright <i>et al</i> , 1986
<i>Armillanella mellea</i>	Trans-verbenol, verbenon, mirtenol		sobrerol, carveol, carvakrol	Draezynska et al, 1985

Mikro-organisme	Produk Mayor			Referensi
	Alilik oksidasi	Epoksidasi	Reaksi lain	
<i>Armillanella mellea</i>			α -terpineol Sobrerol,	Draezynska Lusiak and Slewinski 1989
<i>P. Putida</i>		α -pinena epoksida		Gibbon and Pirth, 1971
<i>P.fluoroscens</i>	Mirtenol		Limonena, perilil alkohol	Best <i>et al.</i> , 1987
<i>P. maltophitia</i>			Limonena, borneol, kamfer, asam perilat, asam 2-(4- metil-3- sikloheksenil diena propiionat	Narushima <i>et al.</i> , 1982
<i>Pseudomonas sp.</i>			Carveol	Rhodes and Winskill, 1985
<i>Candida tropicalis</i>			α -terpineol p-ment-2na- 1,2-diol	Chatterjee <i>et al.</i> , 1999

Terpenoid pada umumnya mempunyai aktivitas anti mikroba. Jika substrat yang digunakan terlalu besar (konsentrasi lebih dari 0,05% v/v), maka dapat terjadi lisis pada sel atau kultur mengalami pertumbuhan berlawanan atau sebagai inhibitor (Vander Werf, *et al*, 1997). Demikian pula oleh Brown *et al* (1987), jika konsentrasi α -pinena yang digunakan konsentrasi 0,5 g/L, maka pertumbuhan kultur pelargonium akan mati. Produk yang dihasilkan dari biotransformasi ini adalah beracun. Untuk mengatasi masalah antimikroba ini, substrat yang ditambahkan secara kontinue dan dengan lambat atau dengan sistem dua fasa

(fase cair dan fase organik). Untuk menghindari efek toksis dari monoterpena konsentrasi substrat dibuat 0,16-0,32 g/l.

Ada beberapa hal penting yang diperhatikan dalam biotransformasi monoterpena monoterpena adalah substrat toksik.

1. Hidrokarbon adalah larut dalam air.
2. Monoterpena mudah menguap selama biotransformasi, yang dapat kehilangan substrat atau produk.
3. Biotransformasi terpena sering menghasilkan campuran produk.
4. monoterpena adalah senyawa yang relatif tidak stabil, contoh dapat terjadi autooksidasi spontan.

3.2 Lipase

Lipase sebagai kelas enzim yang stabil dan sebagai katalis yang berguna untuk aplikasi secara praktis dan industri. Lipase biasanya digunakan untuk merubah alkohol, ester asam karboksilat, sianohidrin, klorohidrin, diol, amina, diamina, dan amino alkohol (Nawani, 2006).

Lipase adalah enzim ekstraselular yang dihasilkan dalam medium kultur, meskipun ada juga lipase intraselular yang telah dilaporkan. Pada beberapa mikroorganisme, produksi lipase ditumbuhkan dan lipase ditemukan pada fase eksponensial atau fase stationer pada kurva pertumbuhan.

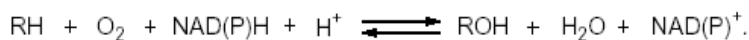
Produksi lipase dilakukan dalam media yang mengandung minyak atau senyawa yang berhubungan dengan minyak. Bagaimanapun juga, produksi lipase menggunakan gula atau

karbohidrat lain sebagai sumber karbon. Produksi lipase dengan mikroorganisme dapat bertambah dengan mengoptimalkan parameter fermentasi.

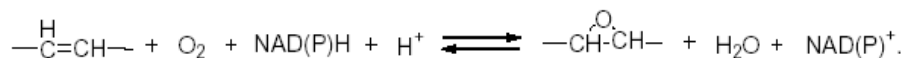
3.3 Biotransformasi terpena dengan *Lipase*

Enzim lipase dapat digolongkan sebagai enzim oksidoreduktase. Enzim oksidoreduktase adalah enzim yang dapat mengkatalisis reaksi oksidasi atau reduksi suatu bahan. Enzim yang paling utama dari golongan ini adalah oksidase dan dehidrogenase. Oksidoreduktase didasarkan pada tipe substrat dan tipe hidrogen atau elektron donor (ekseptor)). Monooksigenase (bagian dari oksidoreduktase) mengkatalisis satu atom pada dioksigen ke dalam substrat menggunakan kofaktor sehingga menghasilkan produk organik yang teroksidai dan molekul air (Gambar 3.5). Monooksigenase dapat mengkatalisis pembentukan epoksida. Beberapa oksidoreduktase memerlukan adanya kofaktor yang bersama dalam reaksi. Kofaktor dapat membentuk ikatan kovalen dari bagian aktif enzim membentuk gugus prostetik atau bereaksi dengan substrat, interaksi dengan enzim. Kofaktor yang sering digunakan untuk proses biosintesis dengan oksidoreduktase adalah nikotinamida adenin dinukleotida, NADH atau NADPH (Bugg, 1999).

A reaction of monooxygenases catalysing hydroxylation:



A reaction of monooxygenases catalysing epoxide formation:



Gambar 3.5 Reaksi terkatalisis monooksigenase

Reaksi organik dengan menggunakan lipase telah dipelajari secara intensif dan teknologi untuk produksi dan aplikasi lipase juga telah berkembang. Oleh karena itu lipase sekarang dipilih sebagai katalis yang efisien dan berguna untuk modifikasi lemak dan minyak dengan asidolisis trigliserida dan untuk sistesis atau hidrolisis ester-ester karboksilat. Lipase juga sering digunakan untuk sintesis senyawa optis aktif karena bersifat regioselektif dan stereoselektif. Demikian juga reaksi terkatalis lipase bekerja pada kondisi yang ringan, sehingga sering untuk reaksi organik.

Aktivitas lipase melalui senyawa peroksi belum menjadi perhatian. Sejauh ini, hanya kemampuan lipase untuk mengkatalisis perhidrolisis (lisis dengan hidrogen peroksida) dari ester-ester asam karboksilat, dan membentuk asam-asam peroksikarboksilat dalam larutan hidrogen peroksida. Stereospesifik dari sintesis terkatalis lipase dari ester asam asetat dengan hidroperoksida organik telah

dilakukan. Pada umumnya, asam peroksikarboksilat terbentuk secara langsung dari asam karboksilat dengan adanya lipase.

3.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri gram negatif, berbentuk batang. Hampir semua strain bergerak dengan flagel tunggal polar, beberapa galur memproduksi pigmen larut air. Bakteri ini terdapat dimana-mana baik dalam air maupun tanah, dan pada permukaan yang bersentuhan dengan air atau tanah, kadang-kadang menyerang manusia dan merupakan patogen utama dari kelompoknya. *P.aeruginosa* ini bersifat *invasif* dan toksikogenik, mengakibatkan infeksi pada pasien dengan penurunan daya tahan tubuh dan merupakan patogen nosokomial yang penting. *Pseudomonas* sering ada dalam jumlah yang sedikit pada flora normal usus dan kulit manusia dan merupakan patogen utama dari kelompoknya. *Pseudomonas* yang lain jarang menyebabkan penyakit. Klasifikasi *Pseudomonas* berdasar pada homologi rRNA/DNA dan sifat pertumbuhannya. *P. aeruginosa* tersebar luas di alam dan biasanya ada di lingkungan lembab di rumah sakit. *P. aeruginosa* dapat berada pada orang sehat, dimana bersifat saprofit. Ini menyebabkan penyakit pada manusia dengan ketahanan tubuh tidak normal. Bakteri ini metabolismenya dengan respirasi dan tidak pernah fermentative, tetapi dapat hidup tanpa adanya O₂ jika terdapat NO₃ sebagai akseptor elektron dalam proses pernafasan.

Pseudomonas aeruginosa hanya membutuhkan persyaratan yang sederhana untuk hidup, sering dijumpai hidup dalam air distilasi yang mempunyai nutrisi yang sangat minimal. Di laboratorium, nutrisi sederhana yang dibutuhkan untuk hidup adalah asam asetat sebagai sumber karbon dan ammonium sulfat sebagai sumber nitrogen. Kemampuan proses metabolisme bakteri ini sangat mengagumkan, dimana bakteri ini dapat memanfaatkan lebih dari 75 senyawa organik sebagai sumber karbon untuk tumbuh. Suhu optimum untuk tumbuh bakteri ini adalah 37°C dan dapat tumbuh hingga 40°C. Bakteri ini juga tahan terhadap garam dengan konsentrasi tinggi, antiseptic lemah serta antibiotic pada umumnya.



a

b

Gambar 3.6. Koloni *Pseudomonas aeruginosa* dalam medium agar (a) dan mikrograf *Pseudomonas aeruginosa* dengan mikroskop elektron (b)

P.aeruginosa dapat bergerak dan berbentuk batang, ukurannya 0,6 x 2 μm , merupakan bakteri Gram negatif dan terlihat

sebagai bentuk tunggal, ganda dan kadang-kadang dalam rantai pendek. Beberapa galur menghemolisis darah, *P.aeruginosa* membentuk koloni bulat halus dengan flouresen kehijauan, sering juga memproduksi pigmen kebiruan dan tidak flouresen disebut Piosianin yang larut dalam agar. Ada juga *P.aeruginosa* yang menghasilkan pigmen flouresen *Pioverdin* yang memberi warna kehijauan pada agar, *P.aeruginosa* tumbuh baik pada 37-42°C. Pertumbuhan pada 42°C membantu membedakannya dari spesies *pseudomonas* pada kelompok *flouresen* yaitu bersifat oksidase positif, tidak meragikan karbohidrat tetapi berbagai galur mengoksidasi glukosa. Identifikasi biasanya berdasar pada bentuk koloni, oksidase positifnya adanya pigmen yang khas dan tumbuh pada 42°C.

P aeruginosa menjadi patogenik hanya jika berada pada tempat dengan daya tahan tubuh menurun misalnya selaput lendir dan kulit yang rusak akibat kerusakan jaringan jika menggunakan kateter pembuluh darah atau saluran kencing atau pada netropenia seperti kemoterapi kanker. Bakteri menempel dan menyerang selaput lendir atau kulit menyebar dari tempat tersebut dan berakibat penyakit sistemik. Proses ini dipercepat oleh pili, enzim dan toksin. Lipopolisakarida mempunyai peran langsung dalam menyebabkan demam, syok, oliguria, leukositosis dan leukopenia, gangguan koagulasi darah dan gejala susah bernafas pada orang dewasa.

Penyerangan pada saluran nafas, khususnya respirator yang tercemar mengakibatkan *pneunomia nekrotik*. Bakteri sering

ditemukan pada *otitis externa* ringan pada perenang. Hal ini dapat menyebabkan *oritis externa* ganas pada penderita diabetes. Infeksi pada mata yang mengarah pada kerusakan mata dengan cepat biasanya terjadi saat luka atau setelah operasi mata.

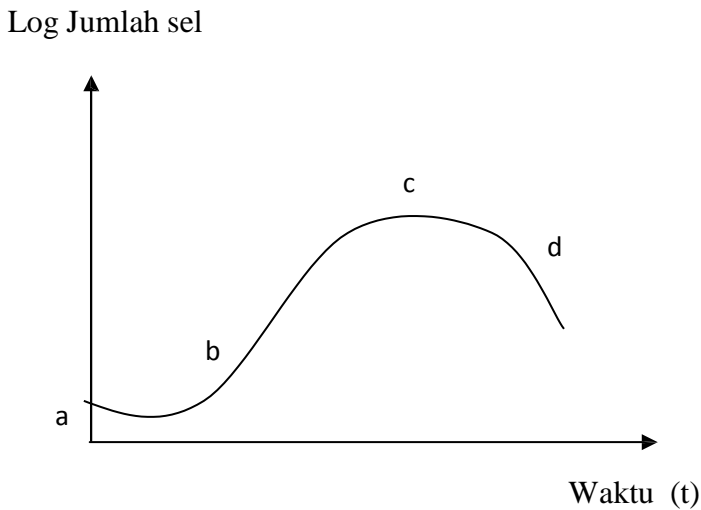
Dinding sel bakteri Gram negatif *P. aeruginosa* lebih kompleks, karena terdapat membran luar yang melindungi peptidoglikan. Struktur membran luar sama dengan membran sel, hanya yang membedakan membran luar terdiri dari fosfolipid dan lipopolisakarida, sementara membran sel terdiri atas dwilapis fosfolipid (Purwoko, 2009).

Pseudomonas sp., dapat digunakan untuk mengoksidasi senyawa alkena seperti mengkatalisis ksilena oksigenase untuk mengepoksidasi styrena ke stirena oksida dengan enantioselektifitas yang tinggi. Selektivitas epoksidasi aril diena dikatalisis dengan oksidasi dari *Pseudomonas putida* dan epoksidasi derivat akrilat tak jenuh dikatalisis dengan CPO (Chloroperoxidase) (Hu, *et all*, 2002).

Pseudomonas aeruginosa terkenal karena ketahanannya terhadap antibiotika. Bakteri ini tahan terhadap antibiotika disebabkan oleh rintangan permeabilitas yang dihasilkan oleh membran LPS pada dinding sel. *P.aeruginosa* dan *Pseudomonas* lain tahan terhadap antimikroba dan karena itu menjadi dominan dan penting jika bakteri dari flora normal ditekan. *P.aeruginosa* menyebabkan infeksi pada luka dan luka bakar, menghasilkan nanah warna hijau biru, meningitis jika masuk melalui infeksi saluran kencing.

3.5 Kurva Pertumbuhan Bakteri.

Pertumbuhan dapat didefinisikan sebagai pertambahan jumlah atau volume serta ukuran sel. Pada organisme prokariot seperti bakteri, pertumbuhan merupakan pertambahan volume dan ukuran sel dan juga sebagai pertambahan jumlah sel. Pertumbuhan sel bakteri biasanya mengikuti suatu pola pertumbuhan tertentu berupa kurva pertumbuhan sigmoid (Gambar 3.7).



Gambar 3.7. Kurva Pertumbuhan Bakteri, menunjukkan empat fase pertumbuhan: a=fase lag; b=fase eksponensial; c=fase stasioner dan d=fase kematian populasi

Perubahan kemiringan pada kurva tersebut menunjukkan transisi dari satu fase perkembangan ke fase lainnya. Nilai logaritmik jumlah sel biasanya lebih sering dipetakan daripada nilai aritmatik. Logaritma dengan dasar 2 sering digunakan, karena setiap unit pada ordinat menampilkan suatu kelipatan-dua dari populasi. Kurva pertumbuhan bakteri dapat dipisahkan

menjadi empat fase utama : fase lag (fase lamban atau lag phase), fase pertumbuhan eksponensial (fase pertumbuhan cepat atau log phase), fase stationer (fase statis atau stationary phase) dan fase penurunan populasi (decline). Fase-fase tersebut mencerminkan keadaan bakteri dalam kultur pada waktu tertentu. Di antara setiap fase terdapat suatu periode peralihan dimana waktu dapat berlalu sebelum semua sel memasuki fase yang baru.

FASE LAG. Setelah inokulasi, terjadi peningkatan ukuran sel, mulai pada waktu sel tidak atau sedikit mengalami pembelahan. Fase ini, ditandai dengan peningkatan komponen makromolekul, aktivitas metabolik, dan kerentanan terhadap zat kimia dan faktor fisik. Fase lag merupakan suatu periode penyesuaian yang sangat penting untuk penambahan metabolit pada kelompok sel, menuju tingkat yang setaraf dengan sintesis sel maksimum.

FASE LOG/PERTUMBUHAN EKSPONENSIAL. Pada fase eksponensial atau logaritmik, sel berada dalam keadaan pertumbuhan yang seimbang. Selama fase ini, masa dan volume sel meningkat oleh faktor yang sama dalam arti rata-rata komposisi sel dan konsentrasi relatif metabolit tetap konstan. Selama periode ini pertumbuhan seimbang, kecepatan peningkatan dapat diekspresikan dengan fungsi eksponensial alami. Sel membelah dengan kecepatan konstan yang ditentukan oleh sifat intrinsik bakteri dan kondisi lingkungan. Dalam hal ini terdapat keragaman kecepatan pertumbuhan berbagai mikroorganisme. Waktu lipat dua untuk *E. coli* dalam kultur kaldu pada suhu

37°C, sekitar 20 menit, sedangkan waktu lipat dua minimal sel mamalia sekitar 10 jam pada temperatur yang sama.

FASE STASIONER. Pada saat digunakan kondisi biakan rutin, akumulasi produk limbah, kekurangan nutrien, perubahan pH, dan faktor lain yang tidak diketahui akan mendesak dan mengganggu biakan, mengakibatkan penurunan kecepatan pertumbuhan. Selama fase ini, jumlah sel yang hidup tetap konstan untuk periode yang berbeda, bergantung pada bakteri, tetapi akhirnya menuju periode penurunan populasi. Dalam beberapa kasus, sel yang terdapat dalam suatu biakan yang populasi selnya tidak tumbuh dapat memanjang, membengkak secara abnormal, atau mengalami penyimpangan, suatu manifestasi pertumbuhan yang tidak seimbang.

FASE PENURUNAN POPULASI ATAU FASE KEMATIAN. Pada saat medium kehabisan nutrien maka populasi bakteri akan menurun jumlahnya, Pada saat ini jumlah sel yang mati lebih banyak daripada sel yang hidup.

Metode Penelitian Biotransformasi

4.1 Bahan-bahan

Sumber bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dari laboratorium mikrobiologi Rumah Sakit Dr. Karyadi Semarang. Media cair untuk produksi enzim lipase: Protease peptone no.3, gliserol, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, dan K_2HPO_4 . Bahan untuk uji aktivitas enzim lipase: minyak, buffer asetat 0,05M, 1 mL $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, aseton, etanol, KOH 0,1M, indikator PP dan enzim lipase. Bahan untuk biotransformasi: Hidrogen peroksida (35%), dan zat-zat kimia (α -pinena 83,4%, asam oktanoat 99%, Na_2SO_4 , dan toluene (99%)). Semua bahan yang digunakan, baik reagen maupun pelarut memiliki kualitas pro analisis (pa.), kecuali bila disebutkan lain, tanpa purifikasi lebih lanjut.

4.2 Alat-alat

- a. 1 set alat distilasi fraksinasi dengan pengurangan tekanan
- b. alat timbangan mekanik, ketelitian 1/10.000
- c. *Sentrifuge*, 2500 rpm
- d. alat-alat gelas seperti : corong pisah 60 ml, gelas ukur 10 ml, labu elenmeyer 100 ml, pipet tetes, pengaduk, dan corong;
- e. *micropipette*, Socorec 50-100 μ L
- f. *Kromatografi gas* (GC, (GC-2014 Shimadzu). Kolom yang digunakan Rtx(R)-1 Crossbond 100% dimethyl Polysiloxane).

Temperatur kolom adalah 120°C dengan suhu awal 30 menit dan bertambah sampai 180°C dengan penambahan 2°C/menit. Gas pembawa adalah helium (He) dan mengalir 0,4μL/menit. Injeksi dan temperature dideteksi pada 250 dan 250°C, dengan detektor FID dengan ketelitian 1/100.

- g. *Kromatografi gas - Spektrometer massa / GC-MS* (Shimadzu, QP-5000); dengan ketelitian kadar 1/100. Identifikasi produk (α -pinena oksida) dibandingkan dengan standart.
- h. *Spektrofotometer IR* (Hitachi 270-50 ; Perkin Elmer Paragon 1000 PC; Shimadzu FTIR-8201PC) dengan ketelitian persen transmitansi 1/1000.

4.3 Cara Kerja

Penelitian ini adalah untuk mengetahui reaksi oksidasi (biotransformasi) α -pinena dengan lipase dari *pseudomonas aeruginosa*. Semua rangkaian peralatan yang akan digunakan adalah rangkaian alat untuk reaksi pada umumnya, berupa peralatan erlenmeyer, yang dilengkapi dengan pengaduk magnet (*stirer*).

a. Uji Awal

Pada tahap ini ditentukan faktor-faktor yang dapat mempengaruhi hasil reaksi biotransformasi α -pinena. Dilakukan uji pendahuluan terhadap beberapa faktor yang diduga berperan penting dalam menentukan kinetika dan mekanisme reaksi yaitu variasi komposisi pereaksi dan waktu reaksi.

b. Produksi Lipase

Kultur (isolat *P.aeruginosa*) ditumbuhkan dalam kondisi yang optimal untuk produksi Lipase. Ke dalam tabung erlemeyer 1000 mL, yang berisi 20g protease pepton no.3; 10 g gliserol; 1,5g MgSO₄. 7H₂O; 1,5g K₂HPO₄ dan akuades pada pH 7,2, dimasukkan 2% inokulum dan diinkubasi pada temperatur 30°C selama 48 jam (Nawani *et al*, 2006). Supernatan yang mengandung lipase digunakan untuk penelitian lebih lanjut.

c. Isolasi lipase dari bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

Isolasi dimulai dengan reaksi pengendapan. Pengendapan dilakukan dengan penambahan amonium sulfat 30-70%. Ke dalam 900 mL supernatan yang mengandung kultur, ditambahkan ammonium sulfat 50% pada temperatur 4°C. Endapan yang diperoleh dikumpulkan dengan sentrifuse pada kecepatan 2700 rpm, temperatur 5°C, selama 20 menit. Supernatan digunakan untuk penentuan aktivitas lipase dan penentuan kadar protein, sedangkan pelet digunakan untuk reaksi biotransformasi pinena.

d. Uji aktivitas lipase

Aktivitas lipase ditentukan dengan menggunakan metode Linfield, *et al*, 1984. masukkan dalam erlenmeyer minyak sawit 2 g, buffer asetat 0,05M pH5,6 4 mL, CaCl₂.2H₂O 1M 2 mL, dan 1 mL enzim. Campuran diaduk selama 60 menit pada temperatur 30°C. Kerja enzim diinaktifkan dengan menambahkan 10 mL campuran aseton dan etanol (1:1). Campuran dititrasi dengan KOH

0,1 M, dengan menambahkan 2-3 tetes indikator PP. Diamati perubahan warnanya dari tidak berwarna menjadi merah muda. Hal di atas dilakukan untuk blangko, enzim diinaktifkan dulu dengan aseton dan etanol.

e. Penentuan kadar protein.

Kadar protein larutan enzim ditentukan dengan menggunakan metode Bradford, dengan reagen dari *Bio-Rad Protein Assay*, dengan menggunakan *bovin serum albumin* (BSA) sebagai standart.

f. Reaksi biotransformasi α -pinena dengan enzim lipase

Ke dalam erlenmeyer kapasitas 100 ml yang dilengkapi dengan pengaduk magnetik dimasukkan 1,63 α -pinena (10 mmol), 1,6 mL asam oktanoat (10mmol), dan toluena 5 mL serta 100 mg enzim lipase dari *pseudomonas aeruginosa*. Reaksi diawali dengan penambahan okson (10 mmol) yang ditambahkan secara bertahap ke dalam campuran. Campuran diaduk selama 6 jam pada temperatur kamar. Hasil reaksi dicuci dengan akuades. Lapisan organik dipisahkan dari lapisan air. Lapisan organik ditambahkan dengan Na_2SO_4 anhidrous untuk menghilangkan sisa air. Filtrat dianalisis dengan menggunakan GC-MS. Reaksi biotransformasi dilakukan dengan variasi perbandingan konsentrasi enzim dan substrat (pinena), tingkat keasaman dan temperatur reaksi serta waktu reaksi (1-6 jam).

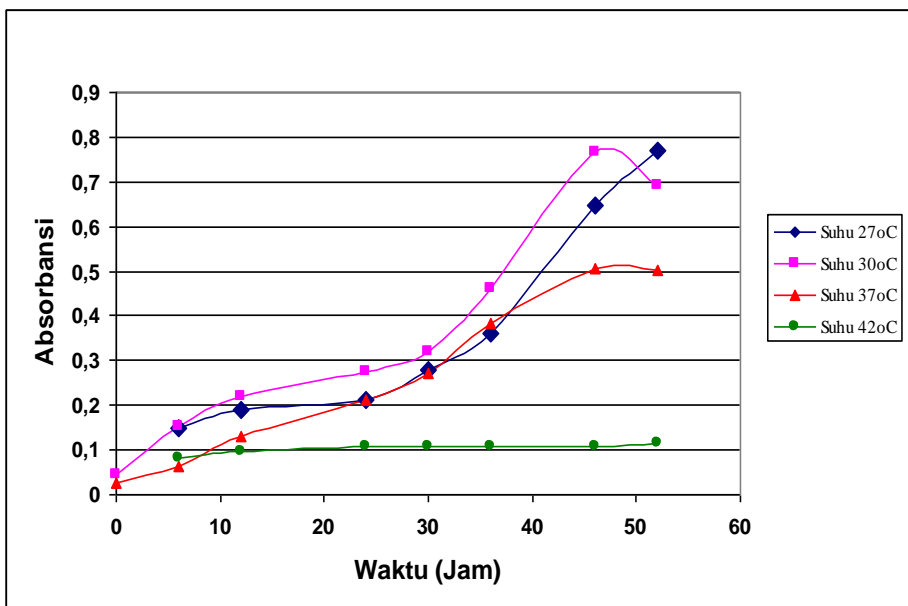
g. Analisis data

Analisis data dilaksanakan setelah diperoleh data pengujian untuk membuat kesimpulan di tahun pertama serta memberikan rekomendasi metode yang digunakan untuk meningkatkan hasil biotransformasi secara enzimatis. Analisis data dengan metode spektroskopi IR, GC dan GC-MS, akan dapat diketahui sistem mana yang lebih efektif sehingga dapat diketahui mekanisme reaksi biotransformasi α -pinena dengan enzim lipase dari *Pseudomonas aeruginosa*. Demikian seterusnya, hingga kesimpulan keseluruhan penelitian sesuai dengan diharapkan.

Hasil Penelitian Bioiransformasi Alfa Pinena

5.1 Hasil Pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yang diperoleh dari laboratorium bagian mikrobiologi RS. Dr. Karyadi Semarang. Pada penelitian ini melakukan pertumbuhan bakteri dengan pH 7,2 dan variasi temperatur yaitu temperatur 27°C, 30°C, 37°C, 42°C .

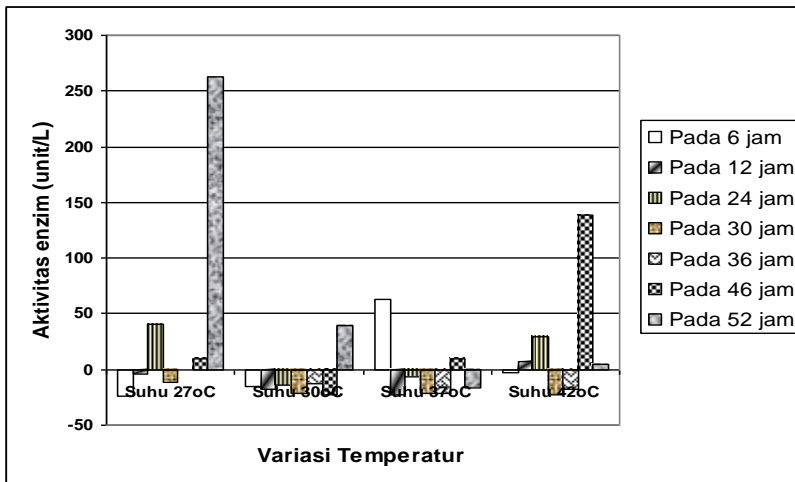


Gambar 5.1 . Pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Pada Gambar 5.1, menunjukkan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* tumbuh dengan baik pada temperatur 30°C, pH 7,2, bila dibandingkan dengan temperatur yang lain. Pada temperatur 30°C bahwa pada jam ke-0 sampai jam ke-30 pertumbuhan bakteri lambat, hal ini dikarenakan pada masa tersebut bakteri sedang beradaptasi terhadap lingkungan atau tahap ini disebut fase lag. Pada fasa ini bakteri tidak melakukan pembelahan, tetapi bakteri melakukan sintesis enzim, protein, RNA, dan meningkatkan aktivitas metabolisme. Pada jam ke- 30 sampai jam ke-46 menunjukkan pertumbuhan bakteri mulai mengalami pembelahan yang sangat cepat. Fase ini disebut fase eksponensial, pada fase ini sel-sel saling membelah secara biner teratur menurut deret geometri. Kecepatan pembelahan sel pada fase ini tergantung pada komposisi medium dan proses inokulasi. Komposisi medium yang sesuai akan mempercepat proses pembelahan sel karena tersedianya nutrisi yang cukup sehingga proses metabolisme dalam sel akan meningkat. Mulai jam ke-46 aktivitas bakteri mulai menurun, hal ini dikarenakan bakteri sudah tidak dapat melakukan metabolisme karena tidak ada lagi nutrisi dalam medium. Pada fase ini disebut fase kematian (*death fase*). Fase ini bakteri yang mati mengalami lisis sehingga pada pengukuran turbiditas fase ini menghasilkan garis yang mulai menurun.

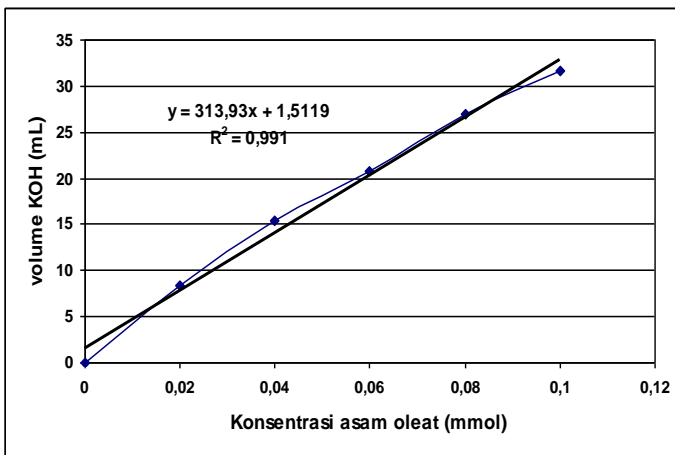
5.2 Aktivitas enzim lipase

Aktivitas enzim diukur pada setiap temperatur pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yaitu temperatur 27°C, 30°C, 37°C, 42°C dan masing-masing temperatur diukur aktivitasnya pada jam ke-6, jam ke-12, jam ke-24, jam ke-30, jam ke-36, jam ke-46, jam ke-52. Aktivitas enzim dapat ditunjukkan pada Gambar 5.2.



Gambar 5.2. Aktivitas enzim lipase

Pengujian aktivitas enzim lipase yaitu dengan dititrasi menggunakan KOH. Aktivitas enzim dapat dilakukan dengan menghitung selisih volume KOH antara sampel dengan blangko saat dititrasi, kemudian dikonversikan terhadap kurva standarisasi asam oleat. Kurva standarisasi asam oleat dapat ditunjukkan pada Gambar 5.3.



Gambar 5.3. Standarisasi asam oleat

Pada Gambar 5.3, diperoleh persamaan $y = 313,93x + 1,5119$, dimana selisih volume KOH yang paling besar yaitu pada temperatur 27°C pH 7,2 jam ke-52 yaitu sebesar 16,3625 mL, ini sebagai harga y, sehingga dapat dimasukkan kedalam persamaan sebagai berikut:

$$y = 313,93x + 1,5119$$
$$16,3625 = 313,93x + 1,5119$$

$$x = 0,04730545026 \text{ mmol}$$

$$x = 47,30545026 \text{ } \mu\text{mol}$$

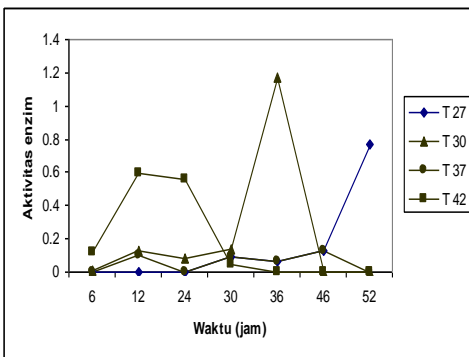
Dari harga x yang diperoleh dimasukkan ke dalam persamaan sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim lipase} &= X \times \frac{1}{V} \times \frac{1}{t} \\ &= 47,30545026 \text{ } \mu\text{mol} \times \frac{1}{3 \text{ ml}} \times \frac{1}{60 \text{ menit}} \\ &= 0,26280833 \text{ } \mu\text{mol menit}^{-1} \text{ ml}^{-1} \\ &= 0,26280833 \text{ unit ml}^{-1} \\ &= 262,80833 \text{ unit L}^{-1} \end{aligned}$$

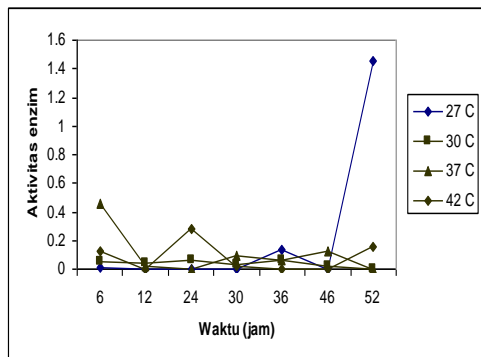
Jadi dari perhitungan tersebut dapat disimpulkan bahwa satu unit aktivitas enzim lipase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat membebaskan satu μmol asam oleat dari minyak terpenin per menit pada kondisi percobaan.

Berdasarkan data pada Gambar 5.4, menunjukkan bahwa aktivitas enzim terbesar pada pH 6.2, 7.2 dan 8.2 berturut-turut adalah 30, 27 dan 27°C.

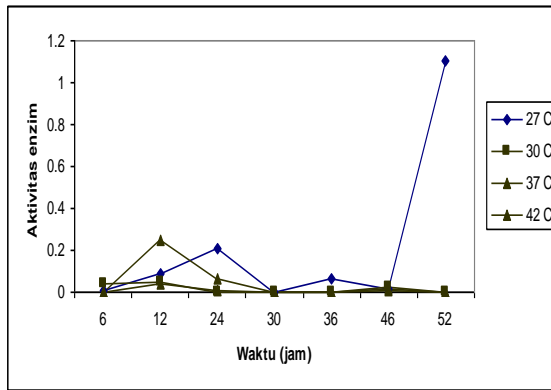
pH 6.2



pH 7.2



pH 8.2



Gambar 5.4. Kurva uji aktivitas lipase dari Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada berbagai pH 6,2, 7,2 dan 8.2 dengan variasi temperatur (27, 30, 37, dan 42)

Uji aktivitas lipase (u/mL), dengan metode titrimetri (Gambar 5.5) dihitung dengan rumus sebagai berikut.

$$= [(A-B) \times N \text{ KOH} \times 1000] / (W \times 60),$$

dimana; A = mL KOH untuk sampel
B = mL KOH untuk blanko
N = normalitas KOH
1000 = konversi dari mmol ke μmol
W = berat minyak
60 = waktu inkubasi (menit)



Gambar 5.5. Hasil titrasi pada uji aktivitas lipase

Isolasi Lipase selanjutnya dilakukan dengan reaksi pengendapan, yaitu dengan penambahan amonium sulfat 50%. Lipase kemudian diisolasi dengan cara disentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit pada temperatur 4°C. Enzim ekstraselular yang dihasilkan kemudian digunakan untuk reaksi biotransformasi α -pinena (Gambar 5.6).



Gambar 5.6 Hasil isolasi lipase pada medium cair dari *Pseudomonas aeruginosa*

5.3 Hasil Reaksi α -Pinena dengan enzim lipase dari

Pseudomonas aeruginosa

α -Pinena merupakan senyawa monoterpena bisiklis yang merupakan cincin beranggota empat. Adanya gugus metil sebagai gugus pendorong elektron dan cincin beranggota empat pada α -pinena ini menyebabkan ikatan rangkap dua karbon-karbonnya (gugus alkena) mudah diadisi oleh reagen elektrofilik. Sifat inilah yang menyebabkan α -pinena dimungkinkan sangat reaktif terhadap oksidator. Menurut Skouridou, *et al*, 2003, Suatu lipase dari *Candida antarctica* yang diimobilisasi dapat mengkatalisis asam peroksikarboksilat dari asam karboksilat dan hidrogen peroksida; asam peroksi yang terbentuk dapat diaplikasikan untuk epoksidasi α -pinena.

Asam peroksioktanoat dapat diturunkan dari asam oktanoat dengan hidrogen peroksida dengan variasi macam sumber lipase (Tabel 5.1) dan variasi asam peroksikarboksilat dalam pelarut heksana dengan Lipase dari *C.Antarctica* yang diimobilisasi telah diteliti Bjorkling, *et al*, 1990 (Tabel 5.2).

Tabel 5.1. Sintesis asam peroksioktanoat dengan variasi sumber lipase.

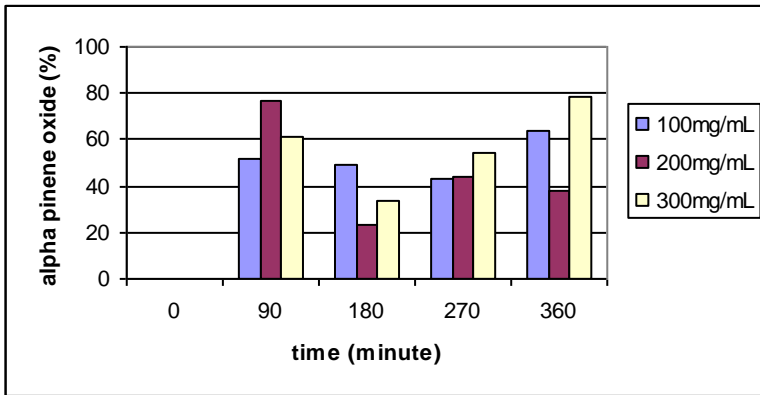
Sumber lipase	Asam peroktanoat yang terbentuk selama 120 menit (mmol dm^{-3})
<i>Candida antartica</i>	33
<i>Mucor miehei</i>	0
<i>Humicola sp</i>	19
<i>Candida cylindracea</i>	20
<i>Pseudomonas sp.</i>	25

Tabel 5.2. Sintesis beberapa asam peroksikarboksilat dalam pelarut heksana

Asam Karboksilat	Asam peroksi yang terbentuk selama 120 menit (mmol dm^{-3})
Asam oktanoat	33
Asam Dekanoat	41
Asam Dodekanoat	24
Asam Tetradekanoat	55
Asam Heksadekanoat	35

a. Pengaruh konsentrasi enzim

Hasil analisis pengaruh konsentrasi enzim dalam campuran reaksi, menunjukkan bahwa jika konsentrasi lipase bertambah, maka jumlah pinena oksida juga bertambah (Gambar 5.7). Hal ini menunjukkan bahwa makin banyak lipase yang digunakan sebagai katalis pada reaksi biotransformasi, makin banyak pula terjadi tumbukan antar molekulnya, sehingga produk reaksi yang dihasilkan makin banyak.



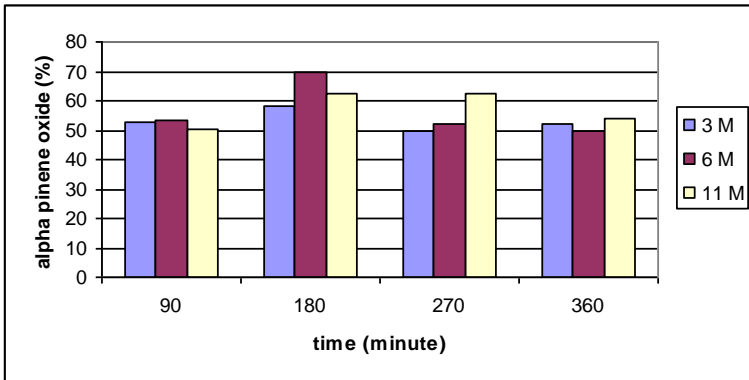
Gambar 5.7 Pengaruh konsentrasi enzim terhadap kadar α -pinena oksida

Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Skouridou, *et all*, 2003. dengan melakukan reaksi sintesis α -pinena oksida dengan enzim lipase dari *Candida antarctica*. Pada tabel 5 dapat dilihat bahwa jika konsentrasi lipase bertambah, maka jumlah pinena oksida juga bertambah. Konversi alkena paling tinggi yang diamati setelah 3 jam pada reaksi enzimatik, ketika hidrogen peroksida telah ditambahkan dalam campuran reaksi. Setelah 24 jam berlangsung, konsentrasi pinena oksida dalam dalam campuran reaksi berkurang, dimungkinkan disebabkan masalah ketidakstabilan produk yang terbentuk dalam sistem reaksi .

b. Pengaruh konsentrasi H_2O_2

Konsentrasi hidrogen peroksida merupakan parameter yang penting pada sintesis epoksida. Konversi paling tinggi (70%)

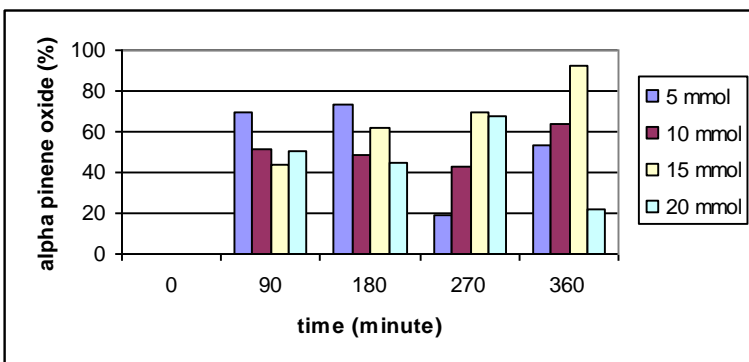
dicapai jika digunakan H_2O_2 6 M (Gambar 5.8). Jika konsentrasi H_2O_2 rendah yang digunakan, konversi lebih lambat tetapi stabil setelah 24 jam (Skouridou, *et al*, 2003).



Gambar 5.8 Pengaruh konsentrasi H_2O_2 terhadap kadar α -pinena oksida

c. Pengaruh mmol asam oktanoat

Mmol asam oktanoat juga merupakan parameter yang penting pada sintesis epoksida. Konversi paling tinggi (73%) dicapai jika digunakan asam oktanoat 5 mmol (Gambar 5.9).



Gambar 5.9 Pengaruh mmol asam oktanoat terhadap kadar α -pinena oksida

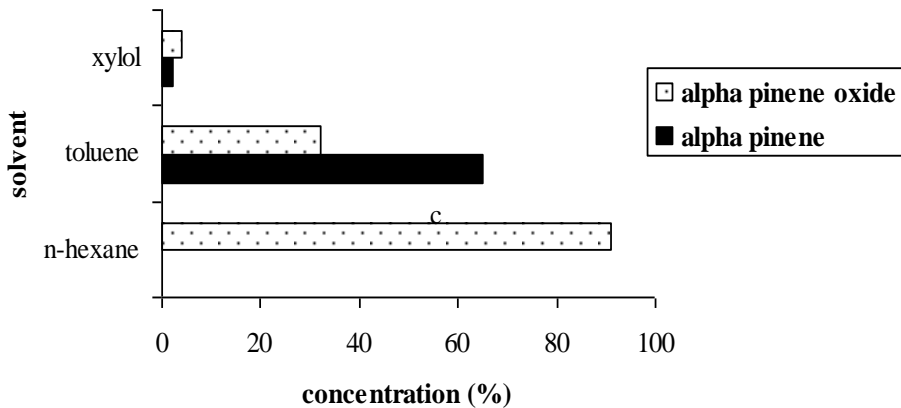
Aplikasi enzim dalam sintesis organik, telah dibuktikan bahwa lipase yang diimobilisasi dapat diaplikasikan untuk merubah asam peroksikarboksilat dalam solven organik secara langsung dari asam karboksilat induk dan hidrogen peroksida. Selanjutnya asam peroksi dalam kondisi reaksi yang ringan dapat diaplikasikan untuk mengepoksidasi alkena.

Tabel 5.3. Pengaruh konsentrasi enzim (penambahan 6M H₂O₂ 3 jam)

Konsentrasi enzim (mg/mL solven)	α -Pinena oksida (mM) yang terbentuk setelah...		
	80 menit	180 menit	24 jam
10	147.6	498	178.6
20	256.2	741.1	270.1
30	283.2	725.2	320.1
40	288.4	1226.8	844.4

Beberapa solven juga telah diteliti untuk mendegradasi perasam terkatalis lipase, hasil asam peroksi yang paling baik menggunakan toluena, xilena atau heksana, hasil yang kurang baik jika menggunakan pelarut dioksan atau asetonitril. Berdasarkan hasil penelitian, lipase umumnya menggunakan pelarut yang tidak larut dalam air. Sintesis asam peroksikarboksilat terkatalis lipase, menguntungkan dalam sistem dua fasa dimana enzim yang diimobilisasi sangat efisien untuk mengkatalisis reaksi pada

antarfase air-solven. Lipase yang diimmobilisasi dari *Pseudomonas Sp.* baik untuk sintesis asam peroksioktanoat dibandingkan lipase dari sumber yang lain dalam pelarut heksana (Gambar 5.10).



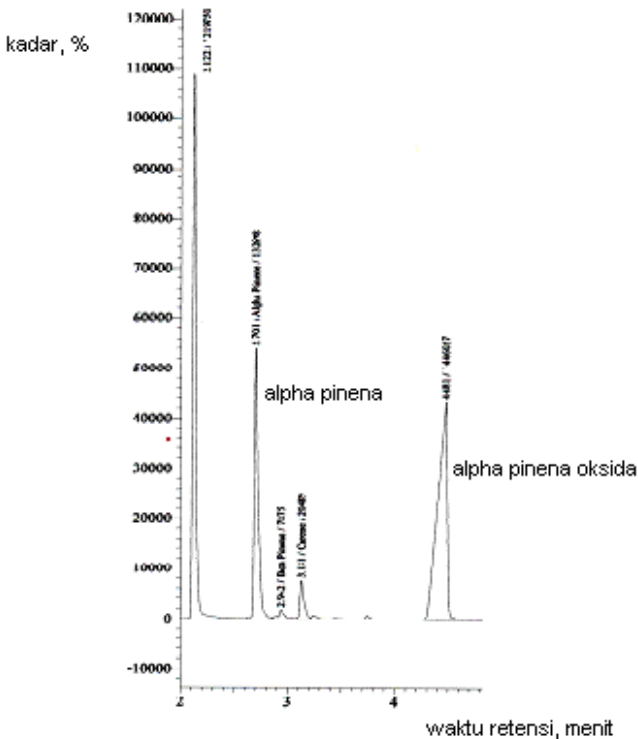
Gambar 5.10 Pengaruh pelarut pada reaksi biotransformasi α -pinena

Lipase kehilangan aktivitasnya jika menggunakan hidrogen peroksida pada konsentrasi tinggi tetapi 75% aktivitasnya jika direaksikan dengan 50 mmol dm^{-3} asam peroktanoat untuk 20 jam. Demikian juga, hasil asam peroksikarboksilat dapat bertambah dengan penambahan hidrogen peroksida secara bertahap dalam campuran reaksi. Pada penelitian ini, penambahan oksidator ditambahkan secara bertahap dalam waktu 1,5 jam.

Hal yang paling penting yang mempengaruhi konversi α -pinena ke α -pinena oksida adalah kecepatan penambahan hidrogen peroksida. Seperti ditunjukkan pada gambar 18, konversi α -pinena diperoleh jika hidrogen peroksida ditambahkan dalam campuran

reaksi selama 1,5 jam. Hal ini menunjukkan bahwa α -pinena oksida tidak larut dalam air, dan sebagai hasil hidrolisis dan sebagai produk yang terbentuk. Jika H_2O_2 ditambahkan selama 6 jam, konversi α -pinena ke α -pinena oksida lebih lambat dan konversi setelah 7 jam adalah 30% (Skouridou, *et al*, 2003). Berdasarkan hal tersebut di atas, pada penelitian ini penambahan H_2O_2 dilakukan selama 1,5 jam.

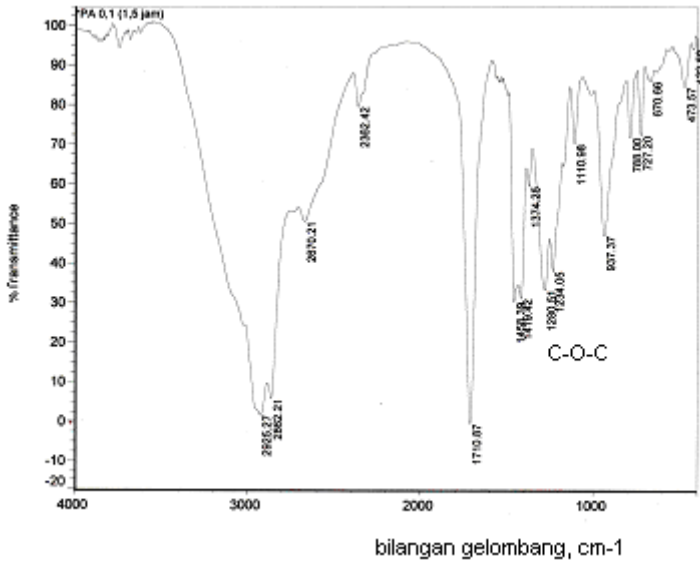
Kromatogram hasil reaksi biotransformasi α -pinena disajikan pada Gambar 5.11.



Gambar 5.11. Kromatogram hasil reaksi biotransformasi α -pinena dengan enzim lipase dari *Pseudomonas aeruginosa*

Analisis dengan kromatografi gas (Gambar 5.11), di mana reaksi biotransformasi α -pinena dengan enzim lipase dari *Pseudomonas aeruginosa* dilakukan pada temperatur kamar, pH 7-8, waktu pengadukan 250 menit menunjukkan bahwa puncak dengan waktu retensi 5,542 menit adalah α -pinena oksida dengan kadar 70%.

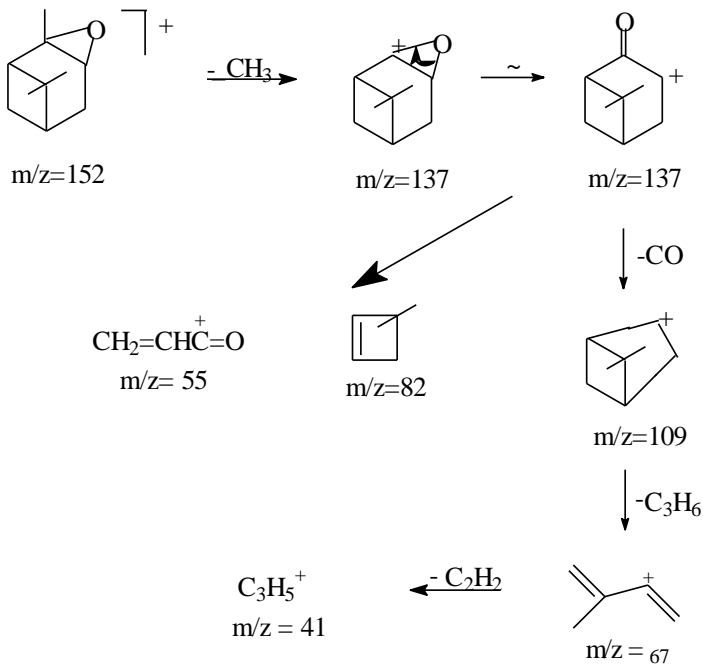
Analisis secara spektroskopi terhadap epoksida hasil reaksi α -pinena dengan dioksirana dilakukan tanpa pemisahan produk atau sisa reaktan. Spektrum IR (Gambar 5.12) menunjukkan hasil reaksi biotransformasi α -pinena dengan enzim lipase dari *Pseudomonas aeruginosa*. Puncak di daerah 1710 cm^{-1} menunjukkan adanya senyawa karbonil. Adanya tiga puncak pada daerah 1280 cm^{-1} , 937 cm^{-1} dan 727 cm^{-1} adalah tiga ciri untuk serapan epoksida. Hal ini menunjukkan bahwa reaksi biotransformasi α -pinena dengan enzim lipase dari *Pseudomonas aeruginosa* dapat menghasilkan senyawa epoksida.



Gambar 5.12. Spektrum IR hasil reaksi biotransformasi α -pinena dengan enzim lipase dari *Pseudomonas aeruginosa*

Fakta percobaan menunjukkan bahwa reaksi biotransformasi α -pinena dengan enzim lipase dari *Pseudomonas aeruginosa* menghasilkan produk α -pinena oksida yang cukup tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa α -pinena (sebagai senyawa trisubstitusi) merupakan sangat reaktif atau mempunyai kereaktifan yang tinggi terhadap asam peroksioktanoat. Reaksi biotransformasi α -pinena dengan enzim lipase dari *Pseudomonas aeruginosa* terjadi pada kondisi ringan dan dapat menghasilkan produk lebih dari 60%. Hal ini menunjukkan bahwa enzim lipase merupakan katalisator yang reaktif, spesifik dan bersifat regioselektif. Reaksi α -pinena dengan asam monoperftalat menghasilkan α -pinena

oksida 48%, dengan okson 12,5% dan dengan H₂O₂ tanpa enzim lipase menghasilkan produk 3,5% dan dengan dimetildioksirana 80% (Nanik, 2004).



Gambar 5.13. Skema Fragmentasi Senyawa α -Pinena Oksida

Fragmentasi / pemecahan senyawa α -pinena oksida ($M_r = 152$) disajikan pada Gambar 5.13. Tidak munculnya $M^+ = 152$, dimungkinkan senyawa α -pinena oksida tidak stabil. Pecahan dengan $m/z = 137$ dimungkinkan dihasilkan dari terlepasnya radikal gugus metil dari molekul induk, melalui penataan ulang menjadi senyawa karbonil. Pecahan dengan $m/z = 109$ dihasilkan

dari terlepasnya gugus -CO (karbonil) dari $m/z = 137$. Pecahan dengan $m/z = 109$ dapat mengalami pemecahan dengan terlepasnya gugus C_3H_6 sehingga menghasilkan pecahan dengan $m/z = 67$ yang merupakan puncak dasar.

Pada Tabel 5.4, disajikan perbandingan hasil reaksi dengan berbagai variasi konsentrasi reaktan berdasarkan data dari kromatografi gas

Tabel 5.4 Analisis Hasil Reaksi Biotransformasi α -Pinena dengan enzim lipase dari *P. Aeruginosa* variasi perbandingan mol reaktan

Pinena: okson: Asam Oktanoat: enzim lipase = 1 : 1 : 1 : 3				
Senyawa Hasil	Waktu (jam)			
	1	2	3	4
Pinena sisa	0,44	0,36	0,34	0,24
Pinena Oksida	18,67	23,48	62,68	76,18
C	9,36	23,05	6,81	5,56
D	7,63	11,64	12,27	11,91
Pinena: okson: Asam Oktanoat: enzim lipase = 3 : 1 : 1 : 1				
Senyawa Hasil	Waktu (jam)			
	1	2	3	4
Pinena sisa	42,19	12,12	8,13	3,16
Pinena Oksida	33,33	68,33	73,76	75,39
C	2,38	7,29	5,79	4,81
D	3,75	9,47	8,99	9,96
Pinena: okson: Asam Oktanoat: enzim lipase = 1 : 1 : 1 : 1				
Senyawa Hasil	Waktu (jam)			
	1	2	3	4
Pinena sisa	3,87	0,95	0,7	0,12
Pinena Oksida	33,75	43,81	56,69	72,04
C	10,17	12,69	7,54	6,88
D	6,83	6,82	11,83	12,81

Pinena: okson: Asam Oktanoat: enzim lipase = 1 : 1 : 0.5 : 1				
Senyawa Hasil	1	2	3	4
Pinena sisa	38,47	6,76	6,5	6,37
Pinena Oksida	33,75	56,95	58,09	64,19
C	7,33	12,93	16,75	7,58
D	3,52	9,78	8	7,85

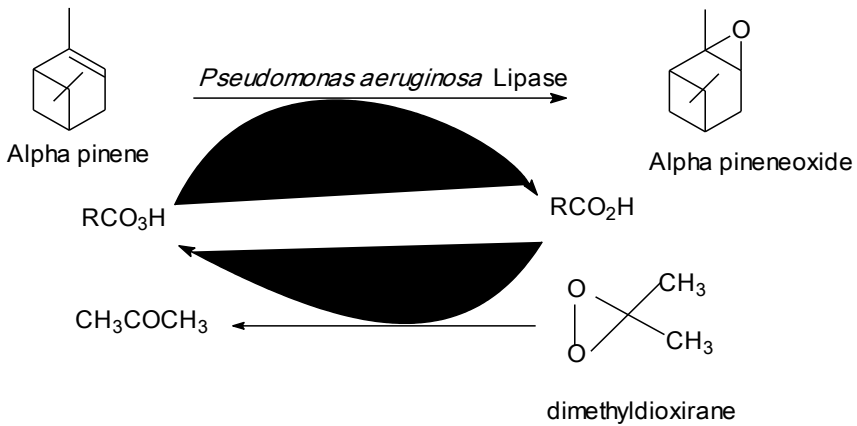
Pinena: okson: Asam Oktanoat: enzim lipase = 1 : 0.5 : 0.5 :

1				
Senyawa Hasil	1	2	3	4
Pinena sisa	65,64	8,93	6,96	6,79
Pinena Oksida	10,55	51,29	53,96	58,11
C	4,69	15,94	14,59	12,38
D	0	7,46	6,87	7,45

Keterangan : A. Perbandingan Konsentrasi α -pinena : Okson. Reaksi Biotransformasi dilakukan pada temperatur 25-28°C, katalis enzim, buffer NaHCO_3 , pelarut toluena 20 ml, aseton 4 ml, asam oktanoat 0,8 mL

Biotransformasi α -pinena dengan enzim lipase terjadi pada kondisi ringan dan dapat menghasilkan produk lebih dari 60%. Hal ini menunjukkan bahwa enzim lipase adalah katalis yang reaktif, spesifik dan bersifat regioselektif. Untuk perbandingan, reaksi α -pinena dengan asam monoperftalat menghasilkan α -pinena oksida 48%, dengan okson 12,5% dan dengan H_2O_2 menghasilkan produk 3,5%. Reaksi pada kondisi sama dan dilakukan 3-4 jam. Hasil yang rendah ini disebabkan adanya reaksi penataan ulang dan pembukaan cincin epoksida.

Berdasarkan pembahasan diatas, dapat dituliskan skema reaksi biotransformasi α -pinena dengan enzim lipase dari *Pseudomonas aeruginosa* (Gambar 5.14). α -Pinena sangat reaktif terhadap oksidator. Suatu lipase dari *Pseudomonas aeruginosa* yang diimobilisasi dapat mengkatalisis pembentukan asam peroksioktanoat dari asam karboksilat dan okson; asam peroksi



yang terbentuk dapat mengoksidasi α -pinena menjadi α -pinena oksida.

Gambar 5.14. Skema reaksi biotransformasi α -pinena dengan enzim lipase dari *Pseudomonas aeruginosa*

BAB 6

PENUTUP

Minyak terpentin dapat disuling dari pohon pinus. Komponen utama dari minyak terpentin adalah senyawa α -pinena (>80%), yang termasuk dalam golongan senyawa monoterpena. Selama ini minyak terpentin harganya murah dan hanya digunakan sebagai pengencer dan pelarut cat. Upaya untuk meningkatkan nilai ekonomi dari minyak terpentin adalah dengan melakukan reaksi derivatisasi melalui biotransformasi dengan suatu enzim lipase.

Reaksi biotransformasi α -pinena dapat dilakukan dengan menggunakan katalis enzim lipase.. Suatu lipase dari *Pseudomonas aeruginosa* yang diimmobilisasi dapat mengkatalisis pembentukan asam peroksioktanoat dari asam karboksilat; asam peroksi yang terbentuk dapat mengoksidasi α -pinena menjadi α -pinena oksida

DAFTAR PUSTAKA

- Armstrong, A., Liyas Washington, and K.N. Houk, 2000, Transition state Stereoselektions in Alkenes Epoxidation by Fluorinated Dioxiranes, *J.Am.Chem.Soc.*, 122, 6297-6298
- Baumstark, A.I., P.J. Franklin, P.C. Vasquez, B.S. Crow, 2004, Kinetics of the Epoxidation of Geraniol and Models Systems by Dimetyldioxirane, *Molecules*, 9, 117-124
- Bjorkling, F., Sven Erik Godtfredsen, Ole Kirk, 1990, Lipase-mediated Formation of Peroxycarboxylic Acids used in Catalytic Epoxidation of Alkenes, *J.Chem.Soc. Chem. Commun*, 1301-1303
- Bohlmann, J., Croteau, R. 1999. Diversity and variability of terpenoid defences in conifers: molecular genetics, biochemistry and evolution of the terpene synthase gene family in grand fir (*Abies grandis*). In: *Symposium on Insect-Plant Interactions and Induced Plant Defence*. D.J. Chadwick and J.A. Goode (Eds.), Novartis Foundation, London: 13-15 October 1998. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 132-145.
- Bugg, T. 1999. An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry. Blackwell Science Ltd. pp. 106-128
- Fäldt, J., Martin, D., Miller, B., Rawat, S., Bohlmann, J. 2003. Traumatic resin defense in Norway spruce (*Picea abies*): Methyl jasmonate-induced terpene synthase gene expression, and DNA cloning and functional characterization of (+)-3-carene synthase. *Plant Molecular Biology* Vol. 51, 119-133.

- Fu, Y.J., C.H.Tong. and D.B. Lund. 2003. Flavor Migration Out of Food Matrices: I. System Development for On-line Measurement of Flavor Concentration. *JFS*. 68(3). 775-783
- Heath, H.B. 1978. *Flavor Technology: Profiles, Product, Application*, AVI Publishing Company Inc., Connecticut.
- Heath, H.B., 1981. *Source Book of Flavors*, AVI Publishing Company Inc., onnecticut.Heath, H.B., 1985. *The Flavor Trap. Food*. February: 21-25
- Hoeffler, J.-F., Hemmerlin, A., Grosdemange-Billiard, C., Bach, T.J., Rohmer, M. 2002. Isoprenoid biosynthesis in higher plants and in *Escherichia coli*: on the branching in the methylerythritol phosphate pathway and the independent biosynthesis of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate. *Biochem. J.* 1(366), 573-583.
- Hu Shanghui, Pankaj Gupta, Ashok K. Prasad, Richard A., Gross and Virinder S. Parmar, 2002, Selective enzymatic epoxidation of dienes:generation of fuctional enantiomerically enriched diene monepoxy monomers, *Tetrahedron Letters* 43, 6763-6766
- Levai Albert, 2003, Dioxirane Oxidation of Sulfur-containing Organic Compounds. *ARKIVOC*, (xiv), 14-30
- McCaskill, D., Croteau, R. 1997. Prospects for the bioengineering of isoprenoid biosynthesis. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* Vol. 55, T. Scheper (Ed), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 107-145.
- Nanik Wijayati, 2004, *Kinetika dan Mekanisme reaksi sintesis α -pinena Oksida dari α -pinena Hasil Isolasi Minyak Terpentin dengan Dimetildioksirana (Sistem Kalium*

Peroksomonosulfat/Okson-Aseton), Laporan Penelitian, Universitas Negeri Semarang.

- Nanik Wijayati, 2005, *Efek Solven pada reaksi epoksidasi α -pinena dengan Dimetildioksirana*, laporan penelitian UNNES
- Nanik Wijayati, Pranowo, H. D., Jumina, Triyono, 2011, Synthesis of terpineol from *a*-pinene Catalyzed TCA/HY-Zeolite, *Indo. J. Chem.*, 11 (3), 234-237.
- Nanik Wijayati, Pranowo, H. D., Jumina, Triyono, 2013, The acid catalysed reaction of *a*-pinene over *y*-zeolite, *Indo. J. Chem.*, 13(1), 59-65
- Nawani Neerupma, Rajvinder Singh, Jagdeep Kaur, 2006, Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic *Bacillus* sp: The effect of process parameters on immobilization of enzyme, *Electronic Journal of Biotechnology*, ISSN:0717-3458, Vol 9, No.5, 559-565
- Oser et al. 1985. Recent Progress in The Consideration of Flavouring Ingredients Under The Food Additive Amendment: 13. GRAS substances. *Food Technology*. 38 (10). 65.
- Perum Perhutani. 2014. Laporan Tahunan Perum Perhutani, diakses pada tanggal 11 Agustus 2015 melalui http://perumperhutani.com/wpcontent/uploads/2014/08/ARA_Perhutani_2014_LOW.pdf
- Phillips, M.A., Savage, T.J., Croteau, R. 1999. Monoterpene synthases of lobolly pine (*Pinus taeda*) produce pinene isomers and enantiomers. *Arch. Biochem. Biophys.* Vol. 372, 197-204.

- Porter, N.A. Huiyang Yin and Derek A. Pratt, 2000, The Peroxy Acid Dioxirane Equilibrium : Base-Promoted Exchange of Peroxy Acid Oxygens, *J.Am.Chem.Soc.*, 122, 11272-11273
- Rohmer, M., Seemann, M., Grosdemange-Billiard, C. 2001. Biosynthetic routes to the building blocks of isoprenoids. In: *Biopolymers*, Vol 2. Eds. Koyama, T., Steinbuechel, Wiley- VCH, New York, pp. 49-72.
- Ríos María Yolanda, Enrique Salazar and Horacio F. Olivo. 1990. Baeyer–Villiger oxidation of substituted cyclohexanones via lipase-mediated perhydrolysis utilizing urea–hydrogen peroxide in ethyl acetate, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, , 1301 – 1303.
- Schwab, W., Williams, D.C., Croteau, R. 2002. Mechanism of monoterpene cyclization: stereochemistry of the transformation of noncyclizable substrate analogs by recombinant (–)-limonene synthase, (+)-bornyl diphosphate synthase, and (–)-pinene synthase. *J. Mol. Cat. B:Enzymatic* Vol. 19-20, 415-421.
- Sjödin, K., Persson, M., Fäldt, J., Ekberg, I., Borg-Karlsson, A.-K. 2000. Occurrence and correlations of monoterpene hydrocarbon enantiomers in *Pinus sylvestris* and *Picea abies*. *J.Chem. Ecol.* Vol. 26, 1701-1720.
- Skouridou V., Haralambos Stamatis, Fragiskos N. Kolisis, 2003, Lipase-mediated epoxidation of α -pinene, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 21, 67-69
- Vlček Tomáš and Zoran S. Petrović 2006, Optimization of the chemoenzymatic epoxidation of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* Vol. 83, 247-252.

- Whitaker, J.R.. and Evans, D.A.. 1987. Bioflavour: an overview.
Di dalam: Bioformation of Flavor. R.L.S. Patterson, B.V. Charlwood, G. Macleod dan A. A. Williams. (ed.). The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Wise, M.L., Croteau, R. 1999. In: *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Vol 2. D.Barton, K. Nakanishi, O. Meth-Cohn (Eds.), Elsevier Science, Oxford, 97-154.



Dr. Nanik Wijayati, M. Si., lahir di Blora pada tahun 1969. Memperoleh gelar Sarjana Pendidikan Kimia dari Jurusan Kimia IKIP Semarang pada tahun 1993, Magister Ilmu Kimia dari Universitas Gadjah Mada pada tahun 1997. Pada tahun 2014, memperoleh gelar doktor dalam karya sintesis alfa terpineol dari minyak terpineol. Penulis juga aktif meneliti di bidang katalis dan sintesis senyawa organik. Beberapa penelitian sudah dipublikasikan pada beberapa seminar internasional diantaranya di Vietnam (2011), Singapura (2012), Thailand (2013), Hongkong (2014), Paris/Perancis (2015) dan Sapporo Hokaido, Japan (2016). Sejak tahun 2006 hingga saat ini merupakan staf pengajar di Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang (UNNES). Mata kuliah pokok yang diampu diantaranya adalah Kimia Organik, Biokimia, dan Penentuan Struktur Molekul.

ISBN 978-602-285-085-4

Hak Cipta © pada Penulis dan dilindungi Undang-Undang Penerbitan.
Hak Penerbitan pada Unnes Press
Dicetak oleh Unnes Press
Jl. Kelud Raya No.2 Semarang 50232 Telp./Fax. (024)8415032

