

LAPORAN PENELITIAN MANDIRI
POTENSI DERIVAT META-HIDROKSIBENZOAT SEBAGAI
ANTIOKSIDAN DENGAN METODE DPPH (1,1-DIFENIL-2-
PIKRILHIDRAZIL)



Tim Pengusul:

apt. Hariyanti, M.Si. (0311097705/Ketua)
Dra. Sri Nevi Gantini, M.Si. (0306116401/ Anggota)

PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI DAN SAINS
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF. DR. HAMKA
JAKARTA
2021

HALAMAN PENGESAHAN PENELITIAN MANDIRI

Judul Penelitian : Potensi Derivat meta-hidroksibenzoat sebagai antioksidan dengan metode dpph (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil).

Skema Penelitian : Penelitian Mandiri

Ketua Peneliti

a. Nama : Dr. apt. Hariyanti, M.Si.
b. NIDN : 0311097705
c. Jabatan Fungsional : Lektor
d. Program Studi/Fakultas : Farmasi/Fakultas Farmasi dan Sains
e. No Handphone : 08561237347.
f. E-mail : hariyanti@uhamka.ac.id.

Anggota Peneliti

a. Nama : Dra. Sri Nevi Gantini, M.Si.
b. NIDN : 0306116401
c. Program Studi/Fakultas : Farmasi/Fakultas Farmasi dan Sains

Lokasi Penelitian : Fakultas Farmasi dan Sains

Lama Penelitian : 6 Bulan

Mengetahui,
Ketua Prodi Farmasi



Dr. apt. Rini Prastiwi, M.Si.
NIDN. 0628097801

Jakarta, 1-Agustus-2021
Ketua Tim Pengusul



apt. Hariyanti, M.Si.
NIDN. 0311097705



Dekan FFS UHAMKA

Dr. apt. Hadi Sunaryo, M.Si.
NIDN. 0325067201

ABSTRAK

POTENSI DERIVAT META-HIDROKSIBENZOAT SEBAGAI ANTIOKSIDAN DENGAN METODE DPPH (1,1-DIFENIL-2-PIKRILHIDRAZIL)

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat proses autooksidasi pada semua bahan yang mengandung lipid. Senyawa vanilil meta-hidroksibenzoat adalah salah satu senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mensintesis ester vanilil meta-hidroksibenzoat dengan metode esterifikasi *steglich* dan mengetahui potensi vanilil meta-hidroksibenzoat sebagai antioksidan dengan metode DPPH. Tahap awal penelitian ini dilakukan reduksi vanilin menggunakan Natrium Borohidrida sehingga diperoleh vanilil alkohol dengan rendemen sebesar 76,0333%. Kemudian dilakukan reaksi esterifikasi *steglich* dengan mereaksikan vanilil alkohol dan asam meta-hidroksibenzoat dengan menggunakan katalis DCC (*N,N'*-*Dicyclohexylcarbodiimide*) dan DMAP (*4-Dimethylaminopyridine*) dalam pelarut tetrahidrofuran. Ester vanilil meta-hidroksibenzoat yang dihasilkan dari penelitian memiliki rendemen sebesar 43,8675 % dan memiliki kemampuan antioksidan dengan IC₅₀ sebesar 28,91 µg/mL.

Kata kunci : vanilil alkohol, asam meta-hidroksibenzoat, esterifikasi *steglich*, uji antioksidan DPPH

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
ABSTRAK	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Perumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	3
D. Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
A. Landasan Teori	4
1. Vanilin	4
2. Asam Meta-hidroksibenzoat	4
3. Esterifikasi	5
4. DCC (N,N'-disikloheksilkarbodiimida)	7
5. DMAP (4-dimetilaminopiridin)	8
B. Karakteristik Hasil Sintesis	8
1. Kromatografi Lapis Tipis	8
2. Spektroskopi Inframerah (FT-IR)	10
C. Uji Aktivitas Antioksidan	11
1. Antioksidan	11
2. Metode Uji Antioksidan	11
BAB III METODELOGI	14
A. Tempat dan Waktu Penelitian	14
1. Tempat Penelitian	14
2. Waktu Penelitian	14
B. Pola Penelitian	14
C. Prosedur Penelitian	14
1. Alat dan Bahan	14
2. Pembuatan Vanilil Alkohol	15
3. Esterifikasi Vanilil Alkohol dengan Asam Meta-Hidroksibenzoat	15
4. Pemurnian Hasil Reaksi Esterifikasi	15
5. Uji Hasil Reaksi Esterifikasi	16
6. Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH	16
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	19
A. Pembuatan Vanilil Alkohol	19
1. Pemurnian Hasil Reduksi Vanilin	19
2. Uji KLT Hasil Reduksi	20
3. Uji FT-IR	21
B. Esterifikasi Vanilil Alkohol dengan Asam Meta-Hidroksibenzoat	22

	C. Pemurnian Senyawa Hasil Sintesis	24
	1. Uji KLT dan Titik Lebur	25
	2. Uji Spektrofotometri UV	26
	3. Analisis FT-IR	27
	D. Uji Aktivitas Antioksidan	28
BAB V	SIMPULAN DAN SARAN	32
	A. Simpulan	32
	B. Saran	32
	DAFTAR PUSTAKA	33
	LAMPIRAN	35

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Serapan Senyawa Hasil Reduksi Vanilin Dibandingkan dengan Serapan Vanilin Menggunakan Spektroskopi FT-IR	21
Tabel 2. Hasil Uji Organoleptis pada Vanilil Meta-Hidroksibenzoat	25
Tabel 3. Hasil Spektrofotometri UV	26
Tabel 4. Serapan Senyawa Hasil Sintesis Vanilil Meta-Hidroksibenzoat dibandingkan dengan Serapan Vanilil Alkohol dan Asam Meta-Hidroksibenzoat dengan Spektroskopi Infra Merah	27
Tabel 5. Hasil Uji Antioksidan Vanilil Meta-Hidroksibenzoat terhadap DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrazil)	29
Tabel 6. Hasil Uji Antioksidan Vitamin C terhadap DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrazil)	29

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Reduksi Vanilin menjadi Vanilil Alkohol	2
Gambar 2. Struktur Vanilin	4
Gambar 3. Struktur Asam Meta-Hidroksibenzoat	5
Gambar 4. Persamaan Reaksi Esterifikasi Secara Umum	5
Gambar 5. Mekanisme Reaksi Esterifikasi Steglich	6
Gambar 6. Kereaktifan Alkohol terhadap Laju Pembentukan Ester	6
Gambar 7. Kereaktifan Asam Karboksilat terhadap Laju Reaksi Esterifikasi	7
Gambar 8. Struktur DCC	7
Gambar 9. Struktur DMAP	8
Gambar 10. KLT Vanilil Alkohol Hasil Reduksi	20
Gambar 11. Kristal DCU (Disikloheksil Isourea)	24
Gambar 12. Hasil KLT Ester Vanilil Meta-Hidroksibenzoat	25
Gambar 13. Grafik Hubungan Konsentrasi dengan Persen Inhibisi Vanilil Meta-Hidroksibenzoat terhadap DPPH	30
Gambar 14. Grafik Hubungan Konsentrasi dengan Persen Inhibisi Vitamin C terhadap DPPH	30
Gambar 15. DCC	63
Gambar 16. DMAP	63
Gambar 17. Vanilin	63
Gambar 18. Asam Meta-Hidroksibenzoat	63
Gambar 19. Proses Sintesis	64
Gambar 20. Proses Ekstraksi	64
Gambar 21. Hasil Reduksi	64
Gambar 22. Hasil Sintesis	64
Gambar 23. Alat UV Box	64
Gambar 24. Alat FT-IR	65
Gambar 25. <i>Melting Point Tester</i>	65
Gambar 26. Proses Reduksi	

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Skema Penelitian Sintesa	35
Lampiran 2. Skema Pembuatan Vanilil Alkohol	36
Lampiran 3. Skema Reaksi Reduksi Vanilin	37
Lampiran 4. Perhitungan Hasil Reduksi Vanilil Alkohol	38
Lampiran 5. Perhitungan Nilai Rf Vanilil Alkohol	39
Lampiran 6. Skema Pembuatan Ester Vanilil Meta-Hidroksibenzoat	40
Lampiran 7. Skema Reaksi Esterifikasi Vanilil Meta-Hidroksibenzoat	41
Lampiran 8. Perhitungan Hasil Sintesis Vanilil Meta-Hidroksibenzoat	42
Lampiran 9. Perhitungan Nilai Rf Ester Vanilil Meta-Hidroksibenzoat	43
Lampiran 10. Skema Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Hasil Sintesis	44
Lampiran 11. Spektrum Panjang Gelombang Maksimum DPPH untuk Vanilil Meta-Hidroksibenzoat	45
Lampiran 12. Spektrum Panjang Gelombang Maksimum DPPH untuk Vitamin C	46
Lampiran 13. Perhitungan % Inhibisi dan IC ₅₀ Vitamin C	47
Lampiran 14. Perhitungan % Inhibisi dan IC ₅₀ Vanilil Meta-Hidroksibenzoat	48
Lampiran 15. Perhitungan % Inhibisi dan IC ₅₀ Vanilil Alkohol	49
Lampiran 16. Spektrum FT-IR Vanilin Standar	50
Lampiran 17. Spektrum FT-IR Vanilil Alkohol Hasil Reduksi	51
Lampiran 18. Spektrum FT-IR Asam Meta-Hidroksibenzoat Standar	52
Lampiran 19. Spektrum FT-IR Ester Vanilil Meta-Hidroksibenzoat Hasil Sintesis	53
Lampiran 20. Hasil Panjang Gelombang Vanilil Alkohol dengan Pelarut Metanol	54
Lampiran 21. Hasil Panjang Gelombang Ester Vanilil Meta-Hidroksibenzoat dengan Pelarut Metanol	55
Lampiran 22. Hasil Panjang Gelombang Asam Meta-Hidroksibenzoat	56
Lampiran 23. <i>Certificate of Analysis</i> N'N-Disikloheksilkarbodiimida	57
Lampiran 24. <i>Certificate of Analysis</i> 4-Dimethylaminopiridine	58
Lampiran 25. <i>Certificate of Analysis</i> Vanillin	59
Lampiran 26. <i>Certificate of Analysis</i> Asam Meta-Hidroksibenzoat	60
Lampiran 27. <i>Certificate of Analysis</i> Etanol Absolut	61
Lampiran 28. Bahan	63
Lampiran 29. Dokumentasi Proses Penelitian	64

BAB I

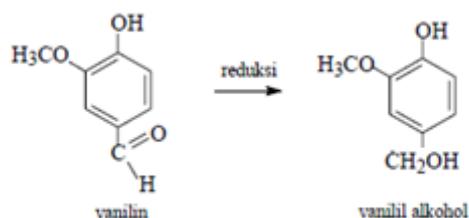
PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Pada saat ini keadaan lingkungan sekitar sudah sangat tidak baik bagi kesehatan manusia, terlebih dengan pola hidup manusia yang kurang seimbang. Banyak sekali senyawa – senyawa yang dapat mengancam kesehatan manusia, salah satunya adalah adanya senyawa radikal bebas dalam tubuh. Radikal bebas adalah spesies molekular yang sangat reaktif dengan elektron tak berpasangan, molekul ini hanya ada dalam waktu sangat singkat (dalam waktu 10^{-9} sampai 10^{-12} detik) sebelum molekul ini berkoalisi dengan molekul lain dan mengambil atau mendonasi elektron agar mencapai stabilitas (David A. Bender 2014). Maka untuk melindungi tubuh terhadap kerusakan radikal bebas diperlukan adanya suatu senyawa antioksidan.

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat proses autooksidasi pada semua bahan yang mengandung lipid. Nawar dkk. berpendapat bahwa antioksidan menghambat pembentukan radikal bebas dengan bertindak sebagai donor H terhadap radikal bebas sehingga radikal bebas berubah menjadi bentuk yang lebih stabil (Nur Aini dkk. 2007). Menurut literatur, senyawa vanillin merupakan salah satu senyawa alam yang memiliki aktivitas antioksidan.

Vanillin (4-hidroksi 3-metoksi benzaldehida) dengan rumus molekul $C_8H_8O_3$ merupakan hablur halus berbentuk jarum, berwarna putih hingga agak kuning dan memiliki rasa dan bau yang khas (Depkes RI 1979). Dilihat dari struktur kimianya, vanillin merupakan senyawa fenol tersubstitusi gugus metoksi pada posisi orto dan gugus aldehida pada posisi para, sehingga vanillin dapat dikelompokkan sebagai senyawa antioksidan. Apabila vanillin dikenai reaksi reduksi akan diperoleh senyawa vanilil alkohol menurut persamaan reaksi sebagai berikut :



Gambar 1. Reduksi Vanillin menjadi Vanilil Alkohol

Vanilil alkohol juga merupakan senyawa fenolik, sehingga memiliki potensi sebagai antioksidan. Dibandingkan dengan vanillin, maka reaktivitas vanilil alkohol terhadap serangan elektrofil akan lebih besar. Pada vanillin, adanya gugus aldehida yang terikat pada cincin benzena akan mengurangi reaktivitas cincin terhadap serangan elektrofil karena bersifat menarik elektron. Reaksi esterifikasi dipengaruhi beberapa faktor, salah satunya halangan atom sterik. Senyawa vanillin direduksi terlebih dahulu menjadi vanilil alkohol untuk meminimalisasi gangguan halangan sterik pada reaksi esterifikasi. Reaksi esterifikasi merupakan reaksi yang penting. Karena produk senyawa ester banyak digunakan untuk aplikasi farmasi, industri makanan/minuman dan industri parfum. Ester dapat disintesis dengan cara mereaksikan asam senyawa asam karboksilat dengan alkohol yang dikenal dengan reaksi esterifikasi (Budimarwanti 2009). Salah satu senyawa asam karboksilat yang dapat digunakan adalah asam meta hidroksi benzoat.

Ada banyak metode esterifikasi yang dapat digunakan, salah satunya adalah metode steglich. Esterifikasi steglich merupakan suatu esterifikasi yang melibatkan senyawa DCC sebagai aktivator dan DMAP sebagai katalis. Dengan metode esterifikasi steglich, substrat asam karboksilat yang sterik tetap dapat membuat ester. Metode reaksi esterifikasi steglich menghasilkan rendemen yang tinggi (M. Irwan 2008).

Melalui penelitian yang telah dilakukan oleh Nur Aini dkk. pada tahun 2007 diperoleh hasil bahwa vanillin memiliki aktivitas antioksidan yang cukup rendah karena gugus substituen pada posisi para yakni gugus aldehida (-CHO) yang bersifat penarik elektron. Dengan adanya gugus penarik elektron ini membuat vanillin kurang reaktif karena kerapatan elektron pada cincin aromatis berkurang sehingga akan mengurangi kemudahan untuk melepaskan atom

hidrogen pada gugus hidroksinya. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Susy Yunita Prabawati (2012) menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan dari vanillin masih cukup rendah, dilaporkan bahwa senyawa turunan vanillin yaitu 1,4 - bis [(2-hidroksi-3-metoksi-5-metanal-fenil)-metil] piperazin memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dari vanillin. Nilai IC_{50} dari senyawa 1,4-bis [(2-hidroksi-3-metoksi-5-metanal-fenil)-metil] piperazin adalah 0,661 mM lebih rendah dari nilai IC_{50} dari vanillin yaitu 3,158 mM. Berdasarkan data di atas maka pada penelitian ini diharapkan dapat mensintesis turunan vanillin dengan nilai IC_{50} yang lebih rendah sehingga memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi.

Maka pada penelitian ini akan dilakukan pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (1,1 Difenil-2-Pikrilhidrazil) dari modifikasi struktur vanilil alkohol dengan asam meta hidroksi benzoat melalui reaksi esterifikasi steglich.

B. Perumusan Masalah

Adapun permasalahan dari penelitian ini adalah “Apakah senyawa vanilil meta-hidroksibenzoat dapat berpotensi sebagai antioksidan?”.

C. Tujuan Penelitian

Adapun penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan senyawa baru dari turunan vanillin dan mengetahui kemampuan antioksidannya.

D. Manfaat Penelitian

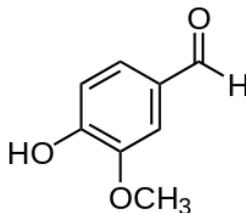
Penelitian ini diharapkan dapat menambah ilmu pengetahuan, menghasilkan senyawa yang dapat digunakan sebagai antioksidan serta dapat memberikan informasi mengenai modifikasi struktur vanilil alkohol dengan asam meta-hidroksibenzoat dan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Landasan Teori

1. Vanillin

Vanilin adalah komponen kimia utama dari ekstrak vanila bean. Ekstrak vanili alami adalah campuran dari beberapa ratus senyawa selain vanili. Selain vanili alami terdapat pula vanili buatan yang berasal dari hasil sintesa. Vanillin pertama kali disintesis dari eugenol yang ditemukan dalam minyak cengkeh. Vanillin berbau senyawa aromatik yang sedap, terbentuk secara alami dalam biji vanili. Vanillin digunakan secara luas sebagai aditif penyedap minuman, memasak dan sebagai aditif aromatik untuk lilin, dupa, bunga rampai, wewangian, parfum dan penyegar udara (Ravendra 2012).



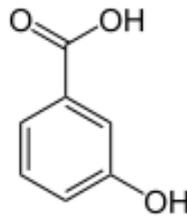
Gambar 2. Struktur Vanillin

Vanillin (4-hidroksi 3-metoksi benzaldehida) adalah fenolik aldehida senyawa organik dengan rumus molekul $C_8H_8O_3$. Vanillin mengandung tidak kurang dari 97,0 % dan tidak lebih dari 103,0 % $C_8H_8O_3$, dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan. Vanillin merupakan hablur halus berbentuk jarum, berwarna putih hingga agak kuning dan memiliki rasa dan bau yang khas. Kelarutan vanillin yaitu sukar larut dalam air, larut dalam air panas, mudah larut dalam *etanol (95 %) P*, dalam *eter P* dan dalam larutan alkali hidroksida dan larut dalam *gliserol P*. Jarak lebur vanillin yaitu antara $81^\circ C$ dan $83^\circ C$ (DepKes RI 1979).

2. Asam meta-hidroksibenzoat

Asam Meta-Hidroksi Benzoat memiliki nama berdasarkan IUPAC yaitu 3-hydroxybenzoic acid maupun sodium 3-hydrobenzoic acid. Kelarutan zat sedikit

larut dalam air, mudah larut dalam etanol panas (95 %) *p.* dalam *eter p.* dan dalam larutan alkali hidroksida dan larutan asam gliserin (Depkes RI, 1995). Asam meta-hidroksibenzoat memiliki titik leleh sebesar 203 °C dan memiliki titik lebur sebesar 346 °C.

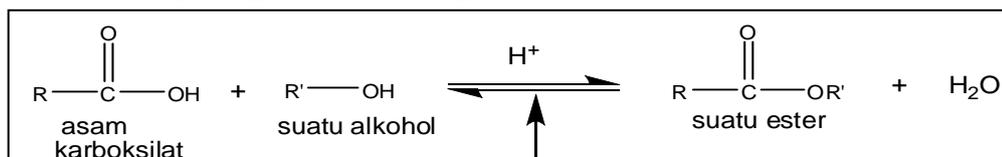


Gambar 3. Struktur Asam meta-hidroksibenzoat

3. Esterifikasi

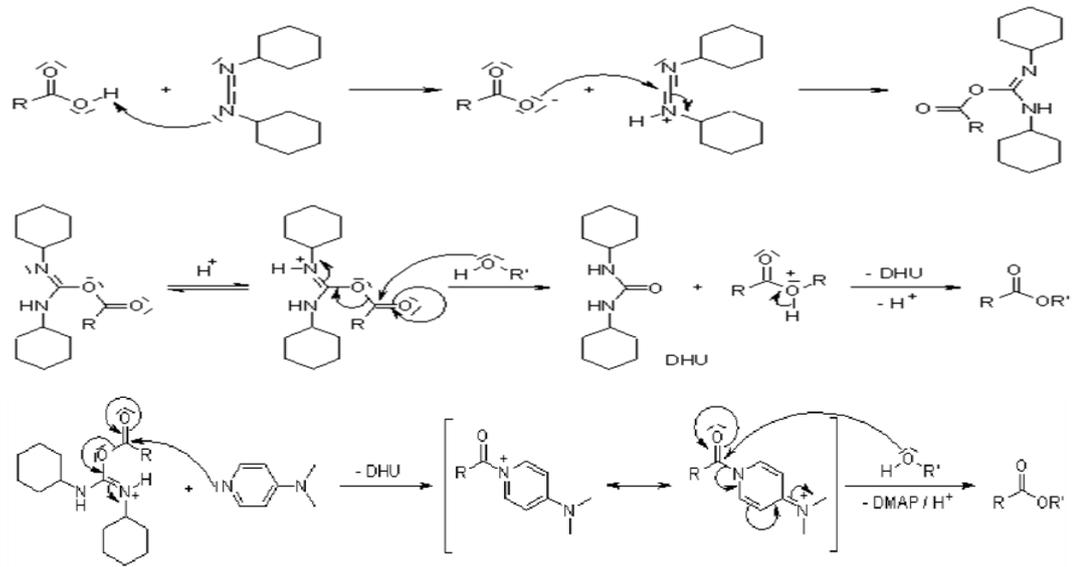
Proses pembuatan ester (esterifikasi) umumnya dilakukan dengan mereaksikan alkohol dengan asam karboksilat. Reaksi berlangsung secara lambat dengan berkesetimbangan. Oleh karena itu, untuk mempercepat reaksi digunakan suatu katalis asam. Reaksi berkesetimbangan karena pada esterifikasinya dihasilkan air yang dapat menghidrolisis kembali ester yang telah terbentuk menjadi asam karboksilat pembentuknya. Meskipun reaksi ini merupakan reaksi kesetimbangan, reaksi dapat digeser ke kanan dengan beberapa cara, salah satunya dapat digunakan alkohol atau asam karboksilat berlebih (Lila 2009).

Menurut Fessenden dan Fessenden (1986) ester merupakan senyawa organik yang sangat berguna, strukturnya dapat diubah menjadi bentuk senyawa lain. Suatu ester dapat dibentuk dengan reaksi langsung antara suatu asam karboksilat dengan suatu alkohol yang disebut dengan reaksi esterifikasi. Ester asam karboksilat ialah suatu senyawa yang mengandung gugus $-COOR$ dengan R dapat berbentuk alkil, aril maupun lakton atau ester siklik. Reaksi esterifikasi secara umum dapat digambarkan sebagai berikut :



Gambar 4. Persamaan Reaksi Esterifikasi Secara Umum (Fessenden dan Fessenden, 1986)

Ada berbagai macam cara dalam pembuatan ester, salah satunya adalah esterifikasi *steglich*. Esterifikasi *steglich* merupakan suatu esterifikasi yang menggunakan senyawa DCC sebagai aktivator dan DMAP sebagai katalis. Dengan metode esterifikasi *steglich*, substrat asam karboksilat yang sterik tetap dapat membuat ester. Mekanisme ini dimulai ketika suatu asam karboksilat bereaksi dengan DCC membentuk senyawa intermediet O-asilisourea, yang kereaktifannya serupa dengan tingkat kereaktifan senyawa anhidrida karboksilat. Kemudian DMAP sebagai nukleofil yang lebih kuat dari alkohol bereaksi dengan O-asilisourea membentuk senyawa intermediet yang reaktif untuk direaksikan dengan alkohol membentuk ester (M. Irwan 2008).

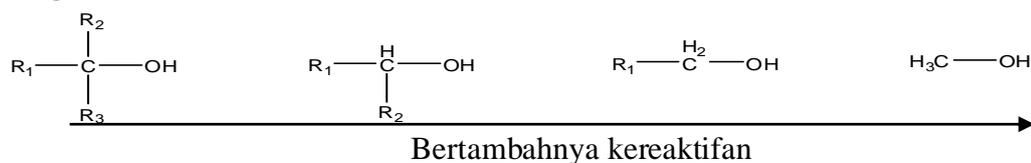


Gambar 5. Mekanisme Reaksi Esterifikasi Steglich

Laju reaksi esterifikasi suatu asam karboksilat tergantung pada:

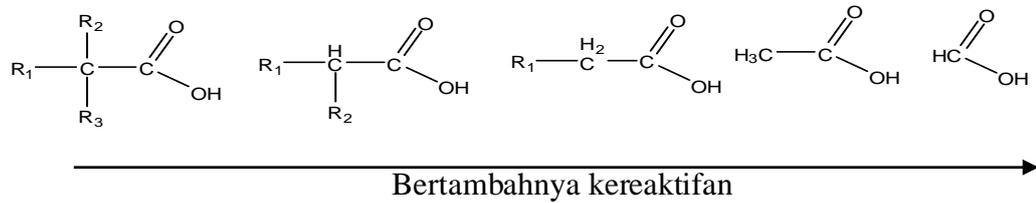
a. Halangan atom sterik

Menurut Fessenden dan Fessenden (1986) halangan sterik dari alkohol dan asam karboksilat merupakan faktor yang paling berpengaruh terhadap laju reaksi esterifikasi. Urutan kereaktifan alkohol terhadap laju pembentukan ester adalah sebagai berikut :



Gambar 6. Kereaktifan Alkohol terhadap Laju Pembentukan Ester

Urutan kereaktifan asam karboksilat terhadap laju reaksi esterifikasi adalah sebagai berikut :



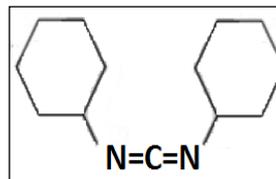
Gambar 7. Kereaktifan Asam Karboksilat terhadap Laju Reaksi Esterifikasi

b. Katalis

Nukleofil lemah seperti alkohol memiliki laju yang sangat lambat dalam menyerang atom karbonil RCOOH yang kurang reaktif. Sifat kereaktifan karbonil ini dapat ditingkatkan dengan cara protonasi, contohnya dengan menggunakan katalis asam. Katalis asam akan meningkatkan kemudahan lepasnya gugus pergi, yaitu pelepasan H_2O dari gugus asam karboksilat (Sykes 1989).

4. DCC ($\text{N,N}'$ -disikloheksilkarbodiimida)

DCC merupakan senyawa organik dengan rumus kimia $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_2$, dengan struktur sebagai berikut:



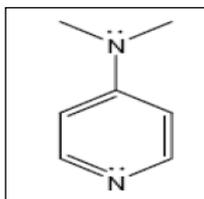
Gambar 8. Struktur DCC

Zat ini memiliki berat molekul sebesar 206,33 g/mol dengan wujud bubuk kristal berwarna putih memiliki titik leleh sebesar $34 - 36\text{ }^\circ\text{C}$ dan titik didih sebesar $122\text{ }^\circ\text{C}$ dan zat ini tidak larut dalam air tetapi sangat larut dalam diklorometana, tetrahidrofurana, asetonitril dan dimetilformamida.

Kegunaan utama DCC adalah sebagai agen pengkopling asam amino pada sintesis peptida artifisial. Selain itu, DCC dapat digunakan sebagai aktivator dalam reaksi esterifikasi asam karboksilat dengan berbagai alkohol termasuk beberapa alkohol tersier, namun masih diperlukan penggunaan katalis seperti DMAP untuk mempercepat laju reaksi (Veronika, 2008).

5. DMAP (4-dimetilaminopiridin)

DMAP adalah senyawa organik dengan rumus molekul $C_7H_{10}N_2$ dengan struktur sebagai berikut :



Gambar 9. Struktur DMAP

DMAP merupakan katalis nukleofilik yang mempunyai sifat mengkatalisis yang kuat. DMAP dapat mengkatalisis berbagai jenis reaksi, diantaranya adalah esterifikasi dengan anhidrida asam, reaksi hidrolisis serta esterifikasi Steglich dengan adanya DCC.

DMAP memiliki berat molekul sebesar 122,17 g/mol dengan wujud kristal berwarna putih. Titik leleh DMAP yaitu sebesar 110 -113 °C dan titik didih sebesar 162 °C pada tekanan 50 mmHg (Veronika 2008)

B. Karakteristik Hasil Sintesis

1. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi adalah teknik pemisahan berdasarkan perbedaan interaksi komponen-komponen dalam sampel terhadap fase diam dan fase gerak. Fase diam kromatografi dibuat dalam bentuk lapisan tipis. Lapisan tipis ini berupa bahan kolom (fase diam) yang dilapisi secara tipis dan merata pada permukaan lembaran kaca, kertas, plastik atau logam aluminium. Fase diam yang biasa digunakan dalam KLT adalah silika dan alumina, fase diam lain yang digunakan adalah selulos, resin, penukar ion dan gel. Sedangkan fase gerak yang digunakan tergantung pada sifat kepolaran sampel yang akan dipisahkan. Kadang-kadang digunakan campuran dua atau lebih pelarut untuk mendapatkan pemisahan yang lebih baik. Cara ini banyak digunakan karena adanya beberapa keuntungan yaitu peralatan yang digunakan sedikit, pengerjaannya sederhana, waktu analisis cepat, pemisahannya cukup baik.

Secara dasar proses pemisahan pada KLT disebabkan adanya keseimbangan yang berurutan dari komponen yang dipisahkan dalam dua fase

yaitu fase diam dan fase gerak. Teknik pengerjaan KLT sebagai berikut, fase diam (pengadsorb) dilapisi pada suatu lembaran kaca atau media yang lain sebagai pendukungnya. Zat yang akan dipisahkan ditotol pada lempengan fase diam tersebut. Lempengan ini diletakkan tegak (agak miring) di dalam wadah dengan sedikit pelarut (fase gerak) (Sunardi 2006).

Pelarut naik melalui lapisan adsorben karena gaya kapiler dan campuran dalam sampel bergerak dengan kecepatan yang berbeda tergantung kekuatan interaksinya dengan adsorben. Bila komponen campuran memiliki sifat kepolaran yang mirip dengan adsorben maka pada akhir kromatografi akan tertahan pada plat dan sebaliknya jika sifat kepolarannya lebih mendekati fase gerak, komponen campuran akan terikat oleh fase gerak sehingga memiliki nilai *Retardation factor* (Rf) yang besar. *Retardation factor* adalah nilai perbandingan jarak yang ditempuh oleh komponen campuran terhadap jarak yang ditempuh oleh eluen dalam waktu yang sama (Padmawinata 1991).

$$Rf = \frac{\text{Jarak yang ditempuh spot}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}} \dots\dots\dots (1)$$

Harga Rf dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu: jenis fase diam, ketebalan lapisan, kadar campuran yang dipisahkan, jenis pelarut yang digunakan dan jumlah zat yang ditotolkan (Sunardi 2006). Kromatografi lapis tipis biasanya digunakan untuk menentukan jumlah komponen dalam sampel, memonitor jalannya reaksi, menentukan efektifitas pemurnian, menentukan kondisi yang sesuai untuk kromatografi kolom dan memonitor kromatografi kolom.

Deteksi kromatogram merupakan tahap akhir yang penting dalam kromatografi. Kromatogram yang diperoleh dapat secara langsung ditentukan secara kualitatif dan kuantitatif menggunakan densitometer, yaitu *TLC Scanner*. Pengukuran densitometer dapat dilakukan berdasarkan cara absorpsi, refleksi dan transmisi. Sinar dari sumber cahaya dibentuk menjadi sinar monokromatis ini difokuskan dan diarahkan ke plat kromatografi. Sinar dikonversi dalam bentuk puncak-puncak.

2. Spektroskopi Inframerah (FT-IR)

Instrumen yang digunakan untuk mengukur resapan radiasi inframerah pada berbagai panjang gelombang disebut Spektrofotometer Inframerah.

Cara kerja alat spektrofotometri inframerah dapat dijelaskan dimana mula-mula sinar inframerah dilewatkan melalui sampel dan larutan pembanding, kemudian dilewatkan pada monokromator untuk menghilangkan sinar yang tidak diinginkan (*stray radiation*). Berkas ini kemudian didispersikan melalui prisma atau *grating*. Dengan melewatkannya melalui *slit*, sinar tersebut dapat difokuskan pada detektor yang akan mengubah berkas sinar menjadi sinyal listrik yang selanjutnya direkam oleh *recorder* “perekam” (Khopkar 2008).

Skala pada dasar spektra adalah bilangan gelombang, yang berkurang dari 4000 cm^{-1} ke sekitar 670 cm^{-1} atau lebih rendah. Panjang – panjang gelombang yang dicantumkan pada bagian atas. Panjang gelombang atau frekuensi titik minimum suatu pita absorpsi, digunakan untuk mengidentifikasi tiap pita. Titik ini lebih dapat diperoleh ulang (reproduksibel) daripada jangka (*range*) suatu pita lebar, yang dapat beranekaragam menurut konsentrasi contoh maupun kepekaan instrumen.

Pita – pita merah dalam sebuah spektrum dapat dikelompokkan menurut intensitasnya: kuat (s, *strong*), *medium* (m) dan lemah (w, *weak*). Suatu pita lemah yang bertumpang tindih dengan suatu pita kuat disebut bahu (sh, *shoulder*). Istilah – istilah ini relatif dan penandaan pada sesuatu pita tertentu sebagai s, m, w atau sh, paling – paling hanya lah bersifat kualitatif belaka.

C. Uji Aktivitas Antioksidan

1. Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang mampu menghambat prose autooksidasi pada semua bahan yang mengandung lipid. Puspita-Nienaber dkk. berpendapat bahwa antioksidan menghambat pembentukan radikal bebas dengan bertindak sebagai donor H terhadap radikal bebas, sehingga radikal bebas berubah menjadi bentuk yang lebih stabil. Antioksidan banyak digunakan sebagai zat aditif untuk mencegah kerusakan terutama ketengikan bahan pangan. Beberapa kriteria antioksidan di antaranya adalah memiliki kelarutan yang tinggi dalam lipid dan

lemak, efektif dalam jumlah relatif sedikit, toksisitas rendah dan radikal yang terbentuk harus lebih stabil daripada radikal bebasnya.

Untuk menentukan aktivitas antioksidan, selama ini telah dilakukan penelitian baik secara eksperimental maupun teoritis dengan bantuan kimia komputasi. Dari kedua aspek, dipercaya bahwa mekanisme antioksidan erat hubungannya dengan proses transfer atom hidrogen dari gugus senyawa fenolik antioksidan ke substrat. Antioksidan alami kebanyakan dalam bentuk fenolik. Gugus fenol pada antioksidan inilah yang memiliki kemampuan untuk menangkap radikal bebas dari rantai peroksida (ROO•) dengan reaksi (2) :



Efektivitas radikal bebas ArO• harus relatif lebih stabil, sehingga mampu menghambat reaksi dengan substrat namun cepat bereaksi dengan ROO• atau yang dikenal sebagai pemutusan rantai antioksidan. Antioksidan akan bereaksi lebih cepat dengan radikal peroksida, sehingga mampu menghambat reaksi dengan substrat. Kemudahan antioksidan untuk memberikan atom hidrogennya ada radikal bebas menunjukkan aktivitas dari antioksidan tersebut.

2. Metode Uji Antioksidan

Untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari senyawa tersebut, maka dilakukanlah uji antioksidan dengan metode sebagai berikut :

a. Metode DPPH (1,1 Difenil 2-pikrilhidrazil)

Salah satu metode yang dapat dipakai untuk mengukur aktivitas antioksidan dari suatu sampel adalah metode efek peredaman radikal bebas *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil* (DPPH) (Veronika 2008).

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil) merupakan radikal bebas yang sangat reaktif. DPPH digunakan untuk melihat senyawa penangkap radikal bebas yaitu asam fenolat, flavanoid dan tannin. Karena adanya elektron yang tidak berpasangan, DPPH memberikan serapan kuat pada 517 nm. Ketika elektronnya menjadi berpasangan oleh keberadaan penangkap radikal bebas, maka absorbansinya menurun secara stokiometri sesuai jumlah elektron yang diambil (Oneil, 2006).

Prinsip uji antioksidan pada metode ini adalah radikal bebas DPPH mengambil hidrogen radikal dari antioksidan sehingga radikal DPPH tersebut berubah menjadi 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazin, sedang radikal antioksidan yang tersisa distabilkan oleh struktur resonansinya.

Aktivitas antioksidan dari suatu senyawa diukur dari nilai *inhibition of Concentration 50* (IC_{50}), yaitu konsentrasi antioksidan ($\mu\text{g/mL}$) yang mampu menghambat 50% radikal bebas. Semakin kecil nilai IC_{50} , semakin aktif senyawa tersebut sebagai antioksidan.

Nilai IC_{50} diperoleh melalui kurva uji aktivitas antioksidan. Kurva uji aktivitas antioksidan tersebut dibuat dengan mengalurkan persen inhibisi sebagai ordinat dan konsentrasi sebagai absis (Veronika 2008).

Metode DPPH digunakan untuk menguji kemampuan suatu komponen sebagai penangkap radikal bebas dalam suatu senyawa dan pengukuran aktivitas antioksidan menggunakan spektrofotometri visibel dengan menghitung IC_{50} dengan menggunakan vitamin C sebagai pembanding karena vitamin C merupakan antioksidan kuat. Metode DPPH dipilih karena sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel.

b. Metode *Reducing Power*

Metode *Reducing power* merupakan metode yang digunakan untuk mengukur kekuatan reduksi suatu sampel. Metode ini dilakukan berdasarkan kemampuan suatu senyawa dalam mereduksi Fe^{3+} menjadi Fe. Antioksidan dalam sampel akan mereduksi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} dengan memberikan sebuah elektron. Jumlah kompleks Fe^{2+} dapat diketahui dengan mengukur formasi *Perl's Prussian blue* pada panjang gelombang 700 nm. Meningkatnya absorban pada 700 nm menjadi indikasi meningkatnya kemampuan mereduksi dari antioksidan (Dehpour A dkk. 2009).

c. Metode Aktivitas Penghambatan Radikal Nitrat Oksida

Oksida nitrat, karena memiliki elektron yang tidak berpasangan, maka diklasifikasikan sebagai radikal bebas dan menunjukkan reaktivitas yang penting dengan jenis tertentu dari protein dan radikal bebas lainnya. Penghambatan secara

in vitro dari radikal nitrat oksida juga diukur sebagai aktivitas antioksidan. Metode ini didasarkan pada inhibisi dari pembentukan radikal nitrat oksida yang dihasilkan dari natrium nitropusid dalam dapar garam dan diukur dengan pereaksi Griess. Dengan adanya penghambatan, absorbansi dari kromofor diukur pada panjang gelombang 546 nm. Aktivitas ini menunjukkan sebagai reduksi dari nitrat oksida (Shivaprassi dkk. 2005).

d. Metode β – Karoten

Metode ini didasarkan pada pemucatan warna emulsi sistem β – Karoten dan asam oleat. BHT sebagai pembanding karena BHT memiliki keefektifan sebagai antioksidan yang paling tinggi walaupun memiliki satu gugus hidroksi (-OH) dan jumlah resonansi yang sama dengan eugenol tetapi lebih bersifat non polar dibanding senyawa lainnya karena adanya gugus alkil yang lebih tersubstitusi yaitu t-butil (-C(CH₃)₃) (Nur Aini 2007).

Pemucatan warna dari sistem merupakan parameter terjadinya reaksi oksidasi. Semakin besar penurunan nilai absorbansinya, semakin tinggi tingkat oksidasi yang terjadi pada sistem tersebut.

BAB III

METODOLOGI

A. Pola Penelitian

1. Penyiapan alat dan bahan penelitian.
2. Reduksi vanillin dengan NaBH_4 .
3. Sintesis asam m-Hidroksi Benzoat dengan vanilil alkohol menggunakan metode *Steglich*.
4. Pemurnian hasil sintesis.
5. Karakterisasi dan Uji hasil reaksi esterifikasi
6. Uji aktivitas antioksidan senyawa hasil sintesis.

B. Prosedur Penelitian

1. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : Labu bulat, *hot plate* dan *stirrer*, kondensor, termometer, spatula, corong pisah, pipet ukur, *Erlenmeyer*, *Beaker Glass*, tabung reaksi, gelas ukur, rotary evaporator, timbangan analitik, pinset, labu ukur, aluminium foil, spatel, *melting point tester* (Stuart) dan Plat KLT GF254nm. Instrumen pengukuran yang digunakan adalah Spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu UV-1601) dan FTIR (Aglient Cary 630 FTIR).

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : Vanilin (Sigma Aldrich), Etanol (Merck), Tetrahidrofur (THF), Aseton, NaBH_4 , Asam Meta-Hidroksibenzoat (Sigma Aldrich), DCC, DMAP, NaHCO_3 10%, CH_2Cl_2 , HCl, CHCl_3 , N-heksan, etil asetat, MgSO_4 anhidrat, larutan DPPH dan aquades.

2. Pembuatan Vanilil Alkohol

a. Reduksi Vanillin dengan Natrium Borohidrida.

Ke dalam labu leher tiga kapasitas 250 mL yang dilengkapi dengan termometer, pendingin balik dan pengaduk magnet serta penangas air dimasukkan

1,5 gram (0,04mol) NaBH_4 dan 3 gram (0,0197 mol) vanillin dalam pelarut etanol sebanyak 30 mL. Campuran diaduk selama 40 menit pada suhu kamar.

b. Pemurnian Hasil Reduksi Vanilin.

Campuran dari hasil reduksi vanilin tersebut kemudian diasamkan dengan HCl 2,5 M sampai pH 4,5. Kemudian diekstraksi dengan Kloroform, ditambah dengan MgSO_4 anhidrous, disaring dan dievaporasi. Hitung hasil rendemen yang dihasilkan dan analisis senyawa hasil dilakukan dengan KLT, uji titik lebur, spektrofotometer UV dan FT-IR.

3. Esterifikasi Vanilil Alkohol dengan Asam Meta-Hidroksi Benzoate menggunakan Metode Steglich.

Reaksi esterifikasi dilakukan dengan cara memasukan 123,2 mg (0,8 mmol) vanilil alkohol dengan 220,99 mg (1,6 mmol) asam meta-hidroksibenzoat dengan menggunakan 40 mL pelarut tetrahidrofur serta menggunakan DCC dan DMAP sebagai aktivator dan katalis masing-masing sebanyak 370,8 mg (1,8 mol) dan 21,99 mg (0,18 mmol). Campuran tersebut diaduk selama 24 jam pada suhu $60^\circ\text{-}70^\circ\text{C}$ dengan menggunakan *magnetic stirrer*.

4. Pemurnian Hasil Reaksi Esterifikasi.

Setelah reaksi berlangsung selama 24 jam, campuran tersebut disaring untuk memisahkan senyawa DCU yaitu zat pengotor yang terbentuk dari reaksi esterifikasi tersebut, lalu dicuci dengan air. Filtrat kemudian ditambahkan dengan larutan NaHCO_3 10% sampai tidak terbentuk lagi CO_2 . Filtrat kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah yang telah berisi etil asetat lalu dikocok. Campuran dicuci sebanyak 3 kali. Hal ini bertujuan agar ester yang terbentuk dipisah dari pengotor yang bersifat polar. Kemudian fasa organik dipisahkan dari fasa airnya, ditambahkan dengan MgSO_4 anhidrat, lalu disaring. Setelah disaring, kemudian pelarutnya diuapkan.

5. Uji Hasil Reaksi Esterifikasi

Senyawa ester yang dihasilkan diuji titik lebur dengan *melting point tester* dan KLT menggunakan pelarut pengembang N-heksan : etil asetat (3:1). Setelah produk ester dilakukan pemurnian, kemudian dianalisis dengan analisa karakterisasi menggunakan instrumentasi FT-IR dan Spektrofotometer UV-Vis. Rendemen hasil sintesis dapat diperoleh dengan rumus (3):

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot hasil sintesis}}{\text{Bobot teoritis}} \times 100\% \dots\dots\dots (3)$$

6. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

a. Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM

Serbuk DPPH (BM 394,32) 3,9432 mg dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 100 mL, volumenya dicukupkan dengan metanol hingga tanda batas (DPPH 0,1 mM).

b. Pembuatan Larutan Blanko DPPH

Larutan DPPH 0,1 mM sebanyak 2 mL dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambah metanol sebanyak 2 mL.

c. Pembuatan Larutan Sampel

Larutan stok 200 ppm dibuat dengan cara menimbang serbuk vanilil meta-hidroksi benzoat sebanyak 20 mg dan dilarutkan dengan metanol sambil diaduk dan dihomogenkan lalu dicukupkan volumenya hingga 100 mL. Selanjutnya dibuat variasi konsentrasi 10, 20, 30, 40 dan 50 ppm.

d. Larutan Induk Vitamin C

Vitamin C sebagai pembanding, masing-masing ditimbang 50 mg, dilarutkan dengan metanol lalu dimasukan dalam labu ukur 100 mL, volume dicukupkan dengan metanol sampai tanda batas. Lalu buat variasi konsentrasi vitamin C 10ppm, 15ppm, 20ppm, 25ppm, dan 30ppm.

e. Pengukuran Absorbansi Antioksidan Vitamin C

Pengukuran Absorbansi Larutan Pembanding Vitamin C dilakukan dengan cara larutan uji pembanding sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan larutan DPPH 0,1 mM sebanyak 2 mL. Selanjutnya, serapan diukur pada panjang gelombang 514 nm.

f. Pengukuran Absorbansi Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Sebanyak 2 mL larutan sampel vanilil meta hidroksi benzoat dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2 mL DPPH 0,1 mM, kemudian didiamkan selama 30 menit di tempat gelap dan terlindung cahaya matahari. Ukur absorbansi dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 514 nm. Setelah nilai absorbansinya didapat, dihitung persen hambatan masing-masing larutan dengan menggunakan rumus (4):

$$\text{Persen (\%) Inhibisi} = \frac{(\text{Abs. Kontrol} - \text{Abs Sampel})}{\text{Abs. Kontrol}} \times 100\% \dots\dots\dots (4)$$

Setelah didapatkan % aktivitas hambatan dicari nilai IC_{50} melalui persamaan regresi linier $y = a + bx$. Dari hasil regresi linier pada data yang diperoleh akan didapatkan nilai a, b dan r kemudian nilai a dan b tersebut dimasukkan ke dalam persamaan regresi linier tersebut maka akan diperoleh nilai x yang dihitung sebagai nilai IC_{50} .

g. Pengolahan Data

Data antioksidan pada radikal DPPH (% penghambatan) senyawa vanilin salisilat dianalisis dan dihitung nilai IC_{50} , Semakin kecil nilai IC_{50} berarti aktivitas antioksidan semakin kuat. Pada penelitian ini nilai IC_{50} dianalisis dan dihitung menggunakan persamaan regresi linear (Molyneux 2004). Hasil persentase penghambatan (inhibisi) digunakan untuk menentukan nilai Probit yang akan digunakan sebagai y dalam regresi linear, sedangkan nilai x pada regresi linear didapat dari nilai log dari dosis. Dari kedua data ini dibuat regresi linier hubungan antara logaritma konsentrasi sebagai x dengan Probit sebagai y. IC_{50} diperoleh dengan cara memasukkan nilai 5 sebagai y ke dalam persamaan regresi linier, kemudian hasil substitusi diantilogaritma dan hasil tersebut merupakan nilai IC_{50} .

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Pembuatan Vanilil Alkohol

Vanilil alkohol dibuat dengan mereduksi vanilin. Reduksi vanilin tersebut akan merubah gugus fungsi aldehida menjadi gugus alkohol primer. Reduktor yang digunakan adalah natrium borohidrida (NaBH_4) yang dilarutkan dalam pelarut etanol. Untuk mereduksi suatu aldehida atau keton dipilih NaBH_4 , karena lebih mudah penanganannya dan tidak reaktif terhadap air (Fessenden and Fessenden 1986).

Percobaan dimulai dengan melarutkan NaBH_4 , yang digunakan sebagai reduktor untuk mengubah suatu gugus aldehyd yang terdapat pada vanilin menjadi vanilil alkohol dan vanilin dalam pelarut etanol di dalam labu alas bulat yang disertai dengan termometer, pendingin balik, *magnetic stirrer* dan penangas air. Campuran tersebut lalu diaduk selama 40 menit pada suhu kamar, proses reduksi ini berlangsung tanpa adanya pemanasan karena proses reduksi dengan NaBH_4 berlangsung secara eksoterm. Pada tahap tersebut NaBH_4 sebagai agen reduktor akan mentransfer elektronnya ke oksidator yaitu vanilin. Vanilin yang akan tereduksi karena mendapatkan elektron yang dilepaskan oleh NaBH_4 . Larutan tersebut kemudian diasamkan dengan HCl 2,5 M sampai pH 4,5 untuk menghidrolisis natrium vanilat yang terbentuk akibat penggunaan NaBH_4 yang bersifat basa menjadi vanilil alkohol. Pada proses ini akan terjadi perubahan warna dari putih menjadi putih saleem. Setelah penambahan HCl akan terbentuk endapan seperti garam, endapan tersebut kemudian disaring.

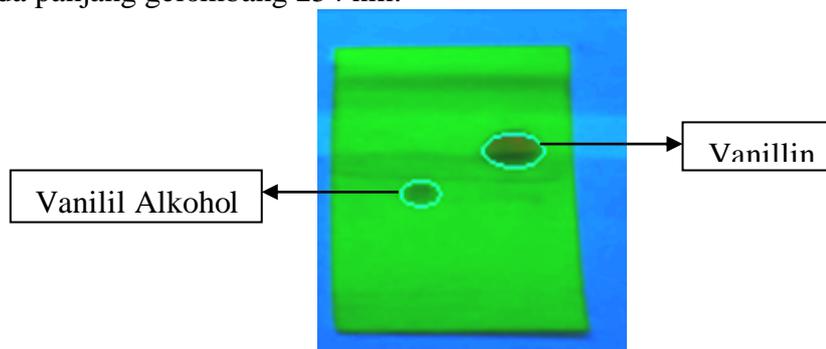
1. Pemurnian Hasil Reduksi Vanilin

Filtrat yang dihasilkan harus dimurnikan kembali dengan penambahan pelarut CH_2Cl_2 (Diklorometan) di dalam corong pisah. Pelarut yang bersifat polar akan melarutkan komponen yang bersifat polar, sementara pelarut non polar akan melarutkan komponen senyawa yang bersifat non polar. Hal ini sesuai dengan prinsip pelarutan suatu zat "*like dissolve like*". Kepolaran suatu pelarut dapat ditentukan berdasarkan sifat kimia yakni ketetapan dielektrikum. Tetapan

dielektrik merupakan ukuran kepolaran suatu pelarut. Pelarut yang mempunyai konstanta dielektrikum yang besar akan lebih melarutkan senyawa polar, sebaliknya pelarut dengan konstanta dielektrikum yang kecil akan melarutkan senyawa yang non polar. Keadaan dielektrikum dikatakan terpolarisasi diakibatkan pergeseran dari muatan positif dan negatif dalam atom atau molekul yang mengakibatkan terjadinya dipol-dipol, adanya perbedaan keelektronegatifan unsur yang mengakibatkan elektron lebih tertarik oleh salah satu unsur. Pengotor-pengotor yang bersifat polar akan tertarik ke fasa air, sedangkan vanilil alkohol akan tertarik ke fasa organik (diklorometan). Fasa organik tersebut dimasukkan ke dalam *beaker glass* kemudian ditambahkan $MgSO_4$ anhidrat untuk mengikat molekul air yang masih terbawa pada fasa organik tersebut, proses perendaman dengan $MgSO_4$ anhidrat selama 30 menit kemudian filtrasi, setelah itu hasil filtrasi tersebut diuapkan untuk mendapatkan serbuk vanilil alkohol.

2. Uji KLT Hasil Reduksi

Vanilil alkohol hasil reduksi tersebut kemudian diuji dengan KLT dan dibandingkan dengan vanilin standar. Dalam uji KLT ini, yang digunakan sebagai fasa diam adalah plat silika gel, sedangkan fasa geraknya adalah larutan pengembang yang digunakan adalah campuran diklorometan, benzene dan asam setat dengan perbandingan 50:1:1. Spot hasil KLT tidak dapat terlihat pada cahaya tampak, sehingga untuk melihat spot tersebut diperlukan sinar lampu ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm.



Gambar 10. KLT Vanilil Alkohol Hasil Reduksi

Hasil uji KLT menunjukkan R_f spot vanilin adalah 0,71 sedangkan Vanilil Alkohol hasil reduksi memiliki satu buah spot dengan nilai R_f sebesar 0,67 (lampiran 5).

Spot vanilin standar sebagai pembanding yang berada jauh di atas spot vanilil alkohol menunjukkan bahwa reduksi telah berlangsung dengan cukup baik karena adanya perbedaan nilai Rf antara vanilin standar dan vanilil alkohol. Karena hanya terdapat satu buah spot pada bagian vanilil alkohol, dapat disimpulkan bahwa vanilil alkohol tersebut memiliki kemurnian yang cukup baik.

3. Uji FT-IR

Vanilil alkohol hasil reduksi tersebut diidentifikasi lebih lanjut menggunakan instrumen FT-IR. Spektrumnya kemudian dibandingkan dengan spektrum FT-IR vanilin standar. Hasil yang didapatkan adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Serapan Senyawa Hasil Reduksi Vanilin Dibandingkan dengan Serapan Vanilin Menggunakan Spetroskopi Infra Merah

Gugus Fungsional	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)		
	Rentang	Hasil Reduksi Vanilin	Vanilin
C=O	1740-1720	-	1661,4
-CH aldehida	2850-2750	-	2858,5
C=C Aromatik	1600-1475	1511,4	1584,3
-OH bebas	3650-3600	3438,5	-
-OH ikatan hidrogen	3400-3200	3151,5	3149,4
-CH alkana	2850-3000	2965,1	2945,2
-CH ₃	1375-1450	1375,5	-
-CH ₂ -	1465	1453,7	1463,1

Spektrum IR hasil reduksi vanilin dibandingkan dengan spektrum IR vanilin sebagai pembanding, ternyata telah menunjukkan perbedaan yaitu hilangnya gugus karbonil aldehida, hal ini menunjukkan bahwa gugus aldehida pada senyawa vanilin sudah mengalami reduksi menjadi alkohol primer. Terjadinya alkohol primer didukung adanya serapan -OH bebas (tidak ada ikatan hidrogen) di 3438,5 cm⁻¹ dan juga pada serapan di daerah 1453,7 cm⁻¹ yang menunjukkan gugus metilen CH₂, serapan gugus metilen ini tidak dijumpai pada spektrum IR vanilin.

Pada hasil spektrum IR hasil reduksi vanilin juga ditemukan serapan melebar di 3400-3100 cm⁻¹, yang menunjukkan serapan gugus fenolik (ada ikatan hidrogen) pada serapan ini tidak dimiliki oleh spektrum IR vanilin.

B. Esterifikasi Vanilil Alkohol dengan Asam Meta-Hidroksibenzoat

Pembuatan ester vanilil meta-hidroksibenzoat dilakukan dengan melarutkan vanilil alkohol dalam tetrahidrofur, larutan tersebut kemudian dicampurkan dengan larutan asam meta-hidroksibenzoat dalam tetrahidrofur. Pada campuran tersebut menggunakan asam meta-hidroksibenzoat yang berlebih dengan komposisi 0,8 mmol vanilil alkohol : 1,6 mmol asam meta-hidroksibenzoat (1:2). Hal tersebut bertujuan supaya minimal pada satu buah gugus meta-hidroksibenzoat dapat teresterifikasi ke dalam vanilil alkohol, yaitu pada gugus OH primer vanilil alkohol karena halangan steriknya yang lebih rendah.

Reaksi esterifikasi adalah suatu reaksi antara asam karboksilat dan alkohol membentuk ester. Turunan asam karboksilat membentuk ester asam karboksilat (Fessenden 1981). Ester dihasilkan apabila asam karboksilat dipanaskan bersama alkohol dengan bantuan katalis. Pada reaksi esterifikasi asam meta-hidroksibenzoat dengan vanilil alkohol diperlukannya kehadiran suatu katalis yang dapat membantu reaksi esterifikasi tersebut. Hal ini karena asam meta-hidroksibenzoat yang termasuk kedalam golongan asam karboksilat yang tidak mudah menjalin reaksi dengan alkohol. Penyebabnya adalah gugus pergi (*leaving group*) pada asam karboksilat yang tidak mudah digantikan oleh gugus lain, karena sifatnya yang merupakan suatu basa kuat. Gugus alkohol (-OH) yang terdapat pada vanilil alkohol merupakan nukleofil lemah, sehingga memiliki laju yang sangat lambat dalam menyerang atom karbonil pada asam meta-hidroksibenzoat yang kurang reaktif.

Laju Esterifikasi asam karboksilat tergantung pada halangan sterik dalam alkohol dan asam karboksilat. Dilihat dari strukturnya, baik asam meta-hidroksibenzoat maupun vanilil alkohol merupakan suatu molekul yang besar, sehingga halangan sterik untuk bereaksi bertambah dan reaksi sulit terjadi. Karena itu, pada reaksi asam meta-hidroksibenzoat dengan vanilil alkohol diperlukan kehadiran katalis. Namun yang perlu diperhatikan, katalis yang bersifat asam dapat menyebabkan reaksi menjadi *reversible* dan menghidrolisis vanilil alkohol. Akibatnya produk ester tidak dapat diperoleh. Oleh karena itu, dalam

penelitian ini esterifikasi asam meta-hidroksibenzoat dengan vanilil alkohol tidak menggunakan katalis asam, namun menggunakan katalis 4-Dimetilaminopiridin (DMAP) dengan dibantu senyawa N,N'-Disikloheksilkarbodiimida (DCC) sebagai aktivator. Dengan kombinasi kerja dari kedua senyawa tersebut, diharapkan reaksi esterifikasi dapat berlangsung dalam waktu yang relatif singkat dan diperoleh produk vanilil meta-hidroksibenzoat secara optimal.

Senyawa DCC merupakan senyawa aktivator yang berfungsi mengaktifkan gugus karboksilat menjadi suatu agen pengasilasi yang reaktif. Gugus aktif senyawa ini adalah isourea ($-N=C=N-$) yang mengandung atom pusat karbon yang kekurangan elektron sehingga sangat mudah diserang oleh nukleofil. Yang bertindak sebagai nukleofil disini adalah muatan negatif pada oksigen dari gugus karboksilat. Senyawa DMAP sebagai nukleofilik yang lebih kuat dari alkohol berfungsi untuk mempercepat laju reaksi esterifikasi.

DMAP merupakan senyawa yang memiliki efek katalitik yang kuat dan digunakan sebagai katalis nukleofilik. DMAP berfungsi sebagai substituen donor elektron. Mekanisme katalis oleh DMAP melibatkan ion N-asilpiridium. Ion ini kemudian bereaksi dengan alkohol membentuk ester dan disikloheksil isourea (DCU) sebagai hasil samping dari penggunaan DCC.

Reaksi esterifikasi dilakukan pada suhu 60°C - 70°C selama 24 jam sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Proses esterifikasi ini dilakukan dengan menggunakan refluks yang dilengkapi dengan kondensor, hal ini bertujuan agar tidak adanya zat yang hilang selama proses esterifikasi. Pada penelitian ini, pemanasan dilakukan dalam wadah berisi parafin liquid. Dari proses esterifikasi tersebut dengan komposisi vanilil alkohol dan asam meta-hidroksibenzoat, didapat ester vanilil meta-hidroksibenzoat berupa serbuk berwarna putih dengan endapan kristal DCU berwarna putih.



Gambar 11. Kristal DCU (Disikloheksil Isoorea)

C. Pemurnian Senyawa Hasil Sintesis

Setelah campuran direaksikan selama 24 jam campuran disaring untuk memisahkan DCU yang berbentuk serbuk putih dari senyawa hasil sintesa. Untuk memisahkan senyawa ester yang masih bercampur dengan DCU, maka endapan DCU tersebut dicuci dengan aquades. Pemilihan aquades sebagai pencuci DCU adalah karena DCU tidak larut dalam air, sehingga memperkecil senyawa DCU larut kembali pada saat pencucian.

Larutan ester tersebut selanjutnya dimurnikan dengan cara ekstraksi menggunakan kloroform. Larutan ester tersebut dimasukkan ke dalam corong pisah, kemudian ditambahkan 10 mL kloroform dan dikocok. Kemudian campuran tersebut didiamkan beberapa saat sampai terjadi pemisahan dua lapisan. Kedua lapisan tersebut dapat dibedakan berdasarkan berat jenisnya. Karena berat jenis air lebih rendah daripada kloroform, maka lapisan yang di atas merupakan fasa air, sedangkan lapisan yang di bawah merupakan fasa organik (kloroform). Ester vanilil meta-hidroksibenzoat memiliki tingkat kepolaran yang sama, sehingga ester tersebut akan tertarik ke dalam fasa organik, sedangkan zat pengotor yang bersifat polar akan tertarik ke dalam fasa air. Maka lapisan bawah dari proses ekstraksi ini lah yang kemudian diambil sebagai filtrat, sedangkan sisanya perlu diekstraksi kembali sebanyak dua kali dengan perlakuan yang sama.

Hasil filtrat yang dikumpulkan dari tiga kali ekstraksi ini kemudian ditambah MgSO_4 anhidrat untuk menarik sisa – sisa air yang kemungkinan terbawa karena pemisahan yang kurang sempurna. Setelah disaring untuk memisahkan MgSO_4 anhidrat, pelarut fasa organik (kloroform) dihilangkan

dengan cara penguapan, sehingga didapat senyawa ester vanilil meta-hidroksibenzoat seberat 0,1205 gram.

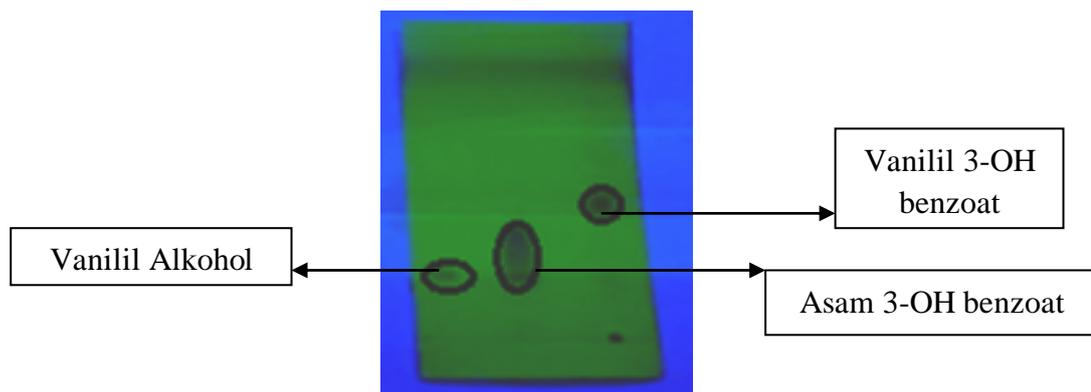
Senyawa ester vanilil meta-hidroksibenzoat tersebut dilakukan uji organoleptis, dimana didapatkan hasil sebagai berikut :

Tabel 2. Hasil Uji Organoleptis pada Vanilil Meta-Hidroksibenzoat

Uji Organoleptis	Hasil Sintesis
Bentuk	Serbuk
Warna	Putih
Bau	Khas, lemah
Tekstur	Tidak lengket
Titik Lebur	194°C - 196°C
Kelarutan	Tidak larut dalam air, larut dalam etanol, metanol, kloroform.

1. Uji KLT dan Titik Lebur

Vanilil meta-hidroksibenzoat hasil sintesis kemudian diuji dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan dibandingkan dengan spot vanilil alkohol dan spot asam meta-hidroksibenzoat (standar). Fasa diam yang digunakan adalah plat silika gel, sedangkan fasa geraknya adalah N-heksan : etil asetat (3 : 1). Spot yang terjadi dilihat dengan bantuan sinar ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm. Sehingga didapatkan hasil sebagai berikut :



Gambar 12. Hasil KLT Ester Vanilil Meta-Hidroksibenzoat

Spot senyawa ester vanilil meta-hidroksi benzoat memiliki nilai $R_f = 0,53$ sedangkan asam meta-hidroksibenzoat (standar) memiliki nilai $R_f = 0,48$ dan vaniilil alkohol memiliki nilai $R_f = 0,31$ (lampiran 9). Hasil KLT menunjukkan

bahwa sintesis telah berlangsung dengan cukup baik, hal ini ditandai dengan nilai Rf antara senyawa ester vanilil meta-hidroksibenzoat dengan pembanding vanilil alkohol dan asam meta-hidroksibenzoat memiliki nilai Rf yang berbeda. Senyawa ester yang dihasilkan memiliki nilai Rf yang lebih tinggi dibandingkan kedua senyawa pembandingnya. Hal ini didasarkan sifat ester yang lebih non polar dibandingkan asam karboksilat dan alkohol, sehingga ester kurang tertahan pada fasa diam silika gel yang lebih polar. Selain itu, vanilil meta-hidroksibenzoat memiliki kemurnian yang cukup baik, hal ini ditandai dengan tidak adanya spot lain pada daerah spot vanilil meta-hidroksibenzoat.

Dari hasil perhitungan yang dapat dilihat pada lampiran 8, didapatkan berat ester vanilil meta-hidroksibenzoat setelah pemurnian adalah 0,0962 gram dengan persen rendemen sebesar 43,8675%. Senyawa ester vanilil meta-hidroksibenzoat dianalisis menggunakan *melting point tester* dan didapatkan hasil bahwa ester vanilil meta-hidroksibenzoat memiliki titik lebur antara 194°C - 196°C.

2. Uji Spektrofotometri UV

Selanjutnya dilakukan analisa menggunakan spektrofotometri UV untuk melihat panjang gelombang yang dihasilkan dari senyawa ester yang terbentuk dengan senyawa standarnya menggunakan pelarut metanol. Dari hasil analisa spektrofotometri UV dengan menggunakan pelarut metanol, maka didapatkan hasil sebagai berikut:

Tabel 3. Hasil Spektrofotometri UV

Senyawa	Panjang Gelombang λ_{max} (nm)	Absorban
Vanilil meta-hidroksibenzoat	266,4	0,2443
Vanilil Alkohol	284,8	0,3960
Asama meta-hidroksibenzoat	234,6	0,7994

Dari data diatas bila dibandingkan antara panjang gelombang vanilil alkohol sebagai senyawa asal dengan ester vanilil meta-hidroksibenzoat, terlihat bahwa terjadi pergeseran biru (hipsokromik) disertai penurunan intensitas serapan (efek hipokromik). Hal ini dikarenakan bahwa adanya konjugasi elektron dari pasangan atom – atom.

3. Analisis FT-IR

Vanilil meta-hidroksibenzoat hasil sintesis diidentifikasi lebih lanjut dengan menggunakan instrumen FT – IR. Spektrum FT – IR hasil pengukuran digunakan untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat dalam sampel. Spektrum yang dihasilkan berupa puncak serapan pada daerah panjang gelombang tertentu. Analisis dilakukan dengan membandingkan spektrum FT –IR untuk vanilil meta-hidroksibenzoat dengan spektrum FT – IR untuk vanilil alkohol dan asam meta-hidroksibenzoat. Hasil pengukuran FT – IR yang didapat adalah sebagai berikut:

Tabel 4. Serapan Senyawa Hasil Sintesis Vanilil Meta-Hidroksibenzoat, dibandingkan Serapan Vanilil Alkohol dan Asam Meta-Hidroksibenzoat dengan Spektroskopi Infra Merah

Gugus Fungsional	Bilangan Gelombang cm^{-1}			
	Rentang	Vanilil Alkohol	Asam 3-OH benzoat	Vanilil 3-OHbenzoat
-OH bebas	3650-3600	3438,5	3309,9	3281,9
-OCH ₃	2850-2810	2888,7	-	2855,3
C-H tidak berfungsi	2960-2850	2965,1	2961,4	2929,7
OH Ikatan Hidrogen	3500-3200	3151,5	-	-
Posisi Meta (OH)	780-690	-	754,8	-
>CO Ester	2300-2000	-	-	2117,1
C=O Ester	1750-1730	-	-	1701,5
C-O Ester	1300-1000	-	-	1278,5
-OH Karboksilat	3400-2400	-	2823,5	-
C=O Karboksilat	1725-1700	-	1679,2	-
C-O Karboksilat	1300-1000	-	1231,9	-
-CH ₂	1465-1458	1466,7	-	-

Analisis dilakukan dengan membandingkan spektrum FT – IR senyawa vanilil meta-hidroksibenzoat hasil sintesis dengan spektrum dari pereaksinya. Gugus C=O pada hasil penelitian ini menyerap pada bilangan gelombang 1750-1730 cm^{-1} dan juga C=O ester menyerap pada bilangan gelombang 1701,5 cm^{-1} . Dari proses esterifikasi vanilil alkohol dengan asam meta-hidroksibenzoat dapat dihasilkan senyawa ester vanilil meta-hidroksibenzoat, ditandai dengan terbentuknya gugus ester dan hilangnya gugus –OH primer pada vanilil alkohol

sebagai senyawa utama yang telah bereaksi dengan senyawa asam meta-hidroksibenzoat.

D. Uji Aktivitas Antioksidan

Senyawa vanilil meta-hidroksibenzoat kemudian diuji aktivitas antioksidannya dengan menggunakan metode DPPH. Metode ini dipilih karena pengerjaannya yang sederhana, cepat dan tidak membutuhkan banyak *reagent* serta hanya memerlukan sedikit sampel untuk dilakukan pengujian. Prinsip dari metode uji aktivitas antioksidan ini adalah pengukuran aktivitas antioksidan secara kuantitatif yaitu dengan melakukan pengukuran penangkapan radikal DPPH oleh suatu senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis sehingga dengan demikian akan diketahui nilai aktivitas peredaman radikal bebas yang dinyatakan dengan nilai IC_{50} (*Inhibitory Concentration*). Nilai IC_{50} didefinisikan sebagai besarnya konsentrasi senyawa uji yang dapat meredam radikal bebas sebanyak 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} maka aktivitas peredaman radikal bebas semakin tinggi (Molyneux 2004). Prinsip kerja dari pengukuran ini adalah adanya radikal bebas stabil yaitu DPPH yang dicampurkan dengan senyawa antioksidan yang memiliki kemampuan mendonorkan hidrogen, sehingga radikal bebas dapat diredam (Robinson 1983).

Pengujian secara kuantitatif ini dilakukan untuk mengetahui absorbansi DPPH yang tersisa setelah ditambahkan senyawa vanilil meta-hidroksibenzoat, panjang gelombang DPPH adalah 515 nm (lampiran 11). Jika suatu senyawa memiliki aktivitas sebagai antioksidan, maka akan terjadi penurunan nilai absorbansi DPPH pada panjang gelombang 515 nm.

Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah vitamin C. Vitamin C merupakan antioksidan yang larut dalam air. Penggunaan kontrol positif pada pengujian aktivitas antioksidan ini adalah untuk mengetahui seberapa kuat potensi antioksidan yang ada pada vanilil meta-hidroksibenzoat jika dibandingkan dengan vitamin C. Apabila nilai IC_{50} sampel sama atau mendekati nilai IC_{50} kontrol positif maka dapat dikatakan bahwa sampel berpotensi sebagai salah satu alternatif antioksidan yang sangat kuat.

Pada tabel 5 dan 6 berikut ini merupakan hasil pengukuran aktivitas antioksidan ester vanilil meta hidroksibenzoat dan vitamin C secara spektrofotometri :

Tabel 5. Hasil Uji Antioksidan Vanilil Meta Hidroksibenzoat terhadap DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrazil)

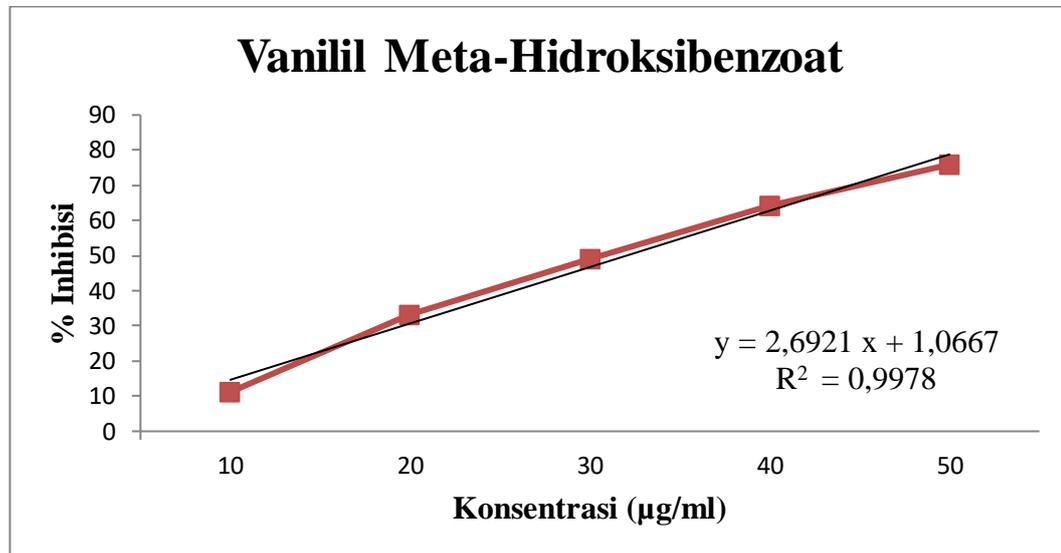
Kons (ppm)	Absorbansi			Log Kons (µg/mL)	Persen Inhibisi (%)	Probit	IC50 (ppm)
	1	2	3				
10	0,6385	0,6392	0,6390	1	11,19	3,7840	
20	0,4802	0,4806	0,4806	1,3	33,22	4,5656	
30	0,3657	0,3662	0,3662	1,48	49,14	4,9774	28,91
40	0,2577	0,2579	0,2574	1,6	64,18	5,3638	
50	0,1737	0,1736	0,1733	1,7	75,88	5,7031	

Tabel 6. Hasil Uji Antioksidan Vitamin C terhadap DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrazil)

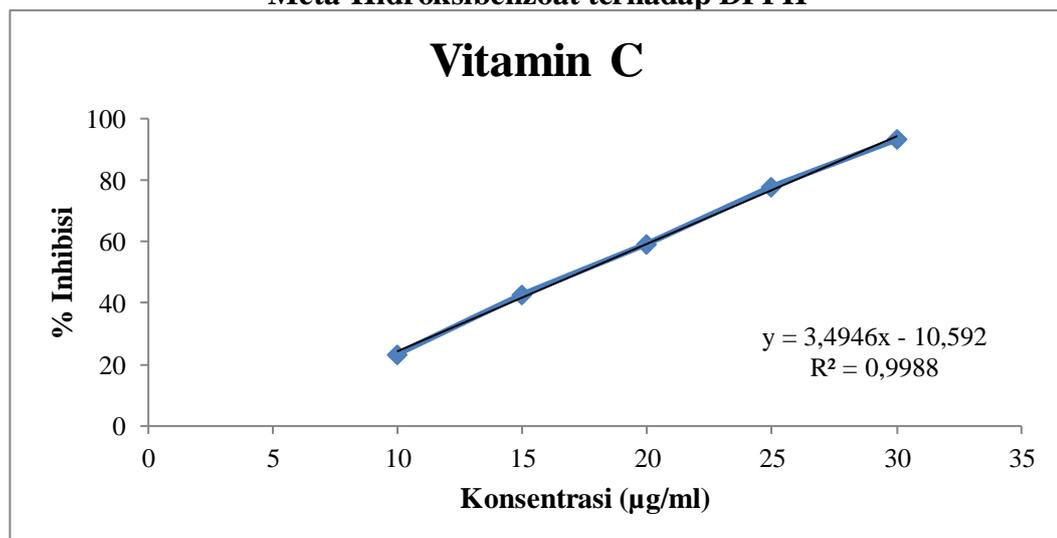
Kons (ppm)	Absorbansi			Log Kons (µg/mL)	Persen Inhibisi (%)	Probit	IC50 (ppm)
	1	2	3				
10	0,5953	0,5950	0,5949	1	23,49	4,2743	
15	0,4465	0,4462	0,4461	1,17	42,62	4,8134	
20	0,3167	0,3166	0,3164	1,30	59,29	5,2327	15,68
25	0,1722	0,1720	0,1720	1,39	77,87	5,7666	
30	0,0528	0,0526	0,0525	1,47	93,23	6,4909	

Nilai IC50 vanilil meta-hidroksibenzoat dan vitamin C didapat dari hasil perhitungan persamaan regresi linier pada tabel 5 dan 6 di atas, dimana persamaan regresi dari vanilil meta-hidroksibenzoat yang didapat pada tabel 5 di atas adalah $y = 2,6921x + 1,0667$ dan $r = 0,9978$, sedangkan persamaan regresi dari vitamin C yang didapat pada tabel 6 adalah $y = 3,4946x - 10,592$ dan $r = 0,9988$. Koefisien y pada persamaan ini adalah sebagai IC₅₀, sedangkan koefisien x pada persamaan ini adalah konsentrasi dari sampel yang akan dicari nilainya, dimana nilai dari x yang didapat merupakan besarnya konsentrasi yang diperlukan untuk dapat meredam 50% aktivitas radikal DPPH. Nilai r pada ester vanilil meta-hidroksibenzoat sebesar 0,9978 dan nilai r pada vitamin C sebesar 0,9988 yang mendekati positif 1 (bernilai positif) menggambarkan bahwa dengan meningkatnya konsentrasi vanilil meta-hidroksibenzoat dan vitamin C maka semakin besar aktivitas antioksidannya hal ini dapat dilihat dari kurva hubungan

konsentrasi vanilil meta-hidroksibenzoat terhadap persen inhibisi serta kurva hubungan konsentrasi vitamin C terhadap persen inhibisi pada gambar berikut :



Gambar 13. Grafik Hubungan Konsentrasi dengan Persen Inhibisi Vanilil Meta-Hidroksibenzoat terhadap DPPH



Gambar 14. Grafik Hubungan Konsentrasi dengan Persen Inhibisi Vitamin C terhadap DPPH

Nilai IC_{50} vanilil meta-hidroksibenzoat jika dilihat pada tabel 5 di atas berada di dalam konsentrasi dimana konsentrasi tertinggi dari vanilil meta-hidroksibenzoat 50 µg/mL mampu menghambat 75,88% radikal DPPH, sedangkan konsentrasi tertinggi dari vitamin C 30 µg/mL mampu menghambat 93,23%. Dari hasil perhitungan juga didapat nilai IC_{50} vitamin C adalah 15,68 µg/mL, sedangkan nilai IC_{50} dari ester vanilil meta-hidroksibenzoat adalah

sebesar 28,91 $\mu\text{g/mL}$ sehingga vanilil meta-hidroksibenzoat memiliki aktivitas antioksidan yang cukup baik bila dibandingkan dengan vitamin C.

Suatu senyawa memiliki antioksidan sangat kuat apabila nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm, kuat apabila nilai IC_{50} antara 50-100 ppm, sedang apabila nilai IC_{50} berkisar antara 100-150 ppm dan lemah IC_{50} berkisar antara 150-200 ppm (Phongpaichit 2007). Mengacu pada batasan ini maka dapat dinyatakan bahwa sampel vanilil meta-hidroksibenzoat memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat dibandingkan dengan vitamin C yang digunakan sebagai pembanding. Namun aktivitas vanilil meta-hidroksibenzoat masih lebih lemah dari aktivitas antioksidan dari vitamin C. Vitamin C yang digunakan tergolong memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. Vitamin C merupakan suatu antioksidan kuat, karena dengan mendonorkan elektronnya vitamin ini mencegah senyawa-senyawa lain agar tidak teroksidasi (Padayatty dkk. 2003). Senyawa fenolik yang terkandung dalam ester vanilil meta-hidroksibenzoat memiliki kemampuan sebagai antioksidan hal ini karena pada strukturnya terdapat gugus hidroksil yang dapat mendonorkan atom hidrogennya kepada radikal bebas sehingga radikal senyawa fenolik dapat meredam radikal bebas.

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Hasil dari reduksi vanilin menjadi vanilil alkohol didapat rendemen sebesar 76,03%. Lalu hasil reaksi esterifikasi dengan metode steglich antara vanilil alkohol dengan asam meta-hidroksibenzoat menghasilkan vanilil meta-hidroksibenzoat dengan rendemen 43,8675% dan diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH didapatkan nilai IC_{50} sebesar 28,91 ppm yang dapat disimpulkan bahwa senyawa vanilil meta-hidroksibenzoat memiliki kemampuan meredam radikal bebas yang kuat.

B. Saran

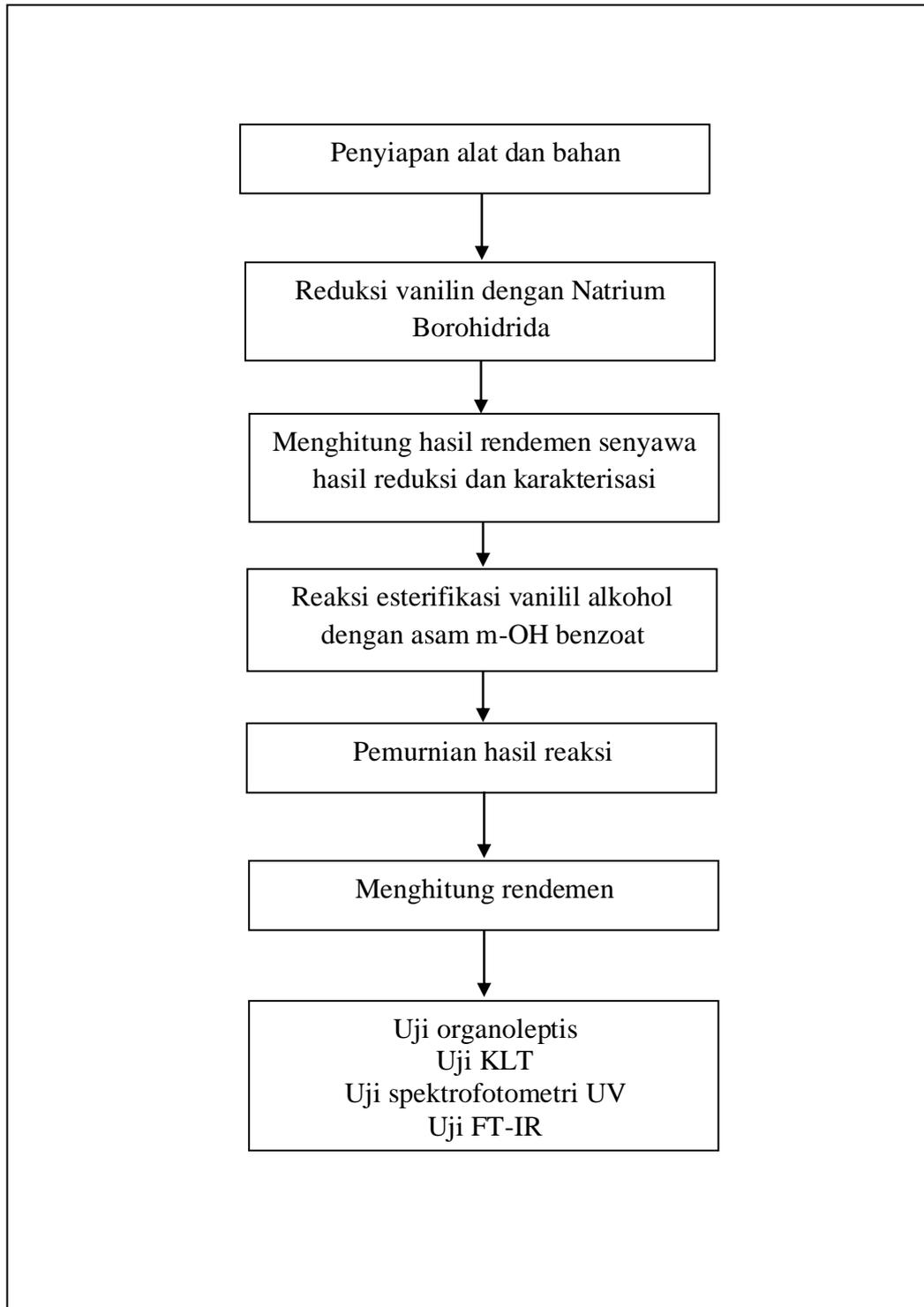
Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk dilakukan uji aktivitas lainnya terhadap senyawa vanilil meta-hidroksibenzoat seperti uji aktivitas antibakteri dan uji toksisitas.

DAFTAR PUSTAKA

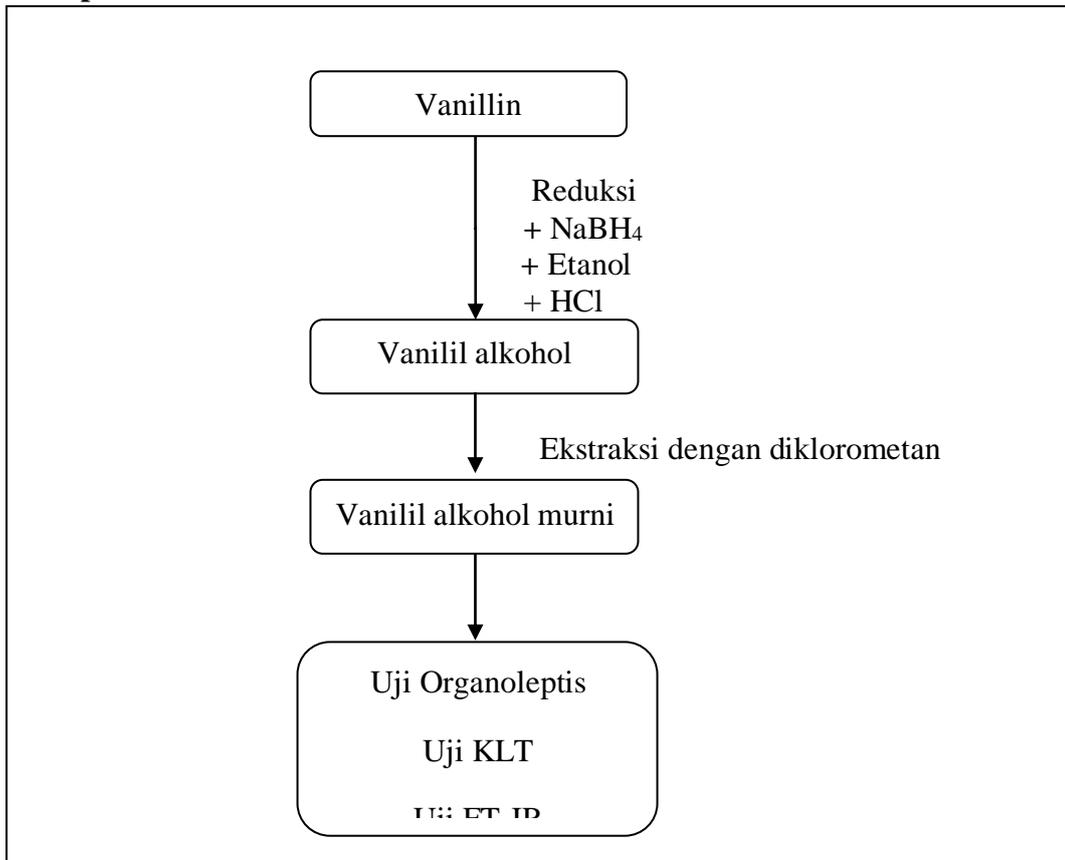
- Aini, Nur, Bambang P., Iqmal T. 2007. *Analisis Hubungan Struktur – Aktivitas Antioksidan dari Isoeugenol, Vanilin dan Turunannya*. Fakultas Matematika dan IPA. Universitas Gajah Mada.
- Badarinath, a. V., Mallikarjuna Rao, C. Madhu Sudhana Chetty. 2010. *A review on In-vitro antioxidant methods: Comparisons, correlations and considerations*. *International Journal of PharmTech Research*, 2(2), pp.1276–1285.
- Bender, David A., Robbert K., Peter J. Kennelly. 2014. *Biokimia Herper* Edisi 29. Jakarta : EGC.
- Budimarwanti, C. 2009. *Sintesis Senyawa 4-Hidroksi -5-Dimetilaminometil-3-Metoksibenzil Alkohol dengan Bahan Dasar Vanilin Melalui Reaksi Mannich*. Jurusan Pendidikan Kimia FMIPA. Universitas Negeri Yogyakarta.
- Dehpour A, Ebrahimzadeh A, Fazel S, Mohammad N. 2009. *Antioxidant Activity of Methanol Extract of Ferula Assafoetida and Its Essential Oil Composition*. *Grasas Aceites*, 60(4), 405-412.
- DepKes RI. 1979. *Farmakope Indonesia Edisi III*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- DepKes RI. 1995. *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Fessenden R.J, dan Fessenden J.S. 1986. *Kimia Organik jilid 2*. Jakarta: penerbit Erlangga.
- Khopkar, S.M. 2008. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI-Press.
- Kumar, Ravendra, P. K. Sharma. 2012. *A Review on the Vanillin derivatives showing variuos Biological activities*. Departement of Pharmaceutical Technology. Meerut Instituet of Engineering & Technology. India.
- Molyneux, Philip. 2004. *The Use of Stable Free Radical Diphenyl –picrylhydrazyl (DPPH) for Estimating antioxidant Activity*. Songklanakarin J. Sci Technal.
- Muzdalifah, Lila. 2009. *Reaksi Esterifikasi Asam p-Hidroksi Benzoat dengan Gliserol Menggunakan Katalis Asam*. Fakultas Matematika dan IPA. Universitas Indonesia. Depok.

- Oneil, M. 2006. *The Merck Index. An Encyclopedin Of Chemicals, drugs, and biological* 40th ed. Merck & Co., Inc. Whitehouse station, New York, USA. Hal 563.
- Padayatty, J., Sebastian, Arie Katz, Yaohui Wang, Peter Eck. 2003. *Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention*. Journal of the American College of Nutrition. Vol. 22, No. 1, 18–35.
- Padmawinata, K. 1991. *Pengantar Kromatografi edisi ke dua, ITB Press, Bandung. Terjemahan : Introduction to Chromatography, Gritter, R.J : J.M Bobbit; A.E Schwarting, 1985*. Holden Day Inc., USA.
- Phongpaichit. 2007. *Biological Activities of Extracts From Endophytic Fungi Isolated From Garcinia Plan*. Chem Pharm Bull: Immunology & Medical Mycrobiology.
- Prabawati, Susy Y. 2012. *Sintesis Senyawa 1,4 - Bis [(2-Hidroksi-3-Metoksi-5-Metanal-Fenil)-Metil] Piperazin dari Bahan Dasar Vanilin dan Uji Aktivitasnya sebagai Zat Antioksidan*. Skripsi. Fakultas Sains dan Teknologi. UIN Sunan Kalijaga. Yogyakarta.
- Puspita-Nienaber, N. L., Rahayu, W., dan Andariwulan, N. 1997. *Sifat Antioksidan dan Antimikroba Rempah-Rempah dan Bumbu Tradisional, Makalah Seminar Sehari Khasiat Keamanan Pangan Bumbu dan Jamu Tradisional*. Yogyakarta.
- Ridho, Ery Al. 2013. *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Buah Lakum (Cayratia trifolia) dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil)*. Skripsi. Fakultas Kedokteran. Universitas Tanjung Pura. Pontianak.
- Robinson, T..1983. *The Organic Constituents of Higher Plants Their Chemistry and Interrelationships, 5th Ed, 200*. Cordus Press. North Amherst.
- Setiadi, Muhammad Irwan. 2008. *Sintesis Maltovanilat melalui Mekanisme Steglich Menggunakan Pelarut Aseton*. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Indonesia. Depok.
- Shivaprasasi, H.N., S. Mohan, M.D. Kharya. 2005. *In-vitro Models for Antioxidant Activity Evaluation*. A. Rivew.
- Sunardi. 2006. *Diktat Kuliah Cara-Cara Pemisahan*. Depok: Departemen Kimia FMIPA UI. Sykes, P. 1989. *Penuntun Mekanisme Reaksi Kimia Organik*. Gramedia. Jakarta.
- Sykes, P. 1989. *Penuntun Mekanisme Reaksi Kimia Organik*. Gramedia. Jakarta.
- Yuliani, Veronika. 2008. *Sintesis Ester Laktovanilat dari Asam Vanilat dan Laktosa serta Uji Aktivitas Antioksidan*. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Indonesia. Depok.

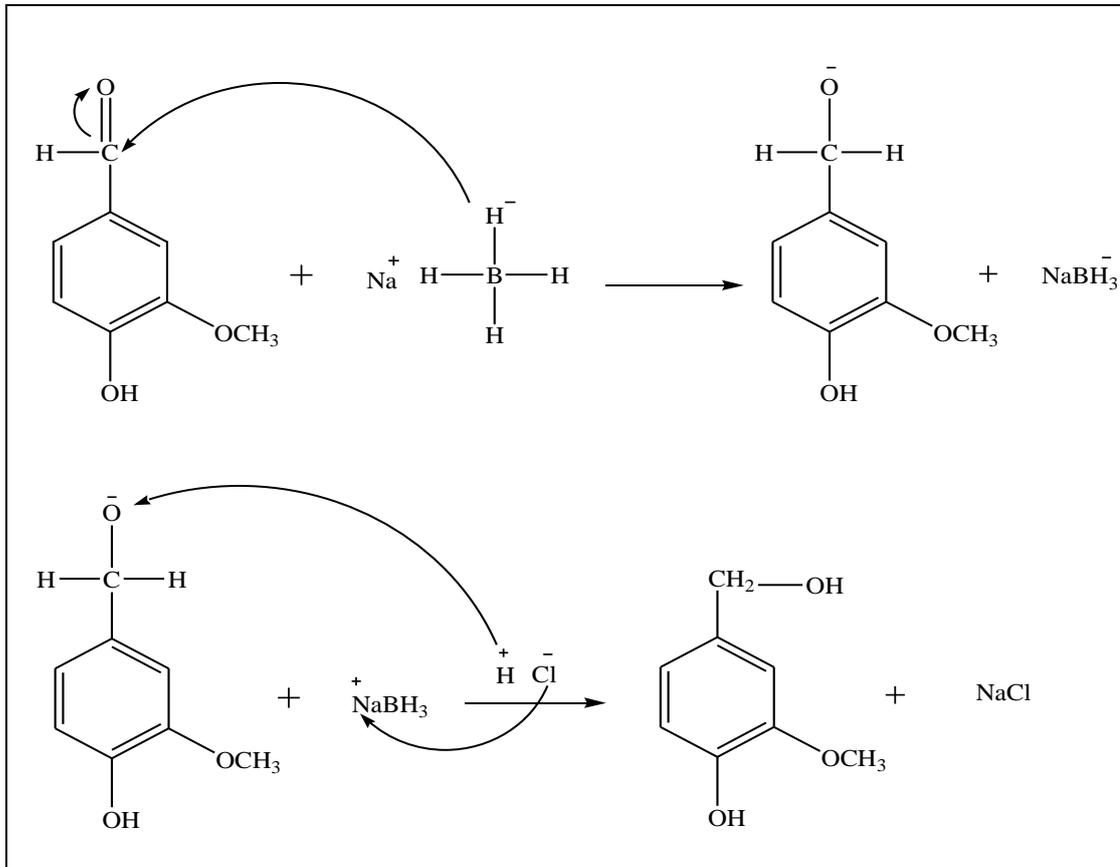
Lampiran 1. Skema Penelitian Sintesa



Lampiran 2. Skema Pembuatan Vanilil Alkohol



Lampiran 3. Skema Reaksi Reduksi Vanilin



Lampiran 4. Perhitungan Hasil Reduksi Vanilil Alkohol

Berat cawan kosong = 55,5300 gram

Berat cawan + sampel = 58,1337 gram

Sampel = 2,3067 gram

Bobot teoritis = **mol vanilin (mol terkecil) x BM vanilil alkohol**

= 0,0197 mol x 154 g/mol

= 3,0338 gram

% Rendemen = $\frac{\text{bobot hasil reduksi}}{\text{bobot teoritis}} \times 100\%$
= $\frac{2,3067 \text{ gram}}{3,0338 \text{ gram}} \times 100\%$
= 76,0333 %

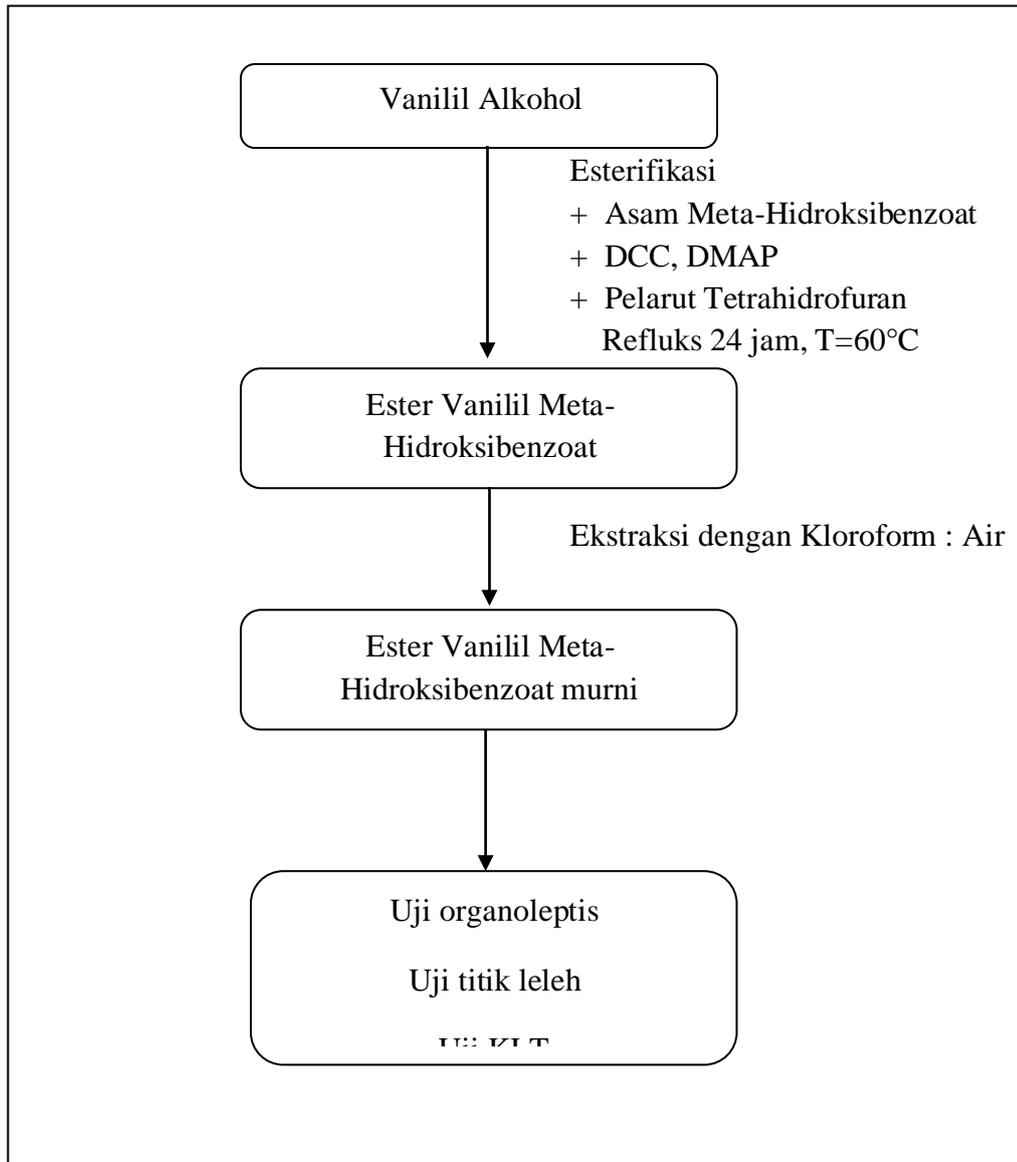
Lampiran 5. Perhitungan Nilai Rf Vanilil Alkohol

$$Rf = \frac{\text{Jarak yang ditempuh spot}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

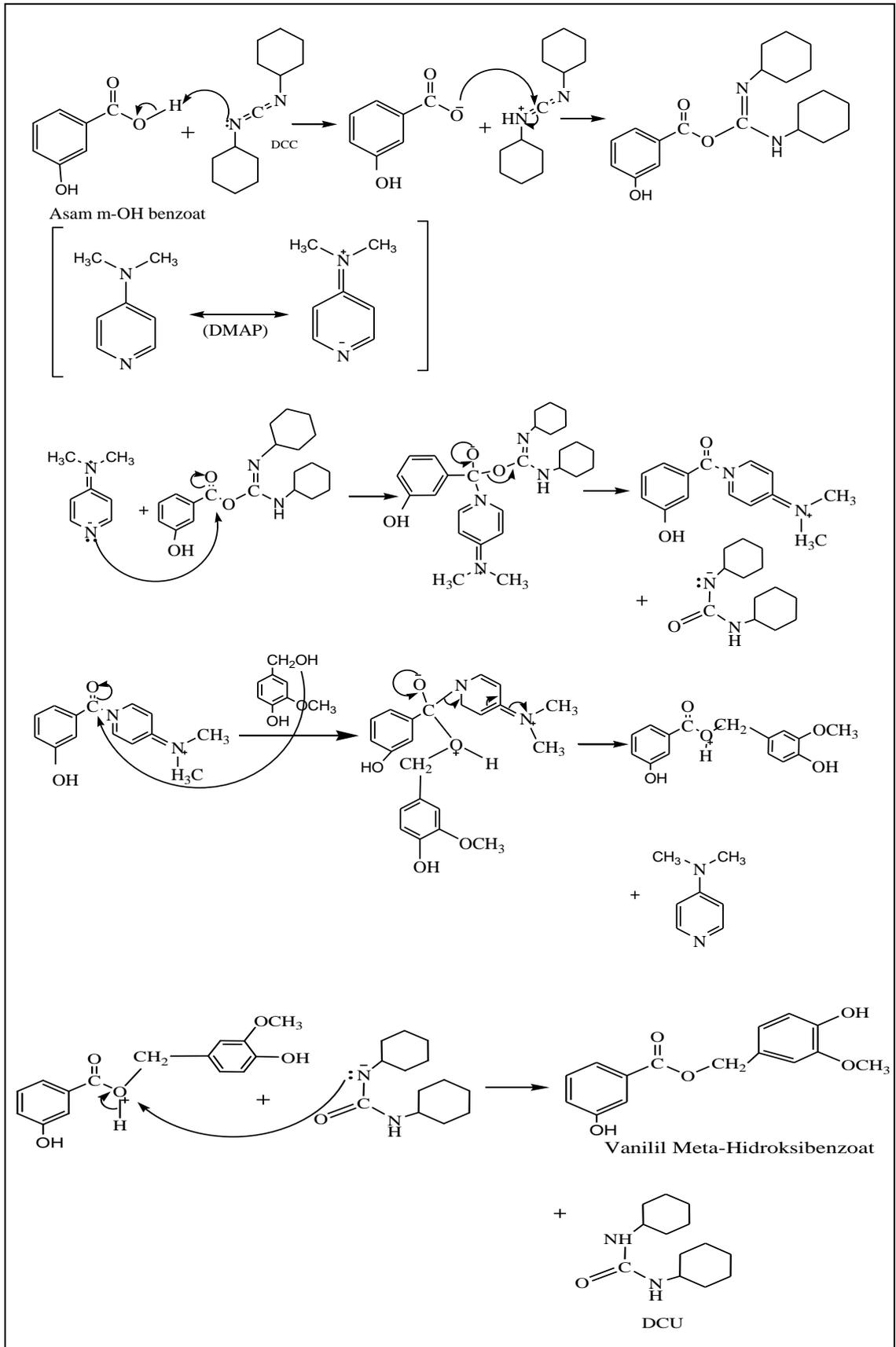
$$= \frac{4 \text{ cm}}{6 \text{ cm}}$$

$$= 0,67$$

Lampiran 6. Skema Pembuatan Ester Vanilil Meta-Hidroksibenzoat



Lampiran 7. Skema Reaksi Esterifikasi Vanilil Meta-Hidroksibenzoat



Lampiran 8. Perhitungan Hasil Sintesis Vanilil Meta-Hidroksibenzoat

Berat cawan kosong = 50,9861 gram

Berat cawan + sampel = 51,1066 gram

Sampel hasil sintesis = 0,1205 gram

Sampel setelah dimurnikan = 0,0962 gram

Bobot teoritis = mol vanilin (mol terkrcil) x BM vanilil 3-OH benzoat

= 0,8 mmol x 274,1207 g/mol

= 219,2966 mg

% Rendemen = $\frac{\text{bobot hasil reduksi}}{\text{bobot teoritis}} \times 100\%$

= $\frac{96,2 \text{ mg}}{219,2966 \text{ mg}} \times 100\%$

= 43,8675 %

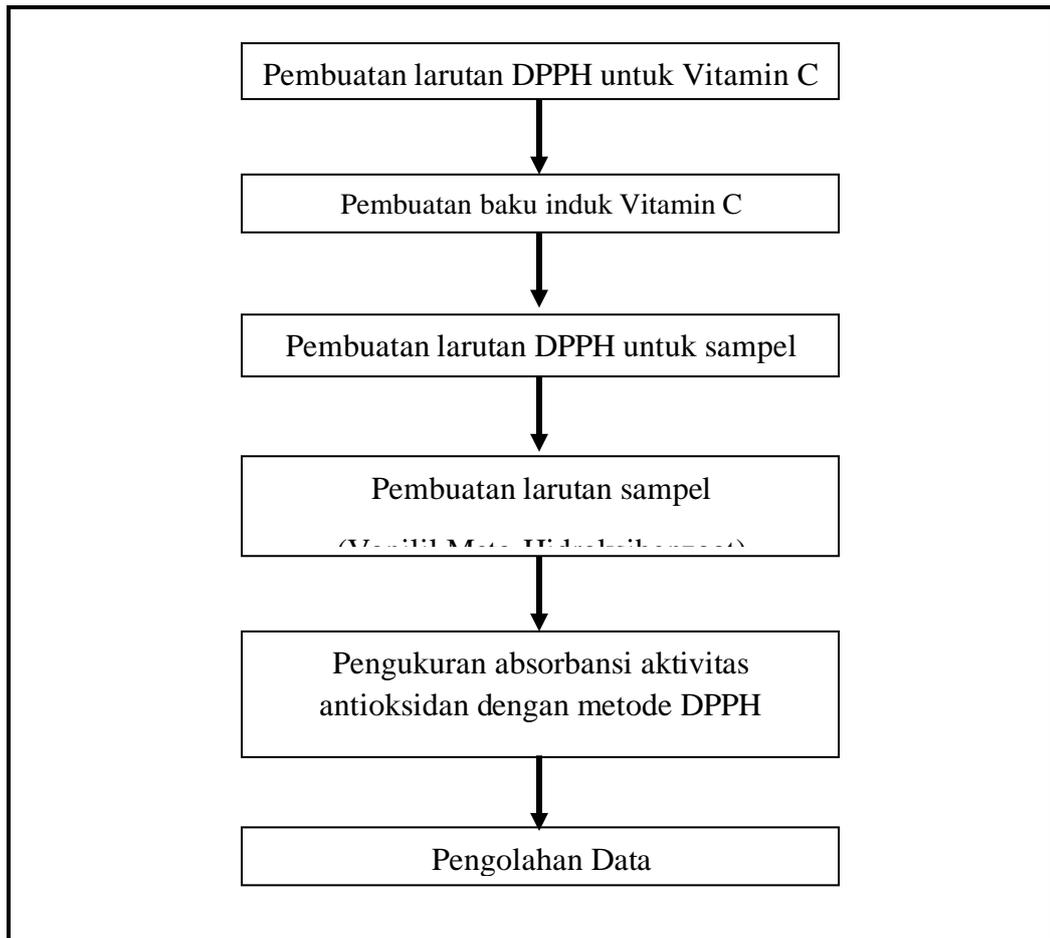
Lampiran 9. Perhitungan Nilai Rf Ester Vanilil Meta-Hidroksibenzoat

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh spot}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

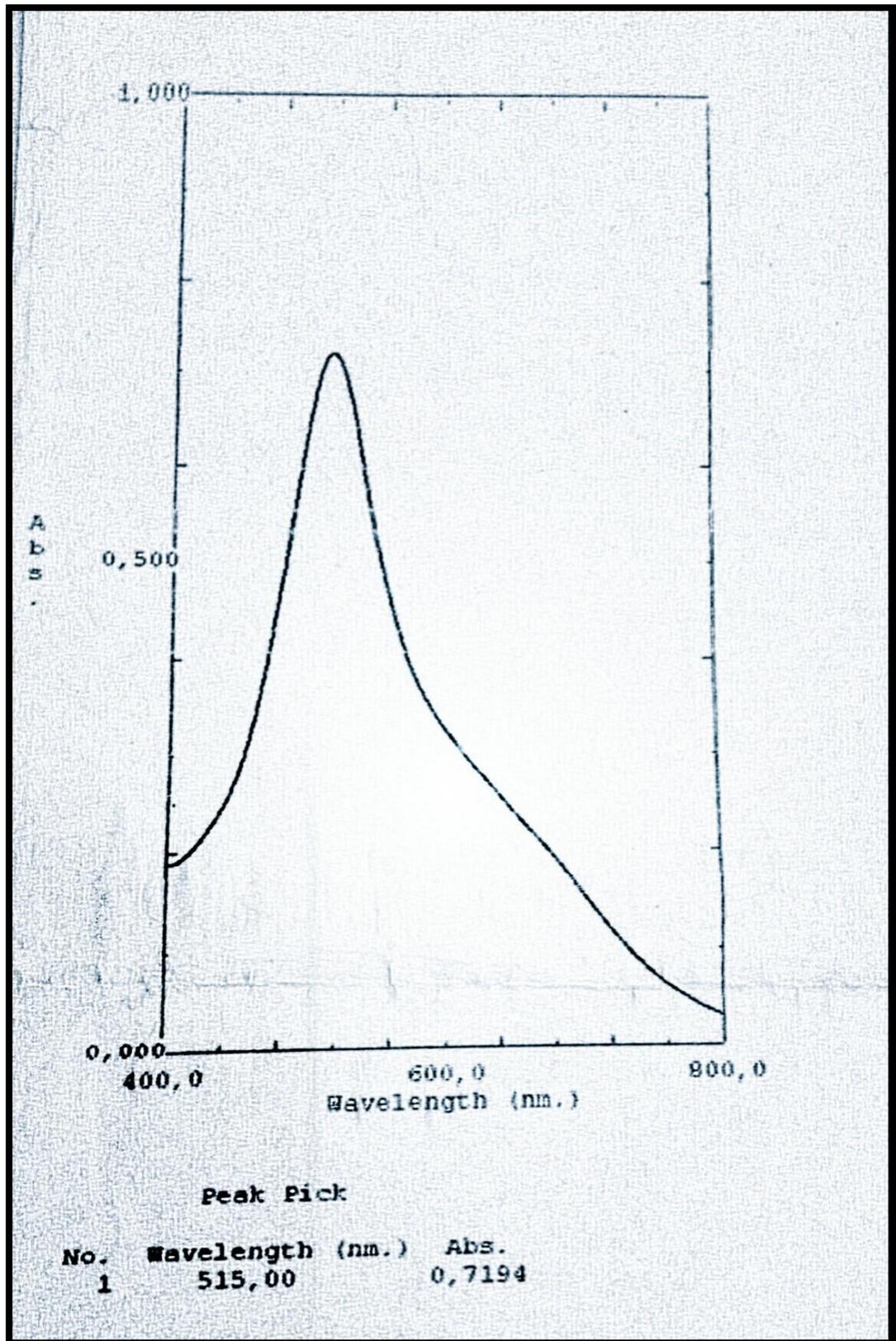
$$= \frac{3,2 \text{ cm}}{6 \text{ cm}}$$

$$= 0,53$$

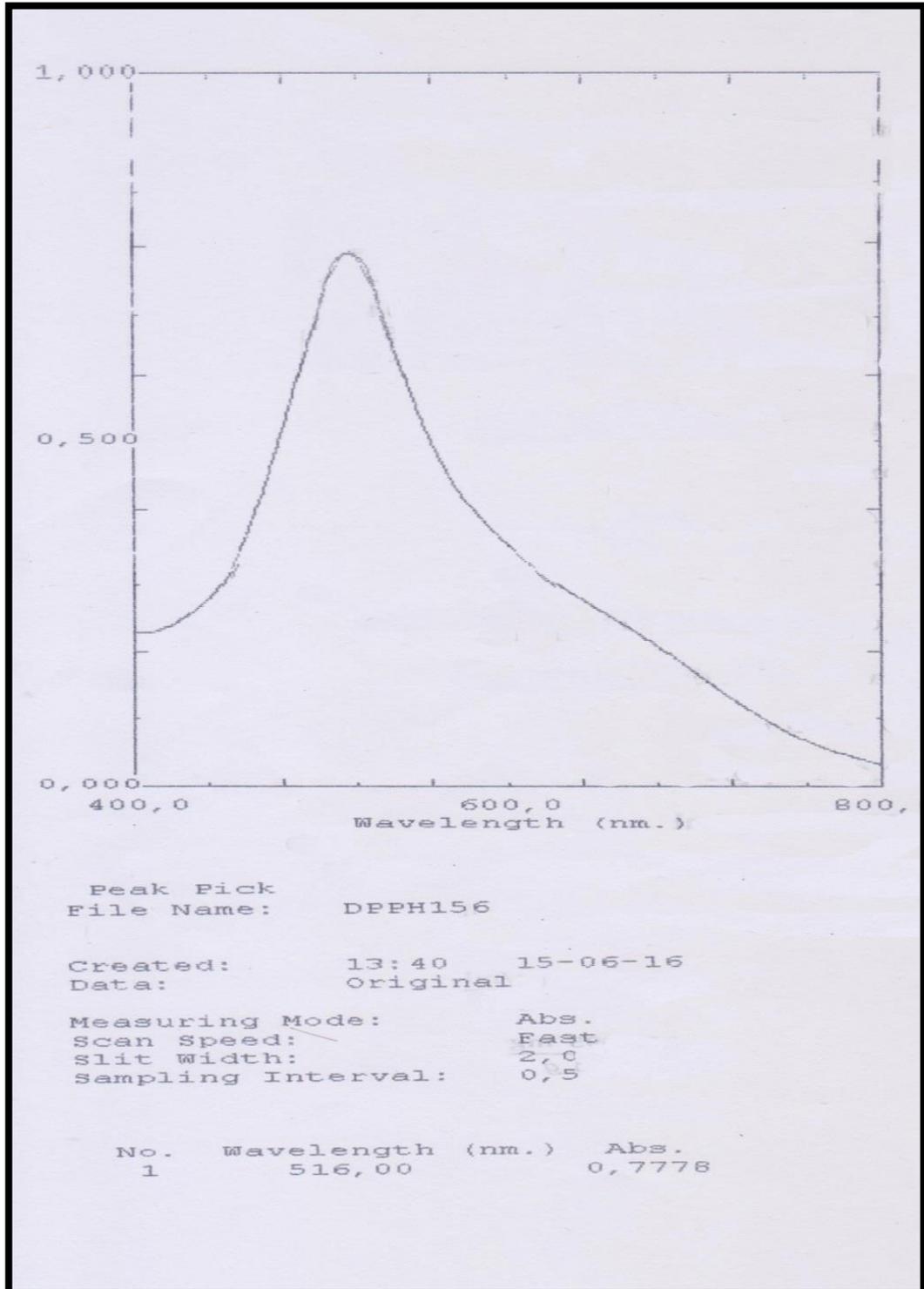
Lampiran 10. Skema Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Hasil Sintesis



Lampiran 11. Spektrum Panjang Gelombang Maksimum DPPH (2,2,-difenil-1-pikrilhidrazil) untuk Vanilil Meta-Hidroksibenzoat.



Lampiran 12. Spektrum Panjang Gelombang Maksimum DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) untuk Vit C.



Lampiran 13. Perhitungan % Inhibisi dan IC50 Vitamin C

Kons (ppm)	Absorbansi			Log Kons (µg/ml)	Rata-Rata Persen Inhibisi (%)	Probit	IC50 (ppm)
	1	2	3				
10	0,5953	0,5950	0,5949	1	23,49	4,2743	
15	0,4465	0,4462	0,4461	1,17	42,62	4,8134	
20	0,3167	0,3166	0,3164	1,30	59,29	5,2327	15,68
25	0,1722	0,1720	0,1720	1,39	77,87	5,7666	
30	0,0528	0,0526	0,0525	1,47	93,23	6,4909	

a. Contoh Perhitungan persen Inhibisi

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{serapan blanko DPPH} - \text{serapan larutan uji}}{\text{serapan blanko DPPH}} \times 100 \%$$

Nilai absorbansi Blanko DPPH = 0,7778

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi } 10 \mu\text{g/ml} &= \frac{0,7778 - 0,5953}{0,7778} \times 100\% = 23,46 \% \\ &= \frac{0,7778 - 0,5950}{0,7778} \times 100\% = 23,50 \% \\ &= \frac{0,7778 - 0,5949}{0,7778} \times 100\% = 23,51 \% \end{aligned}$$

Rata-rata % Inhibisi = 23,49 %

b. Perhitungan IC50

Diperoleh :
 $a = -0,3495$
 $b = 4,4748$
 $r = 0,9719$

Maka : $y = bx + a$
 $5 = 4,4748 x + 0,3495$
 $x = 1,1954$
 $\text{IC}_{50} = \text{Antilog } x$
 $= \text{Antilog } 1,1954$
 $= 15,68 \mu\text{g/ml}$

Lampiran 14. Perhitungan % Inhibisi dan IC₅₀ Vanilil Meta-Hidroksibenzoat

Kons (ppm)	Absorbansi			Log Kons (µg/ml)	Rata-Rata Persen Inhibisi (%)	Probit	IC ₅₀ (ppm)
	1	2	3				
10	0,6385	0,6392	0,6390	1	11,19	3,7840	
20	0,4802	0,4806	0,4806	1,3	33,22	4,5656	
30	0,3657	0,3662	0,3662	1,48	49,14	4,9774	28,91
40	0,2577	0,2579	0,2574	1,6	64,18	5,3638	
50	0,1737	0,1736	0,1733	1,7	75,88	5,7031	

a. Contoh Perhitungan persen Inhibisi

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{serapan blanko DPPH} - \text{serapan larutan uji}}{\text{serapan blanko DPPH}} \times 100 \%$$

Nilai absorbansi Blanko DPPH = 0,7194

$$\text{Konsentrasi } 10 \mu\text{g/ml} = \frac{0,7194 - 0,6385}{0,7194} \times 100\% = 11,25 \%$$

$$= \frac{0,7194 - 0,6392}{0,7194} \times 100\% = 11,15 \%$$

$$= \frac{0,7194 - 0,6390}{0,7194} \times 100\% = 11,18 \%$$

$$= \frac{0,7194 - 0,6390}{0,7194} \times 100\% = 11,18 \%$$

$$= \frac{0,7194 - 0,6390}{0,7194} \times 100\% = 11,18 \%$$

$$= \frac{0,7194 - 0,6390}{0,7194} \times 100\% = 11,18 \%$$

$$\text{Rata-rata \% Inhibisi} = 11,19\%$$

b. Perhitungan IC₅₀

Diperoleh : a = 1,0667

b = 2,6921

r = 0,9978

Maka : y = bx + a

$$5 = 2,6921 x + 1,0667$$

$$x = 1,4610$$

$$\text{IC}_{50} = \text{Antilog } x$$

$$= \text{Antilog } 1,4610$$

$$= 28,91 \mu\text{g/mL}$$

Lampiran 15. Perhitungan % Inhibisi dan IC₅₀ Vanilil Alkohol

Kons (ppm)	Absorbansi			Log Kons (µg/ml)	Rata-Rata Persen Inhibisi (%)	Probit	IC ₅₀ (ppm)
	1	2	3				
25	0,7424	0,7444	0,7462	1,3979	13,83	3,9107	
50	0,5923	0,5906	0,5940	1,6989	31,43	4,5126	
75	0,3923	0,3830	0,3912	1,8750	54,59	5,1105	70,81
100	0,3465	0,3451	0,3473	2	59,90	5,2484	
125	0,1939	0,1930	0,1933	2,0969	77,60	5,7554	

a. Contoh Perhitungan persen Inhibisi

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{serapan blanko DPPH} - \text{serapan larutan uji}}{\text{serapan blanko DPPH}} \times 100 \%$$

Nilai absorbansi Blanko DPPH = 0,8639

$$\text{Konsentrasi } 50 \mu\text{g/ml} = \frac{0,8639 - 0,5923}{0,8639} \times 100\% = 31,43 \%$$

$$= \frac{0,8639 - 0,5906}{0,8639} \times 100\% = 31,63 \%$$

$$= \frac{0,8639 - 0,5940}{0,8639} \times 100\% = 31,24 \%$$

$$= \frac{0,8639 - 0,5940}{0,8639} \times 100\% = 31,24 \%$$

$$= \frac{0,8639 - 0,5940}{0,8639} \times 100\% = 31,24 \%$$

$$= \frac{0,8639 - 0,5940}{0,8639} \times 100\% = 31,24 \%$$

Rata-rata % Inhibisi = 31,43 %

b. Perhitungan IC₅₀

Diperoleh : a = 0,2897

b = 2,5459

r = 0,9874

Maka : y = bx + a

$$5 = 2,5459 x + 0,2897$$

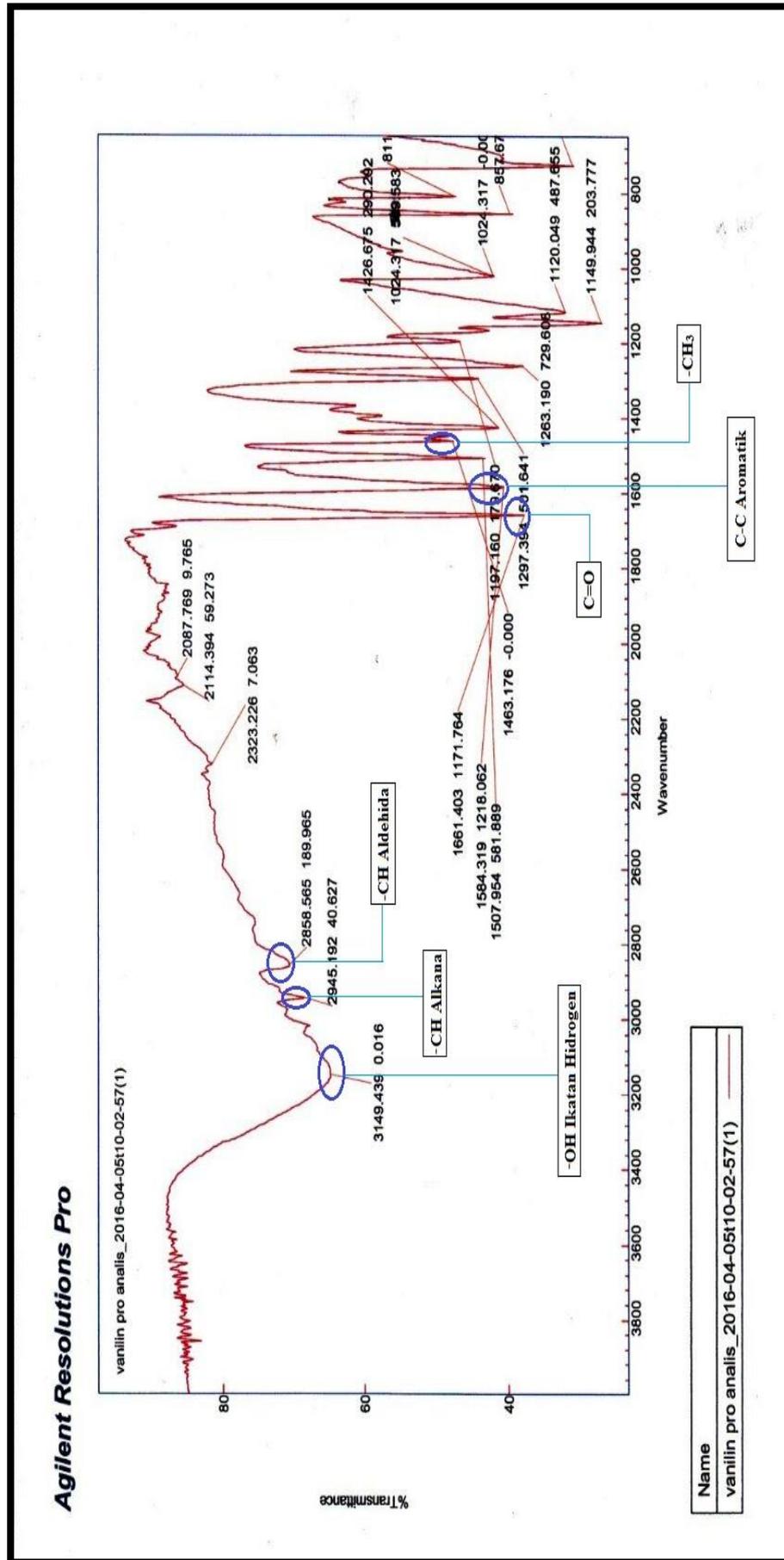
$$x = 1,8501$$

IC₅₀ = Antilog x

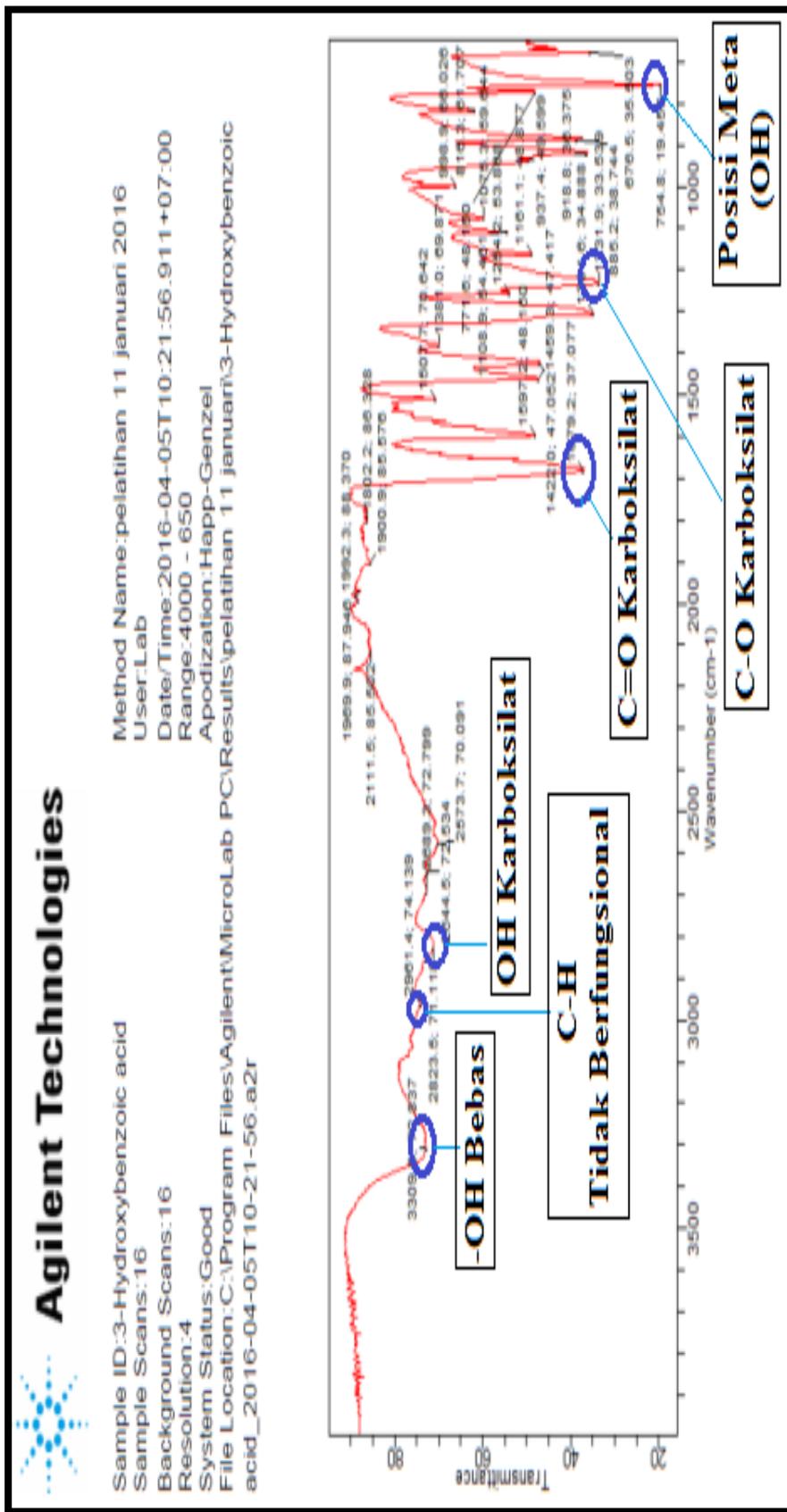
$$= \text{Antilog } 1,8501$$

$$= 70,81 \mu\text{g}$$

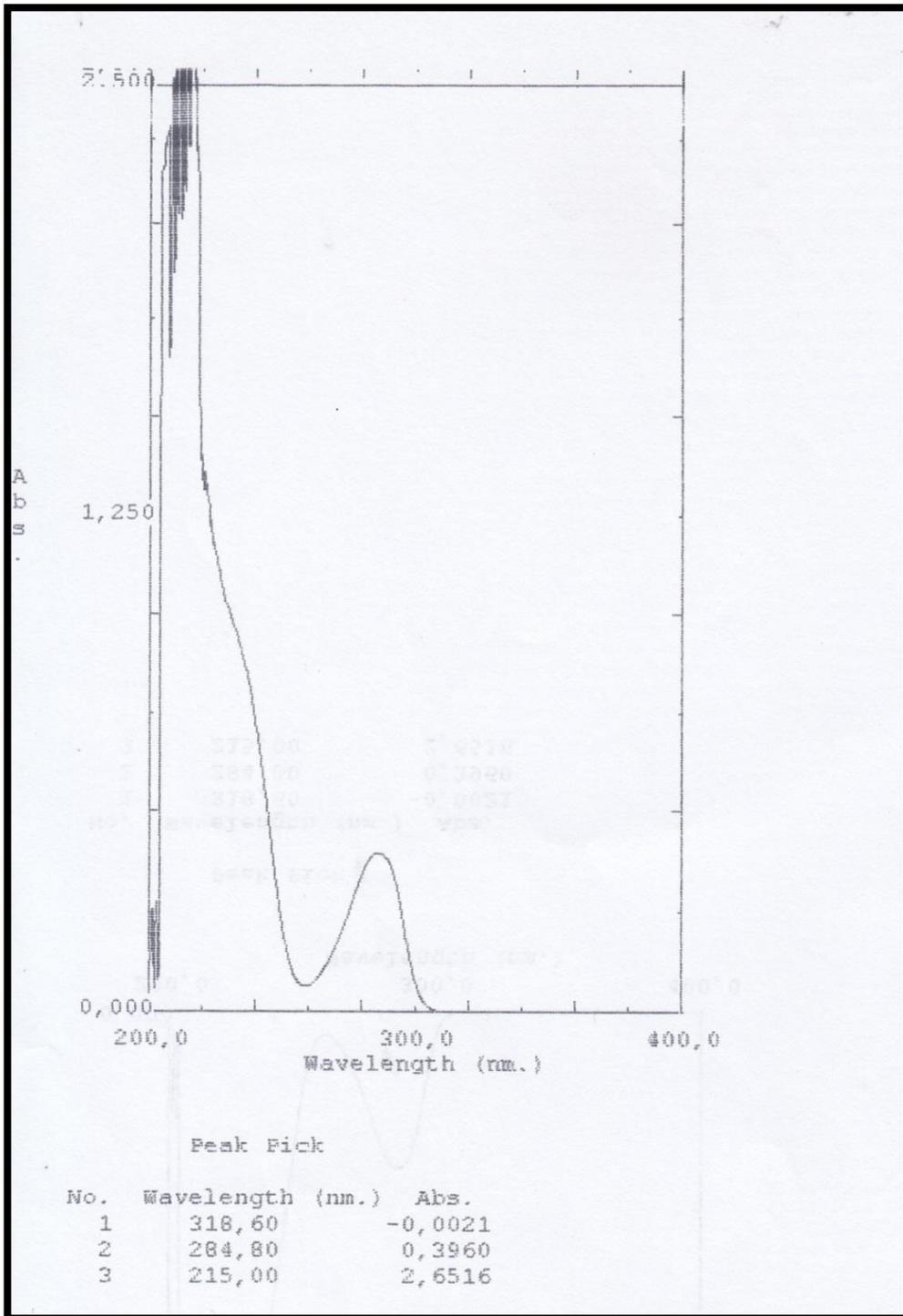
Lampiran 16. Spektrum FT-IR Vanillin Standar



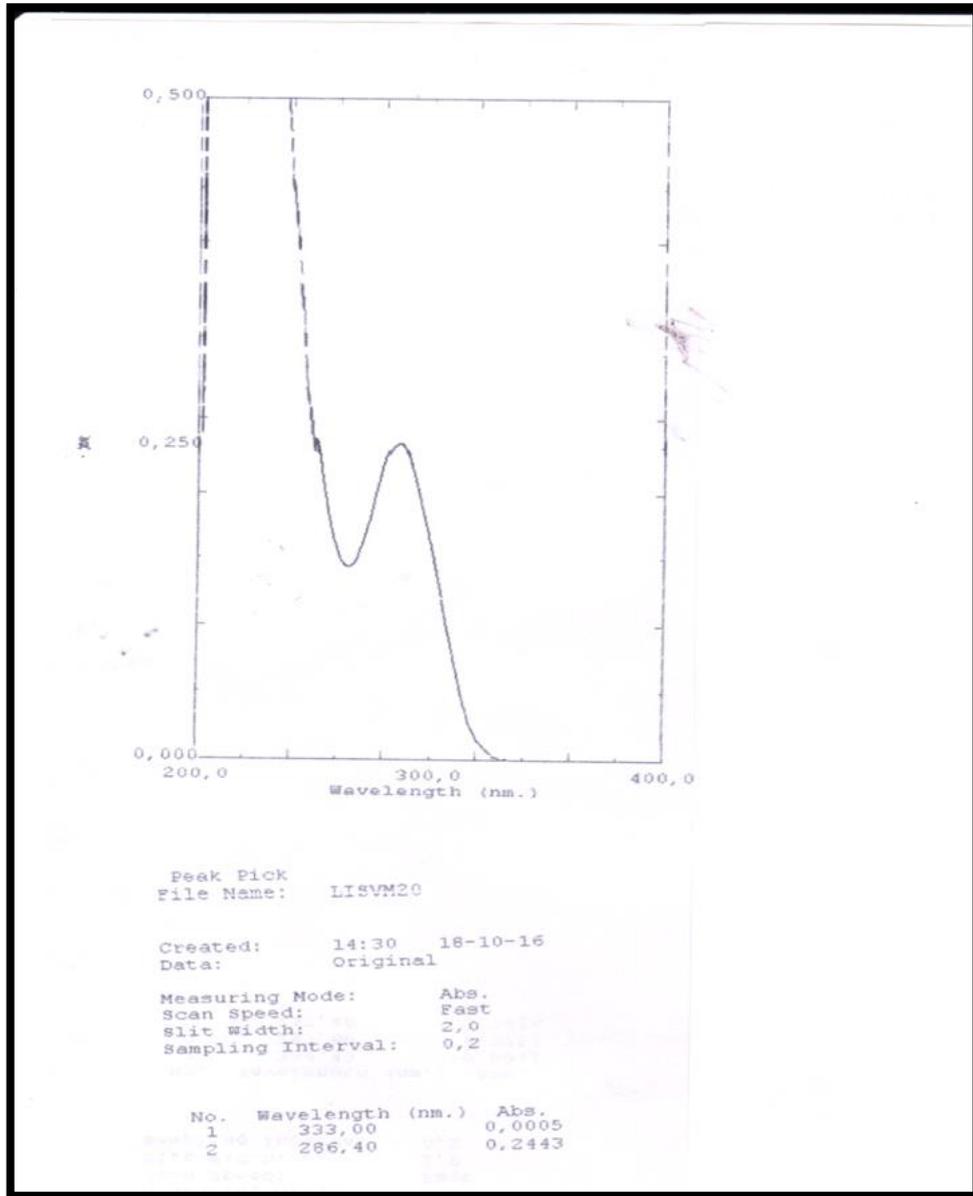
Lampiran 19. Spektrum FT-IR Ester Vanilil Meta-Hidroksibenzoat Hasil Sintesis



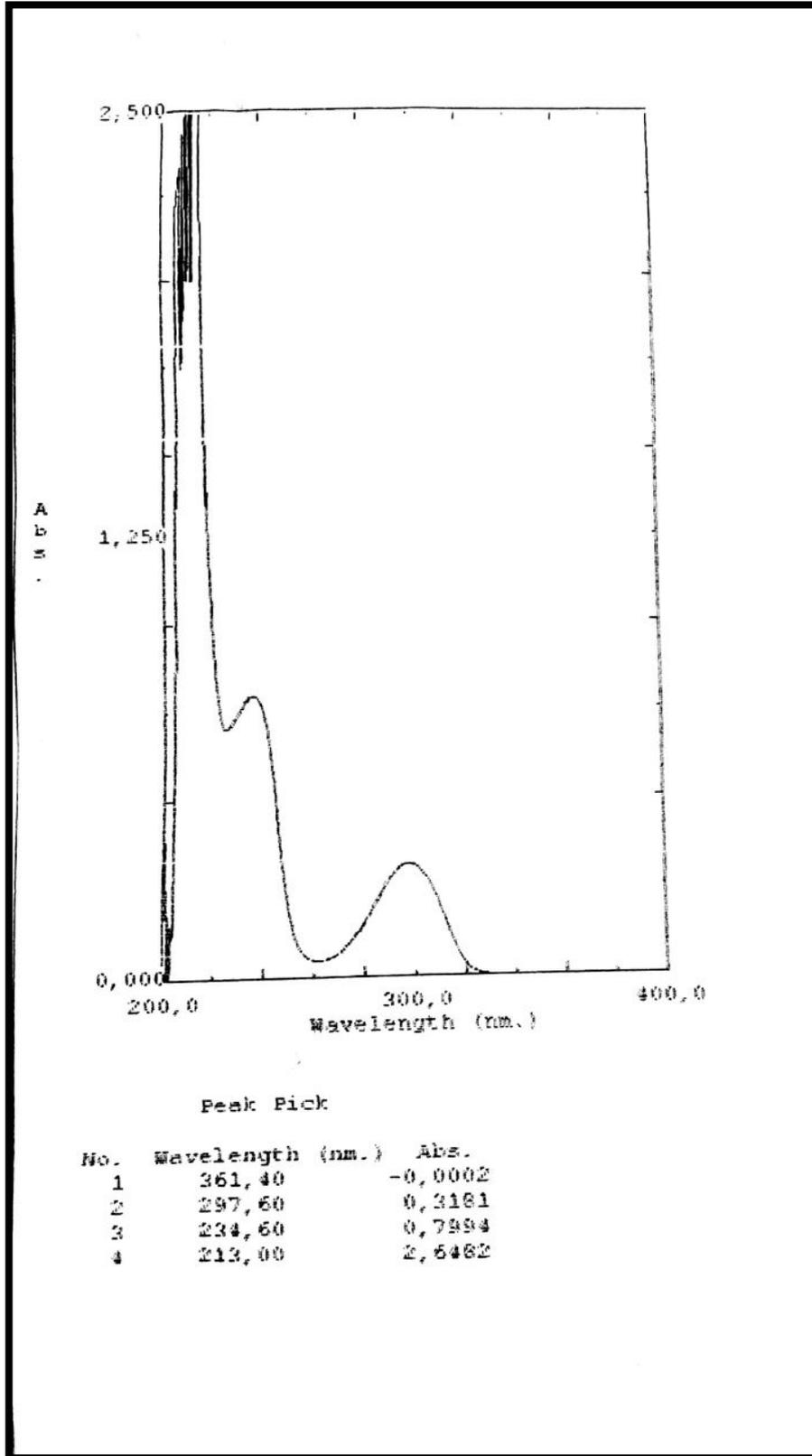
Lampiran 20. Hasil Panjang Gelombang Vanilil Alkohol dengan Pelarut Metanol



Lampiran 21. Hasil Panjang Gelombang Ester Vanilil Meta-Hidroksibenzoat dengan Pelarut Metanol



Lampiran 22. Hasil Panjang Gelombang Asam Meta-Hidroksibenzoat



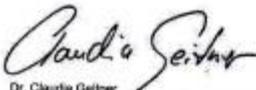
Lampiran 23. Certificate of Analysis N'N-Disikloheksilkarbodiimida

SIGMA-ALDRICH
3870 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
Email USA: techserv@sigma.com Outside USA: eurtechserv@sigma.com

Certificate of Analysis

Product Name: N,N-DICYCLOHEXYLCARBODIIMIDE
Product Number: D80002
Batch Number: BCBK4882V
Brand: Aldrich
CAS Number: 538-75-0
Formula: $C_{12}H_{22}N_2O$
Formula Weight: 206.33
Quality Release Date: 24 JAN 2013
Date retested: 13 JAN 2016

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	WHITE	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER OR CRYSTALLINE CHUNKS OR CRYSTALS	CRYSTALLINE CHUNKS
PURITY (GC AREA %)	≥ 98.5 %	98.5 %
PROTON NMR SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS


Dr. Claudia Geisler
Manager Quality Control
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at sigma-aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Sigma-Aldrich Certificate of Analysis - Product D80002 Lot BCBK4882V Page 1 of 1

Lampiran 24. Certificate of Analysis 4-Dimethylaminopiridine

SIGMA-ALDRICH

sigmaaldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

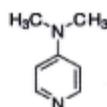
Email USA: techserv@sigal.com

Outside USA: eutechserv@sigal.com

Certificate of Analysis

Product Name: 4-Dimethylaminopyridine - ReagentPlus®, ≥99%

Product Number: 107700
 Batch Number: MKBT6293V
 Brand: ALDRICH
 CAS Number: 1122-58-3
 MDL Number: MFCD00006418
 Formula: C7H10N2
 Formula Weight: 122.17 g/mol
 Quality Release Date: 12 JAN 2015
 Recommended Retest Date: DEC 2017



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White to Off-White	White
Appearance (Form)	Conforms to Requirements	Flakes
Crystalline Powder, Crystalline Flakes, Chips or Granular Powder		
Infrared Spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Purity (Titration by HClO4)	99.0 - 101.0 %	99.6 %
Purity (HPLC)	≥ 99.0 %	99.6 %
Solubility (Turbidity)	Clear to Very Slightly Hazy	Clear
50mg/ml H2O		
Solubility (Color)	Colorless to Very Faint Yellow	Very Faint Yellow
Recommended Retest Period		
3 Years		

Ali Atasi

Ali Atasi, Manager
 Quality Control
 Milwaukee, WI US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Services. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 2

Page 1 of 1

Lampiran 25. Certificate of Analysis Vanillin

SIGMA-ALDRICH

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name: VANILLIN
ReagentPlus, 99 %

Product Number: V1104

Batch Number: BCBQ3211V

Brand: Sigma-Aldrich

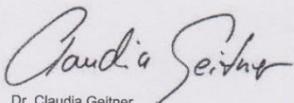
CAS Number: 121-33-5

Formula: 4-(HO)C₆H₃-3-(OCH₃)CHO

Formula Weight: 152.15

Quality Release Date: 17 JUL 2015

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO FAINT YELLOW	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER OR CRYSTALS	POWDER
PURITY (GC AREA %)	≥ 98.5 %	99.97 %
SOLUBILITY (COLOR)	COLORLESS TO VERY FAINT YELLOW	COLORLESS
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLEAR	CLEAR
SOLUBILITY (METHOD)	50MG/ML(5%); ETHANOL	50MG/ML(5%); ETHANOL
CARBON CONTENT	62.2 - 64.1 %	63.2 %
INFRARED SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS
WAVELENGTH (1) (UV)	344 - 350 NM	347.4 NM
MOLAR ABSORBANCY INDEX (1)	≥ 24000	25391
WAVELENGTH (2) (UV)	245 - 251 NM	248.3 NM
MOLAR ABSORBANCY INDEX (2)	≥ 8000	8973
SOLVENT (UV)	0.005G/L; 0.01N NAOH (PH 12.3)	0.005G/L; 0.01N NAOH (PH 12.3)


Dr. Claudia Geitner
Manager Quality Control
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Sigma-Aldrich Certificate of Analysis - Product V1104 Lot BCBQ3211V Page 1 of 1

Lampiran 26. Certificate of Analysis Asam Meta-Hidroksibenzoat

SIGMA-ALDRICH

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name: 3-HYDROXYBENZOIC ACID
ReagentPlus™, 99 %

Product Number: H20008

Batch Number: BCBP5398V

Brand: Aldrich

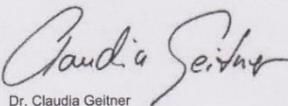
CAS Number: 99-06-9

Formula: $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{H}$

Formula Weight: 138.12

Quality Release Date: 13 FEB 2015

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO OFF WHITE	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER
TITRATION (T) NAOH 0.1M	98.5 - 101.5 %	99.2 %
PURITY (TLC AREA %)	≥ 99 %	99.2 %
SOLUBILITY (COLOR)	COLORLESS	COLORLESS
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLEAR	CLEAR
SOLUBILITY (METHOD)	10 MG/ML IN WATER	10 MG/ML IN WATER
INFRARED SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS


Dr. Claudia Geitner
Manager Quality Control
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Sigma-Aldrich Certificate of Analysis - Product H20008 Lot BCBP5398V Page 1 of 1

Lampiran 27. Certificate of Analysis Etanol Absolut

Certificate of Analysis

1.00983.2500 Ethanol absolute for analysis EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur
Batch K47670583

Cr (Chromium)	≤ 0.000002	%
Cu (Copper)	≤ 0.000002	%
Fe (Iron)	≤ 0.00001	%
Ga (Gallium)	≤ 0.000002	%
In (Indium)	≤ 0.000002	%
Li (Lithium)	≤ 0.000002	%
Mg (Magnesium)	≤ 0.00001	%
Mn (Manganese)	≤ 0.000002	%
Mo (Molybdenum)	≤ 0.000002	%
Ni (Nickel)	≤ 0.000002	%
Pb (Lead)	≤ 0.00001	%
Pt (Platinum)	≤ 0.000002	%
Sb (Antimony)	≤ 0.000002	%
Sn (Tin)	≤ 0.00001	%
Ti (Titanium)	≤ 0.000002	%
Tl (Thallium)	≤ 0.000002	%
V (Vanadium)	≤ 0.000002	%
Zn (Zinc)	≤ 0.00001	%
Zr (Zirconium)	≤ 0.000002	%
Evaporation residue	≤ 0.0005	%
Water	≤ 0,1	%

Date of release (DD.MM.YYYY) 04.03.2016
Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 31.03.2021

Dr. Ute Volkwein
Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

Lanjutan



Certificate of Analysis

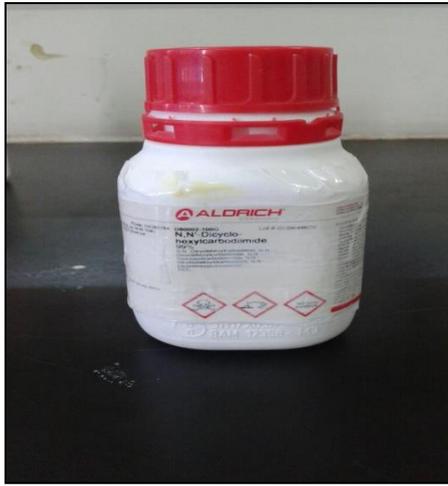
1.00983.2500 Ethanol absolute for analysis EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur
 Batch K47670583

	Batch Values	
Purity (GC)	≥ 99.9	%
Identity (IR)	conforms	
Appearance	conforms	
Colour	≤ 10	Hazen
Solubility in water	conforms	
Acidity or alkalinity	≤ 30	ppm
Titration acid	≤ 0.0002	meq/g
Titration base	≤ 0.0002	meq/g
Density (d 20 °C/20 °C)	0.790 - 0.793	
UV absorption	conforms	
Aldehydes (as Acetaldehyd)	≤ 0.001	%
Fusel oils	conforms	
Substances reducing potassium permanganate (as O)	≤ 0.0002	%
Carbonyl compounds (as CO)	≤ 0.003	%
Readily carbonizable substances	conforms	
Acetone (GC)	≤ 0.001	%
Ethylmethylketone (GC)	≤ 0.02	%
Isoamyl alcohol (GC)	≤ 0.05	%
2-Propanol (GC)	≤ 0.003	%
Higher alcohols (GC)	≤ 0.01	%
Volatile impurities (GC) (Acetaldehyde and Acetal)	≤ 10	ppm
Volatile impurities (GC) (Benzene)	≤ 2	ppm
Volatile impurities (GC) (Methanol)	≤ 100	ppm
Volatile impurities (GC) (Total of other impurities)	≤ 300	ppm
Volatile impurities (GC) (disregard limit)	≤ 9	ppm
Chloride (Cl)	≤ 0.3	ppm
Nitrate (NO ₃)	≤ 0.3	ppm
Phosphate (PO ₄)	≤ 0.3	ppm
Sulphate (SO ₄)	≤ 0.3	ppm
Ag (Silver)	≤ 0.000002	%
Al (Aluminium)	≤ 0.00005	%
As (Arsenic)	≤ 0.000002	%
Au (Gold)	≤ 0.000002	%
Ba (Barium)	≤ 0.00001	%
Be (Beryllium)	≤ 0.000002	%
Bi (Bismuth)	≤ 0.000002	%
Ca (Calcium)	≤ 0.00005	%
Cd (Cadmium)	≤ 0.000005	%
Co (Cobalt)	≤ 0.000002	%

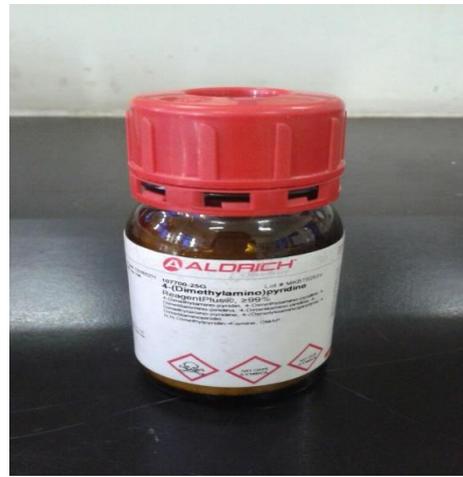
Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany); +49 6151 72-0
 EMD Millipore Corporation - A division of Merck KGaA, Darmstadt, Germany
 290 Concord Road, Billerica, MA 01821, USA, Phone: (978) 715-4321

Page 1 of 2

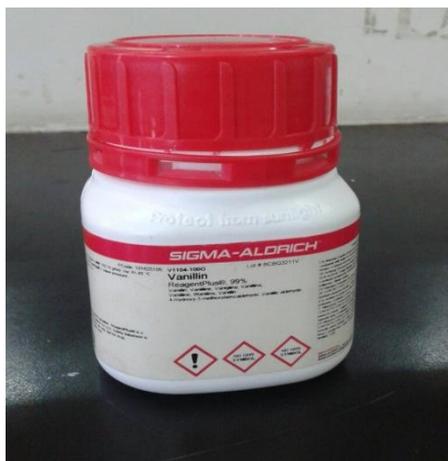
Lampiran 28. Bahan



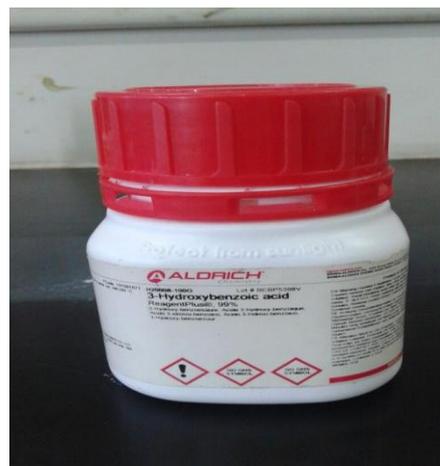
Gambar 15. DCC



Gambar 16. DMAP



Gambar 17. Vanilin

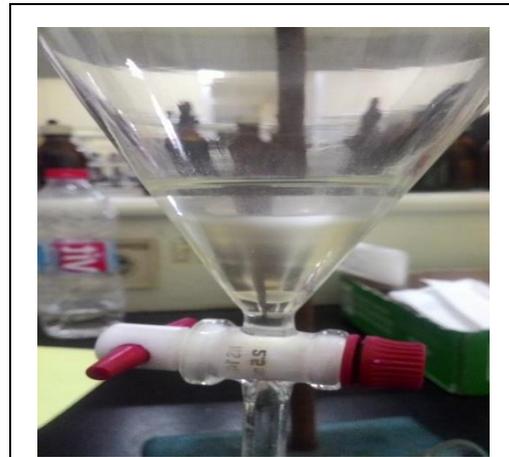


Gambar 18. Asam Meta-Hidroksibenzoat

Lampiran 20. Alat, Proses dan Hasil Penelitian



Gambar 19. Proses Sintesis



Gambar 20. Proses Ekstraksi



Gambar 21. Hasil Reduksi



Gambar 22. Hasil Sintesis



Gambar 23. Alat UV Box



Gambar 24. Alat FT - IR

Lanjutan



Gambar 25. Melting Point Tester



Gambar 26. Proses Reduksi